



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

#### **Analyse des profils d'expression protéique liés aux traits comportementaux d'audace et d'agressivité chez le rivulus des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*) et expression de gènes d'intérêt**

Laurent, Nicolas

*Award date:*  
2019

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Analyse des profils d'expression protéique liés aux traits comportementaux d'audace et d'agressivité chez le rivulus des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*) et expression de gènes d'intérêt

Laurent Nicolas

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



Université de Namur

Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Évolutive

Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology

Promoteur : Frédéric Silvestre

Encadrante journalière : Alessandra Carion

2018 - 2019

## Remerciements

---

Aux termes de ce laborieux travail qu'est un mémoire, je voudrais d'abord remercier mon encadrante Alessandra Carion qui a su m'orienter quand j'étais perdu, me conseiller sur le chemin à suivre et me transmettre ses connaissances autant que possible. Merci pour tout le temps que tu as pu me consacrer et l'éclairage que tu as pu m'apporter.

Merci également à mon promoteur Frédéric Silvestre pour son aide, ses encouragements et les quelques clarifications bien nécessaires quant aux objectifs à poursuivre dans ce travail.

Merci aux différents autres membres de l'URBE qu'ils soient mémorants, doctorants ou chercheurs pour l'aide ponctuelle qu'ils ont pu m'apporter à différentes étapes de mon travail.

Merci à mes amis pour leurs encouragements dans les périodes de doutes et de stress. Et le plus grand des mercis à Jess et ma famille pour leur aide et soutien quotidien.

*« Les gènes contrôlent bien indirectement la fabrication des corps, et cette influence ne va strictement que dans un sens : les caractéristiques acquises ne sont pas héritées. Peu importe la quantité de sagesse et de connaissance que vous pouvez acquérir durant votre vie, vos enfants n'en recevront génétiquement pas la moindre parcelle à la naissance ».*

(R. Dawkins (1976), *The Selfish Gene*, Oxford University Press)

*« La science ne cherche pas à énoncer des vérités éternelles ou de dogmes immuables ; loin de prétendre que chaque étape est définitive et qu'elle a dit son dernier mot, elle cherche à cerner la vérité par approximations successives ».*

(B. Russel (1925), *The ABC of Relativity*, George Allen & Unwin)

## Résumé

La protéomique est une discipline qui a su prendre sa place au sein de la recherche en biologie évolutive en permettant de visualiser, comparer et identifier des milliers de protéines en une seule expérience. Elle permet d'acquérir un aperçu des protéines potentiellement responsables ou associées à des comportements chez des organismes sans pour autant connaître la nature de ces molécules *à priori*. Les objectifs de ce mémoire sont d'une part d'identifier des protéines jouant un rôle dans l'expression des traits comportementaux d'audace et d'agressivité chez l'un des deux seuls vertébrés capables d'autofécondation, le poisson-modèle *Kryptolebias marmoratus* ; et d'autre part de déceler si les niveaux d'audace et d'agressivité influencent le protéome cérébral de ce poisson.

Premièrement, suite à l'établissement de scores résultant de tests comportementaux pour classer les individus dans les continuums d'audace et d'agressivité, 12 poissons hermaphrodites au comportement extrême ont été sélectionnés (N = 3 par extrêmes comportementaux). Bien qu'aucun des individus d'expérience n'ait été exposé à des traitements ou conditions de développement et d'élevage différents, et que la variabilité génétique est presque nulle en raison de la capacité de *K. marmoratus* à produire une descendance isogénique grâce à sa reproduction par autofécondation, une variabilité comportementale individuelle est observée. Une analyse de protéomique quantitative exploratoire sans *à priori* est réalisée sur ces individus par MS/MS "gel-free/label-free". Les données d'abondance relative et les analyses d'enrichissement dévoilent qu'aucune protéine significative n'est partagée entre les poissons audacieux et agressifs, et que peu de protéines significatives sont liées à l'expression de phénotypes comportementaux.

Deuxièmement, quatre protéines liées à l'agressivité (MGLL, IGLON5, SYN3, ATL1) et une protéine liée à l'audace (TLN2), sont sélectionnées sur base des analyses protéomiques et bibliographiques pour étudier l'expression relative de leur gène respectif par RT-qPCR chez 6 individus au comportement extrême (N=3 par extrême agressif). Aucun résultat significatif de l'expression relative de *mgll* et *IgLon5* par rapport au niveau d'agressivité n'apparaît. Les autres protéines n'ont pas pu être étudiées en raison de la faible efficacité et spécificité des primers.

Au-travers de l'analyse des données protéomiques, ce document permet de poser les premières pierres de la voie menant à une étude intégrative des traits comportementaux d'audace et d'agressivité chez *Kryptolebias marmoratus* par ancrage phénotypique.

## Abstract

Proteomics has acquired a particular status in Evolutionary Biology due to its capacity to visualize, compare and identify thousands of proteins in one experiment. This field of study provides a picture of the proteins potentially responsible for or associated with a behavioral response, without requiring any *a priori* knowledge of the nature of these molecules. This master thesis aims to identify proteins involved in boldness and aggressiveness behavioral traits expression utilizing one of the only two vertebrates able of self-fertilization, the fish-model *Kryptolebias marmoratus*. The second goal is to determine if boldness and aggressiveness influence the brain proteome of the fish.

Firstly, 12 hermaphrodites fish depicting extreme behavior according to scores attributed by appropriated behavioral tests have been chosen (N=3 individuals/extreme) for an exploratory quantitative proteomics analysis with MS/MS gel-free/label-free method without *a priori*. Even though there is a minimal environmental variability because all the individuals used in this study have been exposed to a similar rearing environment without any stimuli, and the genetic variability is supposed to be null due to the reproduction method of the *K. marmoratus*, individual behavioral variability has been observed. According to relative abundance data and enrichment analysis, no similar significant protein are found between the bold-related and aggressive-related fish. Also, only a few significant proteins are linked with behavioral phenotypes.

Secondly, 4 proteins linked to aggressiveness (MGLL, IGLON5, SYN3, ATL1) and only one protein linked to boldness (TLN2) are selected based on proteomics results and bibliographic research to study the relative expression of their associated gene with RT-qPCR technique on 6 individuals with extreme behavior (N=3 per aggressive extreme). The analysis did not reveal significant result between *mgll* and *IgLon5* relative expression and aggressiveness response. The other proteins of interest have not been subjected to this analysis due to the low efficiency and specificity of their primers.

With the help of proteomics analysis, this document opening the path leading to an integrative knowledge of boldness and aggressiveness behavioral traits in *Kryptolebias marmoratus* through phenotype anchoring.

## Liste des abréviations

---

ACP : Analyse en composantes principales	HCA : Analyse de clustering hiérarchique
ADN : Acide désoxyribonucléique	HISTH1L : Histone-H1
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	HSP : Paraplégie spastique familiale
AAK1 : AP2-associated protein kinase 1	LEAP : Laboratory of evolutionary and adaptive physiology
ARN : Acide ribonucléique	MGLL : Monoglycéride lipase
ARNdb : Acide ribonucléique double brin	miARN : Micro-Acide ribonucléique
ARNi : Acide ribonucléique interférent	MK- 801 : Dizocilpine
ARNm : Acide ribonucléique messenger	MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
ARNt : Acide ribonucléique de transfert	PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
ATL1 : Atlastine-1	PPFIA3 : Liprine- $\alpha$ -3
BCP : 1-Bromo-3-chloropropane	PSMA2 : Protéasome de type 2
BMP : Bone morphogenetic protein	qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative
CpG : Cytosine-Phosphate-Guanine	RT – qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative précédée d'une transcription inverse
DNMT3 : ADN méthyltransférases 3	SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
DPYL5 : dihydropyrimidinase-related protein 5	SYN3 : Synapsine 3
DPYL2 : dihydropyrimidinase-related protein 2	siARN : Petit acide ribonucléique interférent
E : Variabilité environnementale	TAD : Topologically Associated Domains
FAAH1 : Fatty-acid amide hydrolase 1	TAE : Tris-Acetate electrophoresis buffer
FAAH2 : Fatty-acid amide hydrolase 2	TLN2 : Taline-2
FDR : False Discovery rate	URBE : Unité de recherche en biologie environnementale et évolutive
G : Variabilité génétique	3C : Chromosome Conformation Capture
GxE : Variabilité de l'interaction entre génotype et environnement	
GI : Gene info	
GO : Gene ontology	

## Table des Matières

<b>Remerciements</b>	<b>I</b>
<b>Résumé</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>V</b>
<b>Partie I : Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1) Plasticité phénotypique</b>	<b>1</b>
a) Aspects généraux	1
i) Plasticité comportementale	4
ii) Plasticité comportementale et évolution	5
<b>2) Écologie du comportement</b>	<b>7</b>
a) Généralités sur l'étude du comportement	7
b) L'étude de la personnalité	8
i) Agressivité	11
ii) Audace	11
iii) Syndrome comportemental	12
<b>3) Protéomique</b>	<b>13</b>
a) Généralités	13
b) Protéomique et comportement	15
c) Intérêt de la protéomique dans l'étude de la plasticité phénotypique	16
d) Méthodes utilisées dans les études protéomiques	16
<b>4) Épигénétique</b>	<b>18</b>
a) Généralités et évolution	18
b) Les différents mécanismes épigénétiques	21
c) Intérêt de l'épigénétique dans l'étude de la plasticité phénotypique	21
<b>5) <i>Kryptolebias marmoratus</i> comme modèle d'étude</b>	<b>22</b>

a)	Écologie	22
b)	Cycle de vie – Reproduction	23
c)	Particularités génétiques et épigénétiques	25
d)	Comportement	26
e)	Pourquoi en faire un modèle ?	27
<b>Objectifs</b>		<b>29</b>
<b>Partie II : Matériel et Méthodes</b>		<b>30</b>
1)	<b>Élevage des poissons</b>	<b>30</b>
a)	<b>Test comportementaux</b>	<b>31</b>
i)	Test d'audace	31
ii)	Test d'agressivité	31
b)	<b>Euthanasie des poissons</b>	<b>32</b>
c)	<b>Analyse en composantes principales (ACP)</b>	<b>32</b>
2)	<b>Analyse protéomique</b>	<b>33</b>
a)	<b>Echantillonnage</b>	<b>33</b>
b)	<b>Spectrométrie de masse gel-free/label-free</b>	<b>33</b>
c)	<b>Analyses d'enrichissement</b>	<b>35</b>
i)	Gene Ontology	35
ii)	Volcano Plot	36
iii)	Analyse de Clustering Hiérarchique (HCA)	36
3)	<b>Analyses moléculaires</b>	<b>37</b>
a)	<b>Extraction d'ARN</b>	<b>37</b>
i)	Quantité et contrôle qualité de l'ARN extrait	38
b)	<b>Traitement à la DNase</b>	<b>39</b>
c)	<b>Reverse Transcription (RT) de l'ARN en ADNc</b>	<b>39</b>
d)	<b>Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR)</b>	<b>40</b>
i)	Design et mesure d'efficacité des primers	40
ii)	Amplification des gènes d'intérêt par qPCR	41
iii)	Analyse des résultats qPCR	42

<b>Partie III : Résultats</b>	<b>44</b>
1) <b>Résultats protéomiques</b>	<b>44</b>
a) <b>Tempérament agressif</b>	<b>46</b>
b) <b>Tempérament audacieux</b>	<b>49</b>
2) <b>Gene Ontology</b>	<b>52</b>
a) <b>Aspects généraux</b>	<b>52</b>
b) <b>Analyse par Gene Ontology du trait comportemental d'agressivité</b>	<b>52</b>
c) <b>Analyse par Gene Ontology du trait comportemental d'audace</b>	<b>55</b>
3) <b>Expression relative des gènes d'intérêt par RT-qPCR</b>	<b>58</b>
a) <b>Préparation des échantillons : extraction d'ARN, traitement DNase, transcription inverse (RT)</b>	<b>58</b>
b) <b>Design et efficacité des primers</b>	<b>58</b>
c) <b>Analyse de l'expression des gènes cibles</b>	<b>58</b>
d) <b>Corrélation entre score d'agressivité et expression relative</b>	<b>61</b>
<b>Partie IV : Discussion</b>	<b>62</b>
1) <b>Analyses protéomiques</b>	<b>64</b>
2) <b>Expression relative de gènes d'intérêt par RT-qPCR.</b>	<b>71</b>
<b>Partie V : Perspectives</b>	<b>74</b>
<b>Partie VI : Conclusion</b>	<b>76</b>
<b>Références</b>	<b>78</b>
<b>Annexes</b>	<b>91</b>

## Partie I : Introduction

---

### 1) Plasticité phénotypique

#### a) Aspects généraux

La variabilité dans le règne du vivant est un thème fréquemment discuté au sein de la communauté scientifique, et plus encore depuis la formulation de la théorie de l'évolution par Darwin en 1859. En effet, la variabilité génétique constitue avec le drift génétique<sup>1</sup> le support même de l'évolution des organismes au-travers de l'adaptation perpétuelle que ceux-ci réalisent face à un environnement changeant (Kimura, 1968; Graur and Li, 2000). Dans ce registre, l'étude de la plasticité phénotypique prend tout son sens. Elle constitue un véritable paradigme dans le large spectre des sciences biologiques. En effet, l'écologie, la génétique, l'épigénétique, la protéomique, la physiologie, la morphologie et, comme nous le verrons, le comportement sont toutes des disciplines qui peuvent être abordées au-travers du prisme de la plasticité phénotypique.

La plasticité phénotypique se définit comme la capacité d'un seul génotype à produire de multiples phénotypes suite à des modifications environnementales (Pigliucci, 2001). Bien que d'apparence simple, ce terme a longtemps été sujet à des incompréhensions dans la communauté scientifique en raison du chevauchement entre deux concepts à priori exclusifs : le génotype et l'environnement (Falconer, 1952; Pigliucci, 2005). Le génotype se définit comme étant l'ensemble des gènes d'un organisme. Dans le cas présent, nous le restreignons aux allèles portés pour exprimer un phénotype (Nature Education, 2014). De plus, le type de phénotype concerné par la plasticité phénotypique permet aussi une forme de classification. Ainsi, la morphologie, la détermination du sexe, la physiologie ou encore le comportement peuvent chacun faire preuve de plasticité (West-Eberhard, 2003).

Le phénotype exposé par un organisme résulte de son génotype (G), de l'environnement auquel il est exposé (E) et de l'interaction entre ces deux facteurs (GxE). Une part de hasard attribuée au cours du développement est également sous-entendue dans chacun de ceux-ci

---

<sup>1</sup> Variations aléatoires de la fréquence allélique d'un gène dans une population jusqu'à ce que ces allèles soient soit perdus, soit fixés à un locus particulier. Dans les deux cas, il y a baisse de la diversité génétique dans la population. Le drift génétique peut être vecteur de spéciation lorsqu'une nouvelle population devient génétiquement distincte de sa population d'origine (Nature Education, 2014).

(Fusco and Mineli, 2010; Li *et al.*, 2017). La relation GxE prend tout son sens au regard des performances comparatives entre des génotypes qui varient en fonction de l'environnement. En effet, les performances supérieures d'individus d'une même espèce dans un environnement peuvent être inférieures dans un autre (Li *et al.*, 2017). Par exemple, la capacité des daphnies d'eau douce (*Daphnia spp.*) à développer des appendices dentés en réponse à la présence de prédateurs dans leur environnement lors du développement précoce diminuera la pression de prédation sur elles. Sans ce stimulus au stade développemental, les daphnies n'auraient pas acquis ce trait phénotypique. A l'opposé, l'acquisition de ces appendices sans qu'il n'y ait de pression de prédation dans l'environnement serait une consommation inutile d'énergie nécessaire à d'autres éléments du maintien de la fitness (Barry, 1994; Christjani, Fink and von Elert, 2016).

Pour pouvoir visualiser l'ensemble des phénotypes qu'un seul génotype génère le long d'un gradient environnemental, la norme de réaction est couramment utilisée [Figure 1] (Schlichting and Pigliucci, 1998a; Aubin-Horth, 2009) .

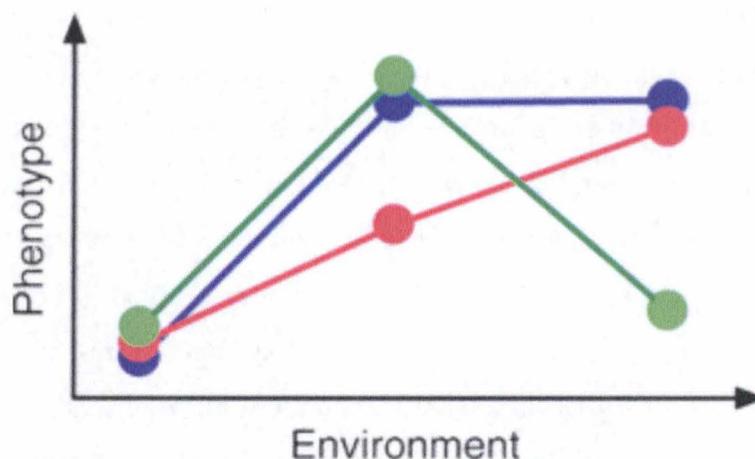


Figure 1. Schéma de norme de réaction pour établir le niveau de plasticité d'un trait. Chaque point illustre la mesure de plasticité d'un génotype soumis à un environnement variable. A chaque couleur correspond un génotype différent. La norme de réaction rouge observe une progression pour chaque condition environnementale. La verte et la bleue présentent un même phénotype pour deux variations environnementales différentes, mais pas pour l'environnement extrême représenté par le point le plus à droite (Aubin-Horth, 2009)

La pente des génotypes, eux-mêmes représentés par les normes de réaction, donne l'expression de la plasticité. Il y a donc plasticité phénotypique si la norme de réaction n'est pas horizontale (Dingemanse *et al.*, 2010).

Le principe même de la plasticité phénotypique nous démontre que des génotypes différents peuvent exprimer des normes de réaction différentes et donc des phénotypes différents même si les conditions auxquelles ils sont exposés sont similaires (Aubin-Horth, 2009). Par ailleurs, pour des individus de lignée identique, un même génotype peut conduire à des phénotypes différents. Ceci sera développé plus loin au-travers de notre animal modèle *Kryptolebias marmoratus*.

A l'échelle des populations, la plasticité phénotypique peut jouer un rôle prépondérant en altérant les phénotypes intra- et interpopulationnels exposés (Schlichting and Pigliucci, 1998b; Aubin-Horth, 2009). En effet, la variance et la moyenne d'un phénotype exprimé au sein d'une population sont des facteurs statistiques qui sont fortement influencés par la plasticité phénotypique. Quand chacun des individus d'une population répond similairement à un signal de l'environnement, il y aura un shift de la moyenne des phénotypes observés vers le nouveau phénotype [Figure 2a)]. Par exemple, chez des poissons de récifs (*Pomacentrus moluccensis*), la réponse comportementale à une augmentation de la température de l'eau de 3°C se traduit par une augmentation de l'agressivité et de l'audace, deux traits comportementaux développés plus loin. Ce shift de comportement, bien qu'il ne se fasse pas avec la même intensité pour chacun des individus, est réel pour chacun dans la population (Biro, Beckmann and Stamps, 2010).

La variance aussi peut évoluer en fonction de la réponse apportée par les individus d'une population. Elle sera réduite quand il y aura une réponse commune de tous les individus de la population [Figure 2b)] et augmentée si chacun des génotypes répond différemment à un même stimulus [Figure 2c)] (Foordyce, 2006).

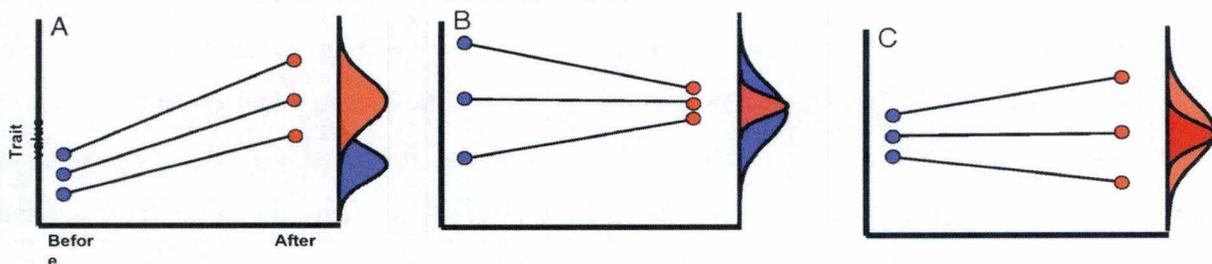


Figure 2. Scénarios des changements de moyenne et/ou de variance d'un phénotype au sein d'une population. En bleu, le phénotype exprimé avant l'interaction avec le stimulus environnemental ; en rouge, le phénotype exprimé après interaction avec le stimulus environnemental. (A) Augmentation de la moyenne et de la variance du trait. (B) Diminution de la variance sans altération de la moyenne. (C) Augmentation de la variance sans altération de la moyenne. Figure modifiée à partir de (Foordyce, 2006)

### i) Plasticité comportementale

Comme l'a avancé Kimura en 1968 dans ce qui est devenu une vision traditionnelle et perfectionnée des mécanismes de l'évolution à l'échelle moléculaire, le taux d'évolution des organismes est déterminé par la combinaison entre le taux de mutations génétiques qui engendrent de la variation et l'intensité de la sélection naturelle sur cette même variation (Kimura, 1968, 1983; Duckworth, 2009). Or, l'interaction des organismes avec l'environnement détermine l'intensité de la sélection. Ainsi, lorsque l'on considère le comportement, ce dernier occupe une place de choix dans l'intensité de la sélection car c'est de celui-ci que de nombreux aspects influençant la vie des individus découle. C'est en effet le comportement qui conditionne le lieu où l'organisme vit, où il se reproduit, sa capacité à obtenir des ressources et à éviter des prédateurs, à répondre à la compétition et à maintenir son homéostasie (Duckworth, 2009).

La détermination de la plasticité d'un comportement peut être mise en évidence par une norme de réaction dite « comportementale ». Elle correspond à l'ensemble des phénotypes comportementaux qu'un individu peut afficher selon l'environnement auquel il est soumis (Dingemanse *et al.*, 2010).

Lorsque l'on étudie la personnalité d'un organisme, c'est-à-dire quand les différences de comportements exprimés par les individus restent constantes peu importe le contexte et la durée, la norme de réaction revêt un intérêt particulier (Réale *et al.*, 2007; Dingemanse *et al.*, 2010). En effet, elle donne l'opportunité d'étudier la sélection naturelle qui s'effectue sur les traits de personnalité, non seulement pour connaître leur plasticité en fonction de l'hétérogénéité environnementale comme le veut une norme de réaction ordinaire, mais aussi en tenant compte du temps passé par les individus dans l'environnement. Par exemple, dans le cas de l'étude du trait de personnalité d'audace du rivulus des mangroves, le temps passé par le poisson dans un environnement nouveau à afficher un comportement exploratoire permet d'estimer la plasticité dans l'audace de l'individu. En effet, un poisson plus audacieux passera plus de temps à explorer son environnement qu'un poisson qui l'est moins. Il s'expose donc à un risque de prédation ou de compétition plus élevé tout en augmentant ses chances de trouver des ressources. La sélection sur un trait de personnalité plastique peut donc varier en fonction du temps passé à l'exprimer (Dingemanse *et al.*, 2010) (Carion *et al.*, 2016).

Plus que les autres types de plasticité affectant d'autres traits comme la morphologie ou la physiologie, la plasticité comportementale implique l'utilisation d'une palette très large de mécanismes comportementaux et des changements physiologiques qui en découlent. Nous

avons par exemple la plasticité neurologique lors de l'apprentissage qui est très énergivore, ou bien l'utilisation de diverses hormones menant à l'expression du comportement (DeWitt, Sih and Wilson, 1998; Mery and Burns, 2010).

## ii) Plasticité comportementale et évolution

Comme abordé précédemment, la variation phénotypique résulte des effets environnementaux, génétiques et de leur interaction. La plasticité a pour objectif de maintenir, voire d'améliorer, la fitness des individus face aux conditions environnementales hétérogènes. Nous parlerons alors de plasticité adaptative. Bien qu'aux premiers abords, ce terme semble décrire un processus au sommet de la capacité évolutive des organismes, il faut tenir compte des coûts inhérents à toute plasticité phénotypique. En effet, pour pouvoir améliorer la fitness des individus d'une population, un trade-off est nécessaire. Celui-ci peut être de nature multiple comme par exemple le coût développemental du trait plastique, son coût de production, son coût de maintien, etc. (Barry, 1994; DeWitt, Sih and Wilson, 1998). La plasticité comportementale engendre elle-même de nombreux coûts, notamment quand elle passe par l'apprentissage des individus. Cela implique que ceux-ci explorent leur milieu, dépensent de l'énergie et fassent des erreurs (Snell-Rood, 2013). Si l'équilibre engendré par le trade-off penche du côté des avantages apportés par la plasticité, alors elle sera adaptative (DeWitt, Sih and Wilson, 1998). Ajoutons que la réponse comportementale à un environnement particulier est plus rapide que, par exemple, dans un cas de plasticité morphologique. Elle peut aussi être réversible. Ces deux facteurs combinés amènent donc à la multiplication des coûts de la plasticité comportementale (DeWitt, Sih and Wilson, 1998; Duckworth, 2009).

Toutefois, dans certains cas, les réponses phénotypiques à des variations environnementales n'améliorent pas la fitness des individus et font pencher la balance du trade-off du côté désavantageux des coûts de la plasticité. Ce bruit environnemental n'est pourtant pas à supprimer mais à tout de même considérer comme une forme de plasticité. Nous parlons alors de plasticité non-adaptative (Fordyce, 2006; Ghalambor *et al.*, 2007; López-Maury, Marguerat and Bähler, 2008).

Quand dans un environnement donné, un phénotype particulier des individus est causé par des effets épigénétiques et facilite la fixation de certaines allèles à un tel point que ceux-ci deviennent exprimés de façon constitutive, après plusieurs générations, s'ils sont adaptatifs alors nous considérons qu'il y a assimilation génétique [Figure 3](West-Eberhard, 2003;

Ledón-Rettig, Richards and Martin, 2012). Par exemple, l'étude de poissons Cichlidés (*Pseudocrenilabrus multicolor*) a révélé de la plasticité morphologique au niveau de la taille de leurs branchies variant en fonction du taux d'oxygénation du milieu dans lequel ils se trouvent. En effet, les populations de poissons vivant dans des eaux avec un faible taux d'oxygène (marais) ont de plus grandes branchies que celles vivant dans des eaux avec un taux d'oxygène plus élevé (lac). Cependant, lorsque les deux populations de la même espèce sont élevées dans des conditions uniformes de laboratoire, bien que la taille des branchies s'adapte à ces conditions, il reste une différence de taille entre les deux populations. Le niveau de plasticité n'est donc pas significativement différent même si une différence de taille des branchies demeure. Il y a donc eu assimilation génétique du trait morphologique plastique depuis la divergence des deux populations (Chapman, Galis and Shinn, 2000; Crispo, 2007).

De l'assimilation génétique, il est nécessaire de distinguer l'accommodation génétique [Figure 3]. Dans le cas de l'assimilation, si l'environnement revient sous sa forme passée, le phénotype des organismes ne reviendra pas sous sa forme précédente car il y aura eu perte de

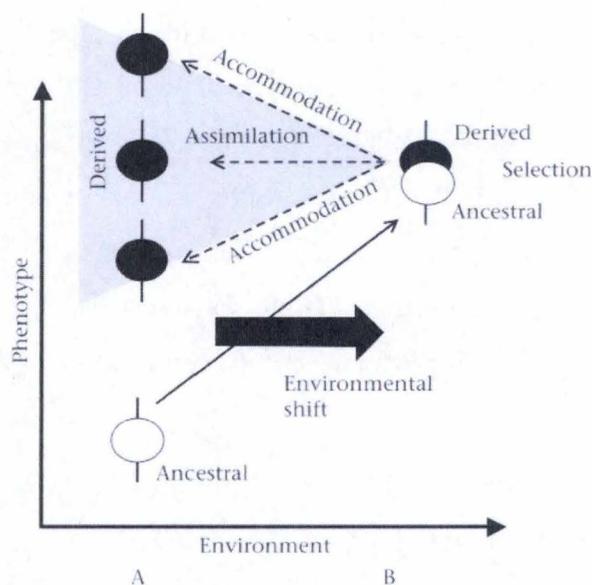


Figure 3. Figure illustrant les concepts d'accommodation et d'assimilation génétique sous forme de normes de réaction. La population ancestrale (cercle ouvert) réside initialement dans un environnement A. Après un shift vers l'environnement B (Flèche solide épaisse), la plasticité mène à l'expression d'un autre phénotype. La norme de réaction (flèche solide fine) représente la plasticité impliquée dans ce shift. Si la population subsiste dans l'environnement B, permettant à la sélection naturelle de jouer son rôle sur la variation génétique nouvelle ou déjà présente, le génotype dérivé (cercle noir) continuera d'exprimer le phénotype dérivé. En raison de cette sélection naturelle, le phénotype produit par le génotype dérivé peut être différent si l'environnement fait un shift retournant vers A. La nouvelle norme de réaction (flèche noire pointillée) révèle alors une plasticité modifiée. Le phénotype alternatif peut soit être fixé sans tenir compte de l'environnement (assimilation génétique), soit être toujours sensible à l'environnement (accommodation génétique). Figure issue de (Renn and Schumer, 2013).

la plasticité. Par conséquent, la fitness pourra diminuer. En ce qui concerne l'accommodation génétique, le phénotype plastique induit par l'environnement est aussi fixé similairement à l'assimilation génétique, mais s'il y a retour à l'environnement ancestral, le phénotype peut

afficher une nouvelle plasticité qui améliorera la fitness ou bien la conservera au même niveau (Crispo, 2007; Aubin-Horth, 2009; Renn and Schumer, 2013; Ehrenreich and Pfennig, 2016). Pour résumer, l'assimilation génétique a donc lieu quand la plasticité est perdue durant l'évolution subséquente tandis que l'accommodation génétique a lieu quand la plasticité d'un trait mène à son évolution.

Comme mentionné dans le paragraphe portant spécifiquement sur la plasticité comportementale, celle-ci a un impact conséquent sur de nombreux aspects de la vie des organismes (reproduction, recherche de nourriture, compétition, évitement de prédateur, etc.). De ce fait, l'intensité de la sélection sur un phénotype comportemental peut être de grande importance et ainsi mener à son évolution. Par exemple, le comportement d'audace d'un individu peut augmenter sa capacité à trouver un partenaire reproducteur ou des ressources et, ce faisant, améliorer sa sélection (Fordyce, 2006; Duckworth, 2009). A ce sujet, le chapitre suivant a pour but d'approfondir nos connaissances sur le comportement, sa définition, ce qu'il implique et plus précisément ce sur quoi ce document porte.

## 2) Écologie du comportement

### a) **Généralités sur l'étude du comportement**

L'éthologie, terme utilisé pour la première fois en 1859 par Isidore Geoffroy Saint Hilaire, est une discipline relativement récente. Il l'a définie comme étant la science des mœurs et du comportement des animaux (Geoffroy Saint-Hilaire, 1859). Bien que le comportement soit un concept dont la signification nous est très instinctive, il est complexe d'y associer les termes appropriés car une définition relève, dans une certaine mesure, d'un choix personnel et des connaissances contemporaines du sujet. Or, l'étude du comportement s'est grandement diversifiée au fil du temps, et notamment en raison de l'ouverture qu'a observé le monde de la recherche ces dernières décennies vers des disciplines étudiant le niveau cellulaire et son influence sur l'écologie. De fait, les disciplines physiologiques, environnementales et psychologiques sont celles qui ont majoritairement poussé à l'évolution de l'étude du comportement (Avital and Jablonka, 2000; Moreno and Muñoz-Delgado, 2007; Levitis, Lidicker and Freund, 2009). Ainsi, pour ce travail, nous choisissons la définition du comportement proposée par Levitis *et al.* en 2009 : « Le comportement est la réponse coordonnée interne d'un organisme vivant entier (individu ou groupe) à des stimuli internes et/ou externes, à l'exclusion des réponses plus facilement comprises comme étant des changements développementaux » (Levitis, Lidicker and Freund, 2009).

Le phénotype comportemental d'un organisme correspond donc à sa réponse face à l'environnement. La sélection naturelle agira dessus non seulement s'il a une influence sur la fitness des individus face à une situation, mais aussi s'il y a de la variation phénotypique entre les individus. La relation, déjà évoquée, démontrant que la variation du phénotype d'un individu dépend de l'effet de l'environnement (E), des effets du génotype (G) et surtout de l'interaction entre ces deux termes (GxE) est donc de première importance pour pouvoir parler de sélection naturelle sur un phénotype comportemental (Falconer, 1990; Réale *et al.*, 2007). De plus, le comportement peut avoir une influence directe importante sur la fitness car c'est en partie de lui que vont dépendre un grand nombre de traits d'histoire de vie et de l'écologie des individus d'une population (Arnold, 1988).

La variation phénotypique entre individus signifie que chacun exprime sa propre réponse comportementale face à une situation donnée. En effet, il est possible de mettre en évidence une variation individuelle se traduisant par de nombreuses différences significatives dans les multiples aspects d'un même comportement. Ceci amène à l'étude de la personnalité, aussi appelée tempérament ou trait comportemental (Réale *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2013; Dosmann and Mateo, 2014).

## **b) L'étude de la personnalité**

Même si, de prime abord, il semblerait que la personnalité<sup>2</sup> soit un terme que l'on ne peut attribuer qu'à l'humain en raison de la subtilité et de la complexité qu'il renferme, il est tout à fait pertinent d'en parler pour tous les animaux, même ceux d'apparence moins complexes tels que les araignées par exemple (Gosling, 2001; Johnson and Sih, 2005; Bell, 2007).

La personnalité a eu de nombreuses définitions depuis les prémices de son étude au début du 20<sup>ème</sup> siècle, mais la plus pertinente est celle fournie par Réale *et al.* Celle-ci nous dit que la personnalité correspond aux différences comportementales individuelles stables à travers le temps et les contextes au sein d'une même espèce (Réale *et al.*, 2007; Nettle and Penke, 2010). Ce nouveau concept dans l'étude du comportement y a entraîné un shift important car les différences comportementales entre individus, qui étaient autrefois considérées comme du bruit, sont désormais devenues un aspect clef de l'étude comportementale des organismes (Wolf and Weissing, 2012). Pour bien cerner cette notion de différences de personnalité dans des populations animales sauvages, voici un exemple académique chez le Crapet Arlequin

---

<sup>2</sup> Trait comportemental, personnalité et tempérament sont des synonymes dans le cadre de ce mémoire.

(*Lepomis macrochirus*), un poisson d'eau douce. Autrefois, cette espèce était considérée uniquement comme prédatrice généraliste capable de prélever sa nourriture autant en pleine eau que sur le littoral. C'est sans compter des études plus récentes qui ont alors démontré qu'il y avait de la variation intraspécifique au niveau comportemental et morphologique. En effet, le comportement de recherche de nourriture, associé au tempérament d'audace sur lequel nous reviendrons plus loin, varie entre certains individus qui restent dans la zone à pleine eau du milieu, d'autres qui restent au littoral et une faible proportion capable d'alterner entre les deux. Par conséquent, ceci témoigne de comportements spécialistes et généralistes au sein d'une même espèce (Sih, Kats and Maurer, 2003). Il y a donc une différence dans la préférence de micro-habitats qui est associée à des différences dans le comportement exploratoire. Ce faisant, il y a aussi une influence sur le régime alimentaire et sur la morphologie des poissons (Werner, Mittelbach and Hall, 1981). Pour mettre en évidence ces différences comportementales, des individus ont été placés dans des conditions stables. Les observations ont alors démontré que si les poissons spécialistes d'un habitat doivent exploiter les ressources d'un autre habitat, ils n'y parviendront pas. A contrario, dans un habitat destiné aux spécialistes, ceux-ci auront plus de succès dans la recherche de nourriture que les généralistes. La réponse des spécialistes est donc limitée (Wilson and Godin, 2009; Wolf and Weissing, 2012).

Cet exemple relève l'importance de l'étude de la personnalité. En effet, il démontre que si différentes personnalités donnent un avantage sélectif aux individus d'une population dans différentes conditions environnementales, alors les variations dans ces traits comportementaux peuvent être maintenues au sein même des populations de cette espèce. Ceci est également valable entre populations (Ledón-Rettig, Richards and Martin, 2012). Les différences de personnalité peuvent donc avoir des conséquences majeures sur les processus écologiques et évolutifs clés comme la sélection naturelle (Wolf and Weissing, 2012). Ceci traduit l'influence que la personnalité peut avoir sur la fitness et de façon plus précise, l'influence que les variations de personnalité d'un individu peuvent avoir sur sa réponse à l'environnement et sur sa fitness (Dall, Houston and McNamara, 2004). Si nous prenons l'exemple du trait d'audace dont nous parlerons plus profondément plus loin, celui-ci permet à l'individu de moduler ses chances de trouver un partenaire en influençant son comportement de dominance face à d'autres individus. Il lui permet aussi de moduler son succès reproducteur en influençant la capacité de dispersion de l'individu et ce faisant augmentant ses chances de trouver un partenaire de reproduction. Finalement, l'audace peut aussi moduler

la survie de l'individu en influençant, par exemple, sa capacité à rechercher de la nourriture [Figure 4] (Réale *et al.*, 2007, 2010; C. N. Toms, Echevarria and Jouandot, 2010).

La personnalité dépend donc de la situation dans laquelle se trouve l'individu (Sih, Bell and J. Chadwick Johnson, 2004; Réale *et al.*, 2010). Or, pour pouvoir comparer les personnalités entre et/ou au sein d'une population, il faut définir à quoi chacun de ces caractères correspond. Voici donc une liste non exhaustive définie par Réale *et al.* des principales catégories de traits comportementaux retrouvés chez les animaux : l'activité, l'exploration, la sociabilité, l'audace et l'agressivité [Figure 4].

L'activité est un trait individuel associé au métabolisme. C'est un trait comportemental à part entière bien qu'il soit fortement associé à l'audace et à l'exploration. Afin de ne pas le biaiser, les mesures pour l'activité sont réalisées dans un environnement qui ne présente aucun risque et qui n'est pas nouveau pour l'individu.

L'exploration correspond à la volonté individuelle d'explorer de nouveaux environnements, sources de nourriture ou objets. Pour le distinguer de l'audace dont ce trait est également très proche, les tests n'utilisent pas de stimuli effrayant ou de prédateur.

La sociabilité est la réaction qu'a un individu face à ses congénères, en faisant abstraction des comportements agressifs (Réale *et al.*, 2007, 2010).

L'agressivité et l'audace sont les deux traits comportementaux sur lesquels porte ce mémoire.

A ce titre, ils feront l'objet d'un paragraphe plus détaillé.

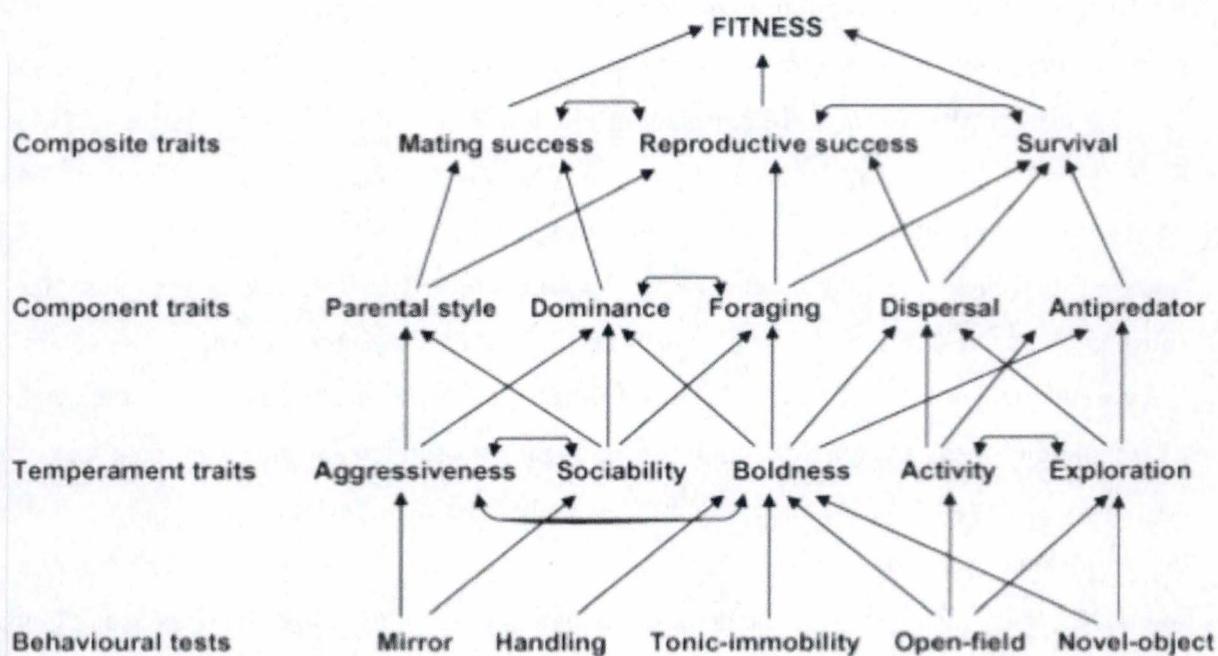


Figure 4. Diagramme illustrant les traits comportementaux, certains tests réalisables pour mesurer leur score et leurs liens avec la fitness. Les flèches ne représentent pas tous les liens possibles entre les variables. Les flèches entre les tests and les traits comportementaux donnent une mesure directe possible. Certains traits mesurés avec un test spécifique pourraient être affectés par d'autres traits. Figure issue de (Réale *et al.*, 2007).

### i) Agressivité

Le trait comportemental d'agressivité correspond à l'ensemble des réactions agonistiques qu'a un individu envers un conspécifique (Huntingford, 1976; Réale *et al.*, 2007). Celles-ci peuvent se présenter dans de multiples situations telles que la compétition pour des ressources ou pour un partenaire, l'acquisition ou la défense d'un territoire, la protection de la descendance et le maintien de la hiérarchie chez les espèces grégaires (Wilson *et al.*, 2009).

Des individus très agressifs et d'autres moins agressifs peuvent tout à fait coexister au sein d'une même population, et face à des environnements similaires (Ruiz-Gomez and Huntingford, 2012). Les variations dans le trait d'agressivité peuvent refléter une réponse adaptative face aux stimuli induits par l'environnement. Par exemple, lors d'une expérience réalisée avec des saumons chinook juvéniles (*Oncorhynchus tshawytscha*), des scientifiques ont voulu tester la dominance entre des poissons issus d'une population sauvage et ayant été acclimatés pendant 6 jours à leur aquarium, et d'autres poissons de la même espèce élevés en pisciculture depuis une génération. Notons bien que la dominance est liée au trait d'agressivité. Les résultats ont démontré que les poissons sauvages sont plus agressifs que ceux d'élevage (Pearsons, Fritts and Scott, 2007). Ces résultats ne vont pas à l'encontre de la définition d'un trait comportemental qui veut que les différences d'agressivité entre individus restent constantes (Réale *et al.*, 2007).

L'expression de l'agressivité par des individus peut entraîner des coûts qui varient selon les contextes. La demande en énergie et la prise de risques peuvent ainsi changer selon l'expression individuelle du trait. De même, l'expression différentielle de ce tempérament selon les contextes permet avant tout d'augmenter la fitness des individus, notamment en améliorant l'accès à la nourriture, le succès reproducteur et les chances de survie (Ruiz-Gomez and Huntingford, 2012). Il y a donc une forme de trade-off dans l'expression d'un trait comportemental comme l'agressivité (Adams *et al.*, 1998).

Les mesures réalisées pour évaluer les scores d'agressivité se font au-travers de tests standardisés évaluant la tendance d'un individu à attaquer un congénère (morsures, postures d'attaque)(Hand, 1986; Earley, Hsu and Wolf, 2000).

### ii) Audace

L'audace est la tendance d'un individu à prendre des risques (Sloan Wilson *et al.*, 1994; Réale *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 2011). De même que le comportement d'agressivité peut s'observer sur un continuum moins agressif/plus agressif chez les individus d'une espèce,

l'audace varie selon un continuum timide/audacieux (Benhaïm *et al.*, 2016). La tendance générale démontre que les individus les plus audacieux ont un meilleur succès reproducteur que les individus timides mais que leur espérance de vie est réduite (Smith and Blumstein, 2008). Les individus timides vivront donc plus longtemps malgré un succès reproducteur diminué à court-terme. Par conséquent, la moyenne de fitness des individus, peu importe le niveau d'audace exprimé, restera en moyenne la même dans un environnement stable (Smith and Blumstein, 2008; Stamps and Groothuis, 2010). Ceci rejoint la notion de trade-off évoquée au paragraphe précédent.

De nombreux tests sont utilisés pour mesurer l'audace. En effet, la définition de ce trait de personnalité n'a pas fait l'objet d'un consensus pendant longtemps, entraînant alors une multitude de tests différents dont chacun est destiné à évaluer différents aspects de ce trait (Fraser *et al.*, 2001; Frost *et al.*, 2007; C. Toms, Echevarria and Jouandot, 2010). Celui utilisé dans le cadre de cette étude est celui de l'émergence. C'est un test qui consiste à acclimater des individus dans un abri et leur offrir la possibilité d'explorer un nouvel environnement. Plusieurs variables telles que le temps de latence avant de sortir de l'abri et le temps passé à explorer le nouveau milieu sont alors mesurés (Sneddon, 2003; Burns, 2008)

### iii) Syndrome comportemental

Un syndrome comportemental se définit comme étant un ensemble de comportements qui sont corrélés au-travers de plusieurs observations (Sih, Bell and J Chadwick Johnson, 2004). L'un des syndromes les plus connus et étudiés est celui d'audace-agressivité. Ceci signifie que les animaux les plus agressifs vis-à-vis de leurs congénères sont aussi ceux qui sont les plus audacieux face à un environnement nouveau et/ou stressant (Sih, Bell and J Chadwick Johnson, 2004; Lee and Berejikian, 2008). Les syndromes comportementaux revêtent une importance majeure dans l'étude des traits de personnalité car ils y imposent des limites. En effet, si, par exemple, deux comportements sont liés par un mécanisme physiologique sous-jacent, alors ces deux comportements ne peuvent pas être modifiés indépendamment l'un de l'autre (Bell and Stamps, 2004). De plus, un syndrome comportemental peut avoir d'autres conséquences négatives sur la fitness des individus. De fait, pour ce qui est du syndrome audace-agressivité, les individus très audacieux et très agressifs sont désavantagés car moins flexibles que les individus timides lors de la réponse à un nouvel environnement. Leur réponse comportementale est en effet saturée pour des niveaux d'audace et d'agressivité élevés et donc la variabilité comportementale en est elle-même réduite (Benhaïm *et al.*, 2016).

Les individus timides, eux, ont une plus grande souplesse comportementale et répondent mieux aux variations environnementales car ils ont tendance à éviter les risques et la nouveauté (Sneddon, 2003; Silvestre *et al.*, 2010).

De multiples études ont mis à jour la présence de syndromes comportementaux chez les animaux tels que les mammifères, oiseaux et poissons (Benus *et al.*, 1991; Sih, Bell and J Chadwick Johnson, 2004; Huntingford and Adams, 2005; Wilson and Godin, 2009). Cependant, en ce qui concerne le rivulus des mangroves adulte, les travaux réalisés précédemment au Laboratoire de physiologie adaptative et évolutive (LEAP) à l'Université de Namur n'ont pas permis à ce jour de dévoiler de syndrome comportemental audace-agressivité (Carion *et al.*, 2016). Cependant, celui-ci n'est pas à mettre de côté définitivement car il peut être présent à un autre stade de vie du poisson.

### 3) Protéomique

#### a) Généralités

Depuis bientôt 20 ans, le monde de la recherche en biologie est entré dans une nouvelle ère avec l'utilisation de techniques permettant une approche plus intégrative du vivant. Dans un premier temps, l'étude des organismes au-travers de la génétique a permis une compréhension plus profonde et détaillée des systèmes qui les composent. Ceci a peu à peu fait place à une approche permettant d'appréhender l'ensemble du vivant dans toute sa complexité et en utilisant les méthodes les moins restrictives possibles. Ces dernières sont caractérisées par des techniques dites "à haut débit" permettant une analyse simultanée de nombreuses variables.

Ces méthodes sont celles de l'« -omique ». Parce que le paradigme de la biologie moléculaire repose sur le principe qu'un flux d'informations génétiques permet de comprendre et d'expliquer le vivant, les disciplines de base de l'omique étudient le processus biologique depuis l'expression de gènes jusqu'à la synthèse de protéines en passant par la transcription et la traduction du transcrit. Ainsi, la génomique, la transcriptomique et la protéomique sont les pierres angulaires de l'étude "omique" mais d'autres disciplines telles que la métabolomique ou l'épigénomique se sont rapidement développées par la suite.

L'ancrage phénotypique (« phenotype anchoring ») est défini comme étant le lien qui existe entre les réponses moléculaires (transcrits, protéines, métabolites) à des changements de phénotypes observés dans un individu ou une population.

L'étude d'un phénotype moléculaire par ancrage phénotypique, donc au-travers de l'ensemble des disciplines de l'omique permet une compréhension détaillée de sa formation, depuis la régulation de son expression génique jusqu'au produit protéique final (Schirmer *et al.*, 2010; Silvestre, Gillardin and Dorts, 2012).

La génomique consiste en l'étude du génome, soit l'ensemble du matériel génétique, son produit et son évolution.

Dans le cadre de ce mémoire, notre intérêt porte sur l'étude protéomique du cerveau du rivulus des mangroves selon les traits comportementaux d'audace et d'agressivité qu'ils affichent.

Les protéines ont souvent un rôle de médiateur du comportement. Un comportement spécifique peut entraîner un changement spécifique dans l'expression de certaines protéines et inversement. Toute adaptation d'un organisme vivant dépend du langage de l'ADN au-travers des nucléotides A, C, G et T. Cependant, la sélection naturelle agit essentiellement sur les phénotypes plutôt que sur les gènes. A ce titre, les protéines ont non seulement une plus grande proximité avec les phénotypes que les gènes ou que les éléments transcrits du génome mais elles sont aussi responsables de l'expression de ces phénotypes.

L'opportunité d'étudier des phénotypes à partir des protéines, et donc par la protéomique, permet une approche plus proximale des mécanismes sous-jacents aux phénotypes tels que les comportements.

La protéomique étudie le protéome d'un tissu ou organe à un moment donné dans le temps. Le terme protéome, introduit pour la première fois en 1994 par Wilkins *et al.*, désigne toutes les protéines exprimées par le génome (Wilkins *et al.*, 1996; Baggerman *et al.*, 2005). C'est donc un terme décrivant la structure, la fonction et l'expression de toutes ces protéines.

A la définition de protéomique, il est nécessaire d'ajouter une notion de temporalité. En effet, les protéines exprimées par un organisme varient en fonction du temps selon les besoins de l'organisme. De ce fait, un génome unique, donc statique, mène à l'expression de plusieurs protéomes changeant constamment. Par exemple chez les Lépidoptères, selon leur stade de vie (chenille ou papillon), les protéines retrouvées seront différentes en réponse aux stimuli externes et internes bien que l'ADN retrouvé dans chacune des cellules somatiques est le même. Ceci marque l'une des différences majeures entre génome et protéome. La protéomique correspond donc à une vision ponctuelle des protéines présentes dans un tissu d'organisme sous une certaines condition.

A ce même titre, protéomique et transcriptomique sont aussi deux disciplines bien distinctes. La transcriptomique consiste en l'étude du transcriptome, soit l'étude de l'ensemble des ARNm synthétisés dans les cellules suite à la transcription de gènes dans un organisme. Cependant, le transcriptome ne représente que le faible pourcentage (5% chez les humains) de gènes transcrits en ARNm (Frith, Pheasant and Mattick, 2005). Tous les ARNm ne sont pas non plus traduits en protéines et, pour que nombreuses de ces dernières soit biologiquement actives, elles nécessitent notamment des étapes de modification post-traductionnelles (protéolyse, glycosylation, acylation, désamination, phosphorylation, etc.). Il n'y a donc pas de relation de proportionnalité et de synchronisation entre quantité de protéines exprimée et quantité d'ARN.

Une étude de 2002 portant sur la corrélation entre quantité de protéines et d'ARNm exprimés dans un type de cancer du poumon chez les humains illustre ceci : sur les 165 spot protéiques étudiés, seuls 17% (28 spots) démontrent une corrélation significative entre protéines et ARNm exprimés (Chen *et al.*, 2002).

Finalement, le niveau d'expression des protéines dépend de multiples paramètres opérant à différents stades du continuum translation-traduction : le taux d'expression de gènes, l'exportation de l'ARNm hors du noyau, de la stabilité du transcrit, de la régulation de la traduction et de la dégradation de la protéine.

### **b) Protéomique et comportement**

Au même titre que n'importe quel autre type de phénotype, l'expression d'un phénotype comportemental repose sur un phénotype moléculaire. En effet, l'expression d'un phénotype comportemental est liée à des modifications physiologiques. Par exemple, d'après de multiples études, la réponse physiologique générale des organismes face à un stress se traduit par une augmentation de la production d'adrénaline et une diminution du niveau de glucocorticoïdes (Ruiz-Gomez *et al.*, 2011; Thörnqvist *et al.*, 2015). Par conséquent, des changements dans les profils d'expression protéiques ont un effet direct sur la physiologie et la fitness des organismes. Le protéome peut donc être considéré comme un phénotype moléculaire en tant que tel.

La protéomique est majoritairement utilisée pour étudier la réponse phénotypique moléculaire des organismes face à un changement environnemental tel qu'un polluant. Néanmoins, elle n'en est pas moins utile dans d'autres contextes.

Comme expliqué précédemment, il est possible de déterminer la personnalité d'un organisme au-travers de tests mesurant les phénotypes comportementaux correspondant à celle-ci. Or comme tout phénotype, les phénotypes comportementaux reposent sur un ensemble de profils moléculaires, donc protéiques. Pour un phénotype comportemental lié à la personnalité d'un organisme vivant et qui varie entre plusieurs individus d'une même espèce voire population, il y a une variation dans les profils protéiques. Ainsi, en cherchant les différences entre phénotype moléculaires entre plusieurs individus, il est possible d'expliquer les différences entre comportements. C'est dans ce contexte que se réalise le présent mémoire.

### **c) Intérêt de la protéomique dans l'étude de la plasticité phénotypique**

Selon la définition même de la plasticité phénotypique, un même génotype peut conduire à des phénotypes différents. Or le profil d'expression protéique d'un organisme vivant correspond au phénotype moléculaire de celui-ci. La norme de réaction, décrite précédemment, peut donc s'appliquer au contexte de la protéomique. La plasticité protéomique est donc le pattern d'expression protéique entre génotypes différents exposés à des conditions différentes (Silvestre, Gillardin and Dorts, 2012). Par exemple, deux écotypes RB et SU de l'escargot marin *Littorina saxatilis* résistent à des stress différents (dessiccation et température pour RB et perturbations physiques pour SU). Par ailleurs, ces écotypes vivent en sympatrie. Ceci traduit de la plasticité phénotypique. Ainsi, une analyse protéomique a révélé que 7% des spots protéiques étudiés ont une expression différentielle entre les deux écotypes (Martínez-Fernández *et al.*, 2008). Au travers de cet exemple, le lien entre phénotype, protéines et fitness est exprimé.

Comme la valeur évolutive de la plasticité phénotypique n'est plus à démontrer (Pigliucci, 2001; Callahan, Maughan and Steiner, 2008; Chevin and Lande, 2011; Wund, 2012; Stephen C. Stearns, 2014), la plasticité protéomique constitue un argument important en faveur de l'étude de la protéomique dans le cadre de la biologie évolutive.

### **d) Méthodes utilisées dans les études protéomiques**

L'apparition de la protéomique repose notamment sur le développement technologique. Les banques de données ont été enrichies grâce au séquençage complet de génome ; aux outils tels que les spectromètres de masse et méthodes de gels d'électrophorèse grandement perfectionnés ; et aux outils bio-informatiques qui se sont profondément améliorés et développés permettant une analyse plus complète de large jeux de données.

De manière générale, nous pouvons distinguer deux types de protocoles en protéomique. Ceux utilisant des gels d'électrophorèse (2D ou 3D) pour la séparation des protéines et ceux n'en utilisant pas (« gel-free »). En effet, les échantillons biologiques sont complexes et composés de nombreux éléments. Il est donc nécessaire de réduire cette complexité en isolant les protéines du reste, et ensuite en séparant les protéines d'intérêt des autres.

La séparation des protéines est rendue possible en utilisant des gels d'électrophorèse (1D ou 2D) ou non (gel-free). Souvent, quand une méthode utilisant un gel est employée, ce dernier consiste en un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) et ensuite une séparation des protéines dite à deux dimensions (2D). Les protéines sont d'abord séparées sur base de leur point isoélectrique (1<sup>ère</sup> dimension) et ensuite sur base de leur masse moléculaire comme dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE classique (2<sup>ème</sup> dimension). Ainsi, les protéines se retrouvent ségréguées dans le gel en spots de protéines partageant un point isoélectrique et une masse proches. Les protéines d'intérêt sont ensuite excisées du gel pour être identifiées par spectrométrie de masse. Dans les gels 1D, les protéines sont simplement séparées sur base de leur masse moléculaire. La résolution obtenue est donc moindre que pour les gels 2D.

Bien que de nombreuses études protéomiques utilisent l'approche des gels 2D, celle-ci est techniquement limitée. En effet, selon le type de tissus étudié, un gel 2D typique ne permet de détecter que 37% du protéome en raison des caractéristiques physico-chimiques des protéines (charges, hydrophobicité, masse moléculaire) et de la résolution limitée pour les protéines en faible concentration. En réponse à ceci, la méthode gel-free a été développée.

Comme son nom l'indique, cette méthode n'utilise plus de gels mais la chromatographie capillaire en phase liquide couplée avec la spectrométrie de masse pour séparer et identifier les protéines. Premièrement, suite à une digestion via une enzyme protéolytique, les protéines sont clivées en peptides. La raison en est que les peptides sont plus facilement séparés par chromatographie liquide. Suite à cette séparation, les peptides sont soumis à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour déterminer et identifier les protéines initialement retrouvées dans le tissu étudié (Baggerman *et al.*, 2005).

La protéomique quantitative consiste à déterminer la quantité de protéines contenues dans un échantillon biologique. La spectrométrie de masse, en plus de pouvoir identifier les protéines, permet aussi de déterminer leur quantité relative entre deux ou plusieurs échantillons. Il existe deux catégories de méthode pour faire cela. Premièrement, la méthode

utilisant des isotopes stables afin de labelliser les protéines ou peptides pour permettre au spectromètre de masse de distinguer les protéines identiques entre plusieurs échantillons. De fait, l'ajout d'un isotope stable de masse connue va augmenter la masse totale des protéines ou peptides et ainsi mener à leur identification (pour plus de détails cfr. (Chahrour, Cobice and Malone, 2015)).

Deuxièmement, la méthode dite "label-free" qui n'utilise pas d'isotopes stables pour identifier les protéines. Suite à la digestion des protéines en peptides à l'aide d'une enzyme protéolytique (étape déjà réalisée avec la méthode gel-free), ces derniers sont analysés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et ensuite les protéines sont identifiées et quantifiées. La différence majeure avec l'approche utilisant des labels est qu'au cours de cette dernière les différents échantillons de protéines sont combinés après l'étape de labélisation et ce pool est analysé par une seule étape de spectrométrie de masse. Par contre, avec la méthode label-free, chaque échantillon est préparé séparément et ensuite individuellement soumis à la spectrométrie de masse (Zhu, Smith and Huang, 2010).

#### 4) Épigénétique

##### a) **Généralités et évolution**

Depuis l'avènement de la théorie de l'évolution avec Darwin en 1859, la recherche scientifique n'a cessé d'y apporter de nouvelles dimensions et détails toujours plus précis pour en faire ce qui constitue aujourd'hui un domaine inextricablement lié à toutes études biologiques. De même que Newton n'a pas inventé la gravitation universelle le jour où une pomme serait tombée sur sa tête, Darwin n'a pas inventé l'évolution le jour où il en a formulé l'illustre théorie. Celle-ci, bien que ses fondements soient ancrés, reste dynamique et incite les chercheurs à de nouvelles découvertes chaque jour. La science ne connaît pas de route à sens unique. Ainsi le domaine de l'épigénétique, introduit en 1942 par Waddington sous le terme « Epigenotype », constitue une nouvelle voie explorée un peu plus chaque jour sur cette autoroute qu'est la théorie de l'évolution (Waddington, 2012).

L'étude de l'épigénétique permet de jeter un pont entre phénotype et génotype car elle se définit comme étant l'étude de changements héréditaires dans l'expression des gènes sans que ces derniers ne modifient la structure même de l'ADN (Goldberg, Allis and Bernstein, 2007; Bollati and Baccarelli, 2010). Cette définition générale permet non seulement de saisir les concepts prépondérants de l'épigénétique mais aussi d'y distinguer une dichotomie reflétant les intérêts des scientifiques dans leurs recherches respectives. Ainsi, l'épigénétique

intragénérationnelle s'applique à l'étude des modifications de gènes par des marques épigénétiques qui peuvent potentiellement entraîner l'expression de phénotypes différents au cours de la vie d'un individu. L'épigénétique transgénérationnelle, quant à elle, étudie la transmission des marques épigénétiques comme la méthylation de l'ADN depuis la génération parentale sans qu'il n'y ait de changement dans les gènes des individus parents et descendants (Burggren, 2016). En effet, en plus d'être stables au cours de la mitose, les marques épigénétiques sont stables au cours de la méiose sous certaines conditions. Ceci signifie qu'elles peuvent être transmises à la génération suivante (méiose) en plus d'être transmises aux cellules-filles (mitose) (Skinner, 2011).

Les marques épigénétiques peuvent être le résultat de mécanismes capables de modifier l'expression des gènes en fonction des influences extérieures (Bollati and Baccarelli, 2010; Tammen, Friso and Choi, 2013). Nous comprenons donc l'intérêt de l'épigénétique dans le cadre de l'évolution des organismes car l'expression d'un phénotype peut alors dépendre de variables externes, biotiques ou non. De cette façon, l'adaptation des organismes à un environnement fluctuant est beaucoup plus rapide via l'épigénétique qu'au-travers du spectre des modifications génétiques. Par exemple, chez l'épinoche, seul le père prend soin des nouveau-nés. Selon la qualité de ces soins, cela peut modifier le comportement d'anxiété, et donc la fitness de sa descendance par la production de *Dnmt3* (DNA methyltransférase), une enzyme fortement impliquée dans le processus de méthylation de l'ADN (Mcghee and Bell, 2014). La modification directe du génome pour obtenir une adaptation efficace face au stress engendré par l'environnement n'aurait pas pu être réalisée sur un délai aussi court qu'est une génération et de façon aussi spécifique sur le trait phénotypique d'intérêt.

L'épigénétique est donc considérée comme une actrice majeure dans les processus micro-évolutifs des individus d'une population. En effet, certaines modifications épigénétiques peuvent être transmises aux futures générations, bien que cela soit mieux documenté chez certains taxa comme les nématodes plutôt que chez les vertébrés (Chong and Whitelaw, 2004; Remy, 2010; Heard and Martienssen, 2014). Grâce à cette héritabilité épigénétique capable d'engendrer de la variabilité phénotypique selon les conditions environnementales, et par extension l'amélioration de la fitness des individus, les mécanismes de l'évolution ont un nouveau support autre que les variations génétiques pour s'appliquer (Anway *et al.*, 2005). De plus, comme l'environnement est responsable de stimuli menant à des processus de modification épigénétique, les interactions écologiques entre les individus peuvent donc amener à une réponse adaptative plus rapide au-travers du spectre de l'épigénétique plutôt que

via celui des modifications génétiques (Bossdorf, Richards and Pigliucci, 2008). Comme l'illustre la Figure 5, ceci dépend également des contextes, un phénotype peut être avantageux ou non selon les conditions environnementales dans lesquelles il apparaît.

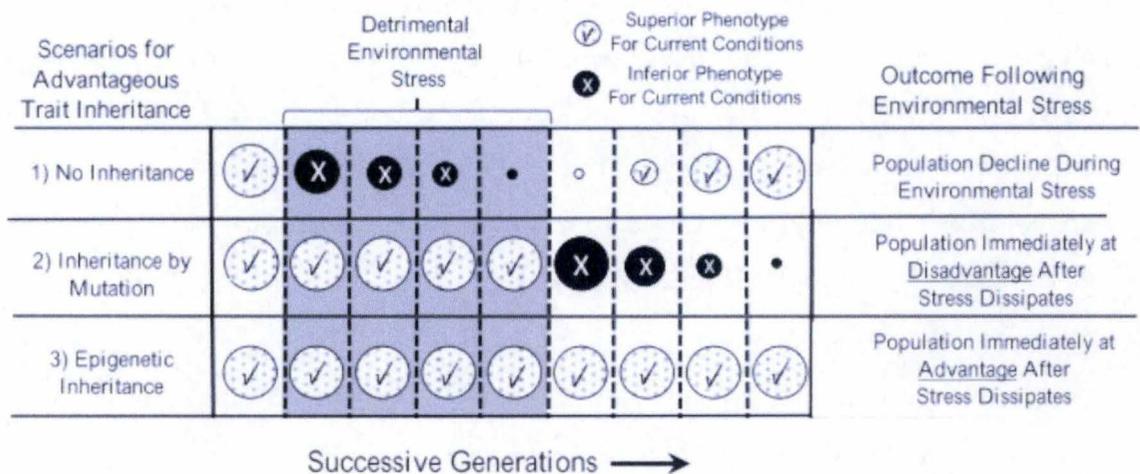


Figure 5. Avantages ou désavantages que peut amener l'héritabilité de traits phénotypiques avantageux dans certaines conditions environnementales au-travers des mécanismes épigénétiques ou génétiques pour une population sur une série de générations. Chaque cercle représente une population dont la densité fluctue au fil des générations. Au début de chaque scénario, chaque population possède un même phénotype avantageux dans un environnement exempt de stress. 1) Scénario sans transmission du trait avantageux à la prochaine génération ; 2) Scénario avec transmission du trait avantageux par le mécanisme génétique de la mutation ; 3) Scénario avec transmission du trait avantageux.

Notons aussi que les modifications épigénétiques permettent de créer de la variabilité phénotypique chez les organismes qui se reproduisent par autofécondation ou qui sont asexués afin que ceux-ci puissent s'adapter à leur environnement (Ellison *et al.*, 2015). Ceci justifie en partie l'intérêt de *Kryptolebias marmoratus* pour l'étude épigénétique.

Finalement, l'épigénétique transgénérationnelle remet aussi la question du lamarckisme sur la table des débats de la communauté scientifique. En effet, la théorie de Lamarck, prédécesseur de Darwin, soutenait qu'il est possible que l'environnement altère directement le phénotype de manière héritable. C'est la transmission directe de caractères acquis (Lamarck, 1802; Penny, 2015). Cette vision a été rapidement délaissée par la communauté scientifique préférant celle de Darwin qui n'excluait pourtant pas tout à fait la vision de son collègue. En effet, la majorité des modèles en biologie évolutive soutient que les mutations aléatoires de l'ADN sont le support primaire de la variation phénotypique héritable. Or, les marques épigénétiques transgénérationnelles et acquises directement par l'influence environnementale forment un obstacle à ceci. De fait, elles démontrent qu'il y a un mécanisme moléculaire capable de traduire l'influence environnementale directement sur le phénotype et même sur le génotype sur une seule génération. Ajoutons aussi que ces modifications sont héritable (Lamarck, 1802; Laland *et al.*, 2014; Penny, 2015; Skinner, 2015). Ces constats ont donné

naissance au néo-lamarckisme qui s'intègre tout à fait dans la théorie de l'évolution moléculaire moderne. Cependant, celui-ci est à considérer avec prudence car l'épigénétique ne confère pas à l'environnement un rôle dans la création de changements héréditaires comme le veut la théorie de Lamarck mais plutôt dans leur sélection (Jablonka and Lamb, 1998; Jablonka, Lamb and Avital, 1998).

### **b) Les différents mécanismes épigénétiques**

Les multiples marques épigénétiques permettent l'activation, la diminution ou l'inhibition de l'expression des gènes autant pour les étapes de transcription que pour celles de traduction par l'action de multiples processus moléculaires sur l'ADN et l'ARN (Goldberg, Allis and Bernstein, 2007; Bossdorf, Richards and Pigliucci, 2008; Holoch and Moazed, 2015). Lors de la transcription de l'ADN et lors du développement précoce, il peut y avoir modification chimique des histones ainsi que méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN ; lors de la traduction de l'ARN, des petits ARN non codants peuvent entrer en jeu pour médier l'expression des gènes (Richa and Sinha, 2014; Jang *et al.*, 2017). L'ensemble de ces mécanismes ne sont pas indépendants les uns des autres car ils permettent le recrutement ou non de protéines de régulation de la transcription de l'ADN via une série d'interactions complexes (Berger, 2007). Par exemple, l'étude de l'organisation physique de la chromatine dans le noyau a mis en évidence des régions du génome appelées TAD ("*Topologically Associated Domain*") aux limites distinctes et contenant des loci capables d'interagir plus fréquemment avec d'autres régions du même TAD plutôt qu'avec des régions dans d'autres TADs (Rocha *et al.*, 2015; Dixon, Gorkin and Ren, 2016; Abematsu *et al.*, 2017). Ceci permet donc d'engager des interactions *enhancer-promoter* au sein d'un même TAD ou de contrôler certains patterns d'expression de gènes. De surcroît, près de la moitié des marques épigénétiques conservées lors de la mitose correspondent aux limites des domaines topologiques de la chromatine tels que les TADs. Ceci souligne l'importance des TADs non seulement sur l'expression directe du génome mais aussi sur la restauration des interactions entre régions du génome après division cellulaire (Kadauke and Blobel, 2013; Abematsu *et al.*, 2017).

### **c) Intérêt de l'épigénétique dans l'étude de la plasticité phénotypique**

Au-travers de la régulation de l'expression génique, les mécanismes épigénétiques ont le potentiel pour définir et altérer les phénotypes. Comme expliqué précédemment, l'épigénome peut être modifié par l'environnement. Ainsi, les mécanismes épigénétiques peuvent réguler le génome en réponse aux changements environnementaux. De cette façon, l'environnement

peut avoir une influence conséquente sur les phénotypes (Duncan, Gluckman and Dearden, 2014). Or, comme le veut la définition même de la plasticité phénotypique, celle-ci consiste en la présence de plusieurs phénotypes pour un seul génotype, dépendamment des conditions environnementales (Pigliucci, 1996, 2001). La relation entre épigénétique et plasticité prend alors tout son sens car la première est potentiellement influencée par l'environnement, tandis que la seconde est dépendante de celui-ci.

La plasticité phénotypique est dans de nombreux cas aussi une forme de prédiction qu'a l'organisme concerné sur la variabilité environnementale. En effet, les signaux reçus par la mère pendant le développement précoce de sa descendance peuvent engendrer de la plasticité en prévision de l'environnement à la naissance et lors du développement. Cette plasticité est mise en place via les marques épigénétiques ayant été générées en réponse aux signaux (Gluckman *et al.*, 2007; Duncan, Gluckman and Dearden, 2014).

## 5) Kryptolebias marmoratus comme modèle d'étude

### a) **Écologie**

Le rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus* et anciennement *Rivulus marmoratus*, est un poisson actinoptérygien de l'ordre des Cyprinodontiformes et de la famille des Rivulidae (Turko and Wright, 2015). Son aire de répartition s'étend le long du continent américain depuis la Floride jusqu'au Sud-Est du Brésil en passant par les Antilles, le Nord-Est du Mexique, les Caraïbes et l'Est de l'Amérique centrale (Taylor, 2000; Avise and Tatarenkov, 2015). Comme son nom l'indique, ce poisson tropical et subtropical vit dans les eaux saumâtres typiques du milieu des mangroves peuplées notamment par le palétuvier rouge (*Rizophora mangle*) (Taylor, Davis and Turner, 1995). Poisson remarquablement tolérant aux différentes conditions environnementales, cette espèce euryhaline supporte des eaux de salinité variant de 0 à 114ppt et une température de 13° à 28°C (notons que des prélèvements ont déjà été recensés dans des températures de 7°C et 38°C) (Taylor, 2000; Turko and Wright, 2015). Le rivulus des mangroves est aussi un poisson amphibie capable de respiration cutanée lui permettant de sauter hors de l'eau et de survivre jusqu'à 66 jours à l'air libre (Taylor, 2012). Cette caractéristique lui donne la possibilité de faire face à des conditions biotiques (i.e. compétition, prédation, alimentation) et abiotiques (i.e. sécheresse, qualité de l'eau moindre, etc.) variables. De ce fait, l'alimentation du rivulus est composée d'organismes retrouvés dans chacun de ces milieux tels que des insectes, des alevins, du zooplancton, des crustacés ou encore des gastéropodes. De plus, de multiples adaptations

physiologiques lui facilitent cette capacité amphibie (Taylor, 1992). Citons notamment la présence d'un nombre à peu près égal d'ionocytes cutanés et branchiales afin de maintenir son équilibre ionique lors de l'émersion et l'agrandissement des cellules neuro-épithéliales permettant la détection d'oxygène dans les branchies et sur la peau afin de faciliter sa tolérance à l'hypoxie (LeBlanc *et al.*, 2010).

### b) Cycle de vie – Reproduction

L'intérêt majeur de l'étude de *Kryptolebias marmoratus* réside dans sa reproduction particulière. En effet, cette espèce est l'un des deux seuls vertébrés connus capable d'autofécondation grâce à la présence d'un ovotestis fonctionnel chez les individus hermaphrodites. L'autre espèce capable du même type de reproduction est sœur de notre animal modèle : *Kryptolebias hermaphroditus*, anciennement *ocellatus*. (Harrington, 1961; Taylor, Davis and Turner, 1995; Farmer and Orlando, 2012)

A ce jour, aucune femelle n'a été identifiée dans la nature. De ce fait, toutes les populations observées sont androdioïques, c'est-à-dire que les individus sont soit mâles, soit hermaphrodites (Mackiewicz, Tatarenkov, Turner, *et al.*, 2006; Tatarenkov, Lima and Avise, 2011). Ajoutons qu'un dimorphisme sexuel apparent permet de distinguer les sexes des individus. Les mâles exposent une couleur orangée relativement pâle [Figure 6A]. Les hermaphrodites, quant à eux, sont de couleur brunâtre sur une palette variant du transparent au plus prononcé et affichent une ocelle sur leur nageoire caudale [Figure 6B] (Grageda, Sakakura and Hagiwara, 2004).

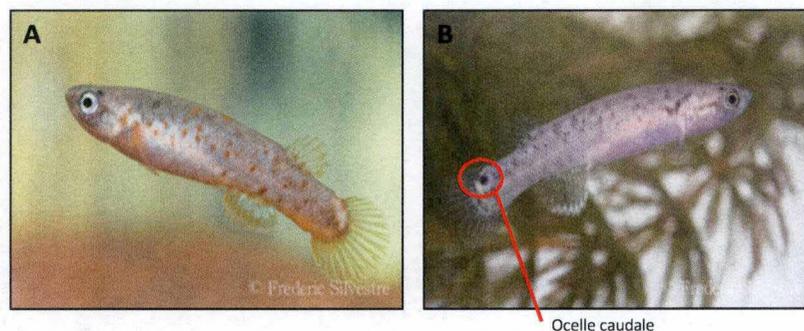


Figure 6. A) *Kryptolebias marmoratus* mâle. B) *Kryptolebias marmoratus* hermaphrodite. (Photos prises par le Pr. Frédéric Silvestre).

Il est possible de faire la distinction entre deux types de mâles chez cette espèce. Premièrement, les mâles dits « primaires » qui ne possèdent que des tissus testiculaires à titre de gonade et deuxièmement les mâles dits « secondaires ». Ces derniers sont des hermaphrodites ayant perdu leur capacité à produire des ovules en raison d'une

dégénérescence tissulaire. Dans le cadre de ce mémoire portant notamment sur le thème de la plasticité phénotypique, il est intéressant de noter que le développement en mâles primaires ou en hermaphrodites est influencé par la température à laquelle les œufs sont exposés lors de l'incubation. Si cette dernière se fait à basse température (20°C), alors la descendance sera composée de mâles primaires (Harrington, 1967; Moran *et al.*, 2015). Il y a donc plasticité dans la détermination sexuelle chez le rivulus avec comme cause proximale la température d'incubation des œufs. La température influence également le passage d'hermaphrodite à mâle secondaire (Harrington, 1967; Weeks, Benvenuto and Reed, 2006; Moran *et al.*, 2015; Kelley *et al.*, 2016).

Concernant les modalités de reproduction chez *K. marmoratus*, rappelons d'abord que la reproduction est sexuée. Cependant, plusieurs situations se présentent. Dans la grande majorité des cas, chez les hermaphrodites, la fécondation est interne. Ces individus possèdent chacun deux gonades et chacune de celles-ci est composée de tissus entremêlés capables de spermatogenèse et d'ovogenèse. La fécondation a lieu dans la cavité ovarienne par des spermatozoïdes et des ovules issus d'une même gonade (Sakakura *et al.*, 2006). Dans un second cas plus rare, la fécondation croisée externe est réalisée lorsque des individus mâles larguent des spermatozoïdes à proximité d'œufs non fécondés. Ceci n'a été observé pour le moment qu'en laboratoire mais les études portant sur la génétique des populations de *K. marmoratus* démontrent que ce type de reproduction est également présent dans la nature bien que peu courant (Mackiewicz, Tatarenkov, Taylor, *et al.*, 2006). Finalement, malgré qu'aucune objection théorique n'ait été relevée à ce jour, aucune étude n'a pu mettre en lumière des cas de fécondations croisées uniquement réalisées entre individus hermaphrodites (Kelley *et al.*, 2016).

Après fécondation des œufs dans la cavité ovarienne, le début du développement embryonnaire a lieu pendant trois jours, toujours de manière interne. Aux termes de ce délai, les œufs sont déposés sur terre ou dans le milieu aquatique selon les conditions environnementales. L'éclosion a lieu environ 16 jours post-fécondation. Cependant, les œufs peuvent entrer en diapause dites « de type III » aux termes de leur développement embryonnaire divisés en 32 stades (Wourms, 1972; Mesak, Tatarenkov and Avise, 2015). La diapause est un moyen pour le rivulus d'éviter les stress engendrés par une période d'hypoxie lors de l'éclosion. Elle dure jusqu'à ce qu'il y ait une nouvelle immersion, après laquelle pourra commencer le développement larvaire. La maturité sexuelle est atteinte pour les

hermaphrodites environ 90 jours après éclosion et environ 70 jours après éclosion pour les mâles (Sakakura and Noakes, 2000; Weeks, Benvenuto and Reed, 2006).

Les latitudes tropicales auxquelles sont retrouvés les *K. marmoratus* affichent un climat stable marqué par une saison sèche et une saison humide chaque année. La reproduction des rivulus peut donc avoir lieu tout au long de l'année (Earley and Hsu, 2008).

### **c) Particularités génétiques et épigénétiques**

Au regard de la reproduction majoritairement par autofécondation du rivulus des mangroves, les lignées descendantes d'un individu sont isogéniques après plusieurs générations. Ceci signifie que les individus d'une même lignée possèdent des génomes identiques, donc que pour ces derniers il n'y pas de variabilité allélique. Une étude de 2015 a en effet démontré, en se basant sur 32 loci microsatellites de plusieurs populations de rivulus en Amérique Centrale, que la majorité des poissons est homozygotes pour tous les locis investigués sauf dans de rares cas où la descendance est issue d'un évènement de fécondation croisée avec un individu d'une autre population (Tatarenkov *et al.*, 2015).

Cette même étude, appuyée par d'autres portant sur la génétique des populations de rivulus, relève que les processus majoritaires intégrant de la diversité génétique, mis à part celle générée par la dérive génétique, sont les évènements de migration d'individus mâles ou hermaphrodites vers des populations de lignée différente pouvant mener à des fécondations croisées interlignées. En effet, la capacité de ce poisson à survivre hors de l'eau pour une période prolongée et, de ce fait, son transport via vecteurs tels que des bois morts ou des noix de coco tombées explique pourquoi le rivulus des mangroves est un poisson répandu au travers de l'Amérique du Sud et Centrale. Ajoutons aussi que les œufs, régulièrement pondus à la surface afin de diminuer les taux de prédation et de profiter des taux d'oxygène élevé, possèdent des propriétés adhésives. La forte tolérance de cette espèce à des salinités différentes (0-114ppt) facilite également sa dispersion et son intégration dans une nouvelle niche (Tatarenkov, Lima and Avise, 2011; Taylor, 2012).

Au niveau épigénétique, de récents résultats de Fellous *et al.* révèlent que les taux de méthylation observés dans les îlots CpG chez des rivulus adultes sont significativement différents entre les tissus [Tableau 1]. Les gonades pour chaque sexe et le foie sont les organes les plus méthylés tandis que le cerveau, les branchies, les muscles et la peau ont un taux significativement plus faible. Il est intéressant de remarquer aussi que la seule différence

significative de taux de méthylation CpG de l'ADN entre les sexes se fait sur les gonades (Fellous *et al.*, 2018).

Tissue	DNA methylation Mean% ( $\pm$ SEM) (Males)	DNA methylation Mean% ( $\pm$ SEM) (Hermaphrodites)	Sidak's multiple comparisons test (between male and hermaphrodite organs)	Sidak's multiple comparisons test (between tissues)
Gonad	87.22 $\pm$ 1.14	79.55 $\pm$ 1.78	0.0058	A
Brain	78.22 $\pm$ 0.84	75.88 $\pm$ 3.68	0.8349	B
Liver	80.93 $\pm$ 1.53	81.67 $\pm$ 2.35	0.9995	C
Gills	76.05 $\pm$ 0.61	77.36 $\pm$ 0.57	>0.9999	B
Muscle	73.71 $\pm$ 1.28	73.73 $\pm$ 7.32	0.9307	B
Skin	73.71 $\pm$ 1.28	74.15 $\pm$ 1.96	>0.9999	B

Tableau 1. Taux de méthylation moyen dans les différents tissus et organes de *Kryptolebias marmoratus* chez des individus adultes mâles et hermaphrodites, suivi d'un test de comparaison multiple post-hoc de Sidak. Les résultats présentant des différences significatives sont représentés par des lettres différentes. Tableau adapté depuis (Fellous *et al.*, 2018).

#### d) Comportement

Dans le cadre des études comportementales, les poissons sont beaucoup utilisés en tant que modèles de psychologie évolutive et d'éthologie, et particulièrement le poisson-zèbre (*Danio rerio*) (Fatsini *et al.*, 2017). Ce dernier, similairement à de nombreuses autres espèces de poissons tels que le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) ou la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), fait preuve d'un comportement agressif lié à la hiérarchie sociale et à la compétition (Øverli *et al.*, 2004; Fatsini *et al.*, 2017). En effet, chez les poissons, la hiérarchie sociale est généralement définie selon le comportement agoniste observé lors de la compétition pour la nourriture ou pour un territoire (Fatsini *et al.*, 2017).

En ce qui concerne le rivulus des mangroves, de nombreuses études démontrent que cette espèce est agressive vis-à-vis de ses congénères en milieu naturel et en conditions de laboratoire (Earley, Hsu and Wolf, 2000; Earley and Hsu, 2008). Cependant, bien qu'il soit un poisson solitaire, le *K. marmoratus* peut se retrouver dans des situations où il y a une forte densité d'individus rassemblés dans un espace restreint tel que le refuge qu'offre un terrier de crabe par exemple (Taylor, 1992, 2000). Il est cependant possible qu'au sein de cette agrégation d'individus, le rivulus soit capable de distinguer ses parents des autres individus en se basant sur la reconnaissance de phéromones. Ainsi, il a été démontré que le rivulus est moins agressif vis-à-vis des individus avec lesquels il est parent (Edenbrow and Croft, 2012). Cette espèce de poisson est donc capable de moduler son agressivité en fonction du génotype de ses congénères.

Concernant le trait d'audace chez les poissons, les individus audacieux sont en général associés à une stratégie proactive car ils ont tendance à soit éviter ou bien à se confronter à un

stimulus stressant en utilisant une réponse dite « fight or flight ». A l'opposé, les individus timides affichent souvent une stratégie réactive se traduisant par un comportement passif de type « freeze and hide » face à un même stimuli (Benhaïm *et al.*, 2016).

Chez le rivulus, il a été démontré que la présence de congénères et de faibles quantités de nourriture diminuent de manière significative le comportement exploratoire des individus. Le risque de prédation quant à lui ne crée aucune différence significative avec les contrôles pour ce même comportement (Edenbrow and Croft, 2013). Par ailleurs, le tempérament d'audace des individus varie en fonction de la présence de congénères, en relation avec l'âge auquel ils ont été soumis à ce stimulus. Ainsi, l'audace diminue s'il y a présence des congénères durant l'ontogenèse, au contraire de l'agressivité qui augmente s'ils sont présents durant l'ontogenèse (Edenbrow and Croft, 2013).

#### e) Pourquoi en faire un modèle ?

Comme mentionné précédemment, *K. marmoratus* est capable d'une plasticité phénotypique élevée lui permettant notamment de vivre dans un environnement aux conditions variables tels que celui des mangroves. Ce dernier requiert des ajustements comportementaux et physiologiques rapides.

Adopter une approche protéomique pour comprendre la variabilité phénotypique au niveau de la personnalité chez ces poissons est plus particulièrement ce sur quoi porte notre intérêt. De fait, tel que démontré à de multiples reprises dans les pages précédentes, l'étude du comportement, et plus particulièrement de la variabilité comportementale chez les animaux s'explique au-travers de celle environnementale (E), génétique (G) et de l'interaction entre ces deux termes (GxE). L'hermaphrodisme de cette espèce modèle et l'utilisation d'une lignée isogénique (DC4) nous permet de réduire le bruit génétique lié à tout phénotype. De plus, au laboratoire, les poissons sont maintenus dans des conditions environnementales contrôlées et identiques afin de diminuer au plus la variabilité environnementale. Ainsi, la réduction des variables environnementales et génétiques permet d'adopter un point de vue inédit pour comprendre les processus biologiques expliquant la plasticité phénotypique observée, notamment au niveau des traits comportementaux.

Ajoutons également que pour des organismes avec un tel mode de reproduction, les conséquences génétiques négatives sont multiples (i.e. accumulation de mutations délétères, diminution de l'adaptation à l'environnement, consanguinité, diminution d'hétérozygotie)(Moran *et al.*, 2015). Ainsi, poursuivre une étude protéomique par celle des

modifications épigénétiques prendrait tout son sens car ces dernières se révèlent être des outils indispensables pour faire face aux nombreux inconvénients de l'hermaphrodisme en créant de la variabilité phénotypique sans engendrer de mutation de l'ADN, et à termes pour s'adapter à l'environnement (Ellison *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces observations rend l'étude des traits comportementaux au travers du spectre de la protéomique tout à fait pertinente chez notre animal-modèle.

## Objectifs

---

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une thèse dont l'objectif est de caractériser les bases moléculaires cérébrales des traits de personnalité du rivulus du *Kryptolebias marmoratus* à l'aide d'approches protéomiques et épigénétiques, ainsi que leur plasticité développementale suite à des stress environnementaux.

Dans le présent document, l'étude du protéome cérébral du rivulus sur base des comportements qu'il exprime a pour objectifs de (1) dévoiler si les niveaux d'audace et d'agressivité ont une influence significative sur le protéome cérébral du rivulus des mangroves et de (2) dès lors mettre en lumière de nouvelles protéines et mécanismes impliqués dans les traits comportementaux d'audace et d'agressivité, le tout sans *a priori*.

L'analyse des protéines exprimées dans le cerveau de *Kryptolebias marmoratus* correspondant aux comportements d'audace et d'agressivité est une première étape dans l'étude des bases moléculaires de la personnalité chez cette espèce. Ceci permettra de mieux comprendre les processus biologiques mis en jeu et aboutissant à une variabilité individuelle de la personnalité de ce poisson hermaphrodite dont, non seulement la diversité génétique est réduite en raison de sa reproduction par autofécondation, mais la variabilité environnementale aussi grâce à des conditions d'élevage précises et constantes.

Pour satisfaire ces objectifs, la stratégie mise en place est divisée en deux étapes. Premièrement, suite à une analyse de données comportementales résultant de tests appropriés pour classer les individus dans les continuums d'audace et d'agressivité, des poissons aux comportements extrêmes ont été sélectionnés. Dès lors, une analyse de jeux de données protéomiques obtenus par spectrométrie de masse "gel-free/label-free" sur ces individus extrêmes est réalisée. Aucun des individus d'expérience n'a été exposé à des traitements ou conditions de développement et d'élevage différents. Deuxièmement, certaines protéines, révélées particulièrement intéressantes d'après l'analyse des jeux de données protéomiques et une recherche bibliographique, sont sélectionnées pour étudier l'expression relative de leur gène respectif chez des individus au comportement extrême.

De manière générale, les recherches réalisées durant ce mémoire permettent d'approfondir les connaissances actuelles des phénotypes comportementaux et leurs bases moléculaires. Elles sont un point de départ vers une compréhension détaillée de ceux-ci, par ancrage du phénotype comportemental (« Phenotype anchoring »), depuis les gènes jusqu'à l'expression du comportement.

## Partie II : Matériel et Méthodes

---

### 1) Élevage des poissons

Le laboratoire de physiologie évolutive et adaptative (LEAP) du Prof. Silvestre travaille en collaboration avec celui du Prof. Ryan Earley de l'Université d'Alabama. Ceci a permis l'acquisition d'individus issus de trois lignées de *Kryptolebias marmoratus* (DC4, DC11, DC22).

Les rivulus des mangroves utilisés lors de ce mémoire sont des échantillons contrôles non-traités issus d'un protocole expérimental de mon encadrante (Alessandra Carion) au cours duquel elle a mesuré les profils d'expression protéomique pour les traits comportementaux entre 41 individus élevés avec des conspécifiques à une salinité classique de 25ppt ou bien 38 individus isolés et traités avec une salinité de 5ppt.. 44 individus sont des contrôles.

Les 123 individus sont issus de la lignée DC4 échantillonnée en 2010 dans les Keys de Floride et de générations différentes. L'homozygotie de cette lignée isogénique a été vérifiée par des analyses démontrant que sur 200 individus issus d'une même population seuls 15% présentaient une différence sur maximum 3 loci sur les 32 étudiés (Mackiewicz, Tatarenkov, Perry, *et al.*, 2006; Mackiewicz, Tatarenkov, Taylor, *et al.*, 2006; Mackiewicz, Tatarenkov, Turner, *et al.*, 2006)

Après la ponte, les œufs sont placés dans des plaques 6 puits jusqu'à éclosion. A ce stade, ils sont disposés individuellement, jusqu'à atteindre 60 jours, dans des bocaux remplis de 200mL d'eau salée. A 90 jours après éclosion, les poissons atteignent leur maturité sexuelle et sont transférés individuellement dans des aquariums fermés en plastique de 500ml et percés de 2 trous d'environ 5mm de diamètre pour la circulation de l'air et le nourrissage. Un morceau de coton ouaté à moitié immergé est ajouté en tant que substrat pour permettre l'oviposition.

L'environnement dans lequel ils se développent est contrôlé. L'eau salée est maintenue à 25ppt avec un mix de sels marins (Instant Ocean, Aquarium System ©) et d'eau déminéralisée. La température de la pièce et de l'eau est maintenue à  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Les poissons sont aussi exposés à une photopériode constante de 12h de lumière (jour) et 12h d'obscurité (nuit).

Les poissons juvéniles et adultes sont nourris une fois par jour *ad libitum* de larves nauplius d'*Artemias* vivantes (1mL/juvéniles ; 3mL/adultes)

### a) Test comportementaux

L'ensemble des 123 individus expérimentaux ont été soumis trois fois (répliquas techniques) aux tests comportementaux d'audace et d'agressivité à 150dph. Sur bases des analyses statistiques et des résultats obtenus par mon encadrante Alessandra Carion, seules les données issues du premier répliqua peuvent être utilisées lors des analyses moléculaires en raison d'une habitude des poissons aux test comportementaux.

#### i) Test d'audace

La détermination du niveau d'audace de chaque individu a été réalisée via un test d'émergence ("shelter test") (Burns, 2008).

Le dispositif expérimental utilisé lors de ce test consiste en une arène transparente de 20 cm de diamètre jouté d'un abri immergé avec une porte coulissante pour permettre la sortie du poisson. L'ensemble est rempli avec 700mL d'eau salée à 25ppt. Afin que les poissons s'acclimatent à l'environnement, chacun est placé dans l'abri recouvert d'un couvercle gris foncé pendant 10 minutes avant le début du test.

Dès le début du test qui dure 30 minutes, la porte donnant sur l'openfield est ouverte et le comportement du poisson est enregistré par vidéo-tracking via le logiciel EthoVision. Le test d'émergence permet de (1) mesurer le temps de latence de première entrée du poisson dans l'openfield, (2) le temps total passé par le poisson dans l'abri ou dans l'openfield et (3) la distance totale parcourue par le poisson dans l'openfield.

La propension à prendre des risques, et par extension l'audace du poisson, est ensuite déterminée sur base de ces trois variables.

#### ii) Test d'agressivité

Le niveau d'agressivité des poissons a été déterminé à partir d'un « Model Test ». Ce dernier consiste en la mesure de phénotypes comportementaux correspondant au tempérament d'agressivité chez chaque *K. marmoratus* par rapport à un modèle 3D en résine. Le modèle de 2,4cm représente un individu hermaphrodite de la même espèce âgé de 80 jours sur base de la taille moyenne des poissons à ce stade de leur vie. Ce dernier est placé au centre d'une arène rectangulaire et fixé à un socle de résine de 1cm. L'arène est remplie de 300mL d'eau salée à 25ppt et à 26±1°C.

Avant de débiter le test, le poisson est déposé durant 5 minutes dans une zone d'acclimatation formée d'un cylindre en plastique blanc et opaque. Le cylindre est ensuite retiré et une vitre est posée par-dessus l'arène pour empêcher le poisson de sauter hors de l'espace de test. Le poisson est alors filmé pendant 10 minutes et est ensuite replacé dans son aquarium en plastique.

Le logiciel Ethovision XT (Noldus©) permet l'analyse des vidéos de chacun des tests sur base de quatre paramètres définis comme correspondant au tempérament d'agressivité : (1) Le nombre de posture d'attaque, (2) le nombre de morsures, (3) La latence entre chaque posture d'attaque et (4) la latence entre chaque morsure.

### **b) Euthanasie des poissons**

Après les test comportementaux, à 235 jours post-éclosion, les poissons sont euthanasiés. Chaque individu est plongé dans de l'eau salée à 25ppt maintenue à 4°C dans un bain-marie de glace. Les poissons sont ensuite immédiatement décapités pour confirmer la mort.

Dans les instants qui suivent la décapitation, le cerveau de chacun des poissons est extrait en suivant un protocole précis. Chaque cerveau est directement placé individuellement dans un eppendorf de 2mL annoté et plongé dans de l'azote liquide pour éviter la dégradation. Chacun de ces eppendorfs est ensuite disposé dans une boîte conservée dans un réfrigérateur à -80°C en vue des analyses moléculaires.

### **c) Analyse en composantes principales (ACP)**

Afin de sélectionner les individus exposant les tempéraments les plus extrêmes pour les analyses protéomiques et moléculaires, une analyse en composantes principales a été réalisée sur les résultats du premier répliquas des tests comportementaux.

Une analyse en composantes principales (ACP) est une analyse statistique descriptive multidimensionnelle illustrant sous forme de graphe un nombre important de variables quantitatives. Dans le cas présent, une ACP permet de réduire les dimensions d'une donnée multivariée telle que les résultats des tests comportementaux à des composantes principales en perdant le moins possible d'informations. Elle permet ainsi d'identifier les variables corrélées et d'identifier les profils cachés d'un jeu de données.

La distribution des individus étudiés lors des tests comportementaux peut donc être visualisée selon les deux traits comportementaux. L'ACP est réalisée avec le logiciel R et ses packages « ADE4 » et « vegan ».

## 2) Analyse protéomique

### a) **Echantillonnage**

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour sélectionner les individus de phénotype comportemental extrême suivant les analyses comportementales. Un total de 3 poissons par condition (audacieux – timide – très agressif – peu agressif), soit 12 échantillons au total, a été envoyé au laboratoire de Prof. Dietmar Kültz de l'UC Davis en Californie avec lequel le Prof. Silvestre collabore pour l'analyse par spectrométrie de masse.

### b) **Spectrométrie de masse gel-free/label-free**

La démarche protéomique réalisée lors de ce mémoire correspond à de la protéomique quantitative. Elle vise à comparer les différences d'abondance des protéines selon les échantillons de phénotypes comportementaux extrêmes sélectionnés dans les continuums audacieux/timides et agressifs/non-agressifs.

Seule l'analyse des résultats et non la mise en œuvre du protocole protéomique à proprement parler a été réalisée par mes soins.

Suivant une analyse protéomique dite "gel-free/label-free", l'extraction protéique, la mesure de la concentration des protéines et la digestion en solution par la trypsine suivent le protocole développé par Kültz (Kültz *et al.*, 2013). Au même titre, la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse suivent précisément les protocoles détaillés par Kültz et Voisin *et al.* (Kültz *et al.*, 2015; Voisin, Kültz and Silvestre, 2019)

Une base de données de 38,516 séquences protéiques du *Kryptolebias marmoratus* a été téléchargée depuis la plateforme NCBI à la date 06 Juillet 2016. Pour avoir une estimation correcte du False Discovery Rate (FDR) des protéines, une méthode utilisant des leurres (i.e. decoy method) est utilisée (Elias and Gygi, 2007). Pour chaque séquence, un leurre a été ajouté dans le logiciel PEAKS Studio 8.0. Cette base de données totale contenant 77,028 entrées (séquences protéiques + leurres) a été utilisée afin de déterminer le FDR.

Les résultats de la recherche sur trois moteurs de recherches (Peaks 8.0 ; Mascot 2.2 (Matrix Science, London, UK) ; X!Tandem Cyclone (<http://www.thegpm.org/tandem/>)) ont été fusionnés dans Scaffold 4.8.2. (Proteome Software Inc., Portland, OR, USA). L'identification des protéines n'a été validée que si le FDR < 1.0% et si elles sont formées de strictement plus qu'un seul peptide identifié par protéines. Des clusters ont été créés avec les protéines qui ne peuvent pas être différenciées sur base des analyses MS/MS mais partageant

des peptides identiques. Cela a été réalisé avec l'algorithme *Protein Prophet* du logiciel Scaffold.

Les paramètres suivants (PEAKS Studio 8.0 (BSI)) ont été utilisés pour le profilage quantitatif sans marquage (i.e. "label-free") des intensités de peptides et le calcul des abondances relatives de protéines dans chaque échantillon :

- FDR < 1%
- Peptide identifié dans au moins 4 échantillons
- Erreur sur la masse de max. 30 ppm
- Tolérance sur le "retention time shift" de 3 minutes

Toutes les données d'identification et de quantification pour l'ensemble des protéines détectées sont accessibles publiquement dans la rubrique CAMP du site :

[https://kueltzlab.ucdavis.edu/CAMP\\_dda.cfm](https://kueltzlab.ucdavis.edu/CAMP_dda.cfm) sous l'ID CAMPDDA00026.

Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse se présentent sous la forme de jeux de données incluant l'abondance relative des protéines détectées dans le cerveau des poissons selon leur tempérament. Ainsi, cela correspond à deux jeux de données, soit un par trait comportemental, comptant les données récoltées lors de la MS/MS pour les six échantillons (3+3) fournis par continuum comportemental (continuum audacieux – timides et continuum agressifs – non agressifs). Après transmission des résultats de spectrométrie de masse par le Pr. Kültz, un tri des données a permis l'identification de protéines différentiellement abondantes entre les poissons exprimant des phénotypes comportementaux extrêmes dans chaque continuum. Parmi ces protéines différentiellement abondantes, il a alors fallu définir les protéines significatives d'intérêt pour l'étude de l'expression de gènes par RT-qPCR.

De manière générale, pour déterminer la significativité des protéines, plusieurs critères doivent être remplis :

- 1) Seules les protéines détectées dans au moins deux échantillons sur trois et possédant au moins deux peptides uniques par protéine sont sélectionnées.
- 2) **|Fold change| ≥ 1.5** . Le fold change est une mesure relative évaluant les changements de quantité d'une protéine dans un échantillon par rapport à un autre. Il se définit comme le ratio de la moyenne de l'aire en-dessous des pics entre le groupe traité par rapport au groupe contrôle. Les pics correspondent à la quantité de chaque protéine détectée par le spectromètre de masse.

- 3) La significativité statistique des protéines est basée sur l'équation  $-10\log(\text{p-valeur})$  selon le logiciel PEAKSQ. Celle-ci a été calculée à partir de l'algorithme MaxQuant optimisé pour des données protéomiques (Cox and Mann, 2008). Un premier seuil de significativité est établi à  $-10\log(\text{p-valeur}) \geq 5$ . A partir des résultats de celui-ci, un second seuil est défini à  $-10\log(\text{p-valeur}) \geq 12$  pour déterminer les protéines hautement significatives.

Des suites de ce tri global des protéines significatives, diverses analyses du jeu de données ont été mises en œuvre pour déterminer des protéines d'intérêt à étudier lors d'une expression de gènes par RT-qPCR.

### c) Analyses d'enrichissement

#### i) Gene Ontology

Une analyse d'enrichissement par Gene Ontology (GO) nous donne un aperçu général des processus biologiques mis en jeu dans le cerveau des rivulus de tempérament différents. Cette analyse se fait sur base des protéines significatives mises en évidence pour les deux traits comportementaux étudiés. Les protéines sont analysées en fonction de leur fold-change relatif. A savoir que les protéines plus exprimées sont regroupées dans un cluster et de même pour les protéines sous-exprimées.

La première étape de cette analyse consiste donc à regrouper les protéines différemment exprimées. Sur un total de 31 protéines significatives chez les individus de trait comportemental agressif, 11 ont un fold-change négatif et 20 ont un fold-change positif. Sur les 24 protéines significatives des individus de tempérament audacieux, 20 ont un fold-change négatif et 4 un fold-change positif.

L'option *Batch Entrez* de NCBI permet ensuite de télécharger les numéros d'accèsion XM et XP à partir des numéros GenInfo (GI) de chaque protéines de chaque cluster. Les numéros XM et XP sont respectivement issus des ARNm et des protéines annotés dans la base de données de NCBI. Ensuite, les numéros XP sont transférés au-travers d'un pipeline basé sur le package TopGO dans R (RStudio 1.1.463) permettant de (1) comparer les numéros d'accèsion XP avec une base de données téléchargée afin d'en retirer les termes d'ontologie, (2) définir statistiquement les termes d'ontologie les plus significatifs. Ce pipeline a été développé par PhD. Victoria Suarez Ulloa (Post-doc au LEAP [Figure 7]).

Le test utilisé ici est le test exact de Fisher. Ce dernier permet de déterminer la significativité d'un terme GO en comparant le nombre de protéines correspondant à ce terme dans notre jeu de données avec le nombre total de protéines liées à ce terme selon les bases de données. La p-valeur obtenue représente donc la probabilité que l'association entre les gènes et les processus biologiques soit uniquement explicable par le hasard.

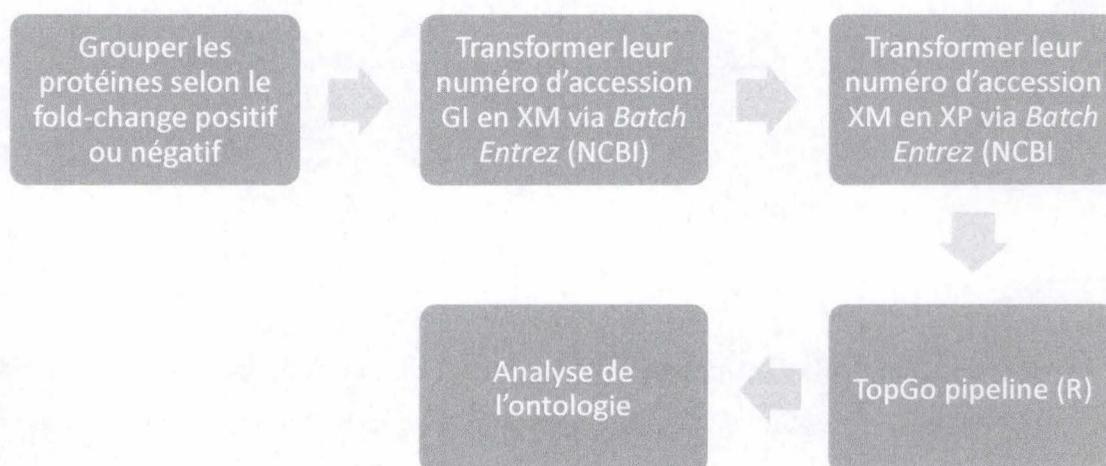


Figure 7. Workflow pour la mise en place de l'ontologie de gènes.

## ii) Volcano Plot

En statistiques, un volcano plot permet de visualiser un grand jeu de données tel que retrouvé dans les disciplines de l'omique. Ici, il illustre le FC de chacune des protéines différentiellement exprimées pour un trait comportemental par rapport à la significativité ( $-10\log P$ ) de celles-ci. Ceci permet l'identification rapide des protéines d'intérêt selon les seuils de significativité préalablement définis.

Le FC est exprimé sous forme de ratio  $\frac{FC_{agressif}}{FC_{non\ agressif}}$  et  $\frac{FC_{caudacieux}}{FC_{timides}}$  afin de centraliser les données autour de zéro et uniformiser les distances.

Les volcano plot ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 7.0a™.

## iii) Analyse de Clustering Hiérarchique (HCA)

Des analyses de clustering hiérarchique (HCA) sous la forme de heatmaps sont réalisées pour observer de manière globale les profils d'expression des protéines significatives. Le principe d'une HCA est d'assembler un ensemble de protéines sous la forme d'un arbre dans lequel chacun des éléments est séparé par des branches plus ou moins longues selon leur

similarité. Cette étape de l'analyse statistique est le clustering. Dans le cas présent, le logiciel en ligne Heatmapper a été utilisé (<http://www2.heatmapper.ca/expression/>) (Babicki *et al.*, 2016). Les valeurs d'abondance des protéines différentiellement régulées sont d'abord transformées selon  $\log_2(FC)$  afin de les normaliser autour de 0. Les protéines sont clusterisées selon la méthode de liens complets ("Complete Linkage") et la distance entre chaque donnée est calculée sur base d'une corrélation de Pearson.

Une première heatmap reprend les 31 protéines significatives chez les poissons du continuum agressivité et une seconde pour les 24 protéines les poissons du continuum audace.

### 3) Analyses moléculaires

Les analyses des résultats protéomiques ont permis d'identifier cinq gènes d'intérêt hypothétiquement impliqués dans les traits comportementaux d'audace et d'agressivité (Cfr. Protéines en gras dans la discussion). Des analyses moléculaires permettraient de vérifier un effet de ces gènes sur le comportement de *K. marmoratus*. De ce fait, une mesure du niveau d'expression de chacun de ces gènes est réalisée par Retro-Transcription de l'ARN en ADNc suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR).

#### a) Extraction d'ARN

L'ARN du cerveau de 14 individus a été extrait. Ces individus ont été sélectionnés sur base de leur score d'agressivité et d'audace obtenus par ACP. Ce sont ceux restant parmi tous les poissons échantillonnés lors de la thèse de mon encadrante (Alessandra Carion).

L'extraction commence par l'ajout de 150 $\mu$ l de TRI Reagent au cerveau. Celui-ci dégrade les cellules et leur composants et inhibe l'activité des RNAses. Il facilite donc le broyage du tissu sans abîmer l'ARN.

Après dissolution complète du cerveau, 350 $\mu$ l de TRI Reagent est encore ajouté pour obtenir un volume total de 500 $\mu$ l. Après une courte incubation à température ambiante, 50 $\mu$ l de est ajouté. Ce dernier entraîne la formation de trois phases dans les échantillons après centrifugation à 4°C pendant 15min. Une phase aqueuse surnageante contenant l'ARN, une phase intermédiaire contenant l'ADN et une phase inférieure contenant les protéines des cellules dégradées.

Dans de nouveaux eppendorfs, la phase surnageante de chaque échantillon est soigneusement prélevée et ajoutée à 250 $\mu$ l d'isopropanol. C'est une étape critique afin de récolter le plus possible d'ARN en évitant toute contamination. L'isopropanol précipite l'ARN et mène donc à la formation d'un culot dans le fond des eppendorfs. Suite à la

filtration de l'isopropanol tout en maintenant le culot, deux lavages successifs avec 1mL d'éthanol 75% sont réalisés dans chaque tube. L'éthanol solubilise l'ARN contenu dans les tubes. Pour éviter toute contamination de solvants, il est essentiel de veiller à ce que les étapes de lavage soient réalisées minutieusement. Lorsque le culot est sec, 15 $\mu$ l d'eau RNase Free est ajoutée à chaque échantillon. Finalement, l'ARN est re-suspendu et maintenu sur glace.

#### i) Quantité et contrôle qualité de l'ARN extrait

D'une part, la qualité et la quantité de l'ARN des suites d'une extraction peuvent être évaluées sur base de la concentration en ARN pour chaque échantillon. Pour ce faire, la technologie de spectrophotométrie du Nanodrop et son logiciel associé NANO DROP 2000™ ont été utilisés. Cet outil donnera les mesures d'absorbance des acides nucléiques contenus dans les échantillons. Le ratio d'absorbance entre 260/280 nm témoigne de la pureté en ARN et ADN des échantillons. Si cette valeur est proche de 1,8, alors on considère l'échantillon comme ne contenant que de l'ARN. Si l'absorbance est plus faible que 1,8 alors on considérera que l'échantillon a pu être contaminé par des protéines. Le ratio d'absorbance 260/230nm permet de déterminer s'il y a eu contamination des échantillons à cause des solvants utilisés lors de l'extraction dont certains composants absorbent à 230nm. Pour ce ratio, si les valeurs se situent autour de 2.0-2.2, alors on considérera qu'il n'y a pas contamination.

D'autre part, l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% est une étape permettant la vérification de la qualité de l'ARN extrait en évaluant sa taille grâce à la discrimination des ARN selon leur taille et leur charge. En effet, à pH neutre, l'ARN est chargé négativement et migrera donc vers l'anode sous l'effet d'un champ électrique.

Le gel est préparé par l'ébullition d'un mélange de tampon TAE 0,5x (Tris, Acétate, EDTA) avec de la poudre d'agarose 1%. L'agarose sert de support de migration pour l'ARN et le TAE 0,5x est un tampon permettant notamment de maintenir le pH de la solution. Après mélange avec 3mL de Sybr Safe, chargement du gel dans le support avec un peigne et polymérisation pendant 25-30 minutes à l'abri de la lumière, le gel peut être immergé dans le tampon TAE 0,5x contenu dans la cuve de la machine à électrophorèse. Chacun des échantillons est ensuite mélangé avec un tampon de charge pour augmenter leur densité afin qu'ils puissent et s'écouler dans les puits.

Les puits sont alors successivement remplis avec un ladder (1Kb), les échantillons et le contrôle négatif. La migration peut alors démarrer en programmant le potentiel sur 100V pendant 30min.

Aux termes de la migration, le gel est récupéré et placé dans un transilluminateur à UV (BioRad<sup>®</sup> et ImageLab<sup>®</sup>) pour le photographier en mettant en évidence les zones émettant de la fluorescence grâce à la fixation de l'agent intercalant sur l'ADN.

### **b) Traitement à la DNase**

L'ARN des 14 individus est traité à la DNase.

La qPCR est une méthode reposant sur l'ARN comme matériel de base pour quantifier l'expression d'un gène dans un organe ou tissu. Cependant, ce dernier doit d'abord être transformé en ADNc par transcription inverse. Pour éviter toute contamination en ADN génomique qui interférerait avec l'ADNc, il faut traiter les échantillons d'ARN extraits à la DNase.

Le traitement à la DNase des échantillons suit le protocole recommandé par le kit RQ1 RNase-Free DNase<sup>®</sup> de PROMEGA. Premièrement, les volumes d'ARN et d'eau nucléase-free à prélever sont calculés pour avoir 1µg d'ARN dans 8µl d'eau sur base des concentrations révélées par le NanoDrop. Un mélange contenant 1µL de réactif RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer et 1µL de RQ1 RNase-Free DNase est ensuite ajouté aux échantillons. Ces deux réactifs éliminent l'ADN génomique résiduel. Suite à une incubation de 30 minutes à 37°C dans un bain sec (Biometra TProfessional<sup>™</sup>), 1µL de DNase STOP Solution est ajouté dans chaque échantillon pour arrêter l'action de la DNase. Suite à une dernière incubation de 10min à 65°C, la concentration en ARN et sa qualité est à nouveau évaluée via le NanoDrop.

### **c) Reverse Transcription (RT) de l'ARN en ADNc**

C'est lors de cette étape que l'ARN extraits des cerveaux des 14 poissons est transformé en ADNc par l'action de la transcriptase inverse avec le kit RevertAid RT Reverse Transcription<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific). A partir des concentrations d'ARN traité à la DNase, le volume d'échantillon nécessaire pour avoir 500ng d'ARN est calculé. Suite à cela, 1µL du réactif Random Hexamer Primer est ajouté à chaque échantillon. Après création d'un mix contenant 4µL de Reaction Buffer, 2µL de 10mM de dNTP Mix, 1µL de Ribolock RNase Inhibitor et 1µL de RevertAid RT, ceci est ajouté à chaque échantillon. L'action de l'enzyme transcriptase inverse du RevertAid RT est alors activée comme lors d'une PCR classique par

incubation des échantillons pendant successivement 5min à 25°C, 60min à 42°C, 5min à 70°C et finalement refroidit à 4°C. Après l'étape de PCR, les échantillons sont conservés au congélateur -80°C.

#### d) Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR)

##### i) Design et mesure d'efficacité des primers

Comme évoqué précédemment, les analyses des résultats protéomiques ont permis de sélectionner un total de cinq gènes d'intérêt pour l'étude de l'expression de gènes par RT-qPCR.

Pour chacun de ces gènes ainsi que deux gènes de références (18S et  $\beta$ -Actine), une série de primer a été désignée. En effet, les étapes de qPCR requièrent des primers spécifiques capables de se lier spécifiquement à l'ADNc pour amplifier la séquence d'intérêt.

Dans un premier temps, L'ARNm de chaque gène est extrait de la base de données NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) et analysé via Primer3Web 4.1.0 (<http://primer3.ut.ee>). Les séquences proposées par ce dernier site web sont alors importées dans le logiciel AmplifX<sup>®</sup> pour simuler une PCR afin d'en évaluer l'efficacité. Les séquences de primers sélectionnés suite à ce premier tri sont ensuite importées dans le site d'accès libre Primer Blast pour vérifier la spécificité des primers avec *K. marmoratus*. L'ensemble des primers choisis et certaines de leurs caractéristiques d'importance sont repris dans le tableau 2. Les primers repris pour les gènes de référence (18S et  $\beta$ -Actine) sont issus de précédents résultats portant sur *Kryptolebias marmoratus*.

Gènes	Primers	Taille	%GC	Tm (°C)	Taille amplicon (pb)
Monoglycérade lipase (MGLL)	F : AGAGACCCAGTGATTTTCGCA	20	50.0	59.02	111
	R : GCATGTGGTTTCAGGAGCTTC	20	55.0	59.19	
Atlastine 1 (ATL1)	F1 : CAAGAAGGCGGCATGAAGTT	20	50.0	59.12	166
	R1 : CATCGAAGTGTGGTTGGTG	20	55.0	59.13	
	F2 : GCGGGACAAGAAGAGAGACT	20	55.0	59.11	185
	R2 : TCCTGCGATGTACCGGTAAG	20	55.0	59.26	
Synapsin 3 (SYN3)	F1 : CACTGACCAACACCTTCACG	20	55.0	59.06	149
	R1 : GACGTCTGCTGCTCAAACAA	20	50.0	59.06	
	F2 : AAGTGGATCGCTCGTGTCT	20	50.0	59.4	194
	R2 : TGTGAGCTGAATCGGAACCT	20	50.0	59.02	
IgLON5	F : GTGCGTTTGGATTTCGCTCT	20	50.0	59.13	184
	R : GAGTTGTCTGCTGCTGATG	20	55.0	59.29	
Taline 2 (TLN2)	F : TTGTGGCGTGTGTGTGATG	20	50.0	59.06	200
	R : CATGGCTCAAACCTGCATGGT	20	50.0	59.11	
<b>Gènes de référence</b>					
18S	F : GAACTCACCGACACCAGCA	19	58.0	56	105
	R : ATCATCGACGCTCCTGGA	18	56.0	54	
$\beta$ -Actine	F : CTTGCGGAATCCACGAGACC	20	60.0	57	150
	R : CCAGGGCTGTGATCTCTCTCTG	22	59	58	

Tableau 2. Liste des gènes d'intérêt et détails des caractéristiques de leurs primers

La dernière étape de mesure d'efficacité des primers a été réalisée par qPCR standard. L'ensemble des 14 échantillons d'ADNc sont rassemblés dans un pool dilué en série. Ces dilutions permettent de tracer une droite de calibration de l'amplification de l'ADNc par qPCR et, à terme, d'évaluer l'efficacité des primers. Deux machines ont été utilisées pour réaliser les tests d'efficacité des primers. La première supporte des plaques qPCR à 96 puits (StepOne™ Real-Time PCR System) et la seconde des plaques à 384 puits (QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System). La quantité de produit ajouté dans chaque puit diffère selon un rapport de 1/2 entre la machine à 96 puits et celle à 384 puits. Ainsi, chaque puit est rempli de ¼ d'ADNc, ¼ de mix de primers sens et anti-sens, ½ de SYBR Green (Bio Rad®). Chaque dilution d'ADNc est ajoutée en triplicatas, de l'eau Nucléase-Free et l'ARN traité à la DNase en dupliqua chacun comme contrôles négatifs. Après une courte centrifugation de la plaque celle-ci est disposée dans la machine et la série d'étapes alternant des températures différentes pour permettre la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADNc commence alors.

Pour calculer l'efficacité de chaque paire de primers, la pente de la droite de calibration est intégrée dans la formule suivante :

$$\text{Efficacité} = 100 \times \left( 10^{\frac{-1}{b}} - 1 \right) \text{ avec } b = \text{pente de la droite de calibration}$$

L'efficacité des primers est exprimée en termes de pourcentage et doit être comprise entre 90% et 110% pour satisfaire une étude par expression de gènes.

## ii) Amplification des gènes d'intérêt par qPCR

Cette étape est celle à proprement parler d'amplification des gènes d'intérêt pour étudier le niveau d'expression de ceux-ci chez les poissons choisis. Parmi les gènes d'intérêt étudiés, seuls deux des sets de primers designés (MGLL et IGLON5) ont une efficacité et une spécificité suffisantes pour pouvoir poursuivre l'étude protéomique quantitative. Ces deux gènes d'intérêt sont liés au trait comportemental d'agressivité, les individus étudiés pour l'expression de gènes sont donc des poissons de phénotype d'agressivité ou de non-agressivité extrêmes. Le gène de référence est le gène 18S.

Le choix des poissons se base sur les scores d'audace et d'agressivité obtenus à partir d'une ACP réalisée sur les échantillons. trois individus extrêmes du comportement agressifs et trois extrêmes pour le comportement non-agressifs sont choisis [Annexe 1].

Les 6 échantillons sont testés en triplicat à une dilution de 50x. Cette dilution résulte de la droite de calibration issue du test d'efficacité du primer d'intérêt. Celle-ci doit prendre en compte la dilution pour laquelle le  $CT_{moyen}$  se situe aux alentours de 20.

Au cours de cette manipulation, pour chaque gène testé, une nouvelle droite de calibration est réalisée à partir du pool des 14 échantillons dilués en série (Facteur de Dilution 1:5).

Une partie de la plaque 96 puits est donc remplie suivant les dilutions du pool d'échantillons pour faire une nouvelle droite de calibration.

Une autre partie de la plaque destinée à la mesure quantitative du niveau d'expression de mes gènes d'intérêt est remplie avec 5 $\mu$ L d'échantillon dilué 50x, 5 $\mu$ L de primers, 5 $\mu$ L de SYBR Green (Bio Rad ©) [Figure 8]

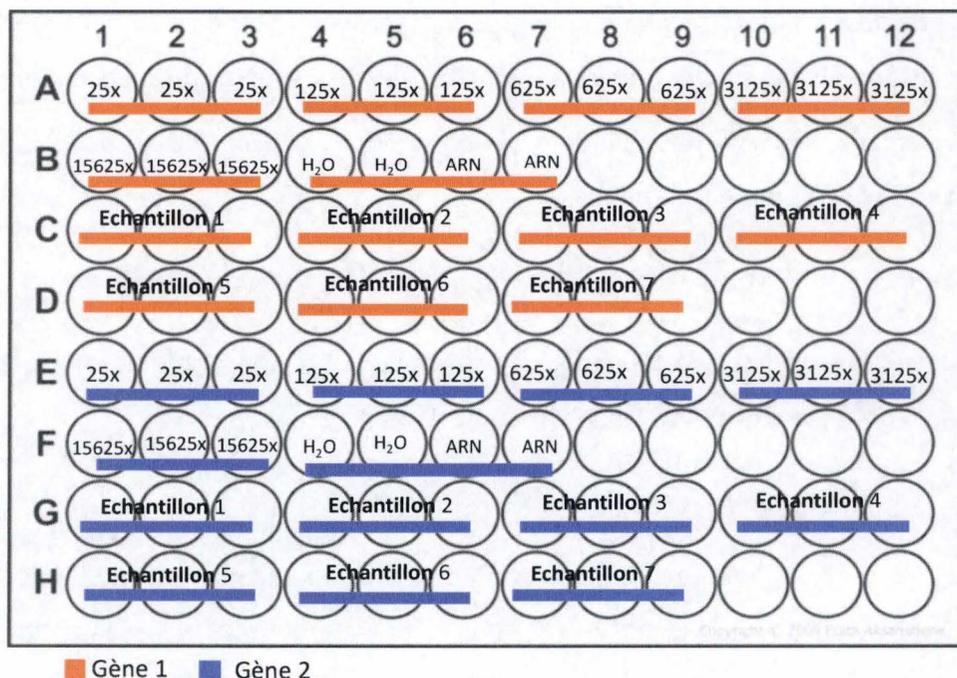


Figure 8. Exemple de plan de plaque utilisé pour l'amplification de gènes d'intérêt par RT-qPCR. Les échantillons sont en triplicat chacun dilué 50x. Une droite de calibration est ajustée à la dilution des échantillon

### iii) Analyse des résultats qPCR

L'expression relative des deux gènes d'intérêt (MGLL et IGLON5) sur base du gène de référence (18s) est calculée à l'aide de la méthode Pfaffl (Pfaffl, 2001). Cette méthode intègre l'efficacité des primers obtenue par une droite de calibration dans le calcul de l'expression relative de gènes.

Les valeurs d'expression relative des gènes d'intérêt sont, d'une part comparée à la moyenne de la quantité de 18s retrouvée dans les échantillons afin de standardiser ceux-ci

autour d'une valeur. Deuxièmement, l'expression relative entre les gènes sont comparées par un ratio avec la valeur d'expression la plus faible retrouvée parmi les échantillons. Ceci afin de déterminer la différence d'expression entre échantillon et tempéraments.

La normalité est testé via un test d'Agostino-Pearson. Si les résultats observent une distribution normale, un test de t non-pairé est réalisé, sinon un test non-paramétrique de Mann-Whitney est appliqué.

La corrélation entre score d'agressivité obtenu via l'ACP et expression relative des gènes cibles est aussi calculée.

L'ensemble des tests statistiques de ce paragraphe est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 7 ©.

## Partie III : Résultats

### 1) Résultats protéomiques

L'analyse des résultats protéomiques permet l'identification des protéines d'intérêt impliquées dans les traits comportementaux d'audace et d'agressivité chez le rivulus des mangroves. L'originalité de l'étude protéomique dans le cas présent repose non seulement sur l'absence de traitement apporté aux individus échantillonnés mais aussi sur l'absence de connaissances à priori pour la sélection des protéines d'intérêt. De ce fait, les résultats ont une portée exploratoire dont il faut tenir compte.

Tous les poissons expérimentaux ont été élevés dans des conditions environnementales similaires et ont été soumis aux mêmes tests comportementaux. De plus, cette analyse protéomique a pour objectif non seulement d'identifier des protéines d'intérêt impliquées dans les traits comportementaux et qui seront testées par expression relative de gènes (RT-qPCR), mais aussi de lever une partie du voile sur les processus biologiques mis en jeu dans l'expression de ces phénotypes comportementaux chez un animal-modèle à la variabilité génétique quasi nulle et soumis à un environnement constant et similaire.

L'analyse protéomique a conduit à l'identification d'un total de 1170 protéines par spectrométrie gel free/label free chez les individus du trait comportemental d'agressivité. Le dynamic range total sur lequel s'étend l'identification par la spectrométrie est de 4 ordres de magnitude.

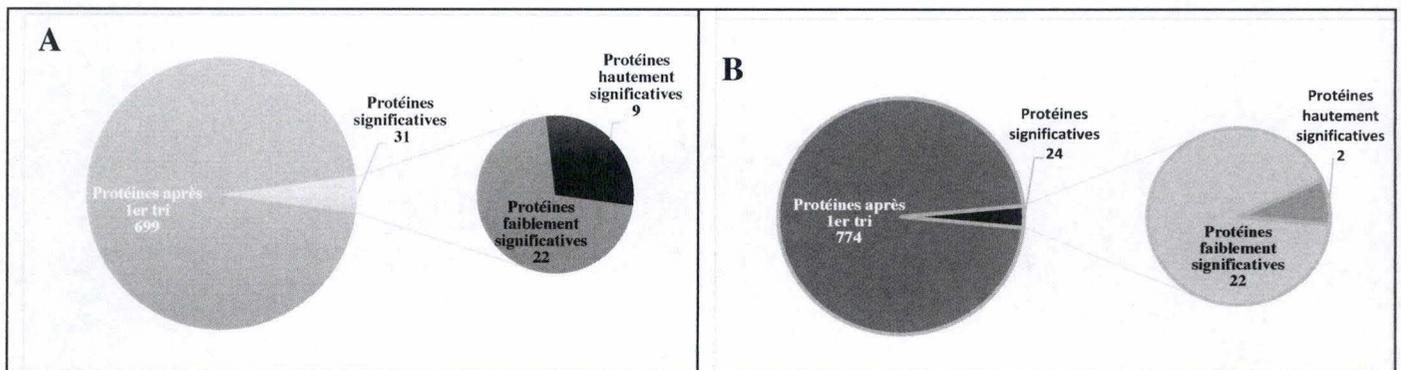


Figure 9. (A) Distribution des protéines identifiées pour le trait comportemental d'agressivité après premier tri ; (B) Distribution des protéines identifiées pour le trait comportemental d'audace après premier tri.

Après un premier tri éliminant les protéines non retrouvées dans au moins deux échantillons des triplicas et les protéines identifiées qu'à partir d'un seul peptide, leur nombre passe à 730. Parmi ces dernières, 31 protéines sont significatives selon les cut-offs décrits

précédemment (Cfr. Matériels et méthodes)[Tableau 3]. 6 protéines sont hautement significatives ( $-10\log P > 12$  et  $|\text{Fold Change}| \geq 2$ ) et les 22 autres sont faiblement significatives ( $-10\log P > 5$  et  $|\text{FC}| \geq 1,5$ ) [Figure 9A]. En tolérant des cut-offs de significativité différents, la sélection sur les protéines significatives est moins stricte. Bien que cela augmente le taux d'erreur de type I, cela permet néanmoins d'inclure de plus nombreuses protéines dans les analyses en aval. Dans le cadre d'une étude de protéomique exploratoire sur des phénotypes comportementaux non-traités dont l'objectif premier est d'identifier des protéines liées aux traits comportementaux, le risque d'erreur de type I est toléré. Chez les individus du trait comportemental d'audace, un total de 1211 protéines ont été détectées. Ce nombre passe à 774 après premier tri. Parmi ces dernières, 24 sont significatives dont 2 hautement significatives [Tableau 4 et Figure 9B]. Le dynamic range de l'ensemble des protéines du tempérament d'audace identifiées s'étend sur 6 ordres de magnitude.

D'après le diagramme de Venn de la Figure 10, parmi l'ensemble des protéines identifiées après premier tri pour les deux comportements étudiés, 160 protéines non significatives sont exclusivement retrouvées chez les individus du continuum audacieux et 117 dans le continuum agressivité. 596 protéines sont retrouvées dans les deux continuums parmi lesquelles 27 sont significatives chez les poissons agressif/non-agressifs et 19 sont significatives chez les individus audacieux/timides. Aucune protéine significative n'est similaire dans les deux tempéraments.

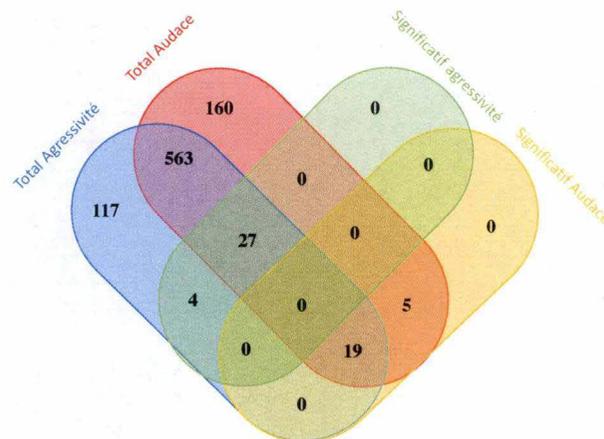


Figure 10. Diagramme de Venn reprenant le nombre total de protéines retrouvées après premier tri et les protéines significatives pour les deux traits comportementaux étudiés.

## a) Tempérament agressif

	Acc. Nos	Human Gene symbol	Protein annotation	Fold change	Significance	Cov (%)	Pep	Uni
<b>Amino acid metabolic process</b>								
	XP_017260604.1	DBT	lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial	1.87	6.74	4	2	2
<b>Apoptose</b>								
	XP_017275246.1	CYFIP2	cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 isoform X2	-1.99	12.67	3	3	3
	XP_017268925.1	ACYP1	acylphosphatase-1	-1.74	8.92	21	3	3
<b>Cytoskeleton/Muscle</b>								
	XP_017282065.1	TPPP	tubulin polymerization-promoting protein isoform X2	-1.51	6.89	34	9	9
	XP_017277413.1	PVALB	parvalbumin beta-like	1.93	14.55	68	7	4
	XP_017274088.1	PVALB	parvalbumin beta	2.13	12.04	61	5	3
<b>DNA duplication and protein synthesis</b>								
	XP_017278249.1	RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0	-2.40	14.57	12	3	3
	XP_017282783.1	RPS12	40S ribosomal protein S12	-3.41	8.71	14	2	2
<b>Generation of precursor metabolites and energy</b>								
	XP_017266650.1	NDUFV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	-1.50	12.99	30	5	5
	XP_017287312.1	IDH	isocitrate dehydrogenase [NADP], cytoplasmic	-1.92	9.23	16	6	4
	XP_017266781.1	MGLL	monoglyceride lipase isoform X2	-2.61	15.75	11	3	3
	XP_017293988.1	NME2	nucleoside diphosphate kinase B-like	5.97	13.84	19	2	2
<b>Lipid metabolism</b>								
	XP_017262455.1	VTG1 (chicken)	vitellogenin-1-like	-1.62	9.41	14	22	4
	XP_017268898.1	VTG2 (chicken)	vitellogenin-2-like	-2.28	8.88	3	4	4
	XP_017290041.1	EPHX2	bifunctional epoxide hydrolase 2	-1.58	5.24	9	4	4
	XP_017267793.1	HSD17B4	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	-2.87	5.67	4	2	2
<b>Nervous system developmental process/synaptic plasticity/neurotransmission</b>								
	XP_017274032.1	PPFIA3	liprin-alpha-3-like	2.73	6.18	6	6	2
	XP_017296511.1	SYN3	synapsin-3-like	1.94	9.26	23	5	3
	XP_017272881.1	ATL1	atlastin-1 isoform X2	-4.93	9.84	4	3	2
	XP_017279241.1	IGLON5	igLON family member 5	-2.81	6.03	7	2	2
<b>Signal transduction</b>								
	XP_017259420.1	GNA01	guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	-1.62	8.30	24	8	3
<b>Transport</b>								
	XP_017259715.1	EIF4H	eukaryotic translation initiation factor 4H isoform X3	1.68	5.76	21	4	3
	XP_017266110.1	AAK1	AP2-associated protein kinase 1-like	-1.58	6.71	7	4	4
<b>Other</b>								
	XP_017281090.1	C3	complement C3-like	1.75	10.28	9	6	4
	XP_017277223.1	HSPA12A	heat shock 70 kDa protein 12A isoform X5	-3.46	19.98	7	4	4
	XP_017260771.1	//	uncharacterized protein LOC108229612	1.65	7.65	17	4	4
	XP_017261229.1	ZP3	zona pellucida sperm-binding protein 3-like	-9.60	22.45	4	2	2
	XP_017270852.1	USP5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform X2	2.28	5.19	5	2	2
	XP_017266660.1	SERS1	serine-tRNA ligase, cytoplasmic	-1.63	7.97	8	4	4

Tableau 3. Classification des protéines significativement exprimées chez les tripliquas de *K. marmoratus* du trait comportemental d'agressivité. Les protéines sont regroupées par rôles principaux selon les bases de données Uniprot et NCBI. Le symbole du gène correspondant à chaque protéine est celui retrouvé chez *Homo sapiens* sauf si ce dernier n'exprime pas le gène. **Significance** exprime le niveau de significativité des protéines sur base de l'équation  $-10\log(P)$  intégrée au logiciel PeaksQ. **Acc. Nos.** correspond au numéros d'accension XP correspondant à la protéines dans la base de données NCBI. **Cov** désigne le pourcentage d'acides aminés retrouvés dans les peptides identifiés par rapport au nombre total d'acides aminés qui composent la séquence protéique. **Pep** indique le nombre de peptides sur lequel repose l'identification de la protéine. **Uni** indique le nombre de peptides retrouvés une seule fois par protéine dans chaque tripliqua. Les flèches indiquent les protéines hautement significatives ( $-10\log(P) \geq 12$  et  $|FC| > 2$ ).

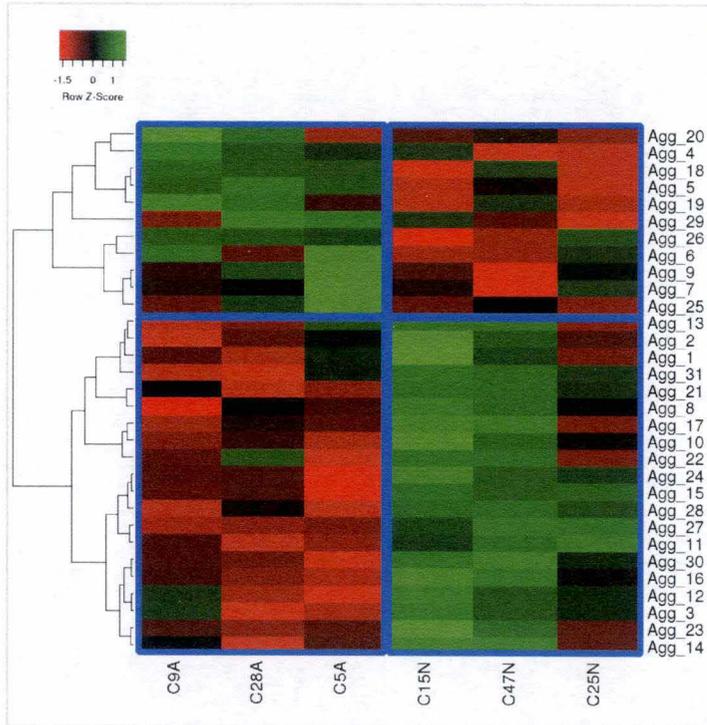
Dans les Tableaux 3 et 4, les protéines sont classées d'après leur fonctions annotées retrouvées dans la base de données UniProt.

Quand le FC noté dans le Tableau 3 est positif, la protéine est différentiellement plus abondante chez les individus agressifs que peu agressifs. A l'inverse le FC est négatif pour les protéines plus abondantes chez les individus peu agressifs. Après premier tri des protéines identifiées, 314 protéines ont un FC positif contre 416 avec FC négatif. Parmi les protéines significatives, 11 ont un FC positif et 19 un FC négatif. La diversité et l'abondance des protéines chez les individus peu agressifs est donc plus importante que chez les individus agressifs.

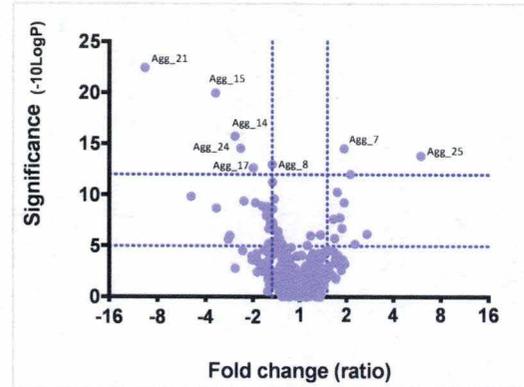
La figure 11B permet de représenter les protéines selon les cuts-off de FC et de significativité définis préalablement. La protéine la plus hautement significative est ZP3 [*Zona pellucida sperm binding protein 3* (Agg\_21)] dont le rôle dans la modulation des phénotypes comportementaux n'est pas connue à ce jour. Il en va de même pour les autres protéines hautement significatives. D'après les annotations UniProt, aucune de celles-ci ne joue un rôle biologique lié à des phénotypes comportementaux tels que par exemple le développement du système nerveux, la neurotransmission, la plasticité synaptique ou encore le transport de molécules.

L'analyse par clustering hiérarchique représentée dans la figure 11A sous forme de heatmap révèle 2x2 clusters d'abondance relative globalement opposée entre extrêmes comportementaux. Les protéines pour lesquelles la différence de FC est la plus marquée entre extrême comportementaux sont : RPLP0 [*60s acidic ribosomal protein P0* ](Agg\_24)], HSPA12A [*Heatshock 70kDA protein 12A Isoform* (Agg\_15)], RPS12 [*40s ribosomal protein 12* (Agg\_28)], ATL1 [*Atlastine 1* (Agg\_27)] et AAK1 [*AP2-associated protein kinase 1* (Agg\_11)]. Parmi ces dernières, seules RPLP0 et HSPA12A figurent parmi les protéines hautement significatives. Aucune de ces deux protéines ne joue un rôle actif connu dans la modulation du comportement chez les animaux. AAK1 joue un rôle de transport de molécules dans le cerveau, rôle plus directement lié à la modulation d'un phénotype comportemental. Dans le cadre de cette étude, les protéines impliquées dans les processus de développement cérébral, de neurotransmission et de plasticité synaptique selon les catégories définies par UniProt revêtent un intérêt majeur. Ainsi, ATL1 mérite une étude plus poussée. Dans le même registre, d'après la figure 11A, les protéines PPFIA3 [*Liprin-3- $\alpha$  like* (Agg\_5)] et SYN3 [*Synapsine 3* (Agg\_19)] sont intéressantes car la différence d'abondance relative entre extrêmes comportementaux est marquée.

**A**



**B**



**C**

Proteines	Human Gene Symbol	Heatmap & VolcanoPlot ID
vitellogenin-1-like	VTG1	Agg_1
guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	GNA01	Agg_2
tubulin polymerization-promoting protein isoform X2	TPPP	Agg_3
Complement C3-like	C3	Agg_4
liprin-alpha-3-like	PPFIA3	Agg_5
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0-like	HNRNPA0	Agg_6
parvalbumin beta-like	PVALB	Agg_7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 mitochondrial	NDUFV2	Agg_8
parvalbumin beta	PVALB	Agg_9
isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH	Agg_10
AP2-associated protein kinase 1-like	AAK1	Agg_11
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	Agg_12
vitellogenin-2-like	VTG2	Agg_13
monoglyceride lipase isoform X2	MGLL	Agg_14
heat shock 70 kDa protein 12A isoform X5	HSPA12A	Agg_15
serine--tRNA ligase cytoplasmic	SERS1	Agg_16
cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 isoform X2	CYFIP1	Agg_17
eukaryotic translation initiation factor 4H isoform X3	EIF4H	Agg_18
synapsin-3-like	SYN3	Agg_19
uncharacterized protein LOC108229612	//	Agg_20
zona pellucida sperm-binding protein 3-like	ZP3	Agg_21
bifunctional epoxide hydrolase 2	EPHX2	Agg_22
acylphosphatase-1	ACYP1	Agg_23
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	Agg_24
nucleoside diphosphate kinase B-like	NME2	Agg_25
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform X2	USP5	Agg_26
atlastin-1 isoform X2	ATL1	Agg_27
40S ribosomal protein S12	RPS12	Agg_28
lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex mitochondrial	DBT	Agg_29
peroxisomal multifunctional enzyme type 2	HSD17B4	Agg_30
igLON family member 5	IGLON5	Agg_31

Figure 11. **(A)** Heatmap hiérarchisée selon les abondances relatives en protéines significatives ( $|FC| \geq 1,5$  et  $-10\log P \geq 5$ ) chez les poissons du continuum d'agressivité (C=Contrôle, A=individu agressif, N= individu non agressif), cadre bleu = clusters ; **(B)** Volcano Plot du ratio de FC des abondances relatives des protéines exprimées chez les individus du continuum d'agressivité par rapport au score de significativité donné par PEAKS pour l'ensemble des protéines avec N>2 peptides. Le seuil de FC fixé à  $|1,5|$  et les seuils de significativité  $-10\log P \geq 5$  et  $-10\log P \geq 12$  sont représentés par les lignes pointillées. La correspondance entre les identifiants des protéines et le nom des protéines est repris dans le tableau (c) ; **(C)** Tableau de correspondance entre protéines significatives chez les individus du continuum d'agressivité et les figures 11B et C.

## b) Tempérament audacieux

	Acc. Nos	Human Gene Symbol	Protein annotation	Fold change	Significance	Cov (%)	Pep	Uniq
<b>Apoptose</b>								
	XP_017264012.1	PPM1H	protein phosphatase 1H-like	-2.40	5.90	7	2	2
<b>Chromatin organization</b>								
	XP_024858097.1		histone H3-like	-1.91	6.94	26	21	3
➔	XP_017290663.1	HISTH1L	histone H1-like	-2.81	7.67	17	5	3
<b>Cytoskeleton/Muscle</b>								
	XP_017263871.1	CFL1	cofilin-1	-1.93	9.33	70	15	13
	XP_017274226.1	TLN2	talin-2 isoform X2	-1.55	7.92	5	11	3
	XP_017266633.1	MYL2	myosin regulatory light chain 2 smooth muscle minor isoform	-2.35	5.92	12	2	2
	XP_017274197.1	MYO5A	unconventional myosin-Va isoform X7	-3.32	5.26	2	2	2
	XP_017294077.1	TBCA	tubulin-specific chaperone A	-1.94	5.38	30	2	2
<b>DNA duplication and protein synthesis</b>								
	XP_017286470.1	EF1A1	elongation factor 1-alpha 1	-2.17	5.90	42	12	3
<b>Generation of precursor metabolites and energy</b>								
	XP_017273004.1	ETFDH	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	-1.75	10.26	8	4	4
<b>Lipid metabolism</b>								
	XP_017267781.1	ACAA2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	-2.18	8.32	58	16	16
	XP_017286705.1	ACADS	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	1.93	9.20	6	2	2
	XP_017288035.1	ACSL3	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3-like	-1.55	7.98	5	2	2
<b>Nervous system developmental process/synaptic plasticity/neurotransmission</b>								
	XP_017277111.1	DPYL5 (Salmo salar)	dihydropyrimidinase-related protein 5-like isoform X2	1.55	6.39	57	24	13
	XP_017274935.1	BCAT	branched-chain-amino-acid aminotransferase cytosolic-like isoform X1	-1.54	6.70	16	6	6
<b>Protein metabolic process</b>								
➔	XP_017265301.1	PSMA2	proteasome subunit alpha type-2	-3.79	14.14	19	4	3
	XP_017286930.1	PSMF1	proteasome inhibitor PI31 subunit	-1.68	5.17	16	4	4
<b>Signal transduction</b>								
	XP_017287475.1	PAK3	serine/threonine-protein kinase PAK3 isoform X2	-1.76	5.25	7	3	3
<b>Transport</b>								
	XP_017275536.1	CLTC	clathrin heavy chain 1-like isoform X4	-1.53	5.71	13	18	3
	XP_017267855.1	CLTC	clathrin heavy chain 1-like isoform X2	-2.02	10.13	10	14	6
	XP_017293914.1	EIF5A1	eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	1.55	5.52	32	4	3
<b>Other</b>								
	XP_017293263.1	BCKDHA	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	2.18	7.74	25	8	8
	XP_017265654.1	UCHL3	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	1.50	5.90	43	8	8

Tableau 4. Classification des protéines significativement exprimées chez les tripliquas de *K. marmoratus* du trait comportemental d'audace. Les protéines sont regroupées par rôles principaux selon les bases de données Uniprot et NCBI. Le symbole du gène correspondant à chaque protéine est celui retrouvé chez *Homo sapiens* sauf si ce dernier n'exprime pas le gène. **Significance** exprime le niveau de significativité des protéines sur base de l'équation  $-10\log(P)$  intégrée au logiciel PeaksQ. **Acc. Nos.** correspond au numéros d'accension XP correspondant à la protéines dans la base de données NCBI. **Cov** désigne le pourcentage d'acides aminés retrouvés dans les peptides identifiés par rapport au nombre total d'acides aminés qui composent la séquence protéique. **Pep** indique le nombre de peptides sur lequel repose l'identification de la protéine. **Uniq** indique le nombre de peptides retrouvés une seule fois par protéine dans chaque tripliqua. Les flèches indiquent les protéines hautement significatives ( $-10\log P \geq 12$  et  $|FC| > 2$ ).

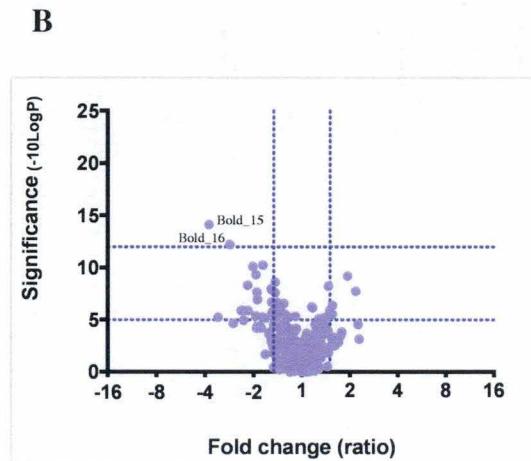
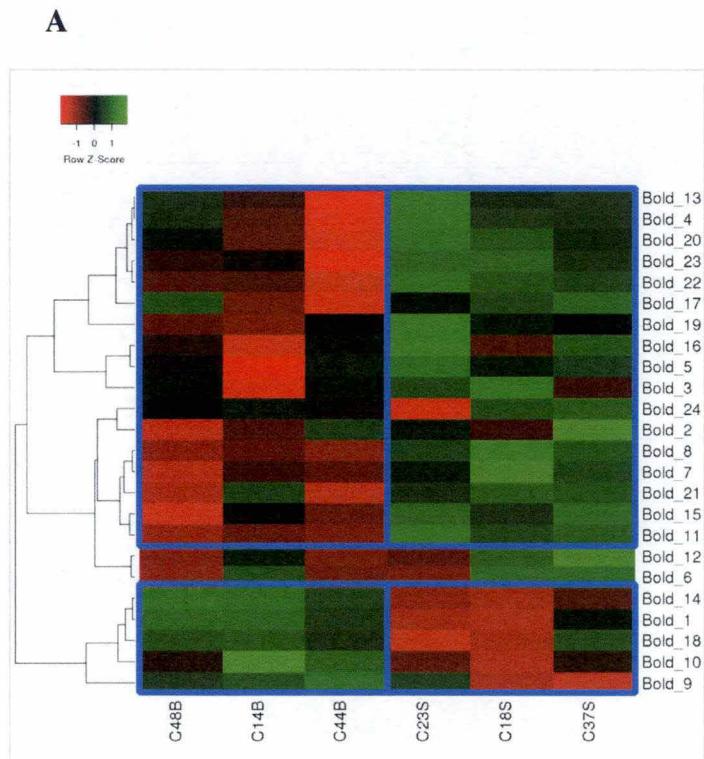
Quand le FC noté dans le Tableau 4 est positif, la protéine est différentiellement plus abondante chez les individus audacieux que timides. A l'inverse le FC est négatif pour les protéines plus abondantes chez les individus timides. Après premier tri des protéines identifiées, 264 protéines ont un FC positif contre 509 avec FC négatif.

Parmi les protéines significatives, 5 ont un FC positif et 19 un FC négatif. La diversité et l'abondance des protéines chez les individus timides est donc plus importante que chez les individus audacieux.

Les protéines hautement significatives sont le PSMA2 [*Proteasome subunit  $\alpha$  type 2* (Bold\_15)] et HSTH1L [*Histone H1-like* (Bold\_16)]. La première est impliquée dans le métabolisme des protéines et la seconde dans l'organisation de la chromatine dans l'ADN selon la base de données Uniprot.

La figure 12A dévoile l'existence de 2x2 clusters de protéines selon leur abondance relative. Malgré qu'il soit possible de distinguer ces clusters, le peu d'uniformité dans les couleurs au sein de chacun des clusters démontre aussi la grande variabilité dans l'abondance de protéines entre poissons de même extrême comportemental. Cependant, il est tout de même possible de distinguer certaines protéines dont l'abondance relative entre extrêmes audacieux est marquée.

Parmi les protéines jouant un rôle dans la neurotransmission, le développement cérébral et le développement neuronal, seule BCAT (Bold\_11) expose une différence d'abondance marquée entre les individus d'extrêmes comportementaux opposés. Notons d'ailleurs que ces rôles sont peu représentés parmi les protéines significatives mises à jour. Toujours sur base de la figure 12A, la protéine TLN2 [*Taline-2* (Bold\_7)] apparaît aussi comme différentiellement abondante entre les individus audacieux et les individus timides. Cette protéine, principalement impliquée dans l'assemblage des filaments d'actines et du cytosquelette, semble également jouer un rôle dans les synapses et dans les comportements d'agressivité comme le suggèrent de récentes études (Bell, Bukhari and Sanogo, 2016). Ce point sera notamment plus développé dans la discussion.



**C**

Protéines	Human Gene Symbol	Heatmap & VolcanoPlot ID
dihydropyrimidinase-related protein 5-like isoform X2	DPYL5	Bold_1
uncharacterized protein LOC108249815	//	Bold_2
clathrin heavy chain 1-like isoform X4	CLTC	Bold_3
cofilin-1	CFL1	Bold_4
clathrin heavy chain 1-like isoform X2	CLTC	Bold_5
3-ketoacyl-CoA thiolase mitochondrial	ACAA2	Bold_6
talin-2 isoform X2	TLN2	Bold_7
elongation factor 1-alpha 1	EF1A1	Bold_8
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha mitochondrial	BCKDHA	Bold_9
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	UCHL3	Bold_10
branched-chain-amino-acid aminotransferase cytosolic-like isoform X1	BCAT	Bold_11
histone H1-like	HISTH1L	Bold_12
electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase mitochondrial	ETFDH	Bold_13
eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	EIF5AL1	Bold_14
proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	Bold_15
histone H3-like	HISTH3L	Bold_16
proteasome inhibitor PI31 subunit	PSMF1	Bold_17
short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial	ACADS	Bold_18
myosin regulatory light chain 2 smooth muscle minor isoform	MYL2	Bold_19
serine/threonine-protein kinase PAK 3 isoform X2	PAK3	Bold_20
unconventional myosin-Va isoform X7	MYO5A	Bold_21
protein phosphatase 1H-like	PPM1H	Bold_22
long-chain-fatty-acidCoA ligase 3-like	ACSL3	Bold_23
tubulin-specific chaperone A	TBCA	Bold_24

Figure 12. **(A)** Heatmap hiérarchisée selon les abondances relatives en protéines significatives ( $|FC| \geq 1,5$  et  $-10 \log P \geq 5$ ) chez les poissons du continuum d'audace (C= Contrôle, B= individu audacieux, S= individu timide), cadres bleus = cluster ; **(B)** Volcano Plot du FC des abondances relatives des protéines exprimées chez les individus du continuum d'audace par rapport au score de significativité donné par PEAKS pour l'ensemble des protéines avec N>2 peptides. Le seuil de FC fixé à  $|1,5|$  et les seuils de significativité  $-10 \log P \geq 5$  et  $-10 \log P \geq 12$  sont représentés par les lignes pointillées. La correspondance entre les identifiants des protéines et le nom des protéines est repris dans le tableau (c) ; **(C)** Tableau de correspondance entre protéines significatives chez les individus du continuum d'audace et les figures 12B et C.

## 2) Gene Ontology

### a) Aspects généraux

Les résultats obtenus pour l'analyse GO sont regroupés dans les tableaux 5 et 6. Les termes GO correspondant aux processus biologiques mis en jeu dans cette expérience sont classés par ordre de significativité sur base des analyses statistiques par Test exact de Fisher. Le test de Fisher se justifie ici car l'objectif statistique poursuivi est de comparer le nombre de protéines significatives détectées lors de l'analyse protéomique qui correspondent à un certain terme GO avec l'ensemble des protéines annotées associées à ce même GO.

Pour rappel, les protéines significatives dont le fold-change est négatif pour le trait comportemental d'agressivité sont relatives aux individus extrêmes non-agressifs. Le fold-change est positif pour les individus extrêmes agressifs. Similairement, dans le continuum d'audace où les protéines significatives avec un fold-change positif sont celles retrouvées chez les individus extrêmes audacieux et celles avec un fold-change négatif sont celles retrouvées chez les individus timides.

Selon l'analyse d'enrichissement par Gene Ontology, les processus biologiques les plus significatifs mis en jeu chez l'ensemble des individus des continuums audacieux et agressifs sont différents selon que leur fold-change est positif ou négatif.

### b) Analyse par Gene Ontology du trait comportemental d'agressivité

Pour les protéines exprimées chez les individus non-agressifs, le processus biologique de régulation de l'endocytose est le plus significatif ( $p\text{-val}=0.00279$ ) [Tableau 5 et Figure 13A]. Comme démontré dans la Figure 13A, de multiples termes GO aboutissent à ce rôle dont notamment la voie impliquant les processus biologiques de régulation du transport. Bien que moins significatives, d'autres voies biologiques sont aussi explorées. De fait, le processus biologique de réponse aux lipides ( $p\text{-val}=0.016$ ) occupe une voie indépendante. Il en va de même pour la voie menant à la phagocytose ( $p\text{-val}=0.01931$ ). Notons que le processus biologique impliquant la voie de signalisation des récepteurs à dopamine ( $p\text{-val} = 0.1862$ ), bien que non significative, est retrouvée parmi les 20 termes GO les plus significatifs.

	Classement	GO.ID	Terme GO	Nombre de gènes annotés au terme GO	Nombre de gènes correspondant au terme GO	Nombre attendu	Test de Fisher (p-valeur)
Protéines négativement exprimées chez les individus agressifs	1	GO:0030100	regulation of endocytosis	15	3	0.3	0.0028
	2	GO:0033993	response to lipid	10	2	0.2	0.016
	3	GO:0006911	phagocytosis, engulfment	11	2	0.22	0.0193
	4	GO:0051050	positive regulation of transport	14	2	0.28	0.0308
	5	GO:0009410	response to xenobiotic stimulus	18	2	0.37	0.0493
	6	GO:0048675	axon extension	21	2	0.43	0.0653
	7	GO:1901700	response to oxygen-containing compound	22	2	0.45	0.071
	8	GO:0006412	translation	65	3	1.32	0.1401
	9	GO:0009966	regulation of signal transduction	69	3	1.4	0.1596
	10	GO:0051130	positive regulation of cellular component organization	39	2	0.79	0.1858
	11	GO:0006399	tRNA metabolic process	10	1	0.2	0.1862
	12	GO:0006869	lipid transport	10	1	0.2	0.1862
	13	GO:0007212	dopamine receptor signaling pathway	10	1	0.2	0.1862
	14	GO:0019953	sexual reproduction	10	1	0.2	0.1862
	15	GO:0033333	fin development	10	1	0.2	0.1862
	16	GO:0007188	adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway	11	1	0.22	0.2029
	17	GO:0007498	mesoderm development	12	1	0.24	0.2193
	18	GO:0008037	cell recognition	12	1	0.24	0.2193
	19	GO:0050908	detection of light stimulus involved in visual perception	12	1	0.24	0.2193
	20	GO:0060042	retina morphogenesis in camera-type eye	12	1	0.24	0.2193
Protéines positivement exprimées chez les individus agressifs	1	GO:0007269	neurotransmitter secretion	16	2	0.12	0.006
	2	GO:0009206	purine ribonucleoside triphosphate biosy...	19	2	0.15	0.0085
	3	GO:0009152	purine ribonucleotide biosynthetic proce...	24	2	0.19	0.0135
	4	GO:0043627	response to estrogen	10	1	0.08	0.0755
	5	GO:0046128	purine ribonucleoside metabolic process	11	1	0.09	0.0828
	6	GO:0044272	sulfur compound biosynthetic process	12	1	0.09	0.09
	7	GO:0050908	detection of light stimulus involved in ...	12	1	0.09	0.09
	8	GO:0006914	autophagy	13	1	0.1	0.0972
	9	GO:0009108	coenzyme biosynthetic process	13	1	0.1	0.0972
	10	GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	18	1	0.14	0.1323
	11	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	19	1	0.15	0.1392
	12	GO:0030900	forebrain development	20	1	0.16	0.146
	13	GO:0008283	cell proliferation	21	1	0.16	0.1528
	14	GO:0031324	negative regulation of cellular metaboli...	21	1	0.16	0.1528
	15	GO:0051172	negative regulation of nitrogen compound...	21	1	0.16	0.1528
	16	GO:0006165	nucleoside diphosphate phosphorylation	22	1	0.17	0.1596
	17	GO:0070647	protein modification by small protein co...	22	1	0.17	0.1596
	18	GO:0010605	negative regulation of macromolecule met...	23	1	0.18	0.1663
	19	GO:0009953	dorsal/ventral pattern formation	25	1	0.19	0.1795
	20	GO:0007005	mitochondrion organization	27	1	0.21	0.1926

Tableau 5. Classement des 20 termes GO correspondant au processus biologiques les plus significatifs à partir des protéines issues du premier tri chez les individus du trait comportemental d'agressivité (protéines retrouvées dans au moins deux échantillons des tripliqués et les protéines identifiées à partir d'au moins deux peptides). Le classement est obtenu sur base d'un test exact de Fisher comparant le nombre de gènes soumis au programme et qui sont retrouvés parmi l'ensemble des gènes correspondant à une annotation avec le nombre de gènes attendus corespondant à cette même annotation. Résultats obtenus avec le package TopGo de R

Toujours pour le trait comportemental d'agressivité mais pour les individus agressifs, deux processus biologiques distincts ressortent significativement [Tableau 5 et Figure 13B]. Le premier est la sécrétion de neurotransmetteurs (p-val= 0.00501). Ce terme est soutenu par 4 voies biologiques significatives qui sont (1) la régulation de neurotransmetteurs (pval=0.0092), (2) le transport de neurotransmetteurs (pval= 0.01346), (3) l'émission de signaux par les synapses (p-val=0.00604), (4) les mécanismes présynaptiques impliqués dans la transmission de signaux dans les synapses (p-val=0.0604).

D'autre part, le second processus biologique mis en évidence est celui composé d'acteurs moléculaires dans la biosynthèse de purines (p-val = 0.00850).

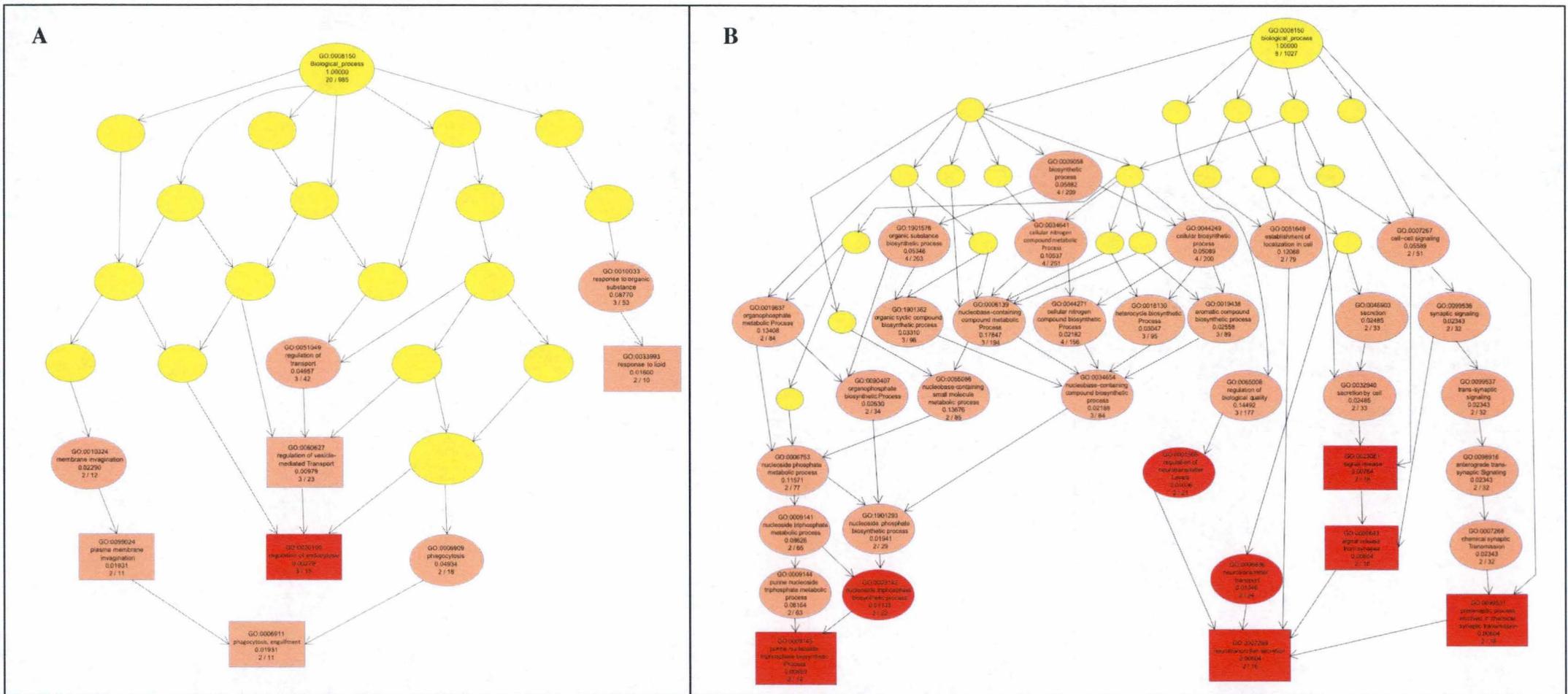


Figure 13. Processus biologiques impliqués chez les poissons du tempérament d'agressivité pour les protéines significatives dont le fold-change est négatif (A) et positif (B). A chaque nœuds sont exprimés le terme GO, le nom du terme GO, la statistique associée selon un Test exact de Fisher, le nombre significatif de protéines associées au terme GO par rapport au nombre total de protéines annotées respectivement pour ce terme. Les rectangles indiquent les 5 termes les plus significatifs. Les couleurs représentent la significativité relative entre termes GO s'étalant du rouge foncé (plus significatifs) au jaune pâle (moins significatifs).

### c) Analyse par Gene Ontology du trait comportemental d'audace

	Classement	GO.ID	Terme GO	Nombre de gènes annotés au terme GO	Nombre de gènes correspondant au terme GO	Nombre attendu	Test de Fisher (p-valeur)
Protéines négativement exprimées chez les individus audacieux	1	GO:0006334	nucleosome assembly	11	2	0.2	0.016
	2	GO:0035051	cardiocyte differentiation	12	2	0.22	0.019
	3	GO:0048738	cardiac muscle tissue development	12	2	0.22	0.019
	4	GO:0045214	sarcomere organization	17	2	0.31	0.037
	5	GO:0007018	microtubule-based movement	19	2	0.35	0.046
	6	GO:0006886	intracellular protein transport	29	2	0.54	0.098
	7	GO:0032268	regulation of cellular protein metabolism	30	2	0.56	0.104
	8	GO:0061371	determination of heart left/right asymmetry	31	2	0.57	0.11
	9	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	32	2	0.59	0.116
	10	GO:0006468	protein phosphorylation	38	2	0.7	0.154
	11	GO:0032984	macromolecular complex disassembly	23	2	0.43	0.065
	12	GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	10	1	0.19	0.171
	13	GO:0098742	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	10	1	0.19	0.171
	14	GO:0008016	regulation of heart contraction	11	1	0.2	0.187
	15	GO:0016311	dephosphorylation	11	1	0.2	0.187
	16	GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	11	1	0.2	0.187
	17	GO:0051336	regulation of hydrolase activity	12	1	0.22	0.202
	18	GO:0055113	epiboly involved in gastrulation with mouth forming second	12	1	0.22	0.202
	19	GO:0001878	response to yeast	13	1	0.24	0.217
	20	GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	13	1	0.24	0.217
Protéines positivement exprimées chez les individus audacieux	1	GO:0048483	autonomic nervous system development	10	1	0.04	0.038
	2	GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	11	1	0.04	0.042
	3	GO:0032270	positive regulation of cellular protein metabolic process	11	1	0.04	0.042
	4	GO:0043244	regulation of protein complex disassembly	12	1	0.05	0.046
	5	GO:0048936	peripheral nervous system neuron axonogenesis	13	1	0.05	0.05
	6	GO:0006414	translational elongation	14	1	0.05	0.053
	7	GO:0010557	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	14	1	0.05	0.053
	8	GO:0009062	fatty acid catabolic process	16	1	0.06	0.061
	9	GO:0043624	cellular protein complex disassembly	17	1	0.07	0.065
	10	GO:0021602	cranial nerve morphogenesis	20	1	0.08	0.076
	11	GO:0031328	positive regulation of cellular biosynthetic process	20	1	0.08	0.076
	12	GO:0031103	axon regeneration	21	1	0.08	0.079
	13	GO:0090287	regulation of cellular response to growth factor stimulus	21	1	0.08	0.079
	14	GO:0070647	protein modification by small protein conjugation or removal	22	1	0.09	0.083
	15	GO:0045664	regulation of neuron differentiation	23	1	0.09	0.087
	16	GO:0007411	axon guidance	27	1	0.11	0.101
	17	GO:0010628	positive regulation of gene expression	27	1	0.11	0.101
	18	GO:0007165	signal transduction	153	2	0.6	0.108
	19	GO:0031344	regulation of cell projection organization	29	1	0.11	0.108
	20	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process	32	1	0.12	0.119

Tableau 6. Classement des 20 termes GO correspondant au processus biologiques les plus significatifs à partir des protéines issues du premier tri (protéines retrouvées dans au moins deux échantillons des tripliques et les protéines identifiées à partir d'au moins deux peptides) chez les individus du trait comportemental d'audace. Le classement est obtenu sur base d'un test exact de Fisher comparant le nombre de gènes soumis au programme et qui sont retrouvés parmi l'ensemble des gènes correspondant à une annotation avec le nombre de gènes attendus corespondant à cette même annotation. Résultats obtenus avec le package TopGo de R

Premièrement, pour les protéines retrouvées chez les individus timides, cinq termes GO sont significativement retrouvés ( $p < 0.05$ ) [Tableau 6 et Figure 14A]. Cependant, aucun de ceux-ci ne semble d'intérêt dans une étude portant sur le comportement car ils sont soit trop généraux (assemblage du nucléosome ( $p\text{-val} = 0.016$ ) ou mouvement basé sur les microtubules ( $p\text{-val} = 0.046$ )) ou sont relatifs à la structure cellulaire cardiaque et musculaire (différentiation des cardiocytes ( $p\text{-val} = 0.019$ ), développement du tissu musculaire cardiaque ( $p\text{-val} = 0.019$ ), organisation des sarcomères ( $p\text{-val} = 0.037$ )). Notons que trois voies différentes impliquant des processus biologiques significatifs aboutissent à celui de l'assemblage du nucléosome. Ceci démontre tout de même l'importance de celui-ci sur base des protéines significatives

retrouvées chez les individus timides. Parmi les 20 termes GO les plus significatifs chez les individus timides, aucun n'est directement relatif aux processus neuraux et à la neurotransmission.

Ensuite, chez les individus audacieux, deux des cinq processus métaboliques significativement retrouvés sont directement impliqués dans la neurotransmission (développement du système nerveux autonome (p-val=0.038) et axogénèse des neurones du système nerveux périphérique) [Tableau 6 et Figure 14B]. D'autres processus retrouvés parmi les 20 processus les plus significatifs sont également impliqués dans l'ensemble des processus neuraux (régénération des axones (p-val = 0.079, régulation de la différenciation neuronale (p-val = 0.087), guidage des axones (p-val = 0.101), transduction de signaux (p-val = 0.108)).

Le réseau obtenu sur la Figure 14B montre aussi que les protéines significatives des individus audacieux impliquent de nombreux processus métaboliques. Parmi ceux-ci, le terme GO reprenant les processus métaboliques de manière générale est fortement impliqué (régulation positive des protéines cellulaires impliqués dans des processus métaboliques (p-val = 0.042).



### 3) Expression relative des gènes d'intérêt par RT-qPCR

Les gènes choisis pour l'étude d'expression relative l'ont été de façon concertée entre résultats protéomiques apportés par la spectrométrie de masse et des connaissances bibliographiques (cfr. Partie IV Discussion)

#### a) Préparation des échantillons : extraction d'ARN, traitement DNase, transcription inverse (RT)

L'ARN des 14 cerveaux de *K. marmoratus* était déjà disponible et de bonne qualité sur base des analyses NanoDrop et gel d'électrophorèse. Tous les individus ont pu être traités à la DNase et leur ARN transformé en ADNc par transcription inverse.

#### b) Design et efficacité des primers

Sur les 5 gènes d'intérêt choisis, seuls 3 ont pu être efficacement amplifiés : La monoglycérine lipase (MGLL) , la taline 2 (TLN2) et IGLON5 [Tableau 7]. Les autres primers n'ont pas une efficacité rentrant dans nos critères de sélection. La taline 2, bien que suffisamment efficace d'après la droite de calibration, n'est cependant pas sélectionnée pour la suite des manipulations. En effet, sur base d'un gel d'électrophorèse 2%, aucun amplicon n'apparaît pour les plus fortes dilutions [Annexe 2]. Les gènes de références  $\beta$ -Actine et 18s, seul 18s peut être utilisé comme gène de référence unique. Le primer correspondant au gène de  $\beta$ -actine ne présente pas une efficacité et une stabilité suffisante.

Gènes	Primers	Taille	%GC	Tm (°C)	Taille amplicon (pb)	Efficacité
Monoglycérine lipase (MGLL)	F : AGAGACCCAGTGATTTGCA	20	50.0	59.02	111	93.65%
	R : GCATGTGGTTCAGGAGCTTC	20	55.0	59.19		
IgLON5	F : GTGCGTTTGGATTGCTCCTT	20	50.0	59.13	184	104.68%
	R : GAGTTGTCGTGCGTCTGATG	20	55.0	59.29		
<b>Gènes de référence</b>						
18S	F : GAACTCACCGACACCAGCA	19	58.0	56	105	101.72%
	R : ATCATCGACGCTCCTGGA	18	56.0	54		

Tableau 7. Liste des primers dont l'efficacité est suffisante (entre 90 et 110%) et de leurs caractéristiques.

#### c) Analyse de l'expression des gènes cibles

Seuls des gènes impliqués dans le trait comportemental d'agressivité ont pu être amplifiés. L'analyse de l'expression relative des gènes par RT-qPCR ne portera donc pas sur le trait comportemental d'audace.

Rappelons également que la RT-qPCR réalisée dans le cadre de ce mémoire fonctionne sans à priori. C'est-à-dire qu'aucun des individus n'a été soumis à un traitement et que leur

trait comportemental est uniquement obtenu via les tests comportementaux expliqués dans la partie Matériels et Méthodes. Les niveaux d'expression relative obtenus pour chacun des gènes ne peuvent donc pas être comparés avec des échantillons contrôles. De ce fait, les niveaux d'expression sont normalisés autour de l'expression relative moyenne du gène de référence 18s afin de situer leur niveau d'expression général [Tableau 8]. Ainsi, les graphes retrouvés à la figure 15 illustrent l'expression relative des gènes MGLL et IGLON5 entre les individus très agressifs et peu agressifs. La distribution des résultats est normale. Les données sont donc analysées par tests de T non-pairés.

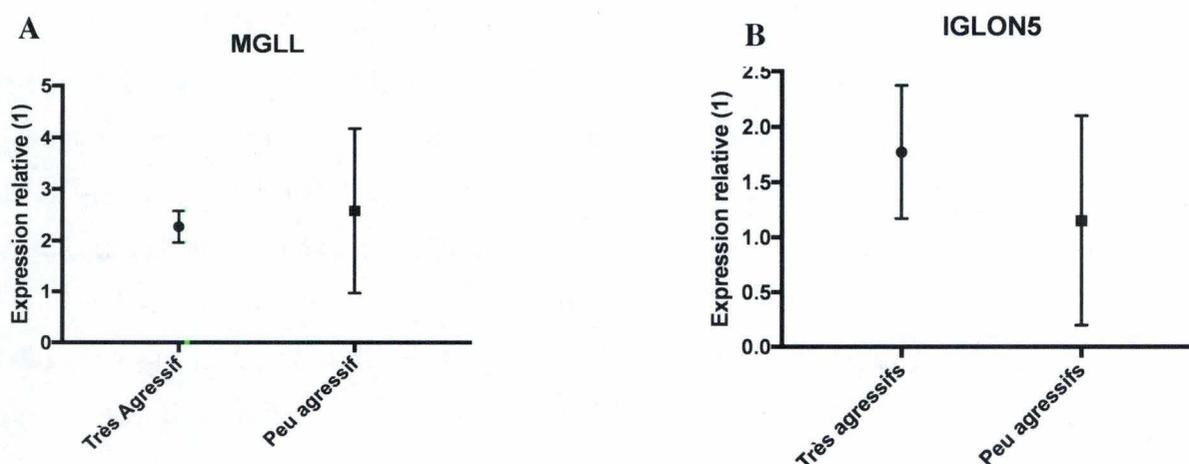


Figure 15. (A) Expression relative (1) du gène codant pour la monoglycéride lipase dans le cerveau du *Kryptolebias marmoratus* par rapport au gène de référence 18s. N=6. Les données ont été analysées par un test de T non-pairé. Il n'y a pas de différence significative entre les individus très agressifs et les individus peu agressifs (p-val = 0.76). (B) Expression relative (1) du gène codant pour la protéine IGLON5 dans le cerveau du *Kryptolebias marmoratus* par rapport au gène de référence 18s. N=6. Les données ont été analysées par un test de T non-pairé. Il n'y a pas de différence significative entre les individus très agressifs et les individus peu agressifs (p-val = 0.39)

L'expression relative du gène de la monoglycéride lipase (MGLL) ne varie pas de façon significative entre les individus très agressifs et les individus peu agressifs (P-val = 0.76) [Figure 15A].

L'expression relative du gène IGLON5 ne varie pas non plus de façon significative entre les individus très agressifs et les individus peu agressifs (p-val = 0.39) [Figure 15B].

	Individus	MGLL		IGLON5	
		Ratio MGLL/18s	Ratio par rapport à Ctl38	Ratio IGLON5/18s	Ratio par rapport à Ctl382
Très agressifs	Ctl12	1.92	1.83	1.22	13.16
	Ctl45	2.49	2.37	1.68	18.09
	Ctl35	2.41	2.29	2.41	25.97
Peu agressifs	Ctl38	1.05	1.00	0.09	1.00
	Ctl40	4.25	4.04	1.42	15.32
	Ctl36	2.43	2.32	1.93	20.81

Tableau 8. Expression relative des gènes de monoglycérade lipase (MGLL) et IGLON5 chez les individus très agressifs et peu agressifs. Les colonnes « ratios "gène d'intérêt"/18s » reprennent les valeurs d'expression relative obtenus par la méthode de Pfaff normalisées par rapport à l'expression relative moyenne du gène de référence 18s ; les colonnes « ratios par rapport à Ctl38 » compare les valeurs d'expression relative avec la valeur d'expression relative la plus faible (Ctl38) obtenue parmi l'ensemble des individus.

Afin de mieux percevoir l'expression relative moyenne des gènes d'intérêt entre les échantillons, les valeurs d'expression relative ont été comparées avec la valeur la plus faible retrouvée parmi tous les individus testés [Figure 16 et Tableau 8]. Ce dernier est un individu peu agressif (Ctl38). Comme il s'agit ici uniquement d'une visualisation différente des mêmes résultats que pour la figure 15, les tests statistiques produisent exactement les mêmes p-valeurs. Même si ces résultats ne sont pas significatifs, il est tout de même possible de voir que l'expression relative des gènes varie de façon importante entre les individus d'un même extrême comportemental. En effet, pour MGLL, l'expression relative individuelle varie jusqu'à 4.04 fois plus par rapport à l'individu pour lequel le gène est le moins exprimé [Tableau 8]. Pour IGLON5, cette variation s'étend jusqu'à 25.97 fois plus

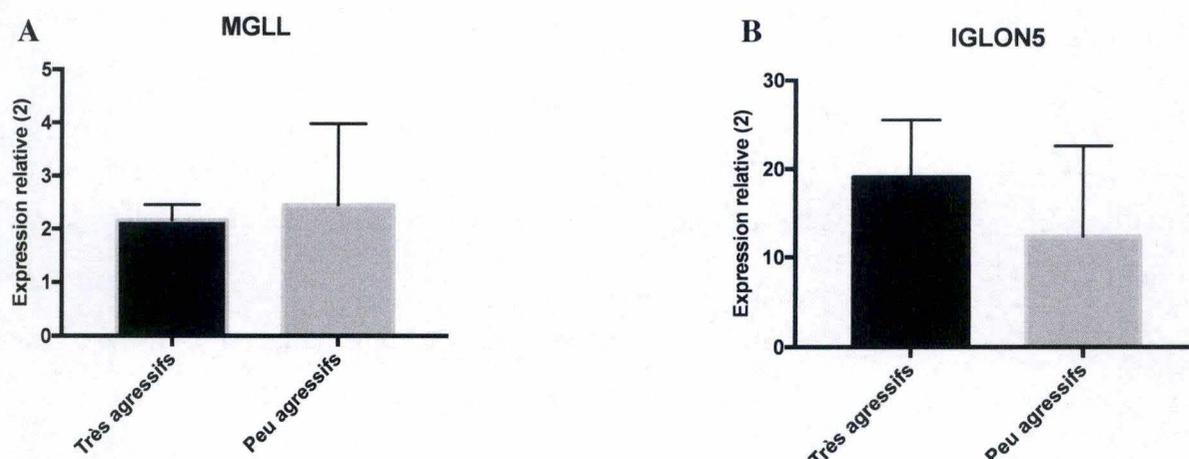


Figure 16. (A) Expression relative (2) du gène codant pour la monoglycérade lipase dans le cerveau du *Kryptolebias marmoratus* par rapport à l'expression relative la plus faible (Ctl38) retrouvée parmi les échantillons analysés. N=6. Les données ont été analysées par un test de T non-pairé. Il n'y a pas de différence significative entre les individus très agressifs et les individus peu agressifs (p-val = 0.76). (B) Expression relative (2) du gène codant pour la protéine IGLON5 dans le cerveau du *Kryptolebias marmoratus* par rapport à l'expression relative la plus faible (Ctl38) retrouvée parmi les échantillons analysés. N=6. Les données ont été analysées par un test de T non-pairé. Il n'y a pas de différence significative entre les individus très agressifs et les individus peu agressifs (p-val = 0.39).

#### d) Corrélation entre score d'agressivité et expression relative

La corrélation de Pearson entre les scores d'audace obtenus par ACP sur les individus et l'expression relative des gènes d'intérêt ne révèle pas de résultats significatifs [Tableau 9 et Annexe 1].

Corrélation de Pearson (r)	Score d'agressivité	MGLL	IgLON5
Score d'agressivité	1	-0.010	-0.500
MGLL	-0.010	1	0.469
IgLON5	-0.500	0.469	1

Tableau 9. Coefficient de corrélation de Pearson (r) entre le score d'agressivité obtenu pour chaque échantillon sur base du test comportemental d'agressivité et le niveau d'expression relative des gènes de monoglycéride lipase (*mgll*) et *IgLON5* potentiellement impliqués dans l'agressivité. Il n'y a pas de corrélation significative.

Il est important de noter que pour l'ensemble des analyses d'expression relative de gènes, un faible échantillonnage est utilisé (N=6 individus répartis en 2x3 individus par niveau d'agressivité). Ceci sera plus amplement discuté par la suite.

## Partie IV : Discussion

Parmi les études protéomiques menées sur les poissons, nombreuses sont celles qui s'intéressent à l'effet d'un traitement tel qu'un polluant ou une condition environnementale spécifique (température, salinité, etc) sur la physiologie d'un organisme sans s'intéresser directement aux phénotypes comportementaux. Ceci est d'autant plus vrai chez le *K. marmoratus* sur lequel relativement peu d'études protéomiques ont été menées à ce jour. Pour illustrer ceci, la Figure 17 reprend le nombre de résultats obtenus à la date du 15 août 2019 dans la base de données de littérature scientifique Scopus pour des recherches utilisant des mots-clefs d'intérêt dans le cadre de ce mémoire. Ces résultats, loin d'être exhaustifs, démontrent tout de même du peu de publications portant non seulement sur le rivulus des mangroves mais aussi sur l'étude du comportement au-travers de la protéomique. De plus, la plus ancienne publication trouvée grâce aux mots-clefs « Kryptolebias », « protein » et « behaviour » date de 2006 (Litwiller, 2006). Ceci s'explique notamment par le fait que cette espèce de poisson est considérée comme un animal-modèle depuis peu et que les technologies permettant des études protéomiques avancées sont relativement récentes.

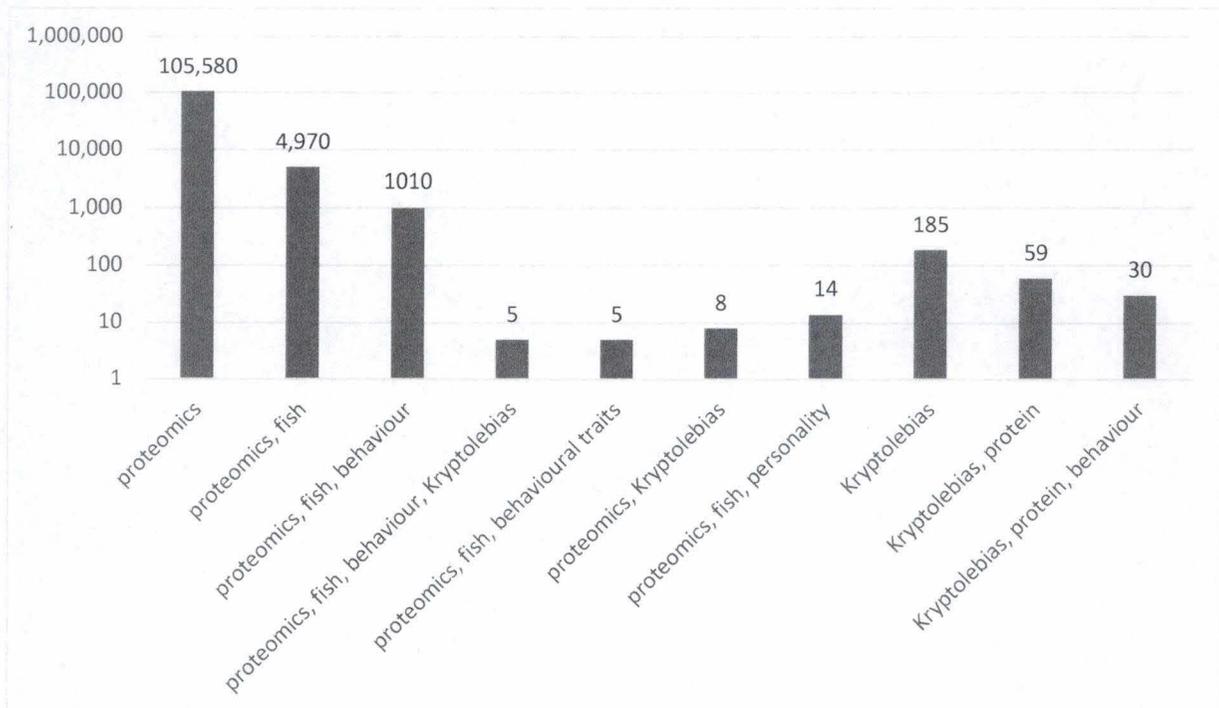


Figure 17. Nombre de résultats obtenus dans la base de données de littérature Scopus à la date du 15 août 2019. Les mots clefs entrés sont en abscisse. Le nombre de résultats est affiché au-dessus de chaque barre plot. Une échelle logarithmique est utilisée ici pour mieux visualiser les résultats.

Les recherches menées au cours de ce mémoire ont permis d'étudier les bases moléculaires des traits comportementaux d'audace et d'agressivité au-travers des protéines exprimées chez des rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus*, aux phénotypes comportementaux extrêmes. Les traits comportementaux d'audace et d'agressivité sont présents chez tous les animaux même si exprimés différemment. Cependant, leurs bases neurophysiologiques sont encore peu claires. De manière générale, les études portant sur l'expression de comportements cherchent à établir un lien entre des neurotransmetteurs spécifiques et l'expression du comportement d'intérêt. Toutefois, cette façon de procéder ne tient pas compte des interactions et combinaisons qui peuvent exister entre certains déterminants biologiques amenant à un tel comportement (Picotti, Bodenmiller and Aebersold, 2013). Les traits comportementaux sont complexes et dépendent de processus multiples. A ce titre, leur contrôle l'est aussi. L'étude menée ici est donc pertinente car elle étudie la base moléculaire de l'expression de traits comportementaux à travers un profilage protéique afin de soulever une partie du voile sur les différentes voies possibles menant à l'expression des comportements d'audace et d'agressivité.

Le rivulus des mangroves est une espèce pouvant être utilisée comme modèle dans différents domaines de recherche tels que l'écotoxicologie, la biologie de la reproduction, l'étude du comportement et certainement la biologie de l'évolution. En effet, sa capacité à pouvoir produire une descendance génétiquement très similaire au parent rend l'étude de la plasticité phénotypique tout à fait pertinente. De fait, il est possible d'étudier des normes de réaction "véritables" traduisant la variabilité environnementale (E) en limitant la variabilité génétique (G) et l'interaction de ces deux termes (GxE) (Voisin, Kultz and Silvestre, 2019).

Pour ce mémoire, tous les poissons expérimentaux se sont développés dans un environnement stable et similaire sans aucun traitement. Ceci afin d'étudier leur protéome cérébral selon qu'ils soient de tempérament audacieux ou agressif. Pour rappel, un(e) tempérament/trait comportemental/trait de personnalité signifie que les différences comportementales individuelles sont stables à travers le temps et les contextes au sein d'une même espèce (Réale *et al.*, 2007; Nettle and Penke, 2010). En limitant la variabilité environnementale et en comptant sur la très faible variabilité génétique du rivulus, il est possible d'étudier au plus proche les bases moléculaires de ces comportements.

## 1) Analyses protéomiques

Pour l'analyse des résultats protéomiques, il est nécessaire de tenir compte de différents biais. En effet, la méthode de spectrométrie de masse utilisée ici fonctionne sans *à priori*. Seules les protéines les plus abondantes présentes dans le cerveau des échantillons examinés sont représentées. Par conséquent, il n'est possible de déterminer celles qui sont intéressantes pour la sélection des gènes d'intérêt que parmi celles-ci. Or, il est tout à fait envisageable que certaines protéines, en dehors du dynamic range (DR) de la méthodologie utilisée, aient un rôle plus important que d'autres plus abondantes ( $DR_{\text{agressivité}} = 4$  et  $DR_{\text{audace}} = 6$ ) (Zubarev, 2013). Pour pouvoir prendre en compte ces protéines, il faudrait se focaliser sur une protéine particulière *à priori* ou bien isoler une famille de protéines particulière *à priori* avant la mise en œuvre de la spectrométrie de masse. Cette méthodologie correspond à la protéomique dite « ciblée » ("Targeted proteomics") par opposition à la technique sans *à priori* dite « à large spectre » ("Shotgun proteomics") utilisée ici (Valcu and Kempenaers, 2015; Barallobre-Barreiro *et al.*, 2016).

Les résultats portant sur le trait comportemental d'agressivité nous révèlent que plus de protéines significatives sont différentiellement exprimées chez les individus peu agressifs que chez les agressifs. Cependant, parmi les protéines hautement significatives, aucune ne joue un rôle directement lié à des phénotypes comportementaux d'après les annotations attribuées par UniProt. Malgré qu'il ne soit pas possible d'en conclure que plus de protéines sont mises en jeu pour l'expression d'un comportement non agressif, cette diminution de l'abondance protéique pourrait refléter une augmentation de la protéolyse ou une diminution de la transcription chez les poissons peu agressifs.

Par ailleurs, l'analyse par clustering hiérarchique via la heatmap [Figure 11A] révèle l'existence de 2x2 clusters d'abondance relative globalement opposée entre extrêmes comportementaux agressifs. Pourtant, sur base des annotations Uniprot, aucun lien n'a pu être déterminé entre les protéines de ces clusters et l'expression du phénotype comportemental. Néanmoins, la protéine kinase AP2 (AAK1) et l'atlastine-1 (ATL1) se révèlent intéressantes car elles sont plus directement liées à l'étude du comportement. AAK1, plus abondante chez les individus peu agressifs ( $FC = -1.58$ ), est une actrice du transport de molécules dans le cerveau durant les processus d'endocytose (Conner and Schmid, 2002). La régulation de l'endocytose revient également dans les processus biologiques identifiés par l'analyse d'enrichissement par Gene Ontology. De fait, le trafic de vésicules au sein d'un organe tel que

le cerveau est essentiel pour la mise en place de processus biologiques comme la neurotransmission (Melikian, 2004). Une étude sur les souris (*Mus musculus*) a notamment démontré l'importance de l'endocytose et de sa régulation pour les récepteurs à dopamine sur l'expression du comportement d'hyperactivité (Shimokawa *et al.*, 2010). Similairement, les liprines, dont la liprines- $\alpha$ -3 (PPFIA3, FC = 2.73), sont aussi impliquées dans le trafic vésiculaire du système nerveux et peuvent donc constituer des éléments de première importance pour l'étude des bases moléculaires de l'agressivité. Les liprines sont retrouvées à hauteur de l'hippocampe chez les souris (Zürner *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2018). Or le phénotype d'agressivité est lié à une zone du cerveau des poissons apparentée à l'hippocampe. En effet, le cerveau des actinoptérygiens tels que le rivulus des mangroves ne possèdent pas de zones strictement appelée "hippocampe" mais une partie du cerveau antérieur y est évolutivement apparentée (Prior *et al.*, 2004; Desjardins and Fernald, 2010; Budaev and Brown, 2011). En outre, AAK1 est plus abondant chez les individus peu agressifs et PPFIA3, quant à lui, soit surexprimé chez les individus plus agressifs. Bien qu'aucun lien entre ces deux molécules n'ait pu être établi au-travers de la littérature, ceci n'exclut pas définitivement leur implication dans l'expression du comportement d'agressivité. En effet, les processus d'endocytose sont retrouvés chez tous les eucaryotes et sont fondamentaux pour la régulation du métabolisme (Fuerst and Sagulenko, 2010). Ainsi, un grand nombre de molécules interviennent dans ce processus agissant à différents niveaux des organismes. Aucune conclusion ne peut donc être tirée à partir du fait que deux protéines, jouant un rôle si essentiel, aient une abondance relative différente chez des individus de comportement distant, voire opposé.

Parce que les annotations UniProt reprises dans ce mémoire ne correspondent qu'aux rôles les plus importants des protéines significatives identifiées et que la majorité des protéines ne sont pas limitées à un seul rôle, il faut tenir compte d'un biais important sur les annotations attribuées dans cette étude. Ainsi, la sélection des protéines d'intérêt pour le volet portant sur l'expression relative de gènes est également basée sur une étude bibliographique approfondie des protéines significatives issues des analyses protéomiques.

D'après les résultats protéomiques, la **monoglycérade lipase** (MGLL) est une protéine hautement significative (significance = 15.75) surexprimée chez les individus au comportement peu agressif (FC= -2.61). Cette protéine est une endocannabinoïde. Ce sont des molécules retrouvées dans divers organes tels que le foie et le cerveau. Elles permettent la

régulation de nombreux processus biologiques tels que la douleur, le nourrissage, la mémoire et la coordination (Taschler *et al.*, 2011; Ward and Tuma, 2014).

Bien que l'annotation UniProt de cette protéine semble peu correspondre avec l'expression de phénotype comportementaux dans le cerveau, l'implication des endocannabinoïdes dans la modulation du comportement d'agressivité chez les animaux a été démontrée.

En effet, certains endocannabinoïdes tels que le FAAH1, FAAH2 et la monoglycérade lipase (MGLL), sont des molécules impliquées dans le comportement d'anxiété et qui sont notamment liées au comportement d'agressivité chez les animaux et les humains (Rodriguez-Arias *et al.*, 2013). L'enzyme MGLL est une enzyme capable d'hydrolyser le 2-arachidonylglycérol (2-AG) se fixant sur des récepteurs à cannabinoïdes (CB-1 et CB-2) pour les activer (Dinh *et al.*, 2002; Puffenbarger, 2005). 2-AG est un messenger trans-synaptique libéré par la dépolarisation de neurones. Cette voie influence l'activité du réseau neuronal et régule la libération de neurotransmetteurs (Martin *et al.*, 2002; Rodriguez-Arias *et al.*, 2013; Ward and Tuma, 2014). L'augmentation de MGLL dans le cerveau peut ainsi mener à une plus grande dégradation de 2-AG et donc une faible activation des récepteurs à cannabinoïdes. Or, une étude a démontré que l'absence de récepteurs CB-1 menait à une augmentation de la réponse comportementale d'agressivité chez les souris (Martin *et al.*, 2002; Taschler *et al.*, 2011). Ceci s'avère être le résultat opposé de ce que l'on observe dans les présents résultats car les rivulus présentant le trait comportemental d'agressivité élevé exprime moins MGLL. Néanmoins, d'après de multiples papiers, le récepteur CB-1 semble avoir des rôles contradictoires dépendamment du contexte environnemental (Mechoulam, 2002). Dans le cas présent, il est donc pertinent de s'intéresser à la molécule MGLL dans l'étude du trait comportemental d'agressivité pour potentiellement soulever un nouvelle extrémité du voile couvrant les voies biochimiques et physiologiques des endocannabinoïdes dans les organismes vivants. Pour ces raisons, MGLL a été sélectionnée pour l'analyse d'expression de gènes.

L'**atlastine-1** (ATL1) est une protéine impliquée dans le développement du système nerveux (Gao *et al.*, 2013). Elle est plus exprimée chez les individus peu agressifs (FC= -4.93). Une étude portant sur *Danio rerio* a démontré que le « knock-down » du gène *atl1* provoque une régulation négative du BMP (Bone morphogenetic protein) durant le développement de l'animal (Fassier *et al.*, 2010). Or, le BMP joue un rôle essentiel dans la guidage et la formation de synapses dans le cerveau des organismes mais aussi le transport

axonal et l'organisation du réseau de microtubules dans le cerveau (Chen, Zhao and Mundy, 2004).

ATL1 est également impliquée dans des maladies neurodégénératives affectant le système nerveux central telles que la paraplégie spastique familiale (HSP). Cette dernière peut aussi affecter le trafic membranaire (Rismanchi *et al.*, 2008; Fassier *et al.*, 2010; Blackstone, O'Kane and Reid, 2011). Sur base de son implication dans des processus de développement neuronal, il est possible que cette protéine joue un rôle dans l'expression du trait comportemental d'agressivité chez les rivulus des mangroves. ATL1 a donc été sélectionnée pour l'analyse complémentaire par expression de gènes.

Contrairement aux autres protéines précédemment citées choisies pour l'analyse par expression relative de gènes, la **synapsine-3** (SYN3) est, elle, plus exprimée chez les individus de tempérament agressif plutôt que chez les non-agressifs (FC = 1.94).

SYN3 est une phosphoprotéine de la famille des synapsines (1/2/3), elle-même divisible en dix différents isoformes (Nesher *et al.*, 2015).

Cette famille de gènes a pour rôle principal de moduler la libération de neurotransmetteurs dans la partie terminale des synapses en fixant les vésicules synaptiques au cytosquelette d'actine. Elle est également impliquée dans la synaptogenèse et la formation des axones (Fassio *et al.*, 2011; Nesher *et al.*, 2015).

Ces rôles importants sont réalisés de concert avec d'autres gènes impliqués dans l'activité synaptique tels que *Rab3a*, *SV2a* ou *Syp* (Boido *et al.*, 2010; Fassio *et al.*, 2011). *Syn3* serait aussi impliquée dans le système dopaminergique via des récepteurs à dopamine régulant négativement son expression chez les souris. Ce système est abondamment cité dans les études moléculaires des comportements dont notamment l'agressivité qu'il régulerait positivement (Benjamin *et al.*, 1996; Filby *et al.*, 2010; Kenar *et al.*, 2013). Le système dopaminergique est conservé chez les vertébrés et donc nos résultats, dans le cas présent, concordent bien que les clades soient différents (O'Connell, Fontenot and Hofmann, 2011).

De plus, plusieurs études ont démontré l'implication de *Syn3* dans des cas de maladies neuropsychiatriques comme l'autisme, la schizophrénie ou l'épilepsie (Boido *et al.*, 2010; Fassio *et al.*, 2011; Medrihan *et al.*, 2013). Ainsi, l'ablation génétique de ces gènes provoque l'apparition de phénotypes épileptiques chez les souris (Fassio *et al.*, 2011). Des analyses génétiques chez les humains ont aussi permis d'identifier une mutation anti-sens sur *Syn1* associée au comportement d'agressivité (Garcia, 2004).

Malgré que les fonctions biologiques de SYN3 ne soient pas encore bien élucidées, son rôle dans le neuro-développement et son appartenance à une famille de protéines impliquées dans divers processus neuronaux présentent un facteur d'intérêt pour son étude dans l'expression des traits comportementaux tels que l'agressivité.

Ainsi, la surexpression de *Syn3* chez les *Kryptolebias marmoratus* est un potentiel facteur menant à un comportement d'agressivité plus important.

La famille de protéines IGLON est composée de 5 gènes (*Lsamp*, *Ntm*, *Opcml*, *Negr1* et *Iglon5*) codant pour des protéines d'adhésion membranaires dans le système neuronal. Ces protéines, conservées entre les organismes vivants au cours de l'évolution, sont essentielles pour l'interaction entre les cellules neuronales (Yang et al., 2014; Vanaveski et al., 2017; Kubick, Brösamle and Mickael, 2018). Les résultats obtenus après analyse protéomique révèlent une surexpression de la protéine **IGLON5** chez les individus non-agressifs par comparaison avec les individus agressifs (FC = -2.81).

Les différentes protéines de la famille IGLON sont exprimées tôt pendant l'embryogenèse des souris et jouent un rôle important tout au long de leur cycle de vie. Ces dernières peuvent donc participer à la mise en place d'un trait comportemental tel que l'agressivité durant les stades de développement des organismes. Ici, les résultats ayant été obtenus à partir d'individus adultes, il est envisageable que la mise en place des traits comportementaux se soient faits plus tôt au cours du développement. Peu d'informations sont disponibles à ce jour concernant les rôles de IGLON5 car cette protéine n'a été découverte que récemment. Cependant, elle est impliquée dans la neurodégénérescence, la formation des synapses et les troubles du sommeil (Hashimoto, Maekawa and Miyata, 2009; Sabater *et al.*, 2014; Kubick, Brösamle and Mickael, 2018; Singh *et al.*, 2018). IGLON5 participe aussi à la régulation de la formation des synapses dans l'hippocampe chez les souris (Vanaveski *et al.*, 2017). Sur base du fait que cette molécule est conservée entre les organismes, son rôle potentiel dans la modulation du trait comportemental d'agressivité au-travers du développement des synapses de l'hippocampe chez les poissons rend son investigation par expression de gènes pertinente.

Les résultats des analyses protéomiques portant sur le trait comportemental d'audace nous indique que près de deux fois plus de protéines sont identifiées chez les individus timides plutôt que chez les audacieux. Cette observation se répète après identification des protéines significatives. L'histone H1 (HISTH1L) et la sous-unité  $\alpha$  du protéasome de type 2

(PSMA2) sont les protéines hautement significatives et aucun lien direct ou documenté avec des processus neuronaux influençant les phénotypes comportementaux n'a pu être établi.

Parmi les protéines faiblement significatives, la protéine 5 liée à la dihydropyrimidinase ("*dihydropyrimidinase-related protein 5*" [DPYL5]), bien que faiblement significative ( $p\text{-val} = 6,39$ ) pourrait être liée au tempérament d'audace. En effet, une étude portant sur le rat a relevé l'effet de l'injection d'un récepteur à glutamate (MK-801 ou *Dizocilpine*) sur le protéome cérébral de ce rongeur au-travers de l'augmentation de l'expression de "*dihydropyrimidinase-related protein 2*" (DPYL2), une protéine de la même famille que DPYL5 (Sarnyai, Jashar and Olivier, 2015a). Les rats traités ont affiché une série de changements comportementaux tels que l'hyperactivité ou des comportements stéréotypés (Sarnyai, Jashar and Olivier, 2015b). Par ailleurs, les tests comportementaux réalisés pour déterminer le niveau d'audace chez nos poissons expérimentaux tiennent notamment compte de la distance parcourue par l'individu dans une arène et du temps passés dans celle-ci. De plus, DPYL2 et DPYL5 jouent tous deux un rôle dans le développement neuronal (Inatome *et al.*, 2000; Inagaki *et al.*, 2001). Ainsi, comme le suggère la surexpression de DPYL5 chez les poissons audacieux ( $FC = 1,55$ ) et la différence d'abondance relativement visible entre individus d'extrêmes opposés sur base des couleurs de la heatmap [Figure 12A], cette protéine pourrait avoir une influence sur le comportement d'audace en augmentant le niveau d'activité du poisson et donc, parallèlement, son niveau d'audace lorsqu'elle est plus abondante. Ces informations n'étant pas connues au moment de la sélection des protéines d'intérêt pour l'étude par expression relative de gènes, DPYL5 n'a pas été sélectionnée. Par conséquent, il serait intéressant de réaliser cette étude complémentaire afin d'approfondir le rôle de cette protéine sur le comportement d'audace.

Parmi l'ensemble des protéines significatives relatives au tempérament d'audace, seule la **taline-2** (TLN2) a été choisie pour l'étude par expression relative de gènes. Cette molécule moyennement significative ( $p\text{-val} = 7.92$ ) est moins exprimée chez les individus audacieux que chez les individus timides ( $FC = -1.55$ ). Ceci semble à première vue contradictoire sur base d'une autre étude qui démontre de la surexpression TLN2 avec l'agressivité (Bell, Bukhari and Sanogo, 2016). Sur base de ceci, il serait souhaitable de corrélérer agressivité et audace mais c'est un piège dans lequel il ne faut pas tomber car, comme les ACP nous l'ont démontré, ces deux traits comportementaux sont différents et indépendamment mesurés. Cependant, les poissons analysés pour l'analyse protéomique sont aussi représentés dans le continuum du trait comportemental d'agressivité. Les protéines

obtenues ne sont donc pas à lier uniquement avec le trait comportemental extrême pour lequel les individus ont été choisis.

TLN2 est une protéine de la famille des talines jouant un rôle important dans l'assemblage des filaments d'actines du cytosquelette. Elle est essentiellement retrouvée dans les cardiomyocytes mais peut également être présente dans les synapses comme le suggèrent nos résultats protéomiques. Une étude portant sur les variations naturelles de l'expression de gènes relatifs à l'agressivité chez les épinoches (*Gasterosteus aculeatus*) a relevé TLN2 comme étant un gène candidat différentiellement exprimé dans ce contexte (Bell, Bukhari and Sanogo, 2016).

L'analyse par Gene Ontology des résultats obtenus chez les individus timides ne révèle aucun lien pertinent avec l'étude comportementale. Néanmoins, en ce qui concerne les individus audacieux, six des vingt termes les plus significatifs correspondent à des processus neuronaux. Ceci suggérerait une plus grande mobilisation du système neuronal lorsque les poissons sont plus audacieux. Cette affirmation n'est que faiblement supportée par la surexpression de DPYL5 chez les individus audacieux car aucune autre protéine significative identifiée, ni les recherches bibliographiques menées sur celles-ci ne démontrent un lien avec les phénotypes comportementaux. Les protéines jouant un rôle dans l'expression du trait comportemental d'audace pourraient donc figurer parmi les protéines non significatives.

En effet, pour déterminer les protéines significatives, nous utilisons deux critères majeurs. Le premier est la présence des protéines détectées dans au moins deux des trois échantillons et la présence d'au moins deux peptides uniques pour l'identification protéique. Le second est la significativité ("significance) qui est une valeur logarithmique de la p-valeur. Pour le niveau de significativité le plus exigeant, nous souhaitons une significativité  $\geq 12$ , ce qui correspond à une p-valeur de 0.05. Pour le choix moins exigeant, nous utilisons une significativité  $\geq 5$ , ce qui correspond à une p-valeur de 0.3. Nous utilisons ces deux seuils de tolérance car aucun traitement n'est appliqué aux échantillons. Pour pouvoir détecter une différence significative entre agressif et non-agressif ou entre audacieux et timide, il faut que le seuil d'exigence soit moins élevé. Rappelons d'ailleurs que la p-valeur n'est en aucun cas une donnée statistique immuable dont la valeur seuil de significativité est 0.05. Ainsi, il est possible d'encore augmenter le seuil de significativité à une p-valeur permettant d'identifier l'analyse d'un plus grand nombre protéines. Cependant, les observations qui en seraient retirées ne seraient pas solides en raison de la probabilité décuplée d'identifier des faux positifs (erreur de type I).

## 2) Expression relative de gènes d'intérêt par RT-qPCR.

Sur les 4 protéines liées à l'agressivité et l'unique protéine liée à l'audace sélectionnées pour l'étude de l'expression relative de leurs gènes, seules la monoglycéride lipase (MGLL) et IGLON5 ont pu être étudiées. En effet, en raison non seulement d'une efficacité et une spécificité des primers designés insatisfaisantes pour les autres gènes mais aussi d'un manque de temps pour recommencer la méthodologie aboutissant au design de nouveaux primers, ces autres protéines d'intérêt n'ont pas pu être étudiées. Elles ne sont donc pas à exclure pour de futures études portant sur les bases moléculaires des tempéraments d'audace et d'agressivité.

Il n'y a pas de différence significatives dans l'expression relative des gènes *mgll* et *IgLon5* entre les individus peu agressifs et très agressifs. Il n'y a pas non plus de corrélation entre niveau d'agressivité et expression relative de ces mêmes gènes. C'est-à-dire le niveau d'expression relative des gènes *IgLon5* et *mgll* ne varie pas de façon significative avec le niveau d'agressivité. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats.

Premièrement, aucune source de variabilité environnementale telle que l'application d'un traitement n'a été appliquée au cours du développement des poissons. Ils sont tous issus d'un groupe de contrôles expérimentaux d'une expérience menée précédemment par A. Carion. Ainsi, l'étude protéomique par spectrométrie de masse repose sur l'observation de nos deux traits comportementaux chez des organismes isogéniques qui se sont développés dans un environnement similaire. Par conséquent, les variations dans le protéome cérébral des individus peuvent être trop faibles en raison de l'absence d'un traitement permettant d'augmenter le niveau d'expression des gènes relatifs au comportement. Il faut aussi tenir compte d'un effet épistatique potentiel des gènes d'intérêt dans l'étude de la personnalité. C'est-à-dire que c'est l'interaction entre plusieurs gènes aux niveaux d'expression faibles, qui engendrerait un phénotype comportemental particulier. Le niveau d'expression de ces gènes peut être trop faible que pour entrer dans le dynamic range de la méthodologie appliquée ici, empêchant donc les protéines d'être détectées (Fitzpatrick, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2005). Par ailleurs *K. marmoratus* serait un bon modèle dans l'étude des effets épistatiques des gènes. En effet, leur très faible variabilité génétique combinée avec leur élevage dans un environnement contrôlé permettrait de définir si des gènes liés par épistasie d'après des études sur d'autres organismes le sont réellement en étudiant leur fréquence de ségrégation. Ceci pourrait par exemple être appliqué dans des études futures portant sur des gènes de référence liés à des phénotypes comportementaux.

Deuxièmement, les résultats des analyses protéomiques quantitatives sont une représentation figée de la quantité relative de protéines présentes dans le cerveau des poissons à un instant donné. Comme aucun traitement n' a été appliqué, des variations dans le bruit environnemental (exposition à la lumière, nourriture, oviposition récente, etc.) peuvent donc être la cause des différences significatives d'abondance de certaines protéines (Bierbach, Laskowski and Wolf, 2017).

Pour limiter cette influence des bruits environnementaux, une perspective serait de silencer des gènes d'intérêt et d'étudier les effets conséquents sur le comportement des poissons tout en tenant compte de la pléiotropie des gènes (Fitzpatrick *et al.*, 2005).

Notons que dans cette discussion, plusieurs biais amenés par la technique du spectrométrie de masse ont déjà été évoqués. Il en existe d'autres qui ne seront pas repris dans le mémoire. Pour plus de détails, les biais et avantages des méthodes de spectrométrie de masse sont repris dans le livre d'introduction à la protéomique de Lovric (Lovric, 2011).

Troisièmement, les individus utilisés pour l'analyse d'abondance relative des protéines par spectrométrie MS/MS ont été choisis par A. Carion sur base de leur score d'audace et d'agressivité obtenu par ACP. Ceux-ci, malgré certains biais expliqués dans le point suivant, sont donc bien des poissons aux scores extrêmes d'audace et d'agressivité. Par ailleurs, l'analyse d'expression relative de gènes, elle, est réalisée à partir d'individus restants après les manipulations menées par A. Carion pour sa propre étude. Les individus utilisés pour la RT-qPCR ne sont donc pas strictement les plus extrêmes issus de l'ensemble des poissons testés comportementalement mais les plus extrêmes parmi les poissons résiduels. De ce fait, il est envisageable que des protéines significatives trouvées par MS/MS ne soient pas ou trop peu exprimées chez les individus utilisés lors de l'expression de gènes. Malgré que la relation entre abondance protéique et abondance en ARNm soit peu proportionnelle comme expliqué dans l'introduction, il est tout de même possible que la variabilité dans la sélection des individus sur base de leur score comportementaux pour les deux étapes méthodologique de ce mémoire explique l'absence de significativité des résultats obtenus (Valcu and Kempnaers, 2015).

Ajoutons également que l'échantillonnage pour l'analyse d'expression relative de gènes est faible ( $N_{\text{agressifs}} = 3$  et  $N_{\text{peu agressifs}} = 3$ ) et ne contribue donc pas à la robustesse statistique des résultats. Il serait donc pertinent de réitérer une analyse par RT-qPCR sur l'ensemble des gènes correspondant aux protéines d'intérêt avec un plus grand échantillonnage et des

individus au score d'audace et d'agressivité proches de ceux utilisés lors de la spectrométrie de masse MS/MS.

Finally, the scores of boldness and aggressiveness of the ensemble of individuals used during this memory were obtained on the basis of a single technical replication of the behavioral tests. In fact, due to the habituation of the fish to the behavioral tests, the other replications cannot be taken into account. Habituation is a form of learning during which the individual stops responding to a stimulus or a condition to which it has already been exposed (Deshmukh and Bhalla, 2003). The absence of technical replications represents a statistical weakness that is first of all reflected by a potentially biased value of the behavioral scores and then by a sampling that does not represent the true behavioral extremes. From this fact, it would be interesting to confirm, by modifying the behavioral tests in such a way as to limit habituation, that the measurements made during the behavioral tests correspond well and truly to an evaluation of behavioral traits and not of behavioral variables that are not linked.

## Partie V : Perspectives

---

Au cours de la discussion, plusieurs perspectives de recherche mineures appelant à une amélioration de la méthodologie poursuivie lors de la réalisation de ce mémoire ont été évoquées.

Les perspectives reprises dans cette partie-ci remettent quant à elles l'étude de la variabilité comportementale chez le rivulus dans le contexte plus large de la biologie évolutive. En effet, l'étude menée au cours de ce mémoire est basée sur l'observation inattendue de variabilité comportementale individuelle chez des poissons isogéniques élevés dans un environnement similaire sans traitement. Comme nous avons pu le voir à plusieurs reprises, la variabilité phénotypique résulte de la variabilité génétique, environnementale et l'interaction de ces deux termes. Or dans le cas présent, l'ensemble de ces variabilités est diminuée, voire nulle. Ceci soulève donc la question de la raison expliquant la variabilité individuelle des traits comportementaux chez cette espèce. Des théories récentes suggèrent que des stimuli environnementaux, même très faibles et sur des organismes clonaux, au cours du développement sont tout de même capables de créer de la variabilité phénotypique en engageant l'organisme sur une voie développementale particulière (Bierbach, Laskowski and Wolf, 2017). Ceci pourrait expliquer nos observations chez *K. marmoratus*.

Une autre hypothèse explore la voie de l'épigénétique pour expliquer la variabilité individuelle chez des individus isogéniques élevés dans un même environnement. En effet, il est possible que des mécanismes épigénétiques héritables soient mis en jeu afin de transmettre l'expression d'un phénotype comportemental particulier à la génération suivante. Ceux-ci, conjugués à la variabilité individuelle basée sur les micro-changements environnementaux décrits dans le paragraphe précédent, expliquerait la variabilité individuelle observée chez nos poissons. En effet, il est possible qu'un individu fasse l'expérience d'un changement environnemental minime au cours de son développement, l'engageant dès lors sur une voie amenant à l'expression d'un phénotype comportemental particulier. Si ce phénotype n'est pas avantageux, par une stratégie de bet-hedging par exemple, l'individu parent pourra transmettre des motifs épigénétiques à sa descendance dont le phénotype comportemental variera en conséquence (Bierbach, Laskowski and Wolf, 2017).

Par ailleurs, d'après une étude réalisée par A. Fellous sur le *K. marmoratus*, ce dernier réalise un reprogramming épigénétique plus long et profond que d'autres organismes tels que *Danio rerio* au cours du développement embryonnaire. Il est donc possible que des signaux environnementaux, même minimes, influencent cette fenêtre critique du développement en apposant des motifs épigénétiques qui engendreraient la variabilité phénotypique individuelle (Fellous *et al.*, 2018).

L'étude des diverses perspectives exposées précédemment pourrait donc amener une compréhension approfondie de la variabilité phénotypique individuelle, ses origines et ses capacités adaptatives.

## Partie VI : Conclusion

---

Ce mémoire consiste en une étude exploratoire des bases moléculaires des traits de personnalité d'audace et d'agressivité via l'utilisation de la protéomique quantitative. L'utilisation du modèle hermaphrodite *Kryptolebias marmoratus*, l'un des deux seuls vertébrés capables d'autofécondation, permet de limiter l'influence de la variabilité génétique sur l'expression des phénotypes d'audace et d'agressivité tout en contrôlant la variabilité environnementale au-travers des conditions d'élevage et de développement.

Des analyses protéomiques exploratoires sans *à priori* utilisant la technique de spectrométrie de masse « gel free/label free » ont permis d'identifier une série de protéines hypothétiquement impliquées dans l'expression des phénotypes comportementaux chez le rivulus des mangroves. Sur base des analyses du protéome cérébral de poissons exprimant des phénotypes comportementaux aux extrêmes des continuums d'audace et d'agressivité et de recherches bibliographiques complémentaires, aucune protéine directement liée à l'expression des comportements d'audace et d'agressivité n'a pu être mise à jour. Cependant, une série de protéines d'intérêt indiquant la pluralité des processus biologiques capables d'influencer le comportement ont pu être dévoilées.

Afin de soutenir l'hypothèse que certaines des protéines d'intérêt identifiées jouent un rôle sur l'expression du comportement, les protéines MGLL et IGLON5 ont été sélectionnées pour étudier l'expression relative de leur gène respectif chez des individus au comportement d'agressivité extrême. Aucune implication de ces gènes dans l'expression des comportements n'a pu être détectée. Malgré cela, de nombreuses protéines d'intérêt identifiées ne demandent qu'à être testées.

Ces observations soulèvent l'hypothèse que de multiples protéines non-détectées par spectrométrie peuvent agir de concert pour influencer sur l'expression de phénotypes comportementaux.

Dans l'absolu, les analyses protéomiques exploratoires menées dans le cadre de ce mémoire constituent un point de départ vers une compréhension intégrative des phénotypes comportementaux d'audace et d'agressivité. Une multitude de comportements tels que l'agressivité ou l'audace sont conservés chez les humains et les animaux. Ceux-ci peuvent jouer des rôles notoires dans l'organisation des systèmes sociaux. Par exemple, l'expression d'agressivité en dehors d'un contexte approprié a été identifiée comme l'un des plus grands

challenges auquel la société peut faire face. En élucidant l'ensemble des mécanismes que ces comportements impliquent, depuis les gènes jusqu'à l'expression du phénotype, il en découlera non seulement une meilleure compréhension des mécanismes évolutifs mis en jeu dans l'établissement de la variabilité comportementale et notamment de la personnalité chez les organismes vivants, mais aussi une plus grande capacité à faire face aux problèmes sociétaux.

## Références

---

- Abematsu, M. *et al.* (2017) *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics, Handbook of Epigenetics*. doi: 10.1016/B978-0-12-375709-8.00050-2.
- Adams, C. E. *et al.* (1998) 'Alternative competitive strategies and the cost of food acquisition in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)', *Aquaculture*. Elsevier, 167(1–2), pp. 17–26. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00302-0.
- Anway, M. D. *et al.* (2005) 'Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 308(5727), pp. 1466–9. doi: 10.1126/science.1108190.
- Arnold, S. (1988) 'Behavior, Energy and Fitness', 28, pp. 815–827.
- Aubin-Horth, N. (2009) 'Genomic reaction norms : using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity', *Molecular Ecology*, pp. 1–18. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04313.x.
- Avise, J. C. and Tatarenkov, A. (2015) 'Population genetics and evolution of the mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus* , the world's only self-fertilizing hermaphroditic vertebrate', *Journal of Fish Biology*, 87(3), pp. 519–538. doi: 10.1111/jfb.12741.
- Avital, E. and Jablonka, E. (2000) 'Animal traditions: behavioural inheritance in evolution', in *Animal traditions: behavioural inheritance in evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1–20. doi: 10.1017/CBO9780511542251.
- Babicki, S. *et al.* (2016) 'Heatmapper: web-enabled heat mapping for all', *Nucleic acids research*, 44(W1), pp. W147–W153. doi: 10.1093/nar/gkw419.
- Baggerman, G. *et al.* (2005) 'Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review', *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(8), pp. 669–677. doi: 10.2174/138620705774962490.
- Barallobre-Barreiro, J. *et al.* (2016) 'Systems biology-opportunities and challenges: the application of proteomics to study the cardiovascular extracellular matrix.', *Cardiovascular research*. Oxford University Press, 112(3), pp. 626–636. doi: 10.1093/cvr/cvw206.
- Barry, M. J. (1994) 'The costs of crest induction for *Daphnia carinata*', *Oecologia*. Springer-Verlag, 97(2), pp. 278–288. doi: 10.1007/BF00323161.
- Bell, A. (2007) 'Animal personalities', *Nature*, 447(May), pp. 539–540. doi: 10.1038/447539a.
- Bell, A. M., Bukhari, S. A. and Sanogo, Y. O. (2016) 'Natural variation in brain gene expression profiles of aggressive and nonaggressive individual sticklebacks', *Behaviour*, 153(13–14), pp. 1723–1743. doi: 10.1163/1568539X-00003393.
- Bell, A. M. and Stamps, J. A. (2004) 'Development of behavioural differences between individuals and populations of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*', *Animal Behaviour*, 68(6), pp. 1339–1348. doi: 10.1016/j.anbehav.2004.05.007.
- Benhaïm, D. *et al.* (2016) 'The shy prefer familiar congeners', *Behavioural Processes*, 126, pp. 113–120. doi: 10.1016/j.beproc.2016.03.008.
- Benjamin, J. *et al.* (1996) 'Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking', *Nature Genetics*, 12(1), pp. 81–84. doi: 10.1038/ng0196-81.
- Benus, R. F. *et al.* (1991) 'Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping

- strategies.', *Experientia*, 47(10), pp. 1008–19.
- Berger, S. L. (2007) 'The complex language of chromatin regulation during transcription', *Nature*, 447(7143), pp. 407–412. doi: 10.1038/nature05915.
- Bierbach, D., Laskowski, K. L. and Wolf, M. (2017) 'Behavioural individuality in clonal fish arises despite near-identical rearing conditions', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, p. 15361. doi: 10.1038/ncomms15361.
- Biro, P. A., Beckmann, C. and Stamps, J. A. (2010) 'Small within-day increases in temperature affects boldness and alters personality in coral reef fish.', *Proceedings. Biological sciences*. The Royal Society, 277(1678), pp. 71–7. doi: 10.1098/rspb.2009.1346.
- Blackstone, C., O'Kane, C. J. and Reid, E. (2011) 'Hereditary spastic paraplegias: Membrane traffic and the motor pathway', *Nature Reviews Neuroscience*. NIH Public Access, pp. 31–42. doi: 10.1038/nrn2946.
- Boido, D. *et al.* (2010) 'Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam', *Neuroscience*, 171(1), pp. 268–283. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.046.
- Bollati, V. and Baccarelli, A. (2010) 'Environmental epigenetics', *Heredity*, 1052, pp. 105–112. doi: 10.1038/hdy.2010.2.
- Bossdorf, O., Richards, C. L. and Pigliucci, M. (2008) 'Epigenetics for ecologists', *Ecology Letters*, 11(2), pp. 106–115. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01130.x.
- Budaev, S. V and Brown, C. (2011) *Fish Cognition and Behavior*. Wiley-Blackwell. doi: 10.1002/9781444342536.ch7.
- Burggren, W. (2016) 'Epigenetic Inheritance and Its Role in Evolutionary Biology: Re-Evaluation and New Perspectives', *Biology*, 5(2), p. 24. doi: 10.3390/biology5020024.
- Burns, J. G. (2008) 'The validity of three tests of temperament in guppies (*Poecilia reticulata*).', *Journal of Comparative Psychology*, 122(4), pp. 344–356. doi: 10.1037/0735-7036.122.4.344.
- Callahan, H. S., Maughan, H. and Steiner, U. K. (2008) 'Phenotypic plasticity, costs of phenotypes, and costs of plasticity: Toward an integrative view', *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 44–66. doi: 10.1196/annals.1438.008.
- Carter, A. J. *et al.* (2013) 'Animal personality: What are behavioural ecologists measuring?', *Biological Reviews*, 88(2), pp. 465–475. doi: 10.1111/brv.12007.
- Chahrour, O., Cobice, D. and Malone, J. (2015) 'Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier, pp. 2–20. doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.013.
- Chapman, L. G., Galis, F. and Shinn, J. (2000) 'Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: Hypoxia-induced trade-offs in the morphological traits of an African cichlid', *Ecology Letters*, 3(5), pp. 387–393. doi: 10.1046/j.1461-0248.2000.00160.x.
- Chen, D., Zhao, M. and Mundy, G. R. (2004) 'Bone Morphogenetic Proteins', *Growth Factors*, 22(4), pp. 233–241. doi: 10.1080/08977190412331279890.
- Chen, G. *et al.* (2002) 'Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas', *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(4), pp. 304–313. doi: 10.1074/mcp.m200008-mcp200.
- Chevin, L. M. and Lande, R. (2011) 'Adaptation to marginal habitats by evolution of increased phenotypic plasticity', *Journal of Evolutionary Biology*, 24(7), pp. 1462–1476. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02279.x.
- Chong, S. and Whitelaw, E. (2004) 'Epigenetic germline inheritance', *Current Opinion in Genetics*

*and Development*, pp. 692–696. doi: 10.1016/j.gde.2004.09.001.

- Christjani, M., Fink, P. and von Elert, E. (2016) 'Phenotypic plasticity in three *Daphnia* genotypes in response to predator kairomone: evidence for an involvement of chitin deacetylases', *The Journal of Experimental Biology*, 219(11), pp. 1697–1704. doi: 10.1242/jeb.133504.
- Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2002) 'Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 156(5), pp. 921–929. doi: 10.1083/jcb.200108123.
- Cox, J. and Mann, M. (2008) 'MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 26(12), pp. 1367–1372. doi: 10.1038/nbt.1511.
- Crispo, E. (2007) 'The Baldwin effect and genetic assimilation: Revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity', *Evolution*, pp. 2469–2479. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00203.x.
- Dall, S. R. X., Houston, A. I. and McNamara, J. M. (2004) 'The behavioural ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective', *Ecology Letters*. Wiley/Blackwell (10.1111), 7(8), pp. 734–739. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00618.x.
- Deshmukh, S. S. and Bhalla, U. S. (2003) 'Representation of odor habituation and timing in the hippocampus.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(5), pp. 1903–15.
- Desjardins, J. K. and Fernald, R. D. (2010) 'What do fish make of mirror images?', *Biology Letters*. The Royal Society, 6(6), pp. 744–747. doi: 10.1098/rsbl.2010.0247.
- DeWitt, T. J., Sih, A. and Wilson, D. S. (1998) 'Costs and limits of phenotypic plasticity', *Trends in Ecology & Evolution*. Elsevier Current Trends, 13(2), pp. 77–81. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01274-3.
- Dingemans, N. J. *et al.* (2010) 'Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity', *Trends in Ecology and Evolution*, 25(2), pp. 81–89. doi: 10.1016/j.tree.2009.07.013.
- Dinh, T. P. *et al.* (2002) 'Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 99(16), pp. 10819–24. doi: 10.1073/pnas.152334899.
- Dixon, J. R., Gorkin, D. U. and Ren, B. (2016) 'Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization', *Molecular Cell*. Cell Press, 62(5), pp. 668–680. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2016.05.018.
- Dosmann, A. and Mateo, J. M. (2014) 'Food, sex and predators: Animal personality persists with multidimensional plasticity across complex environments', *Animal Behaviour*. Elsevier Ltd, 90, pp. 109–116. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.01.011.
- Duckworth, R. A. (2009) 'The role of behavior in evolution: A search for mechanism', *Evolutionary Ecology*, pp. 513–531. doi: 10.1007/s10682-008-9252-6.
- Duncan, E. J., Gluckman, P. D. and Dearden, P. K. (2014) 'Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?', *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. Wiley-Blackwell, pp. 208–220. doi: 10.1002/jez.b.22571.
- Earley, R. L. and Hsu, Y. (2008) 'Reciprocity between endocrine state and contest behavior in the killifish, *Kryptolebias marmoratus*', *Hormones and Behavior*, 53(3), pp. 442–451. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.11.017.

- Earley, R. L., Hsu, Y. and Wolf, L. L. (2000) 'The Use of Standard Aggression Testing Methods to Predict Combat Behaviour and Contest Outcome in *Rivulus marmoratus* Dyads (Teleostei: Cyprinodontidae)', *Ethology*, 106(8), pp. 743–761. doi: 10.1046/j.1439-0310.2000.00586.x.
- Edenbrow, M. and Croft, D. P. (2012) 'Kin and familiarity influence association preferences and aggression in the mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*', *Journal of Fish Biology*, 44, pp. 503–518. doi: 10.1111/j.1095-8649.2011.03181.x.
- Edenbrow, M. and Croft, D. P. (2013) 'Environmental and genetic effects shape the development of personality traits in the mangrove killifish', *Oikos*. Wiley/Blackwell (10.1111), 122(5), pp. 667–681. doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20556.x.
- Ehrenreich, I. M. and Pfennig, D. W. (2016) 'Genetic assimilation: A review of its potential proximate causes and evolutionary consequences', *Annals of Botany*, 117(5), pp. 769–779. doi: 10.1093/aob/mcv130.
- Elias, J. E. and Gygi, S. P. (2007) 'Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 4(3), pp. 207–214. doi: 10.1038/nmeth1019.
- Ellison, A. *et al.* (2015) 'Epigenetic regulation of sex ratios may explain natural variation in self-fertilization rates', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1819), p. 20151900. doi: 10.1098/rspb.2015.1900.
- Falconer, D. S. (1952) 'The Problem of Environment and Selection', *The American Naturalist*, 86(830), pp. 293–298. doi: 10.1086/281736.
- Falconer, D. S. (1990) 'Selection in different environments: effects on environmental sensitivity (reaction norm) and on mean performance', *Genetical Research*. Cambridge University Press, 56(01), p. 57. doi: 10.1017/S0016672300028883.
- Farmer, J. L. and Orlando, E. F. (2012) 'Creating Females? Developmental Effects of 17-Ethinylestradiol on the Mangrove *Rivulus* Ovotestis', *Integrative and Comparative Biology*. doi: 10.1093/icb/ics110.
- Fassier, C. *et al.* (2010) 'Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway', *Nature Neuroscience*, 13(11), pp. 1380–1387. doi: 10.1038/nn.2662.
- Fassio, A. *et al.* (2011) 'Synapsins: From synapse to network hyperexcitability and epilepsy', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22, pp. 408–415. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.005.
- Fatsini, E. *et al.* (2017) 'Dominance behaviour in a non-aggressive flatfish, Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and brain mRNA abundance of selected transcripts', *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0184283.
- Fellous, A. *et al.* (2018) 'DNA methylation in adults and during development of the self-fertilizing mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*', *Ecology and evolution*, (April), pp. 1–18. doi: 10.1002/ece3.4141.
- Filby, A. L. *et al.* (2010) 'Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model', *BMC Genomics*. BioMed Central, 11(1), p. 498. doi: 10.1186/1471-2164-11-498.
- Fitzpatrick, M. J. (2004) 'Pleiotropy and the genomic location of sexually selected genes', *American Naturalist*, 163(6), pp. 800–808. doi: 10.1086/386297.
- Fitzpatrick, M. J. *et al.* (2005) 'Candidate genes for behavioural ecology', *Trends in Ecology and Evolution*, pp. 96–104. doi: 10.1016/j.tree.2004.11.017.
- Fordyce, J. A. (2006) 'The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through

- phenotypic plasticity', *Journal of Experimental Biology*, 209(12), pp. 2377–2383. doi: 10.1242/jeb.02271.
- Fraser, D. F. *et al.* (2001) 'Explaining Leptokurtic Movement Distributions: Intrapopulation Variation in Boldness and Exploration', *The American Naturalist*, 158(2), pp. 124–135. doi: 10.1086/321307.
- Frith, M. C., Pheasant, M. and Mattick, J. S. (2005) 'Genomics: The amazing complexity of the human transcriptome', *European Journal of Human Genetics*, 13(8), pp. 894–897. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201459.
- Frost, A. J. *et al.* (2007) 'Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness?', *Proceedings. Biological sciences*. The Royal Society, 274(1608), pp. 333–9. doi: 10.1098/rspb.2006.3751.
- Fuerst, J. A. and Sagulenko, E. (2010) 'Protein uptake by bacteria: An endocytosis-like process in the planctomycete *Gemmata obscuriglobus*.' , *Communicative & integrative biology*. Taylor & Francis, 3(6), pp. 572–5. doi: 10.4161/cib.3.6.13061.
- Fusco, G. and Mineli, A. (2010) 'Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts', *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 365, pp. 547–556. doi: 10.1098/rstb.2009.0267.
- Gao, Y. *et al.* (2013) 'Atlastin-1 regulates dendritic morphogenesis in mouse cerebral cortex', *Neuroscience Research*, 77(3), pp. 137–142. doi: 10.1016/j.neures.2013.08.007.
- Garcia, C. C. (2004) 'Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy', *Journal of Medical Genetics*, 41(3), pp. 183–186. doi: 10.1136/jmg.2003.013680.
- Geoffroy Saint-Hilaire, I. (1859) *Histoire naturelle générale des règnes organiques, principalement étudiée chez l'homme et les animaux* | Isidore GEOFFROY SAINT-HILAIRE. Edited by Librairie de Victor Masson. Paris.
- Ghalambor, C. K. *et al.* (2007) 'Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments', *Functional Ecology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 21(3), pp. 394–407. doi: 10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x.
- Gluckman, P. D. *et al.* (2007) 'Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(31), pp. 12796–800. doi: 10.1073/pnas.0705667104.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D. and Bernstein, E. (2007) 'Epigenetics: A Landscape Takes Shape', *Cell*, pp. 635–638. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006.
- Gosling, S. D. (2001) 'From mice to men: what can we learn about personality from animal research?', *Psychological bulletin*, 127(1), pp. 45–86.
- Grageda, M. V. C., Sakakura, Y. and Hagiwara, A. (2004) 'Early development of the self-fertilizing mangrove killifish *Rivulus marmoratus* reared in the laboratory', *Ichthyological Research*, 51(4), pp. 309–315. doi: 10.1007/s10228-004-0235-5.
- Graur, D. and Li, W.-H. (2000) *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates.
- Hand, J. L. (1986) 'Resolution of Social Conflicts: Dominance, Egalitarianism, Spheres of Dominance, and Game Theory', *The Quarterly Review of Biology*. Stony Brook Foundation, Inc. , 61(2), pp. 201–220. doi: 10.1086/414899.
- Harrington, R. W. (1961) 'Oviparous hermaphroditic fish with internal self-fertilization', *Science*, 134(3492), pp. 1749–1750. doi: 10.1126/science.134.3492.1749.

- Harrington, R. W. (1967) 'Environmentally Controlled Induction of Primary Male Gonochorists from Eggs of the Self-Fertilizing Hermaphroditic Fish, *Rivulus marmoratus* Poey', *Biological Bulletin*, 132(2), pp. 174–199.
- Hashimoto, T., Maekawa, S. and Miyata, S. (2009) 'IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons', *Cell Biochemistry and Function*. John Wiley & Sons, Ltd, 27(7), pp. 496–498. doi: 10.1002/cbf.1600.
- Heard, E. and Martienssen, R. A. (2014) 'Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms', *Cell*, pp. 95–109. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.045.
- Holoch, D. and Moazed, D. (2015) 'RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression.', *Nature reviews. Genetics*. NIH Public Access, 16(2), pp. 71–84. doi: 10.1038/nrg3863.
- Huntingford, F. A. (1976) 'The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus Aculeatus*', *Animal Behaviour*, 24(2), pp. 245–260. doi: 10.1016/S0003-3472(76)80034-6.
- Huntingford, F. and Adams, C. (2005) 'Behavioural syndromes in farmed fish: Implications for production and welfare', *Behaviour*, 142(9), pp. 1207–1221. doi: 10.1163/156853905774539382.
- Inagaki, N. *et al.* (2001) 'CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons', *Nature Neuroscience*, 4(8), pp. 781–782. doi: 10.1038/90476.
- Inatome, R. *et al.* (2000) 'Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain', *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), pp. 27291–27302. doi: 10.1074/jbc.M910126199.
- Jablonka, E. and Lamb, M. J. (1998) 'Comments on "Epigenetic inheritance in evolution"', *Journal of Evolutionary Biology*, 11(2), pp. 159–183. doi: 10.1007/s000360050074.
- Jablonka, E., Lamb, M. J. and Avital, E. (1998) "'Lamarckian" mechanisms in darwinian evolution', *Trends in Ecology & Evolution*. Elsevier Current Trends, 13(5), pp. 206–210. doi: 10.1016/S0169-5347(98)01344-5.
- Jang, H. S. *et al.* (2017) 'CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function.', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(6). doi: 10.3390/genes8060148.
- Jaynes, J. (1969) 'The historical origins of "Ethology" and "Comparative psychology"', *Animal Behaviour*, 17(4), pp. 601–606. doi: 10.1016/S0003-3472(69)80001-1.
- Johnson, J. C. and Sih, A. (2005) 'Precopulatory sexual cannibalism in fishing spiders (*Dolomedes triton*): a role for behavioral syndromes', *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer Verlag, 58(4), pp. 390–396. doi: 10.1007/s00265-005-0943-5.
- Kadauke, S. and Blobel, G. A. (2013) 'Mitotic bookmarking by transcription factors', *Epigenetics & Chromatin*. BioMed Central, 6(1), p. 6. doi: 10.1186/1756-8935-6-6.
- Kelley, J. L. *et al.* (2016) 'The genome of the self-fertilizing mangrove rivulus fish, *Kryptolebias marmoratus*: a model for studying phenotypic plasticity and adaptations to extreme environments.', *Genome Biology and Evolution*, p. evw145. doi: 10.1093/gbe/evw145.
- Kenar, A. N. İ. *et al.* (2013) 'Association of Synapsin III Gene with Adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder', *DNA and Cell Biology*, 32(8), pp. 430–434. doi: 10.1089/dna.2012.1937.
- Kimura, M. (1968) 'Evolutionary rate at the molecular level', *Nature*, 217(5129), pp. 624–626. doi: 10.1038/217624a0.
- Kimura, M. (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.

- Kubick, N., Brösamle, D. and Mickael, M. E. (2018) 'Molecular Evolution and Functional Divergence of the IgLON Family', *Evolutionary Bioinformatics*. SAGE Publications, 14, p. 1176934318775081. doi: 10.1177/1176934318775081.
- Kültz, D. *et al.* (2013) 'Quantitative molecular phenotyping of gill remodeling in a cichlid fish responding to salinity stress', *Molecular and Cellular Proteomics*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 12(12), pp. 3962–3975. doi: 10.1074/mcp.M113.029827.
- Kültz, D. *et al.* (2015) 'Population-specific plasma proteomes of marine and freshwater three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*)', *Proteomics*, 15(23–24), pp. 3980–3992. doi: 10.1002/pmic.201500132.
- Laland, K. *et al.* (2014) 'Does evolutionary theory need a rethink?', *Nature*, 514(7521), pp. 161–164. doi: 10.1038/514161a.
- Lamarck, J. B. (1802) *Recherches sur l'organisation des corps vivants*. Paris: Maillard.
- LeBlanc, D. M. *et al.* (2010) 'A Fish Out of Water: Gill and Skin Remodeling Promotes Osmo- and Ionoregulation in the Mangrove Killifish *Kryptolebias marmoratus*', *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(6), pp. 932–949. doi: 10.1086/656307.
- Ledón-Rettig, C. C., Richards, C. L. and Martin, L. B. (2012) 'Epigenetics for behavioral ecologists', *Behavioral Ecology*, pp. 311–324. doi: 10.1093/beheco/ars145.
- Lee, J. S. F. and Berejikian, B. A. (2008) 'Stability of behavioral syndromes but plasticity in individual behavior: consequences for rockfish stock enhancement', *Environmental Biology of Fishes*, 82(2), pp. 179–186. doi: 10.1007/s10641-007-9288-4.
- Levitis, D. A., Lidicker, W. Z. and Freund, G. (2009) 'Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour', *Animal Behaviour*, 78(1), pp. 103–110. doi: 10.1016/j.anbehav.2009.03.018.
- Li, Y. *et al.* (2017) 'Genotype by environment interactions in forest tree breeding: review of methodology and perspectives on research and application', *Tree Genetics & Genomes*, 13(3), p. 60. doi: 10.1007/s11295-017-1144-x.
- Litwiller, S. L. (2006) 'Rapid increase in the partial pressure of NH<sub>3</sub> on the cutaneous surface of air-exposed mangrove killifish, *Rivulus marmoratus*', *Journal of Experimental Biology*, 209(9), pp. 1737–1745. doi: 10.1242/jeb.02197.
- López-Maury, L., Marguerat, S. and Bähler, J. (2008) 'Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation', *Nature Reviews Genetics*, 9(8), pp. 583–593. doi: 10.1038/nrg2398.
- Lovric, J. (2011) *Introducing Proteomics: From Concepts to Sample Separation, Mass Spectrometry and Data Analysis*, Wiley-Blackwell. Wiley-Blackwell. doi: 10.1002/pmic.201190118.
- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A., Turner, B. J., *et al.* (2006) 'A mixed-mating strategy in a hermaphroditic vertebrate', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1600), pp. 2449–2452. doi: 10.1098/rspb.2006.3594.
- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A., Taylor, D. S., *et al.* (2006) 'Extensive outcrossing and androdioecy in a vertebrate species that otherwise reproduces as a self-fertilizing hermaphrodite', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), pp. 9924–9928. doi: 10.1073/pnas.0603847103.
- Mackiewicz, M., Tatarenkov, A., Perry, A., *et al.* (2006) 'Microsatellite Documentation of Male-Mediated Outcrossing between Inbred Laboratory Strains of the Self-Fertilizing Mangrove Killifish (*Kryptolebias Marmoratus*)', *Journal of Heredity*. Narnia, 97(5), pp. 508–513. doi: 10.1093/jhered/esl017.

- Martin, M. *et al.* (2002) 'Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour', *Psychopharmacology*, 159(4), pp. 379–387. doi: 10.1007/s00213-001-0946-5.
- Martínez-Fernández, M. *et al.* (2008) 'Proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation', *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 7(11), pp. 4926–4934. doi: 10.1021/pr700863e.
- Mcghee, K. E. and Bell, A. M. (2014) 'Paternal care in a fish: epigenetics and fitness enhancing effects on offspring anxiety', *Proc. R. Soc. B*, 281. doi: 10.1098/rspb.2014.1146.
- Mechoulam, R. (2002) 'Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression', *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2–3), pp. 93–99. doi: 10.1054/plef.2001.0340.
- Medrihan, L. *et al.* (2013) 'Synapsin II desynchronizes neurotransmitter release at inhibitory synapses by interacting with presynaptic calcium channels', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 1512. doi: 10.1038/ncomms2515.
- Melikian, H. E. (2004) 'Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation', *Pharmacology & Therapeutics*. Pergamon, 104(1), pp. 17–27. doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2004.07.006.
- Mery, F. and Burns, J. G. (2010) 'Behavioural plasticity: an interaction between evolution and experience', *Evol Ecol*, 24, pp. 571–583. doi: 10.1007/s10682-009-9336-y.
- Mesak, F., Tatarenkov, A. and Avise, J. C. (2015) 'Transcriptomics of diapause in an isogenic self-fertilizing vertebrate', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 16(1), p. 989. doi: 10.1186/s12864-015-2210-0.
- Moran, P. *et al.* (2015) 'Epigenetic regulation of sex ratios may explain natural variation in self-fertilization rates', *Proc. R. Soc. B*, 282. doi: 10.1098/rspb.2015.1900.
- Moreno, C. B. and Muñoz-Delgado, J. (2007) 'An account on the history of ethology.', *Apuntes sobre la historia de la etología.*, 14(2), pp. 213–224.
- Nature Education (2014) *genotype | Learn Science at Scitable*. Available at: <https://www.nature.com/scitable/definition/genotype-234> (Accessed: 22 April 2018).
- Nesher, E. *et al.* (2015) 'Synapsin IIb as a functional marker of submissive behavior', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 10287. doi: 10.1038/srep10287.
- Nettle, D. and Penke, L. (2010) 'Personality: bridging the literatures from human psychology and behavioural ecology.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 365(1560), pp. 4043–50. doi: 10.1098/rstb.2010.0061.
- O'Connell, L. A., Fontenot, M. R. and Hofmann, H. A. (2011) 'Characterization of the dopaminergic system in the brain of an African cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*', *The Journal of Comparative Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 519(1), pp. 75–92. doi: 10.1002/cne.22506.
- Øverli, Ø. *et al.* (2004) 'Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout', *Hormones and Behavior*, 45(4), pp. 235–241. doi: 10.1016/j.yhbeh.2003.12.002.
- Pearsons, T. N., Fritts, A. L. and Scott, J. L. (2007) 'The effects of hatchery domestication on competitive dominance of juvenile spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. NRC Research Press Ottawa, Canada, 64(5), pp. 803–812. doi: 10.1139/f07-058.
- Penny, D. (2015) 'Epigenetics, Darwin, and Lamarck', *Genome Biology and Evolution*, 7(6), pp. 1758–1760. doi: 10.1093/gbe/evv107.
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR',

- Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 29(9), pp. 45e – 45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Picotti, P., Bodenmiller, B. and Aebersold, R. (2013) 'Proteomics meets the scientific method', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 24–27. doi: 10.1038/nmeth.2291.
- Pigliucci, M. (1996) 'Modelling phenotypic plasticity. II. Do genetic correlations matter?', *Heredity*, 77 ( Pt 5), pp. 453–60.
- Pigliucci, M. (2001) *Phenotypic plasticity : beyond nature and nurture*. Johns Hopkins University Press.
- Pigliucci, M. (2005) 'Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now?', *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9), pp. 481–486. doi: 10.1016/j.tree.2005.06.001.
- Prior, H. *et al.* (2004) 'Exploration, emotionality, and hippocampal mossy fibers in nonaggressive AB/Gat and congenic highly aggressive mice', *Hippocampus*. John Wiley & Sons, Ltd, 14(1), pp. 135–140. doi: 10.1002/hipo.10166.
- Puffenbarger, R. (2005) 'Molecular Biology of the Enzymes that Degrade Endocannabinoids', *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*, 4(6), pp. 625–631. doi: 10.2174/156800705774933050.
- Réale, D. *et al.* (2007) 'Integrating animal temperament within ecology and evolution', *Biological Reviews*, pp. 291–318. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x.
- Réale, D. *et al.* (2010) 'Evolutionary and ecological approaches to the study of personality', *Philosophical transactions*, 365, pp. 3937–3946. doi: 10.1098/rstb.2010.0222.
- Remy, J.-J. (2010) 'Stable inheritance of an acquired behavior in *Caenorhabditis elegans*', *Current Biology*. Cell Press, 20(20), pp. R877–R878. doi: 10.1016/J.CUB.2010.08.013.
- Renn, S. C. P. and Schumer, M. E. (2013) 'Genetic accommodation and behavioural evolution: Insights from genomic studies', *Animal Behaviour*, 85(5), pp. 1012–1022. doi: 10.1016/j.anbehav.2013.02.012.
- Richa, R. and Sinha, R. P. (2014) 'Hydroxymethylation of DNA : an epigenetic marker', *EXCLI Journal*, 13, pp. 592–610.
- Rismanchi, N. *et al.* (2008) 'Atlantin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 17(11), pp. 1591–1604. doi: 10.1093/hmg/ddn046.
- Rocha, P. P. *et al.* (2015) 'Breaking TADs: Insights into hierarchical genome organization', *Epigenomics*. NIH Public Access, pp. 523–526. doi: 10.2217/epi.15.25.
- Rodriguez-Arias, M. *et al.* (2013) 'CB1 cannabinoid receptor-mediated aggressive behavior', *Neuropharmacology*. Pergamon, 75, pp. 172–180. doi: 10.1016/J.NEUROPHARM.2013.07.013.
- Ruiz-Gomez, M. de L. *et al.* (2011) 'Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles', *Physiology & Behavior*. Elsevier, 102(3–4), pp. 317–322. doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2010.11.023.
- Ruiz-Gomez, M. L. and Huntingford, F. A. (2012) 'Boldness and aggressiveness in early and late hatched three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*', *Journal of Fish Biology*, 81(3), pp. 966–976. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03340.x.
- Sabater, L. *et al.* (2014) 'A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: A case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study', *The Lancet Neurology*. Elsevier, 13(6), pp. 575–586. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70051-1.

- Sakakura, Y. *et al.* (2006) 'Gonadal morphology in the self-fertilizing mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*', *Ichthyological Research*. Springer-Verlag, 53(4), pp. 427–430. doi: 10.1007/s10228-006-0362-2.
- Sakakura, Y. and Noakes, D. L. G. (2000) 'Age, Growth, and Sexual Development in the Self-fertilizing Hermaphroditic Fish *Rivulus marmoratus*', *Environmental Biology of Fishes*. Kluwer Academic Publishers, 59(3), pp. 309–317. doi: 10.1023/A:1007627411492.
- Sarnyai, Z., Jashar, C. and Olivier, B. (2015a) 'Modeling combined schizophrenia-related behavioral and metabolic phenotypes in rodents', *Behavioural Brain Research*. Elsevier, pp. 130–142. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.016.
- Sarnyai, Z., Jashar, C. and Olivier, B. (2015b) 'Modeling combined schizophrenia-related behavioral and metabolic phenotypes in rodents', *Behavioural Brain Research*, pp. 130–142. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.016.
- Schirmer, K. *et al.* (2010) 'Transcriptomics in ecotoxicology', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer, 397(3), pp. 917–923. doi: 10.1007/s00216-010-3662-3.
- Schlichting, C. D. and Pigliucci, M. (1998a) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective.*, *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sunderland: Sinauer Associates Incorporated.
- Schlichting, C. D. and Pigliucci, M. (1998b) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective.*, *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sunderland: Sinauer Associates Incorporated.
- Shimokawa, N. *et al.* (2010) 'CIN85 regulates dopamine receptor endocytosis and governs behaviour in mice', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 29(14), pp. 2421–2432. doi: 10.1038/emboj.2010.120.
- Sih, A., Bell, A. and Johnson, J Chadwick (2004) 'Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview', *Trends in Ecology and Evolution*, pp. 372–378. doi: 10.1016/j.tree.2004.04.009.
- Sih, A., Kats, L. B. and Maurer, E. F. (2003) 'Behavioural correlations across situations and the evolution of antipredator behaviour in a sunfish-salamander system', *Animal Behaviour*. Academic Press, 65(1), pp. 29–44. doi: 10.1006/anbe.2002.2025.
- Silvestre, F. *et al.* (2010) 'A proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 408(16), pp. 3176–3188. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.04.005.
- Silvestre, F., Gillardin, V. and Dorts, J. (2012) 'Proteomics to assess the role of phenotypic plasticity in aquatic organisms exposed to pollution and global warming', *Integrative and Comparative Biology*, 52(5), pp. 681–694. doi: 10.1093/icb/ics087.
- Singh, K. *et al.* (2018) 'The combined impact of IgLON family proteins Lsamp and Neurotrimin on developing neurons and behavioral profiles in mouse', *Brain Research Bulletin*. Elsevier, 140, pp. 5–18. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.03.013.
- Skinner, M. K. (2011) 'Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. Wiley-Blackwell, 93(1), pp. 51–55. doi: 10.1002/bdrc.20199.
- Skinner, M. K. (2015) 'Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: A neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution', *Genome Biology and Evolution*, 7(5), pp. 1296–1302. doi: 10.1093/gbe/evv073.
- Sloan Wilson, D. *et al.* (1994) 'Shyness and boldness in humans and other animals', *Trends in Ecology & Evolution*, 9(11), pp. 442–446. doi: 10.1016/0169-5347(94)90134-1.

- Smith, B. R. and Blumstein, D. T. (2008) 'Fitness consequences of personality: A meta-analysis', *Behavioral Ecology*. Oxford University Press, pp. 448–455. doi: 10.1093/beheco/arm144.
- Sneddon, L. U. (2003) 'The bold and the shy: individual differences in rainbow trout', *Journal of Fish Biology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 62(4), pp. 971–975. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00084.x.
- Snell-Rood, E. C. (2013) 'An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity', *Animal Behaviour*. Academic Press, 85(5), pp. 1004–1011. doi: 10.1016/J.ANBEHAV.2012.12.031.
- Stamps, J. and Groothuis, T. G. G. (2010) 'The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives', *Biological Reviews*, 85(2), pp. 301–325. doi: 10.1111/j.1469-185X.2009.00103.x.
- Stephen C. Stearns (2014) 'Evolution of reaction norms', *Princeton Guide to Evolution*. Oxford University Press, New York, pp. 261–267.
- Tammen, S. A., Friso, S. and Choi, S. W. (2013) 'Epigenetics: The link between nature and nurture', *Molecular Aspects of Medicine*, pp. 753–764. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.018.
- Taschler, U. *et al.* (2011) 'Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance', *Journal of Biological Chemistry*. JBC Papers in Press, 286(20), pp. 17467–17477. doi: 10.1074/jbc.M110.215434.
- Tatarenkov, A. *et al.* (2015) 'Genetic Subdivision and Variation in Selfing Rates Among Central American Populations of the Mangrove Rivulus, *Kryptolebias marmoratus*', *Journal of Heredity*, (Nordborg 1997), pp. 276–284. doi: 10.5061/dryad.528nm.
- Tatarenkov, A., Lima, S. M. Q. and Avise, J. C. (2011) 'Extreme homogeneity and low genetic diversity in *Kryptolebias ocellatus* from south-eastern Brazil suggest a recent foundation for this androdioecious fish population', *Journal of Fish Biology*, 79(7), pp. 2095–2105. doi: 10.1111/j.1095-8649.2011.03155.x.
- Taylor, D. S. (1992) 'Diet of the killifish *Rivulus marmoratus* collected from land crab burrows, with further ecological notes', *Environmental Biology of Fishes*, 33(4), pp. 389–393. doi: 10.1007/BF00010951.
- Taylor, D. S. (2000) 'Biology and ecology of *Rivulus marmoratus*: New insights and a review', *Florida Scientist*, 63, pp. 242–255. doi: 10.2307/24321270.
- Taylor, D. S. (2012) 'Twenty-four years in the mud: What have we learned about the natural history and ecology of the mangrove rivulus, *kryptolebias marmoratus*?', in *Integrative and Comparative Biology*. Oxford University Press, pp. 724–736. doi: 10.1093/icb/ics062.
- Taylor, S., Davis, W. and Turner, B. (1995) '*Rivulus marmoratus*: ecology of distributional patterns in florida and central indian river lagoon', *Bulletin of marine science*, 57(1), pp. 202–207.
- Thomson, J. S. *et al.* (2011) 'Physiological and genetic correlates of boldness: Characterising the mechanisms of behavioural variation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*', *Hormones and Behavior*, 59(1), pp. 67–74. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.10.010.
- Thörnqvist, P.-O. *et al.* (2015) 'Natural selection constrains personality and brain gene expression differences in Atlantic salmon (*Salmo salar*).', *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists Ltd, 218(Pt 7), pp. 1077–83. doi: 10.1242/jeb.114314.
- Toms, C. N., Echevarria, D. J. and Jouandot, D. J. (2010) 'A Methodological Review of Personality-Related Studies in Fish: Focus on the Shy-Bold Axis of Behavior', *International Journal of Comparative Psychology*, 23, pp. 1–25.
- Turko, A. J. and Wright, P. A. (2015) 'Evolution, ecology and physiology of amphibious killifishes

- (Cyprinodontiformes)', *Journal of Fish Biology*, 87(4), pp. 815–835. doi: 10.1111/jfb.12758.
- Valcu, C.-M. and Kempenaers, B. (2015) 'Proteomics in behavioral ecology', *Behavioral Ecology*. Oxford University Press, 26(1), pp. 1–15. doi: 10.1093/beheco/aru096.
- Vanaveski, T. *et al.* (2017) 'Promoter-Specific expression and genomic structure of Iglon family genes in mouse', *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers, 11, p. 38. doi: 10.3389/fnins.2017.00038.
- Voisin, A. S., Kültz, D. and Silvestre, F. (2019) 'Early-life exposure to the endocrine disruptor 17- $\alpha$ -ethinylestradiol induces delayed effects in adult brain, liver and ovotestis proteomes of a self-fertilizing fish', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 194, pp. 112–124. doi: 10.1016/j.jprot.2018.12.008.
- Waddington, C. H. (2012) 'The epigenotype. 1942.', *International journal of epidemiology*, 41(1), pp. 10–13. doi: 10.1093/ije/dyr184.
- Ward, S. J. and Tuma, R. F. (2014) 'Endocannabinoids', *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 2, pp. 42–47. doi: 10.1016/B978-0-12-385157-4.00041-5.
- Weeks, S. C., Benvenuto, C. and Reed, S. K. (2006) 'When males and hermaphrodites coexist: A review of androdioecy in animals', *Integrative and Comparative Biology*, 46(4), pp. 449–464. doi: 10.1093/icb/icj048.
- Werner, E. E., Mittelbach, G. G. and Hall, D. J. (1981) 'The Role of Foraging Profitability and Experience in Habitat Use by the Bluegill Sunfish', *Ecology*. Wiley-Blackwell, 62(1), pp. 116–125. doi: 10.2307/1936675.
- West-Eberhard, M. J. (2003) 'Developmental plasticity and evolution', *Nature*. Oxford University Press, p. 794. doi: 10.2002/ajpa.20219.
- Wilkins, M. R. *et al.* (1996) 'From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis.', *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 14(1), pp. 61–5.
- Wilson, A. D. M. and Godin, J.-G. J. (2009) 'Boldness and behavioral syndromes in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*', *Behav Ecol*, 20, pp. 231–237. doi: 10.1093/beheco/arp018.
- Wilson, A. J. *et al.* (2009) 'Indirect genetic effects and the evolution of aggression in a vertebrate system', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society, 276(1656), pp. 533–541. doi: 10.1098/rspb.2008.1193.
- Wolf, M. and Weissing, F. J. (2012) 'Animal personalities: Consequences for ecology and evolution', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Current Trends, pp. 452–461. doi: 10.1016/j.tree.2012.05.001.
- Wong, M. Y. *et al.* (2018) 'Liprin- $\alpha$ 3 controls vesicle docking and exocytosis at the active zone of hippocampal synapses', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 115(9), p. 201719012. doi: 10.1073/pnas.1719012115.
- Wourms, J. P. (1972) 'The Developmental Biology of Annual Fishes, pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes.', *Journal of Experimental zoology*, 182, pp. 389–414.
- Wund, M. A. (2012) 'Assessing the impacts of phenotypic plasticity on evolution', in *Integrative and Comparative Biology*. Narnia, pp. 5–15. doi: 10.1093/icb/ics050.
- Yang, X. *et al.* (2014) 'Intercellular protein–protein interactions at synapses', *Protein & Cell*. Higher Education Press, 5(6), pp. 420–444. doi: 10.1007/s13238-014-0054-z.
- Zhu, W., Smith, J. W. and Huang, C. M. (2010) 'Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hindawi Publishing Corporation.

doi: 10.1155/2010/840518.

Zubarev, R. A. (2013) 'The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics', *Proteomics*, 13(5), pp. 723–726. doi: 10.1002/pmic.201200451.

Zürner, M. *et al.* (2011) 'Analyses of the spatiotemporal expression and subcellular localization of liprin- $\alpha$  proteins', *The Journal of Comparative Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 519(15), pp. 3019–3039. doi: 10.1002/cne.22664.

## Annexes

### Annexe 1 : Scores d'audace et d'agressivité obtenus par Analyse en Composantes

Principales sur les résultats des tests comportementaux

Fish ID	Score agressivité	Score audace
Ctl 2	-0.23	0.60
Ctl 3	1.46	-0.03
Ctl 4	-0.15	0.76
Ctl 5	2.41	-1.71
Ctl 6	2.37	-0.88
Ctl 7	0.42	1.63
Ctl 8	-3.74	-0.22
Ctl 9	5.02	-2.40
Ctl 10	-0.21	0.61
Ctl 12	-2.37	-2.24
Ctl 13	1.00	2.11
Ctl 14	3.37	0.91
Ctl 15	-0.38	1.44
Ctl 16	-3.59	-0.34
Ctl 17	-3.77	-0.11
Ctl 18	-0.10	1.09
Ctl 20	0.83	2.61
Ctl 21	0.82	1.45
Ctl 22	0.16	-0.62
Ctl 23	-3.61	-0.47
Ctl 24	-2.76	-2.24
Ctl 25	-1.76	0.51
Ctl 26	-2.89	-2.05
Ctl 27	0.56	0.85
Ctl 28	2.31	-3.15
Ctl 30	1.51	-2.06
Ctl 31	1.05	-2.00
Ctl 32	1.52	-0.38
Ctl 34	-3.18	-0.18
Ctl 35	1.24	-0.87
Ctl 36	1.21	0.79
Ctl 37	-3.20	-1.42
Ctl 38	-3.38	2.24
Ctl 39	0.62	0.53
Ctl 40	0.47	1.05
Ctl 42	1.89	-0.20
Ctl 43	0.52	-0.63
Ctl 44	2.25	1.08
Ctl 45	-0.18	-1.15
Ctl 46	0.76	1.34
Ctl 47	-0.93	1.78
Ctl 48	2.18	0.98
Ctl 49	-0.52	0.32
Ctl 50	1.01	0.65

Annexe 1. Scores d'audace et d'agressivité obtenus par analyse en composantes principales (ACP) sur l'ensemble des échantillons contrôles de la manipulation réalisée par A. Carion. Les échantillons utilisés pour l'ensemble des manipulations réalisées au cours de ce mémoire sont colorés. (vert) = échantillons extrêmes dans le continuum d'audace utilisés pour l'analyse de quantification protéique par MS/MS ; (bleu) = échantillons extrêmes dans le continuum d'agressivité utilisés pour l'analyse de quantification protéique par MS/MS ; (rouge) = échantillons extrêmes dans le continuum d'agressivité utilisés lors de l'expression relative de gènes par RT-qPCR

**Annexe 2** : Gel d'électrophorèse pour la vérification de l'efficacité des primers préalablement à l'analyse par expression relative de gènes

Annexe 2. Gel d'électrophorèse 2% (TAE 0,5x) après qPCR de vérification d'efficacité de primer. La taline-5 (TLN5) n'a pas été utilisée comme le démontre l'absence de bandes pour les plus hautes dilutions, donc l'absence d'amplification de l'ADNc pour ce gène candidat. Le deuxième réplicas de chaque dilution a été choisi. Un ladder de 100bp et un autre de 1Kb ont été utilisés pour évaluer la taille des amplicons. NC = Contrôle négatif

