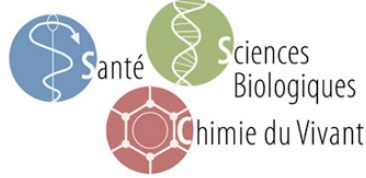




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : CHAMERO-BENITO Pablo

Unité : UMR PRC 7247 - INRA Centre Val de Loire

Equipe : Neuroendocrinologie des Interactions et Comportements sexuels

Filière de rattachement : D

Email de l'encadrant : pablo.chamero-benito@inra.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : -

2. Titre de la thèse :

Rôle de la voie sensorielle olfactive *Gai2* dans la modulation des comportements reproducteurs et socio-sexuels

3. Résumé :

Chez la plupart des mammifères, le système olfactif module les comportements reproducteurs et socio-sexuels via des informations chimiosensorielles (phéromones) détectés par les neurones sensoriels de l'épithélium olfactif. Les signaux olfactifs sont détectés par des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR), organisés en plusieurs grandes familles de gènes, chacune exprimée par un sous-ensemble unique de neurones sensoriels dispersés. L'identité des cellules réceptrices impliquées dans des réponses comportementales et reproductives spécifiques reste à déterminer. Des indices, issues d'expériences génétiques et comportementales chez la souris, indiquent un rôle des neurones *Gai2*-positifs (comprenant 239 gènes intacts de la famille des récepteurs de type V1R) comme transducteurs des signaux olfactifs impliqués dans la reproduction et les comportements sexuels. Chez les animaux domestiques (chien, chat, vache, cheval, mouton, chèvre...), seuls les neurones exprimant V1R-*Gai2* sont présents dans le système olfactif accessoire. Cependant, la contribution précise de la voie sensorielle *Gai2* aux fonctions comportementales et reproductives est inconnue.

L'objectif principal de ce projet est de déterminer comment les comportements reproducteurs et socio-sexuels sont contrôlés par le système olfactif des mammifères, en particulier par la sous-population des neurones sensoriels V1R-*Gai2* présente au sein de l'organe voméronasal. **Notre hypothèse** est que *Gai2* est le composant clé de la transduction sensorielle en aval des récepteurs V1R, qui participent à la détection de phéromones spécifiques qui contrôlent les comportements reproductifs et sexuels. Pour explorer cette hypothèse, nous avons créé une nouvelle souris knock-out conditionnelle pour le gène *Gai2* (*Gnai2*). Nous avons utilisé le système Cre-lox pour réaliser une ablation de *Gai2* en croisant des souris floxées pour *Gnai2* (*Gnai2^{flx/flx}*) avec des souris Cre pour l'*Omp* (olfactory marker protein, *Omp^{Cre}*). La délétion conditionnelle est ainsi restreinte au tissu olfactif. Auparavant, nous avons utilisé une stratégie similaire pour l'ablation de *Gnao1*, qui code pour la protéine *Gao*, afin de définir le rôle de la famille des récepteurs V2R en tant que détecteurs de peptides et de protéines impliqués dans l'agression¹, l'attraction sexuelle chez la femelle² et l'évitement des odeurs de prédateurs³. Actuellement, nous ne savons pas si *Gai2* joue un rôle clé en tant que sous-unité α de la protéine G agissant comme médiateur de la détection de ligands de type V1R comme le fait *Gao* pour les V2R.

Pour explorer ce point, nous allons effectuer des enregistrements par imagerie calcique sur culture de neurones sensoriels olfactifs dissociés, afin de détecter les signaux calciques induits par différentes

phéromones chez les animaux mutants par rapport aux animaux wild-type. **Objectif n ° 1:** Cela permettra pour la première fois d'établir le rôle de *Gai2* dans la transduction du signal olfactif et déterminera si la perte de *Gai2* provoque des altérations dans les potentiels des récepteurs évoqués par le ligand et les réponses Ca^{2+} . Nous nous attendons à ce que la délétion génétique de *Gai2* bloque la signalisation en aval des V1R et ainsi, les signaux sensoriels ne seront plus transmis au cerveau, réalisant l'ablation sélective de cette voie sensorielle.

Deuxièmement, nous aborderons le rôle fonctionnel des neurones *Gai2* dans le contrôle des comportements sexuels et reproducteurs. Nous testerons les souris *Gnai2^{fx/fx}-Omp^{Cre}* pour cinq comportements de reproduction de base chez les mâles ou les femelles: 1) le comportement de monte des mâles envers les femelles, 2) le comportement de lordose ou de réceptivité sexuelle femelle. 3) l'induction de l'ovulation par les odeurs mâle (accélération de la puberté et effet Whitten). 4) les comportements parentaux, y compris l'agression maternelle, l'agression dirigée vers les jeunes et les soins aux jeunes. 5) enfin, nous effectuerons une mesure de la fertilité générale, de la fonction et de la morphologie ovarienne dans les conditions normales de reproduction et d'entretien au sein de notre animalerie. **Objectif n ° 2:** Ces tests détermineront le rôle des neurones *Gai2* sur les interactions reproductives et sociosexuelles.

Enfin, nous caractériserons la population de neurones *Gai2* à partir chez un animal domestique, la chèvre, afin de vérifier si les mécanismes mis en évidence chez la souris sont également pertinents chez les mammifères domestiques dans le contexte de la perception des odeurs mâles chez les femelles. Pour cela, nous utiliserons l'imagerie Ca^{2+} dans les neurones olfactifs de chèvre pour identifier les réponses aux phéromones de chèvre synthétiques et aux extraits de poils mâles. Nous caractériserons les neurones détectant la phéromone en cartographiant les réponses Ca^{2+} avec l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques par immunomarquage (expression de *Gai2*, *Gαolf*, etc.). **Objectif n ° 3:** Cette carte d'activité révélera l'identité moléculaire des cellules qui répondent aux stimulations olfactives et permettra d'établir le rôle des neurones *Gai2* dans la détection des phéromones chez la chèvre.

Ainsi, ce projet mettra en lumière les mécanismes neuronaux qui sous-tendent le traitement des phéromones dans le système olfactif de la souris et des animaux domestiques afin de comprendre comment les entrées olfactives périphériques interagissent avec les centres neuronaux contrôlant les réponses comportementales reproductives. L'utilisation de composés olfactifs/de phéromones pour contrôler la fonction reproductrice et / ou le comportement sexuel présente un grand intérêt pour les animaux domestiques dans le cadre d'une approche durable, sans hormones, pour améliorer l'efficacité reproductrice et le bien-être animal.

[1] Chamero et al. (2011) Proc Natl Acad Sci USA 108, 12898-12903.

[2] Dey et al. (2015) Cell 161, 1334-1344.

[3] Pérez-Gómez et al (2015) Curr Biol 25, 1340-1346.

4. Résumé en anglais :

Role of olfactory *Gai2* signal transduction mechanisms mediating reproductive and sociosexual behaviors

In most mammals, the olfactory system modulates reproductive and socio-sexual behaviors using chemosignals (pheromones) detected by sensory neurons in the nose. Olfactory signals are detected by single unidentified olfactory G protein coupled receptors (GPCRs), organized in several large gene families, each expressed by a unique subset of dispersed sensory neurons. The identity of receptor cells implicated in specific behavioral and reproductive responses remains to be determined. Evidence from genetic and behavioral experiments in mice indicate a role of *Gai2*-positive neurons (comprising 239 intact genes of the V1R receptor family) as transducers of pheromones implicated in reproduction and sexual behaviors. In domestic animals such as dog, cat, cow, horse, sheep, and goat only V1R-*Gai2*-expressing neurons are present in the accessory olfactory system. However, the precise

contribution of *Gai2* sensory pathway to the behavioral and reproductive functions is unknown. **The main goal** of this project is to determine how reproductive and socio-sexual behaviors are controlled by the mammalian olfactory system, specifically by the subpopulation of V1R-*Gai2* sensory neurons.

Our hypothesis is that *Gai2* is the key sensory transduction component downstream of V1R family of receptors, which participate in the detection of specific pheromones that control reproductive and sexual behaviors. To address this point, we create a novel conditional knockout mouse for *Gai2* gene (*Gnai2*). We use the Cre-lox system to ablate *Gai2* sensory input using by crossing *Gnai2*-floxed mice (*Gnai2^{fx/fx}*) with olfactory marker protein-Cre mice (*Omp^{Cre}*). The conditional gene deletion is restricted to olfactory tissue. Previously, we used a similar strategy to ablate *Gnao1*, which encodes *Gao*, to define the role of the V2R family as detectors of peptides and proteins involved in aggression¹, female attraction² and predator avoidance³. Currently, it is not known whether *Gai2* plays a key role as the primary G protein α -subunit mediating V1R ligand detection as *Gao* does for V2Rs. To confirm this point, we will perform single-cell calcium imaging recordings in sensory neurons to detect signals evoked by pheromones in wild type vs. mutants. **Goal #1:** This will define for the first time the role of *Gai2* in transduction and determine whether loss of *Gai2* causes alterations in ligand-evoked receptor potentials and Ca^{2+} responses. We expect that genetic deletion of *Gai2* will block signaling downstream of V1Rs and sensory signals will no longer be transmitted to the brain, selectively ablating this sensory neural pathway.

Second, we will address their functional role of *Gai2* neurons in the control of sexual and reproductive behaviors. We will test *Gnai2^{fx/fx}-Omp^{Cre}* mice on for male and female behavior on five basic reproductive behaviors: 1) Male mounting behavior toward females, 2) Lordosis or female sexual receptivity, 3) Induction of ovulation by male scents (puberty acceleration and Whitten effect), 4) Parenting behaviors including maternal aggression, pup-directed aggression and pup care, 5) Monitoring of general fertility, ovary function and morphology during breeding and maintenance conditions in our animal facility. **Goal #2:** These tests will determine the role of *Gai2* neurons underlying reproductive and sociosexual interactions with conspecifics.

Third, we will characterize the *Gai2* neuron population from a domestic animal model, the goat, to verify whether the mechanisms explored in mice are also of relevance in domestic mammals in the context of the perception of male odors in females. For this, we will use Ca^{2+} imaging in goat olfactory neurons to identify responses to synthetic goat pheromones and male hair extracts. We will characterize pheromone-detecting neurons mapping ligand-evoked Ca^{2+} responses with expression of specific molecular markers (*Gai2*, *G α olf*, etc.) combining imaging with immunostaining. **Goal #3:** This activity map will reveal the molecular identity of responding cells establishing the role of *Gai2* neurons in goat pheromone detection.

This project will shed light on the neural mechanisms underlying processing of pheromones in the olfactory system of the mouse and domestic animals helping to understand how peripheral olfactory inputs interact with the neural centers configuring the reproductive and socio-sexual behavioral response controlled by the brain. The use of olfaction/pheromones as a tool to control reproductive function and/or sexual behavior is of great interest in farm animal species as part of a clean, green and ethical, hormone-free approach to improve both reproductive efficiency and animal welfare.