

## Thèmes de mémoire du laboratoire de physiologie adaptative et évolutive LEAP (F Silvestre)

<http://www.evolution-physiology.be>

<https://twitter.com/fsilvestrelab>

*Our researches belong to integrative, comparative and evolutionary physiology. We aim to investigate the impacts of environmental changes (pollution, temperature, salinity, etc) on aquatic organisms at different levels: molecular, physiological, phenotypic. Different aquatic species are studied with priorities given to fish models. If we are using zebrafish as a common laboratory model, our main current interests concern two killifish species: the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*, and the Turquoise killifish, *Nothobranchius furzeri*. The former has a unique mixed-mating system that allows self-fertilization, while the latest has a very short life-span (around 20 weeks). Our approaches try to understand how these organisms are affected by environmental stress and how they can acclimate, adapt and evolve. The mangrove rivulus, with its very low genetic diversity, is a perfect model to study the role of epigenetics in adaptation and evolution, while the turquoise killifish is great to decipher the interplay between pollutants and aging. We have developed a workflow of DNA methylation analysis and strive to correlate environmental cues, epigenetic mechanisms, molecular phenotype (at transcriptomic and proteomic levels) and organism phenotype, mainly of behavioural traits. We are combining laboratory experiments (e.g. pollutant exposure, DNA methylation analysis, fish respirometry, fish behaviour) with bioinformatic analyses and field experiments and sampling (in Florida and Belize). All together we aim at investigating proximate (mechanistic) and ultimate (evolutionary) consequences of environmental changes on organisms.*

Les mémoires réalisés au sein du LEAP bénéficieront de l'encadrement des chercheurs suivants (sauf thème 5 en collaboration avec le labo de P. Kestemont): Frédéric Silvestre (promoteur), Ivan Blanco et Valentine Chapelle (doctorants FRIA), Anthony Mathiron (chercheur post-doc), Antoine Wittorski (assistant), Jérôme Lambert et Alice De Groot (techniciens).

Les étudiants seront surtout intéressés par les thèmes suivants : questions d'adaptation et d'évolution, le comportement animal, les mécanismes épigénétiques, l'écotoxicologie. Les principales techniques employées seront des analyses comportementales, y compris le traitement des données (modèles linaires mixtes), l'expression de gènes par qPCR et le pyroséquençage bisulfite (en plus bien sûr de l'expérimentation sur des poissons). D'autres techniques sont possibles en fonction des thèmes et des centres d'intérêt des étudiants. Merci de visiter le site web du labo pour plus d'informations.

**Tous les thèmes de mémoire proposés sont susceptibles de déboucher sur une thèse de doctorat.**

## Thème 1 : Evolution divergente de la stratégie de reproduction dans différentes populations du rivulus des mangroves : rôle des voies de détermination du sexe.

**Mots-clés :** *rivulus des mangroves ; évolution et adaptation ; détermination du sexe ; expression de gènes ; épigénétique ; comportement ; reproduction ; hormones*

Le rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus*, est un poisson exceptionnel à plus d'un titre. Il est notamment le seul vertébré connu dont les individus hermaphrodites pratiquent l'auto-fécondation conduisant à des lignées très peu diversifiées d'un point de vue génétique. Toutefois, il existe également des mâles (alors qu'aucune femelle n'a jamais été identifiée) capables de féconder des hermaphrodites et augmentant ainsi la diversité génétique de la population. De plus, les différentes populations connues présentent des taux de mâles très variables. Ainsi, une population de Floride présente moins de 1% de mâles et une diversité génétique très faible. A l'autre extrémité, une population au Belize présente jusqu'à 42% de mâles et une diversité génétique élevée. A ce jour, personne ne comprend les mécanismes expliquant ces différences. Cette question rejoint des questions fondamentales de biologie évolutive comme un évident paradoxe de la dépression de consanguinité, la sélection d'un « general-purpose genotype » ou encore le rôle des mécanismes épigénétiques dans la diversification phénotypique. Des variants de gènes sexuels ou des épimutations pourraient être spécifiques à certaines populations et augmenter l'effet masculinisant d'une faible température lors du développement embryonnaire. L'objectif général de ce thème est de mieux comprendre les facteurs qui déterminent le sexe chez le rivulus des mangroves afin de mieux comprendre l'évolution de stratégies de reproduction différentes entre les populations.

Ce thème pourra être divisé en deux mémoires. Ils pourront comprendre des analyses de l'expression (qPCR) et du niveau de méthylation (pyroséquençage bisulfite) de gènes impliqués dans la différenciation sexuelle chez des organismes prélevés sur le terrain et/ou des organismes de laboratoire (notamment DNMT3a2 et MeCP2 - tous deux impliqués dans des mécanismes épigénétiques - montrant des niveaux d'expressions supérieurs chez les mâles) ; la recherche de liens entre l'expression/méthylation de gènes impliqués dans la différenciation sexuelle avec des différences comportementales entre sexes (ex : audace et/ou agressivité) (données récoltées sur le terrain et/ou nouveaux tests comportementaux en laboratoire) ; le suivi de réponses des voies de différenciation sexuelle suite à l'exposition en laboratoire à des facteurs environnementaux (température, cortisol, dexaméthasone, inhibiteur d'aromatase,...) ; des analyses hormonales. Des échantillons de gonades d'hermaphrodites déjà prélevés dans 4 populations naturelles pourront être analysés, ainsi que de nouvelles expériences en laboratoire sur des individus provenant de une ou deux lignées.

## Thème 2: Effets de l'exposition précoce à l'insecticide perméthrine (pyréthroïde) sur différentes formes d'apprentissage chez le rivulus des mangroves. Implications de mécanismes épigénétiques.

**Key words:** neurotoxicité – perméthrine – DOHaD – épigénétique – *Kryptolebias marmoratus* – plasticité phénotypique – comportement - apprentissage

Dans le règne animal, il est clairement établi que les périodes de vies précoces (embryons, larves, fœtus, juvéniles) sont très sensibles à des perturbations de l'environnement. Chez l'homme, des expositions à des polluants comme des pesticides peuvent être impliqués dans ce que l'on appelle le DOHaD, soit le « developmental origin of health and disease ». Par exemple, des maladies neurodégénératives comme Parkinson se déclareraient plus tard dans la vie mais seraient en partie déclenchées par l'exposition à des composés neurotoxiques pendant des périodes précoces. Nous utilisons des modèles de poissons afin d'étudier les effets qu'ont des expositions précoces à des composés neurotoxiques sur le comportement des adultes. Nous recherchons ainsi les mécanismes moléculaires impliqués, essentiellement dans le cerveau, et notamment des mécanismes épigénétiques. Ce thème a pour objectif d'étudier les effets d'une exposition précoce à la perméthrine, un insecticide pyréthroïde très répandu, sur le processus d'apprentissage associatif et d'habituation chez des juvéniles de rivulus des mangroves, *Kryptolebias marmoratus*. La particularité de la reproduction de ce petit poisson habitant les mangroves américaines (cfr la description dans le thème 1) permet d'isoler des lignées isogéniques et d'ainsi limiter l'effet du génotype sur les effets phénotypiques du pesticide. Cela permet également d'identifier des mécanismes épigénétiques qui sont indépendants du génome, et donc potentiellement importants d'un point de vue adaptatif et évolutif.

Ce thème de mémoire s'appuiera sur une expérience de laboratoire sur une ou plusieurs lignées de rivulus exposés par baignade à de la perméthrine. Des analyses comportementales seront effectuées (les poissons seront testés dans des arènes) afin de déterminer l'apprentissage associatif (via un shuttle-test) et l'habituation (via la répétition de tests de personnalité). Des analyses moléculaires sur l'expression (qPCR) et le niveau de méthylation (par pyroséquençage bisulfite) de certains gènes cibles (impliqués dans la neurotoxicité de la perméthrine ou dans les processus cognitifs et d'apprentissage) seront réalisées chez les juvéniles et chez les adultes.

### **Thème 3 (1 sujet possible) : Personnalité, plasticité et prédictabilité comportementales dans des populations clonales du rivulus des mangroves.**

**Key words:** *comportement – épigénétique – *Kryptolebias marmoratus* – plasticité phénotypique – audace – individualité - personnalité*

Les populations de Floride du rivulus des mangroves (cfr thème 1 pour sa description) présentent peu de diversité génétique, par opposition aux populations du Belize. Pourtant, une étude de terrain a montré que les individus de Floride présentent une forte variabilité interindividuelles au niveau de certains traits de personnalités comme l'audace, nommée individualité. A l'opposé, les individus du Belize présentent une faible individualité. Ce résultat contre-intuitif pose la question de savoir quels mécanismes permettent d'expliquer ces différences d'individualité. L'hypothèse générale est que des mécanismes épigénétiques permettent cette individualité chez les poissons de Floride.

Ce thème a pour objectif d'étudier en laboratoire (common garden) l'individualité de l'audace sur des individus provenant de plusieurs populations différentes, sa plasticité (changement au cours du temps ou du contexte) et sa prédictabilité (variabilité intra-individuelle). Cela est possible en effectuant plusieurs répétitions (5 ou 6) du test d'audace sur chaque individu en changeant légèrement le contexte (avec ou sans plantes, température différente, etc). Des gènes cibles (comme le DIPC2) seront ensuite étudiés pour leur niveau d'expression (qPCR) et leur niveau de méthylation (pyroséquençage bisulfite) afin d'élucider des mécanismes épigénétiques qui permettraient de comprendre l'individualité sans diversité génétique.

## Thème 4: Le killifish turquoise comme modèle d'étude des interactions entre stress environnemental et vieillissement.

**Key words:** *vieillissement - comportement – épigénétique – killifish turquoise – plasticité phénotypique – coloration – transgénérationnel – stress environnemental - pesticide*

Le killifish turquoise est une nouvelle espèce modèle utilisée notamment pour comprendre le vieillissement. En effet, ce poisson vivant dans des mares temporaires en Afrique (Zimbabwe et Mozambique) présente la particularité d'être le vertébré avec le cycle de vie le plus court (entre 9 et 20 semaines). Tous les marqueurs de vieillissement habituellement étudiés chez les mammifères sont également retrouvés chez ce poisson. Actuellement, la communauté scientifique ignore quasi complètement les mécanismes épigénétiques présents chez cette espèce (méthylation de l'ADN, modifications des histones, RNA interférents, enzymes impliquées, etc). Au sein de notre laboratoire, nous développons un nouvel axe de recherche qui a pour objectif d'analyser les mécanismes épigénétiques (surtout méthylation de l'ADN) dans différents organes de l'adulte (surtout le cerveau) ainsi que pendant le développement larvaire. Ces mécanismes seront alors suivis au cours du processus de vieillissement. Nous utiliserons cette espèce comme modèle afin d'étudier les liens entre mécanismes épigénétiques et développement de troubles comportementaux tels que des maladies neurodégénératives. De plus, des questions évolutives tentent de répondre à la signification d'un vieillissement précoce et aux mécanismes épigénétiques associés, ainsi qu'à la transmission de marques épigénétiques d'une génération à l'autre.

Ce thème pourra être divisé en deux mémoires. La principale question est de comprendre l'impact de l'environnement sur le processus de vieillissement de cette espèce. Pour ce faire, nous ferons varier des paramètres comme l'alimentation, la température, la reproduction (le fait de se reproduire ou non) et/ou nous utiliserons une exposition à un insecticide pyréthroïde (comme la perméthrine) afin de suivre l'évolution des traits phénotypiques liés au vieillissement (comportement et morphologie). En parallèle, des marqueurs épigénétiques de vieillissement seront recherchés par pyroséquençage et/ou RRBS. La transmission de ces traits phénotypiques d'une génération à l'autre pourra être envisagée (sur 3 générations). De plus, une mise au point technique pourra consister en l'élaboration d'une méthode d'analyse du pattern de coloration des individus et de son évolution au cours du temps (en collaboration avec le département de physique) par des photographies à haute précision et analyses de spectres colorimétriques. Ces patterns seront également associés à des traits de personnalité.

## **Thème 5: Investigation of phenotypical, physiological and molecular modifications occurring in successive generations of zebrafish to understand the continuous evolution mechanism triggered during a domestication process.**

Ce thème émane d'une collaboration entre l'UNamur et l'Université de Nancy-Lorraine. Certaines expériences/analyses pourront être réalisées à Nancy. Ce thème sera en co-promotion entre Frédéric Silvestre et Patrick Kestemont.

**Key words:** *domestication - zebrafish – phenotypic plasticity - épigénétique*

To ensure the sustainability of aquaculture, it is of major importance to understand and control the routes of fish domestication. Domestication plays essential roles in modulating the phenotypes of teleosts and is responsible of deep physiological changes linked to welfare and reproduction capacity. While a “domestication syndrome” has been described in mammals gathering the classical phenotypical changes, there is no evidence that such phenomenon occurs in teleosts. For the first time, we raise the hypothesis that a “domestication syndrome” exists in fish including the phenotypic changes currently observed during the first generations in captivity. We also hypothesize that these modifications are due to the combination of molecular alterations at the genetic, epigenetic and gene expression levels.

The zebrafish will be used as a relevant fish model exhibiting a range of assets (quick growth and precocious puberty; broad molecular information) that will allow us understanding more quickly and efficiently the putative “fish domestication syndrome”.

The aim of this theme will be to understand the physiological mechanisms that explain the alteration of global phenotype along the first steps of domestication. To this end, a wide-range measures of physiological markers linked to immunity, stress and reproduction will be carried out after sampling different generations of zebrafish. This will provide the first clues about the existence of a “fish domestication syndrome”. It will also be possible to investigate the effects of domestication on genetic diversity, epigenetics changes and transcriptome/proteome alteration in a selection of relevant organs in relation with welfare and reproduction.