

<b>Centre INRA</b>	Rennes	
<b>Unité</b>	<b>Codique</b>	1037
	<b>Intitulé</b>	Laboratoire INRA de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)
<b>Titre de la thèse*</b>	" Caractérisation fonctionnelle et évolutive de l'implication de la voie des TFG-beta lors de la différenciation du sexe: génécité chez différentes espèces d'intérêt piscicoles".	
<b>Résumé (10 – 15 lignes)</b>		
<p>Impliquée dans les régulations de fonctions biologiques aussi variées que la morphogenèse précoce, la croissance ou plus généralement de l'homéostasie, maintenant relativement bien décrites, la voie des TFG-<math>\beta</math> au sens large semble nouvellement émerger en tant que régulateur clef de la différenciation sexuelle, la spécification et la maintenance des cellules germinales ainsi que de la gamétogenèse. Récemment démontrés comme étant impliqués en tant que déterminants majeurs chez différentes espèces de poissons (travaux de notre laboratoire), mais aussi importants pour la maintenance gonadique, ces facteurs de type TGF-<math>\beta</math> semblent être un axe d'étude prometteur pour mieux comprendre la physiologie de la gonade chez les poissons.</p> <p>Ainsi notre projet s'articule autour de trois questions majeures : (i) Le rôle relatif de chaque voie de signalisation de type TFG-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math> <i>sensu stricto</i>, Amh, activin ou BMP) lors de la gonadogenèse/gamétogenèse. (ii) La traduction physiologique au niveaux cellulaires ou organismiques (testicule ou ovaire) de l'activation de ces différentes voies de signalisation (étude de poissons gain ou perte de fonctions). (iii) L'aspect intégré de ces voies. A savoir comment cette/ces voie/s s'intègrent dans le schéma classique avec les autres voies « canoniques » de la différenciation/maintenance gonadique.</p>		

## Encadrement

<b>Responsable(s) de la thèse</b>	Amaury HERPIN	<b>HDR ? (O/N)</b>	N
<b>Directeur(s) de la thèse (si différent du(des) responsable(s))</b>	Yann GUIGUEN	<b>HDR ? (O/N)</b>	O

<b>Liste de 5 publications récentes du (des) responsable(s) de la thèse</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li><b>Herpin, A.</b> and Scharl, M. (2011) Sex determination: switch and suppress, <i>Curr Biol.</i> 21(17): R656-659.</li> <li><b>Herpin, A.,</b> Adolphi, M., Nicol, B., Hinzmann, M., Schmidt, C., Klughammer, J., Engel, M., Tanaka, M., Guiguen, Y. and Scharl, M. (2013) Divergent expression regulation of gonad development genes in medaka shows incomplete conservation of the downstream regulatory network of vertebrate sex determination, <i>Mol Biol Evol.</i> 30(10): 2328-46.</li> <li>Nishimura, T., <b>Herpin, A.,</b> Kimura, T., Hara, I., Kawasaki, T., Nakamura, S., Yamamoto, Y., Saito, T. L., Yoshimura, J., Morishita, S., Tsukahara, T., Kobayashi, S., Naruse, K., Shigenobu, S., Sakai, N., Scharl, M. and Tanaka, M. (2014) Cell autonomous sexual identity of germ cells by sex chromosomes prior to the gonadal formation in medaka, <i>Development.</i> 141(17):3363-9.</li> <li><b>Herpin, A.,</b> Scharl, M. (2015) Plasticity of the gene regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers and usurpaters, <i>EMBO reports.</i> 16(10):1260-74.</li> </ol>

5. Zhang, X., Guan, G., Li, M., Zhu, F., Liu, Q., Naruse, K., **Herpin' A.**, Li, J., Nagahama, Y. and Hong, Y. (2016) Autosomal *gsdf* acts as a male sex initiator in the fish medaka, *Scientific reports*, 6, 19738.

<b>Université d'inscription de l'étudiant en thèse</b>	Université de Rennes
<b>Composition prévue du comité de thèse</b> (nom, laboratoire)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membre 1 : Manfred Schartl (Université de Würzburg)</li> <li>• Membre 2 : Julien Bobe (LPGP, INRA)</li> <li>• Membre 3 : Eric Pailhoux (BDR, INRA)</li> <li>• Membre 4 : Tuteur Ecole doctorale VAS (à définir)</li> </ul>

## Description du projet (4 pages maximum)

### Enjeux socio-économiques

Le développement de la pisciculture « moderne » passe actuellement par une phase de diversification accrue des espèces d'intérêt. Corolaire de cette expansion rapide, la plupart de ces nouvelles espèces n'ont que peu ou prou bénéficié d'un apport de connaissances fondamentales en relation avec leur biologie et physiologie. Ces connaissances sont pourtant indispensables au développement d'une aquaculture durable et raisonnée. Nos efforts doivent donc contribuer à l'amélioration de l'efficacité des conditions d'élevage (croissance, résistance aux maladies, fertilité, qualité ovocytaire...) ainsi qu'à leur adaptation à de nouveaux contextes (environnements contingents, pollution, densité...). A ce titre, le contrôle du sexe phénotypique, mais aussi la maîtrise de la fertilité et la qualité ovocytaire chez ces nouvelles espèces sont des enjeux majeurs et nécessaires au développement et à l'optimisation de cette aquaculture moderne.

Impliquée dans les régulations de fonctions biologiques aussi variées que la morphogenèse précoce, la croissance ou plus généralement de l'homéostasie, maintenant relativement bien décrites, la voie des TFG- $\beta$  au sens large semble nouvellement émerger en tant que régulateur clef de la différenciation sexuelle, la spécification et la maintenance des cellules germinales ainsi que de la gamétogenèse. Récemment démontrés comme étant impliqués en tant que déterminants majeurs chez différentes espèces de poissons (travaux de notre laboratoire), mais aussi importants pour la maintenance gonadique, ces facteurs de type TGF- $\beta$  semblent être un axe d'étude prometteur pour mieux comprendre –et contrôler- la physiologie de la gonade chez les poissons.

A ce titre notre sujet de thèse vise à la “ **Caractérisation fonctionnelle et évolutive de l'implication de la voie des TFG- $\beta$  lors de la différenciation du sexe : généricité chez différentes espèces d'intérêt piscicoles** ”. Ce sujet s'inscrit totalement dans le périmètre redéfini de la thématique de notre laboratoire, qui ambitionne « d'étudier la physiologie des poissons afin de maîtriser les phénotypes d'intérêt pour les systèmes piscicoles durables », et il est aussi bien sûr en adéquation avec les missions premières de notre institut : produire des connaissances et mobiliser les avancées en biologie et en biotechnologies au service d'un développement agricole durable (« science et impact »).

### Situation du projet et état de l'art scientifique – Originalité du projet

Les cascades de gènes impliqués lors du développement sont généralement sous la dépendance de facteurs ou régulateurs (master regulators), conservés lors de l'évolution, qui infléchiront la/les destinée(s) de différents lignages cellulaires vers la différenciation des différents tissus ou organes lors de l'embryogenèse. Singulièrement, la différenciation de la gonade et la gonadogenèse ne se conforment pas totalement à cette règle. Ainsi, différentes études ont mis en évidence certaines divergences marquées de facteurs et réseaux de gènes impliqués au cours de l'évolution. Particulièrement, une forte diversité des déterminants majeurs du sexe gouvernant la hiérarchie

de ces réseaux géniques est observée Refs. #1, #4 de la liste de publications). D'un autre coté certains facteurs aval s'avèrent avoir été plus conservés lors de l'évolution et semblent converger vers la régulation de voies de signalisation communes. Ce paradigme peut être illustré par le gène déterminant majeur des mammifères -SRY- qui n'est pas détecté en dehors des mammifères thériens. Néanmoins certains gènes avals de SRY tels que les facteurs de transcription SOX9 ou DMRT1, les voies de signalisation (TGF- $\beta$ /Amh, Wnt4/ $\beta$ -catenin, Hedgehog) ou bien même des gènes régulant la propre expression de SRY (SF1, WT1), disposent d'homologues conservés ayant des fonctions présumées similaires lors de la gonadogenèse et la gamétogenèse aussi bien chez les protostomes que chez les deutérostomes. Ce paradigme a été verbalisé sous le slogan: « *Master change, slaves remain* ».

Tacitement acceptée cette règle n'est expérimentalement supportée que par la diversité avérée des déterminants majeurs au sein des espèces. De façon remarquable certains déterminants majeurs ont cependant été identifiés de manière récurrente au point d'acquérir le grade de « usual suspects » lors de la quête de nouveaux déterminants (Ref. #1). De façon notoire, tous ces gènes, qu'ils soient dupliqués, ou paralogues sont néanmoins quasiment toujours issus de réseaux géniques pré-existants régulant soit la gonadogenèse ou la gamétogenèse.

Parmi ces « usual suspects », et plus particulièrement chez les poissons, la voie de signalisation des TGF- $\beta$  (Amh, récepteurs Amh, Gsdf, GDF6) semble maintenant émerger, notamment suite à de récents travaux effectués au laboratoire ([1, 2], #4 et #5, travaux en cours sur le brochet, le panga, le killifish (*Nothobranchius*) et le medaka réalisés au laboratoire).

Emergence de la voie des TGF- $\beta$ : L'hormone anti-Müllerienne (Amh) est un facteur de croissance appartenant à la super-famille des TGF- $\beta$  et jouant, chez les mammifères, un rôle dans la dégradation/régression des canaux de Müller de l'appareil reproductif femelle lors du développement de l'embryon male. L'Amh n'est ensuite pas requis pour le développement du testicule chez la souris. Singulièrement chez les vertébrés non mammifères cette voie joue un rôle central lors de la formation des testicules. Ainsi dans les gonades embryonnaires de poulet l'Amh est préférentiellement exprimée chez les males et est fortement suspectée d'être impliquée dans la morphogenèse précoce du testicule chez les oiseaux en général. Chez le mutant *hotei* de medaka la voie de signalisation Amh est perturbée suite à une mutation dans le récepteur de type I à l'Amh. Par voie de conséquence une réversion sexuelle male vers femelle est induite, et une sur-prolifération des cellules souches germinales observée. La gamétogenèse et plus particulièrement l'ovogenèse/folliculogénèse s'en trouvent impactées [3].

Bien qu'agissant clairement en tant que second rôle quant à la régulation de ces réseaux géniques chez les mammifères, le système Amh/récepteur Amh a toutefois réussi à se hisser au sommet de la hiérarchie à plusieurs reprises. Ainsi, chez le pejerrey, un poisson d'eau douce originaire de Patagonie, une version dupliquée de l'Amh a endossé le rôle de déterminant majeur du sexe sur le chromosome Y [1]. Chez le fugu une simple variation allélique est responsable d'une moindre activité du récepteur Amh localisé sur le chromosome X [2]. Tout comme chez le medaka, une réduction du signal Amh est connectée à une féminisation de la gonade. Plus proche de nous, notre groupe a pu aussi mettre en évidence la prise de contrôle de la détermination du sexe par la voie de l'Amh chez le brochet et le panga.

Phylogénétiquement proche des Amhs, le gonadal soma-derived factor (Gsdf) est un autre facteur de croissance appartenant à la famille des TGF- $\beta$ . Innovation évolutive, Gsdf est uniquement présent chez les poissons et sa caractérisation biochimique encore peu étudiée. Son expression exclusive durant la gonadogenèse de tous les poissons examinés pour l'heure en fait un acteur incontournable. Malgré un rôle aval dans la cascade de régulation gonadique, tout comme l'Amh/Amh-rec, *gsdf* s'est imposé comme déterminant majeur chez différentes espèces de medaka (*Oryzias luzonensis*, *marmoratus*) et vraisemblablement chez le sablefish (travaux menés partiellement au laboratoire et en collaboration).

Toujours dans la même optique et appartenant à la voie des TGF- $\beta$ , nous sommes impliqués dans un projet visant en la caractérisation de GDF6/BMP13 établi en tant que déterminant majeur du sexe chez le *nothobranchius*.

De manière plus particulière mais sans être anecdotique, le récepteur de type I par lequel le ligand

Amh signale reste inconnu, tout comme peuvent l'être les récepteurs (type 1 et 2) aux ligands Gsdf ou Gdf6. Aussi la prédominance de telle ou telle sous famille de TGF- $\beta$  lors de gonadogenèse /gamétogenèse ainsi que les réelles modalités de transmissions de leur signal (spécificité propre à chaque voie) restent obscures.

### Question de recherche proposée au candidat

S'il apparaît maintenant évident qu'une pléthore de molécules apparentées à la superfamille des TGF- $\beta$  semble avoir pris le contrôle de la détermination du sexe chez les poissons (amh, gsdf, amhr1, BMPR2, gdf6) de manière récurrente lors de l'évolution, **(i)** les modalités de spécificité et de transmission du signal, **(ii)** la traduction physiologique aux niveaux cellulaires ou organismiques (testicule ou ovaire) de l'activation de ces différentes voies de signalisation, ainsi que **(iii)** l'aspect intégré de ces voies au sein du réseau génétique de différenciation gonadique restent pour le moins peu documentés.

Il apparaît alors primordial de mieux caractériser la fonction physiologique de cette voie de signalisation non seulement lors de la détermination du sexe mais aussi lors de la gamétogenèse.

Pour ce faire notre travail s'appuiera principalement sur une espèce modèle, à savoir le medaka. Espèce pour laquelle de nombreux outils moléculaires (lignées reportrices fluorescentes, édition du génome...) ont déjà été développés au laboratoire

Ainsi notre projet s'articule autour de trois questions majeures :

**(i)** Le rôle relatif de chaque voie de signalisation de type TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  *sensu stricto*, Amh, activin, gdf6 ou BMP) lors de la gonadogenèse/gamétogenèse.

Pour ce faire il sera important de (a) caractériser finement les interactions ligands/récepteurs/smads au sein de ces différentes voies. (b) Quantifier l'importance relative de ces différentes voies (phénomène d'hétérodimérisation).

**(ii)** La traduction physiologique aux niveaux cellulaires ou organismiques (testicule ou ovaire) de l'activation de ces différentes voies de signalisation (étude de poissons gain ou perte de fonctions par transgénèse additive ou CRISPR).

**(iii)** L'aspect intégré de ces voies. A savoir comment cette/ces voie/s s'intègrent dans le schéma classique avec les autres voies (pour l'instant la voie TGF- $\beta$  ne branche avec aucune voie « canonique » de la différenciation/maintenance gonadique).

### Hypothèses de travail

Notre hypothèse de travail reposera tout d'abord sur la conservation évolutive de ces facteurs de type TGF- $\beta$  au cours de l'évolution ainsi que sur une certaine généralité de leur(s) fonction(s) biologique(s) en rapport avec la gonadogenèse/gamétogenèse chez les poissons.

Des medaka transgéniques pour lesquels l'amh a été invalidée ont déjà été générés. Bien que n'étant pas le déterminant majeur de cette espèce, la réversion sexuelle de ces poissons plaide pour un rôle majeur de l'amh lors de la détermination sexuelle.

### Méthodes prévues, matériel nécessaire (disponible et/ou à produire), source(s) de financement des travaux

-Lignées transgéniques reportrices afin de discriminer l'activation de ces différentes voies de type TGF- $\beta$ . Ceci se fera au niveau des effecteurs aval de ces voies, à savoir les différentes smads. Un système *in vitro* optimisé fonctionne déjà en culture cellulaire (système reporteur de type UAS/Gal4). Chez le poisson (medaka) une adaptation de ce système sera réalisée et reposera sur la fusion des différents domaines transactivateurs de Smads avec un Gal4 et « driver » de type UAS-GFP. Ces premières lignées ont déjà été générées et sont disponibles pour analyse.

-Interactome : Yeast two hybrid system (sera sous-traité).  
-Surexpression des différents ligands/récepteurs dans des cellules souches (embryonnaires ou spermatogoniales) et RNA-seq pour une analyse comparée des différentes régulations  
-Poissons KO ou conditionnel KI (Amh , Amh-rec (déjà disponibles), GDF6).  
-Analyse des mutants (KO ou KI conditionnels) à l'aide de notre bibliothèque d'une vingtaine de poissons reporteurs fluorescents dans les différents lignages cellulaires de la gonade par microscopie confocale.  
Toutes ces techniques (édition du génome, transgénèse, microscopie confocale, transfection de cellules) sont utilisées en routines au sein même de notre équipe. Certaines lignées ont été générées et sont dorénavant et déjà disponibles pour analyse.

### Programme de recherches

**1-Rôle relatif de chaque voie de signalisation de type TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  *sensu stricto*, Amh, activin ou BMP) lors de la gonadogenèse/gamétogenèse et caractérisation des interactions :**  
-Système cellulaire pour évaluer les interactions ligands, récepteurs et smads (les outils sont générés) : transfections/analyses.  
-Poissons reporteurs Gal4 (lignées « Smads 1 et 2 et effectrice» déjà établies, reste « smad 3, 5, 8 » à générer).  
-Yeast two hybrid system (à sous-traiter en utilisant le ligand orphelin gsd6).  
-Poissons perte de fonction (amh (déjà établi) et gdf6 (à générer)).  
**2-Analyse des phénotypes sur poissons gain/perte de fonction (amh et gdf6) et analyse comparée de la régulation des différentes voies (RNA-seq et poissons Gal4 : histologie, microscopie confocale). Analyse des résultats du yeast two hybrid system (exploratoire, éventuellement analyse fonctionnelle des résultats du screen).**  
**3-Intégration phylogénétique des résultats (structure fonction) en relation avec d'autres modèles utilisés au laboratoire sur des thématiques croisées : amh chez le brochet et gdf6 chez le cavefish.**

### Calendrier

**Partie 1 (octobre 2018-avril 2019):** poissons transgéniques reporteurs et perte de fonction: 1an et six mois ; système cellulaire : 6 mois ; yeast two hybrids : 6 mois.  
**Partie 2 (mai 2019-juin 2020):** Analyse de lignées déjà établies (histologie, microscopie confocale): 1 an. Mise en forme des résultats, écriture d'une revue  
**Partie 3 (juillet 2020-octobre 2020):** intégration phylogénétique : 6 mois. (durées estimées indicatives mais chevauchantes). Ecriture des articles (thèse sur articles).

### Publications envisagées

3 publications comme suit en premier auteur : **(i)** Revue sur l'évolution des acteurs de la voie des TGF- $\beta$  chez les poissons (duplications spécifiques, sous-fonctionnalisation) ; emphase sur leur rôle lors du développement de la gonade en général en tant que déterminants majeurs du sexe chez les poissons (servira d'introduction à la thèse). **(ii)** Spécificité des voies de signalisation de type TGF- $\beta$  lors de la mise en place de la gonade chez le medaka (atlas dynamique du pattern d'expression ; poissons rapporteurs Gal4). **(iii)** Spécificité fonctionnelle du gsd6 chez les poissons (récepteurs utilisés, crosstalk, partenaires).  
Implication (de par les outils créés lors de la thèse) dans d'autres projets collaboratifs actuellement en cours (gsd6 du sablefish (Adam Luckenbach NOAA Federal), gdf6 chez astyanax (thèse du labo)).  
Communications orales à des congrès (détermination du sexe et poissons modèles).

### Compétences cognitives et techniques acquises par le doctorant durant la thèse

- Compétence discursive (analyse de résultats/démontrer/convaincre)
- Compétences théoriques en rapport avec : reproduction / evolution / déterminisme du sexe / différenciation du sexe.
- Compétences techniques/technologiques : biologie moléculaire, génomique fonctionnelle (micro-injection, transgénèse, CRISPR/Cas9), histologie, microscopie confocale, RT-QPCR, culture cellulaire/transfection, micro-array/RNA-seq).

### Partenariat scientifique et industriel dans lequel s'inscrit le travail

- Ce projet de thèse s'insère partiellement dans le projet ANR PhyloSex (projet Blanc International, SVSE7, 2013), projet ANR acquis pour lequel nous avons déjà construit un partenariat scientifique fort avec des collègues de l'université de Würzburg en Allemagne (Prof. Manfred Scharl) et de l'université de l'Oregon aux USA (Prof. John H. Postlethwait). Ces deux collègues sont des scientifiques de renommée internationale dans le domaine de l'évolution de gènes chez les poissons et de la détermination du sexe.
- Nous avons aussi développé récemment des collaborations fructueuses avec le Dr Nathalie di Clemente (Unité de biologie fonctionnelle et adaptative, CNRS UMR 8251) qui est une spécialiste de l'implication de l'AMH sur la reproduction chez les mammifères. Ces collaborations seront étendues à ce présent projet de thèse.
- Un projet ANR (PRCI) sera déposé en mars 2018 sur ce sujet précis (collaboration A. Herpin/M. Scharl (Université de Würzburg, Allemagne)).

## Candidat

<b>Candidat pressenti (O/N)</b>	N	<b>Nom, Prénom</b>	
---------------------------------	---	--------------------	--

*Si le candidat est déjà connu, joindre un CV complet (études, diplômes, expériences professionnelles)*

## Autres informations (dont les compétences acquises, 1/2 page maximum)

Dans la mesure où le responsable principal de cette thèse, Amaury Herpin n'a pas son HDR cette thèse sera officiellement portée par Yann GUIGUEN mais Amaury Herpin s'engage à passer son HDR courant 2018 pour prendre la direction de cette thèse (si elle était financée) dès son commencement à l'Automne 2018.

---

## **Avis du directeur d'unité**

### **Avis du directeur de l'unité**

1. **Priorité accordée au projet, en cas de demandes multiples de l'unité**
2. **Avis sur le projet scientifique**
3. **Avis sur le candidat (si connu au moment du dépôt du projet)**

**Date et nom du DU**