



HAL
open science

Etude des mécanismes d'action mis en jeu par la testostérone dans la régulation du comportement sexuel mâle

Clarisse Marie-Luce

► **To cite this version:**

Clarisse Marie-Luce. Etude des mécanismes d'action mis en jeu par la testostérone dans la régulation du comportement sexuel mâle. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66527 . tel-00833257

HAL Id: tel-00833257

<https://theses.hal.science/tel-00833257v1>

Submitted on 12 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de doctorat de
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Dans le but d'obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
Spécialité NEUROSCIENCES

 cole doctorale CERVEAU, COGNITION et COMPORTEMENT
Unité de Recherche : UMR 7224 Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central

Présentée et soutenue publiquement par
Clarisse MARIE-LUCE

ÉTUDE DES MÉCANISMES D'ACTION MIS EN JEU PAR
LA TESTOSTÉRONE DANS LA RÉGULATION DU
COMPORTEMENT SEXUEL MÂLE

Thèse soutenue le 9 novembre 2012 devant le jury composé de

- | | |
|------------------------------|--------------------|
| • Pr Anne LOHOF | Président |
| • Pr Virginie ROUILLER-FABRE | Rapporteur |
| • Dr Charlotte CORNIL | Rapporteur |
| • Pr Anne DUITTOZ | Examineur |
| • Dr Eric HOUDEAU | Examineur |
| • Dr Frédéric LÉVY | Examineur |
| • Dr Sakina MHAOUTY-KODJA | Directeur de thèse |

Il paraît que «Tout ce qui ne tue pas rend plus fort»

*Ce travail est dédié à mes parents,
mes anges gardiens...*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci notamment au Pr Anne Lohof qui a accepté de présider ce jury ; aux Pr Virginie Rouiller-Fabre et Dr Charlotte Cornil pour avoir accepté de consacrer du temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit ; et enfin aux Pr Anne Duittoz, Dr Éric Houdeau et Dr Frédéric Lévy d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineurs. Je remercie Anne Duittoz et Virginie Rouiller-Fabre d'avoir été présentes et pour leurs encouragements lors de mon comité de mi-thèse.

Je remercie tout particulièrement Sakina Mhaouty-Kodja qui m'a donné l'opportunité d'intégrer ce projet en master2 et d'avoir fait confiance à ma motivation. Je la remercie pour son encadrement rigoureux tout au long de ma thèse. Je la remercie aussi pour son investissement et sa disponibilité pour la réalisation des études expérimentales, les discussions et les nombreuses corrections qui ont été nécessaires à l'élaboration de ce manuscrit. Tout au long de ces quatre années, j'aurai fait de mon mieux pour répondre à tes attentes.

Je remercie François Tronche d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe lorsque nous étions au Collège de France, malgré des conditions de travail qui étaient incertaines. Je remercie sincèrement Anne-Marie Godeheu pour nous avoir donné le protocole secret pour la révélation TMB nécessaire à l'étude du noyau spinal bulbocaverneux. Merci aux collaborateurs qui ont participé au projet ANR : Mariangela Martini, Matthieu Keller, Frédéric Lévy, Isabelle Franceschini, Claire Leconte, Marika Nosten-Bertrand et Gaël Grannec. Merci à David Godefroy de l'institut de la vision pour les très nombreuses lames scannées au Nanozoomer.

J'exprime ma sincère gratitude à tous les membres de l'équipe actuelle et ancienne qui ont partagé cette aventure avec moi au quotidien et qui ont fortement contribué à l'aboutissement de ce travail. Tout d'abord, je remercie avec toute mon affection Kalina Raskin. Elle a été présente lorsque je suis arrivée en master et m'a transmis tout ses savoirs et savoir-faire nécessaires pour poursuivre le projet qu'elle m'avait confié. Sincèrement merci pour tous ces bons moments partagés au laboratoire et en dehors, pour tes encouragements dans les moments de doute et pour ton écoute sans jugement lorsque j'étais au plus mal. Je suis fière de te compter parmi mes amis, tu es pour moi un modèle. Un énorme merci à Marie, alias Marie P. et à Lydie, alias la Bizarde. Merci à vous deux pour avoir été présentes au jour le jour, pour votre

aide, vos conseils et nos quelques coups de gueules rapidement effacés par nos nombreux fous rires. Je vous suis également très reconnaissante pour votre disponibilité lors de mon absence prolongée. Merci à Marie pour la relecture de ce manuscrit et tous ces mots appris ou redécouverts. Merci à Lydie pour ses explications des statistiques et ses mots improbables. Merci à Christelle, alias la Sauterelle qui est parmi nous depuis un an et qui très vite a fortement contribué à l'avancement des projets. Merci pour tes petites attentions, ton humour qui m'a permis de rire en toute circonstance et notre complicité. Ce fût un plaisir, tant sur le plan professionnel qu'humain, de travailler avec vous trois. Nos longues heures passées à la paillasse à monter les coupes ou à disséquer vont...ou plutôt l'ambiance qui accompagnait ces moments difficiles va me manquer. J'ai le sentiment d'être liée à vous « par le lien sacré du labo » maintenant. Je remercie aussi Hélène, Valérie et Caroline, qui font récemment partie de l'équipe émergente, pour leur participation au projet.

Parmi les membres de l'équipe GMNC, un énorme merci à Camille, alias l'Anguille pour sa bonne humeur et tous ses petits mots laissés sur des post-it sur mon bureau. Mais surtout je ne te remercierai jamais assez pour mon magnifique surnom !...Cf à la fin. Je suis triste de savoir que le jour de la soutenance se passera sans toi, il y aura comme un vide. Merci à Layal pour son dynamisme, son calme et son enthousiasme sans faille. Merci à Christophe, Ana-Clara et Émilie pour vos encouragements lors de la rédaction et pour les échanges scientifiques ou non. Merci également à Jacques, alias Super C..... pour ses conseils et ses entrées en fanfare et pleines de surprise (même ma mère en a fait les frais). Bon alors, on le fait ce cours de Salsa ?! Merci à Gérard, alias G.G, Sheela, Alain, Samah et Jean-Pol pour leur gentillesse et leur attention à mon égard ... sans oublier tous les membres de l'unité PMSNC. Un grand merci aux animaliers pour leurs patience, disponibilité et bienveillance envers moi et mes précieuses souris, sans vous ce projet n'aurait pas été possible.

C'est avec émotion que j'exprime toute ma reconnaissance à mes amis proches. Chacun à leur manière, ils m'ont soutenue moralement et physiquement, ont permis à ce que j'ai une vie en dehors du laboratoire et ont donc permis que je tiens le coup jusqu'au bout. De tout mon cœur merci à mes trois amis fidèles : ma douce Hélène, ma Paupau et mon Pascal. Je ne compte plus les années, les moments de joie et de peine partagées. Je vous remercie car vous avez été d'une compréhension et d'un soutien sans faille pendant toutes ces années. Votre écoute sans jugement dans les moments de doutes a été une aide inestimable. Nous allons enfin pouvoir reprendre nos vendredi « Sex and the City ». Merci également à Patricia pour avoir

toujours pris de mes nouvelles et pour l'appartement. Un merci plein de respect à Mamadou, alias Papito, celui que je considère comme mon frère. Merci pour notre complicité, ta disponibilité et nos danses qui me redonnent vie quand je craque. Un merci chaleureux à la Famillia Son: Sophia, Oumar, David, Sarrou, Fabien et tous les nouveaux...merci de croire en moi et pour tous ces moments de partage simple et sincèrement plein d'amour qui me transportent en Afrique à chaque fois. Merci à mes amis d'enfance, Héli, Hélène et Christelle pour m'avoir toujours encouragé même de loin. Merci à Karine pour ta tendresse et nos longues discussions à se remonter le moral mutuellement. Je tiens également à remercier Dosa car donner les cours de salsa avec toi pendant plus d'un an, a été une expérience enrichissante et a accentué mon amour de la danse. À toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et que j'aurais oubliées de citer.

C'est avec beaucoup d'émotion que j'exprime mes plus doux remerciements à mes parents. Ils m'ont soutenue, encouragée, soignée, apaisée...Il me faudrait un manuscrit entier pour transcrire tout l'Amour qu'ils m'ont apporté et m'apportent chaque jour pour me donner la force de continuer. Ces années de thèse ont été riches en émotions et sans vous je n'aurais pas pu finir. Alors tout simplement je dirai, de tout mon cœur, je vous aime ! Merci également à toute ma famille qui est en France et en Guadeloupe, qui je le sais, pense à moi et m'encourage de loin.

Même si la thèse nuit gravement à la santé (si, si allez voir le lien suivant : <http://www.phdelirium.com>)....Merci pour tout.

Alias Super Saucisse (merci Camille ;-))

Résumé

La testostérone libérée par les testicules pendant la période périnatale joue un rôle crucial dans l'organisation du système nerveux central. Elle masculinise et déféminise de manière irréversible les circuits neuronaux, potentialisant ainsi les comportements et fonctions typiques des mâles. À l'âge adulte, la testostérone joue un rôle activationnel de ces réponses. Dans le système nerveux mâle, la testostérone agit en activant directement le récepteur des androgènes (AR) ou indirectement les récepteurs des œstrogènes (ER α et ER β), après conversion en œstradiol par l'aromatase cytochrome P450. Au cours de ma thèse, nous avons généré des souris invalidées sélectivement pour l'AR ou l'ER β sélectivement dans le système nerveux en utilisant la technique de mutagenèse conditionnelle Cre-loxP. Ainsi nous avons pu étudier l'implication relative de l'AR et l'ER β central dans la régulation du comportement sexuel par la testostérone, sans interférer avec les fonctions périphériques de cette dernière.

L'ensemble des souris mâles mutantes conditionnelles, pour l'AR ou l'ER β , a un tractus urogénital complet et sont fertiles. Les résultats obtenus au cours de ma thèse indiquent que, chez le mâle, la régulation du comportement sexuel par la testostérone implique deux voies complémentaires utilisant l'AR et l'ER α . En effet, nous avons montré qu'au niveau cérébral l'AR n'est pas nécessaire à l'organisation de la région préoptique par la testostérone au cours du développement. Mais les altérations du comportement sexuel indiquent qu'il est essentiel pour initier et maintenir le comportement sexuel à l'âge adulte. En revanche, au niveau spinal, l'AR joue un rôle important à la fois dans l'organisation et l'activation du noyau spinal bulbocaverneux par la testostérone. Quant à l'ER β central, il ne semble jouer un rôle ni dans l'organisation ni dans l'activation du comportement sexuel mâle par la testostérone.

D'autre part, nous avons évalué dans quelle mesure une exposition à de faible dose de Bisphénol A (BPA) peut interférer avec les effets organisationnels et activationnels de la testostérone. En effet, le BPA est un monomère hormono-mimétique largement utilisé dans le milieu industriel pour la fabrication d'une très grande variété de contenants en polycarbonates, destinés au conditionnement et au stockage de produits et boissons alimentaires (notamment les biberons). Le BPA est considéré comme un perturbateur endocrinien. Nous avons montré que la différenciation sexuelle des circuits neuronaux par la testostérone n'était pas affectée par l'exposition périnatale à de faibles doses de BPA. Ce dernier pourrait perturber l'activation de la voie androgénique par la testostérone à l'âge adulte, nécessaire à l'expression du comportement sexuel.

Mots clés : testostérone, système nerveux, région spinale, récepteur des androgènes, récepteurs aux œstrogènes, neuroendocrinologie, comportement sexuel, érection, perturbateur endocrinien.

Summary

Testosterone released by the testes during the perinatal period plays a crucial role in the organization of the central nervous system. It masculinizes and defeminizes irreversibly the neural circuitry, thus potentiating behaviors and typically male functions. In adulthood, testosterone plays an activation role for these responses. In the male nervous system, testosterone can act either directly through activation of androgen receptors (AR) or indirectly by stimulating estrogen receptors (ER α and ER β) after conversion into estradiol by aromatase cytochrome P450. In my thesis, we generated mice line selectively lacking *AR* or *ER β* in the nervous system using the conditional mutagenesis Cre-loxP approach. Thus we could study the relative involvement of AR and ER β in the central regulation of sexual behavior by testosterone, without interfering with the peripheral functions of the latter.

All male mice mutants conditional for AR or ER β have a complete urogenital tract and are fertile. The results obtained during my project indicate that, in the male, the regulation of sexual behavior by testosterone involves two complementary ways using the AR and ER α . Indeed, we have shown that in brain, the AR is not required for the organization of the preoptic area by testosterone during development. But impairment in sexual behavior indicates that it is essential to initiate and maintain sexual behavior in adulthood. However, at the spinal level, the AR plays an important role in both the organization and activation of the spinal bulbocavernosus nucleus by testosterone. The central ER β seems to play a role either in the organization or in the activation of male sexual behavior by testosterone.

On the other hand, we have assessed to what extent the exposure to low doses of bisphenol A (BPA) can interfere with the organizational and activation effects of testosterone. In fact, BPA has hormonal-like activities and is widely used in industry in the production of a wide variety of containers polycarbonates, for packaging and storage of food products and beverages (in particular baby-bottles). It was considered an endocrine disruptor. We have shown that sexual differentiation of neural circuits by testosterone is not affected by perinatal exposure to low doses of BPA. In contrast, BPA could disrupt the activation of the androgenic signalling pathway of testosterone in adulthood, necessary for the expression of male sexual behavior.

Keywords: testosterone, nervous system, spinal region, androgen receptor, estrogen receptors, neuroendocrinology, sexual behavior, erection, endocrine disruptor.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	7
-----------------------------------	----------

Théories sur la différenciation sexuelle du système nerveux.....	10
Perturbation des effets de la testostérone.....	13

ÉTAT DE L'ART.....	15
---------------------------	-----------

CHAPITRE I.

DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DU SYSTÈME NERVEUX PAR LES HORMONES GONADIQUE CHEZ LE MÂLE.....

I. Différenciation sexuelle du tractus uro-génital.....	17
II. Variations des taux circulants des hormones stéroïdes gonadiques.....	20
<i>II.1. La testostérone et ses métabolites.....</i>	<i>20</i>
<i>II.2. Les variations des taux d'hormones stéroïdes sexuelles au cours de la vie.....</i>	<i>21</i>
III. Les dimorphismes neuroendocrines et comportementaux liés au comportement sexuel.....	23
<i>III.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope.....</i>	<i>23</i>
<i>III.2. Le comportement sexuel.....</i>	<i>26</i>
IV. Les périodes de mise en place des dimorphismes.....	28
<i>IV.1. La période périnatale, l'organisation permanente des circuits neuronaux.....</i>	<i>28</i>
<i>IV.2. À l'âge adulte, activation transitoire des circuits neuronaux.....</i>	<i>30</i>
<i>IV.3. La puberté, une autre période de maturation.....</i>	<i>31</i>
V. Les autres facteurs impliqués dans la différenciation sexuelle du cerveau.....	32

CHAPITRE II.

ORGANISATION DES CIRCUITS NEURONAUX IMPLIQUÉS DANS L'EXPRESSION DU COMPORTEMENT SEXUEL.....

I. Les différentes régions cérébrales et spinales impliquées dans l'expression du comportement sexuel et la régulation de l'axe HPG.....	35
<i>I.1. Les régions cérébrales impliquées dans le comportement sexuel.....</i>	<i>35</i>
<i>I.2. Les régions spinales impliquées.....</i>	<i>40</i>
<i>I.3. Les régions cérébrales impliquées dans la régulation de l'axe HPG.....</i>	<i>42</i>
II. Les différents processus de la différenciation sexuelle du système nerveux.....	43
<i>II.1. Modulation du nombre de neurones par la mort cellulaire ou la neurogenèse.....</i>	<i>44</i>
<i>II.2. Modulation de la taille des corps cellulaires et l'arborisation dendritique.....</i>	<i>46</i>
<i>II.3. Modulation de la morphologie des astrocytes.....</i>	<i>47</i>
<i>II.4. Modulation de la neurotransmission.....</i>	<i>48</i>
III. Les mécanismes d'action de la testostérone dans le système nerveux.....	50

<i>III.1. Les récepteurs nucléaires, un mécanisme d'action génomique lent.....</i>	<i>50</i>
<i>III.2. Les mécanismes d'action rapide.....</i>	<i>53</i>
<i>III.3. Les sites d'expression des récepteurs.....</i>	<i>54</i>

CHAPITRE III.

L'IMPLICATION DES DIFFÉRENTS RÉCEPTEURS DANS LA RÉGULATION DU COMPORTEMENT SEXUEL PAR LA TESTOSTÉRONE.....	57
I. Les études pharmacologiques.....	57
<i>I.1. Les études comportementales.....</i>	<i>57</i>
<i>I.2. Les études neuroanatomiques.....</i>	<i>58</i>
II. Les modèles génétiques d'invalidation ubiquitaire.....	58
<i>II.1. Les animaux <i>Tfm</i> et <i>ARKO</i>.....</i>	<i>59</i>
<i>II.2. Les animaux <i>AroKO</i>.....</i>	<i>60</i>
<i>II.3. Les animaux <i>ERαKO</i> et <i>ERβKO</i>.....</i>	<i>62</i>
III. Les modèles génétiques d'invalidation conditionnelle.....	64
<i>III.1. Obtention de la lignée invalidée pour l'AR spécifiquement dans le système nerveux.....</i>	<i>64</i>
<i>III.2. Caractérisation de la lignée <i>AR^{NesCre}</i>.....</i>	<i>66</i>
<i>III.3. Deuxième modèle d'invalidation conditionnelle et comparaison des deux études.....</i>	<i>69</i>

CHAPITRE IV.

LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET LA TESTOSTÉRONE.....	71
I. Le BPA, un perturbateur endocrinien répandu.....	71
<i>I.1. Définition d'un perturbateur endocrinien.....</i>	<i>71</i>
<i>I.2. Les sources de production de BPA.....</i>	<i>73</i>
<i>I.3. Les différents modes d'exposition au BPA.....</i>	<i>74</i>
<i>I.4. Le métabolisme du BPA.....</i>	<i>75</i>
II. Les mécanismes d'action du BPA.....	76
<i>II.1. Activité œstrogénique.....</i>	<i>77</i>
<i>II.2. Activité anti-androgénique.....</i>	<i>77</i>
<i>II.3. Autres activités.....</i>	<i>77</i>
III. La position réglementaire actuelle.....	78
IV. Les effets observés du BPA sur les fonctions centrales de la testostérone.....	79
<i>IV.1. Les effets sur l'axe HPG.....</i>	<i>80</i>
<i>IV.2. Les effets au niveau central.....</i>	<i>81</i>

CHAPITRE V.

ÉTUDES RÉALISÉES AU COURS DE MA THÈSE.....	85
I. Étude de l'implication de l'AR dans l'organisation et l'activation par la testostérone du comportement sexuel mâle.....	85

II. Effets perturbateurs d'une exposition périnatale et adulte à faibles doses de bisphénol A et mécanismes impliqués.....	86
III. Étude de l'implication de l'ERβ dans la régulation du comportement sexuel mâle par la testostérone.....	86

RÉSULTATS.....89

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....91

ARTICLES.....95

I. Implication de l'AR dans l'organisation et l'activation par la testostérone du comportement sexuel mâle :	95
Résumé article 1.....	95
Résumé article 2.....	103
II. Effets perturbateurs d'une exposition à de faibles doses de bisphénol A sur l'expression du comportement sexuel et mécanismes d'action:	109
Résumé article 3.....	109
III. Caractérisation de la lignée invalidée pour l'ERβ dans le système nerveux :	115
Résumé article 4.....	115

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....119

I. L'AR et la régulation du comportement sexuel par la testostérone.....	122
I.1. Au niveau cérébral.....	122
I.2. Au niveau spinal.....	126
II. L'ERβ et la régulation de l'expression du comportement sexuel mâle.....	129
III. Le BPA et perturbation des effets de la testostérone.....	131
IV. Perspectives.....	135

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....139

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Le processus de différenciation sexuelle du cerveau selon le modèle classique <i>versus</i> parallèle.....	12
Figure 2 : Principe de la différenciation sexuelle du tractus uro-génital chez les mammifères.....	18
Figure 3 : Organisation du tractus uro-génital mâle.....	19
Figure 4 : Chaîne de biosynthèse de la testostérone et de ses métabolites.....	21
Figure 5 : Les variations des taux de testostérone chez le mâle au cours de la vie.....	22
Figure 6 : Les variations des taux d'œstradiol chez la femelle au cours de la vie.....	23
Figure 7 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope (HPG) chez le mâle et la femelle.....	25
Figure 8 : Démonstration des effets organisationnels de la testostérone en période périnatale.....	29
Figure 9 : Démonstration des effets activationnels de la testostérone chez la souris adulte.....	31
Figure 10 : Schéma du circuit neuronal impliqué dans la détection des stimuli olfactifs et le comportement sexuel mâle, chez la souris.....	38
Figure 11 : Organisation des motoneurones dans le NSB chez le mâle <i>versus</i> la femelle.....	41
Figure 12 : Effets de la castration à l'âge adulte chez la souris mâle sur les MTN du NSB.....	47
Figure 13 : Les processus par lesquels les dimorphismes sexuelles neuroanatomiques peuvent être établis, au niveau cérébral et spinal.....	50
Figure 14 : Les différents récepteurs activés par la testostérone et leur structure.....	51
Figure 15 : Distribution neuroanatomique de l'expression des récepteurs des androgènes (AR) et œstrogène (ER α et ER β) dans les différentes régions cérébrales.....	55
Figure 16 : Schéma du croisement pour l'obtention de la lignée AR ^{NesCre}	65
Figure 17 : Invalidation de l'AR spécifiquement dans le système nerveux.....	66
Figure 18 : Phénotype mâle et statut endocrinien des mâles contrôles et AR ^{NesCre}	67
Figure 19 : Le comportement sexuel mâle chez les mâles contrôles et AR ^{NesCre}	68
Figure 20 : Structure chimique de l'œstradiol et du Bisphénol A.....	72
Figure 21 : Photos représentant les objets contenant du BPA présents dans notre environnement et les symboles de recyclage permettant de les identifier.....	73
Figure 22 : Mécanismes d'action potentiels du Bisphénol A.....	80
Figure 23 : Schéma du protocole de traitement au BPA.....	92
Figure 24 : Quantification des neurones Tyrosine-hydroxylase (TH) dans l'AVPV.....	97
Figure 25 : Détection des neurones ER β - et AR-positifs dans la région préoptique médiane hypothalamique par immunohistochimie.....	116

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des régions sexuellement dimorphiques.....	42
Tableau 2 : Récapitulatif des différents modèles knockout et leur phénotype.....	63
Tableau 3 : Classification des différentes substances à effets perturbateurs endocriniens.....	72
Tableau 4 : Récapitulatif des effets d'une exposition à de faibles doses de BPA (inférieure ou égale à DJA) selon les conditions de traitement.....	83
Tableau 5 : Récapitulatif des différents anticorps anti-ER β utilisés.....	116

ABRÉVIATIONS

A

Afp : α -fœtoprotéine
AMe : Amygdale médiane
AMH : Anti-Müllérienne
AOB : Bulbe olfactif accessoire
AR : Récepteur des androgènes
ARE : Élément de réponse aux androgènes
AR^{NesCre} : Lignée de souris invalidée pour l'AR dans le système nerveux
ARKO : Lignée de souris invalidée pour l'AR de façon ubiquitaire
AroKO : Lignée de souris invalidée pour l'aromatase de façon ubiquitaire
AVPV : Antéroventrale périventriculaire

B

BC : Bulbocaverneux
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BPA : Bisphénol A
BPA-G : BPA glucuronide
BPS : Bisphénol S

C

CT-HRP : Toxine de choléra couplée à la peroxydase

D

DA : Dopamine
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
DJA : Dose journalière acceptable

E

E : Stade embryonnaire
ERs : Les récepteurs des œstrogènes
ER α : Le récepteur des œstrogènes α
ER α KO : Lignée de souris invalidée pour l'ER α de façon ubiquitaire
ER β : Le récepteur des œstrogènes β
ER β KO : Lignée de souris invalidée pour ER β de façon ubiquitaire
ER β ^{NesCre} : Lignée de souris invalidée pour l'ER β dans le système nerveux
ERE : élément de réponses aux œstrogènes
ERR : Récepteur lié aux récepteurs des œstrogènes
ERR γ : Récepteur lié aux récepteurs des œstrogènes de type gamma

F

FCG : Fore Core Genotype
FSH : Hormone stimulant les follicules

G

GnRH : Hormone de libération des gonadotropines
GRP : Peptide de libération de la gastrine
GRP-R : Récepteur de GRP

H

HPA : Hypothalamo-hypophysio-surrénalien
HPG : Hypothalamo-hypophysaire gonadotrope

K

Kiss : Kisspeptine

KO : Knockout, modèle invalidé de façon ubiquitaire

L

LA : Levator ani

LBD : Domaine de liaison au ligand

LH : Hormone lutéïnisante

LST : Noyau du lit de la strie terminale

M

MOB : Bulbe olfactif principal

MOE : Epithélium olfactif

MTN : Motoneurones

N

NArc: Noyau arqué

NO : Monoxyde d'azote

NOAEL : Dose à laquelle aucun effet n'est observé

nNOS : NOS neuronale

NPV : Noyau paraventriculaire

NSB : Noyau spinal bulbocaverneux

NTD : Domaine N terminal

O

OT : Ocytocine

P

P : Jour postnatal

PE : Perturbateur endocrinien

POA : Aire préoptique médiane

R

RDLN : Noyau rostrodosolatéral

S

SAE : Sphincter annal externe

SERM : Modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes

SDN-POA : Noyau sexuellement dimorphique de la région préoptique

SF-1KO : Souris invalidée pour le facteur stéroïdogénique1

SOA : Système olfactif accessoire

SOP : Système olfactif principal

T

TDF : Facteur de détermination testiculaire

TMB : Tétramethylbenzidine

Tfm : Testicular feminization mutation = féminisation testiculaire

TH : Tyrosine-hydroxylase

U

UGT : UDP glucuronosyltransferase

V

VNO : Organe voméronasal

Introduction

Générale

« Le comportement d'un individu est à la fois 100% génétique et 100% environnement »

Richard C. Lewantin, 2003

Au cours de l'évolution, les mâles et les femelles ont été programmés pour jouer des rôles très distincts et des différences sexuelles marquées sont observées, entre autre au niveau de l'anatomie et des comportements. Depuis de nombreuses années, ces différences entre les sexes sont un sujet persistant de fascination, de par leur implication dans la pérennité de l'espèce via la reproduction, et ont inspiré de nombreuses études. Le sexe phénotypique d'un individu, dessiné par les caractères sexuels primaires (organes génitaux et gonades), est le signe distinctif le plus évident entre mâles et femelles chez les mammifères. Il est déterminé par la nature des chromosomes sexuels hérités, auquel est généralement associée l'expression d'un comportement typique. Chez les mammifères, et de nombreuses autres espèces, les principaux mécanismes d'acquisition des caractères sexuels (primaires et secondaires) sont décrits. En revanche les comportements sont des traits phénotypiques complexes qui se développent sous l'influence de plusieurs facteurs et se révèlent être souvent complexes et incompris.

Chez plusieurs espèces de mammifères dont l'Homme, de nombreux comportements présentent des différences de genre. Beaucoup sont liés à des fonctions de survie de base (recherche de nourriture, affrontement d'un prédateur...) et à la survie de l'espèce (comportements liés à la reproduction, défense du territoire...). Les comportements reproducteurs sont les comportements sexuellement dimorphiques des plus instinctifs. En effet, lors d'un accouplement le mâle et la femelle adoptent une posture propre à chacun sans apprentissage ou expérience au préalable (bien qu'il y ait une amélioration avec l'expérience). Mais les mécanismes de régulation qui sous-tendent ces manifestations restent encore mal compris. D'autant que le comportement sexuel n'est pas le seul comportement pour lequel un dimorphisme est décrit ; l'anxiété, l'agression, le comportement parental et cognitif en font également partie.

De la même façon des zones d'ombres subsistent chez l'Homme, concernant les différences de genre décrites pour la prévalence de certains désordres psychiatriques comme l'autisme qui touche plus fréquemment les garçons ou la dépression plus répandue chez les femmes.

Théories sur la différenciation sexuelle du système nerveux

Aujourd'hui, on considère que les dimorphismes sexuels comportementaux sont directement dus à une différenciation sexuelle du système nerveux via l'organisation différentielle des circuits neuronaux. Selon une théorie émergente, celle-ci serait sous l'influence des hormones gonadiques et, en parallèle, de composants héréditaires.

La question de l'éventuelle implication des gènes dans l'expression des comportements, a été évoquée depuis plusieurs décennies. Le comportement inné (ou instinctif) est en partie dépendant du capital génétique. Mais ce n'est que récemment que de nouvelles études, à l'origine d'un modèle dit « parallèle », ont révélées la participation directe des gènes situés sur les chromosomes sexuels indépendamment de l'action des hormones stéroïdes sexuelles (Figure 1). Ceci, grâce aux découvertes faites chez le diamant mandarin et plus particulièrement chez les individus gynandromorphes. Ces derniers sont pour moitié de phénotype masculin et de l'autre féminin possédant à la fois un testicule et un ovaire. Leur cerveau est également pour moitié mâle et pour moitié femelle, et ce bien que le cerveau soit entièrement imprégné du même milieu hormonal (Agate et al., 2003). Ces observations ont permis de démontrer que des facteurs indépendants de la sécrétion d'hormones gonadiques peuvent influencer la différenciation sexuelle du système nerveux. Les mêmes conclusions ont pu être tirées grâce aux modèles de souris FCG (Fore Core Genotypes) (De Vries et al., 2002; Arnold, 2009; McCarthy et Arnold, 2011; Gatewood et al., 2006; Majdic et Tobet, 2011) et de souris SF-1KO, invalidées pour le facteur stéroïdogénique 1 (Ingraham et al., 1994; Zhao et al., 2008; Kim et al., 2009; Schimme et White, 2010; Majdic et Tobet, 2011). Ces souris ont été obtenues à partir de manipulations génétiques ; avec la translocation du gène SRY sur un autosome ou l'invalidation du facteur de transcription nécessaire au développement des gonades respectivement. Ainsi les effets des hormones gonadiques ont pu être dissociés de ceux des informations génétiques situées sur les chromosomes sexuels, sur les phénotypes sexuellement dimorphiques.

Plus récemment, une étude a montré le rôle important des informations situées sur les chromosomes sexuels et l'influence du nombre de chromosomes sexuels X dans la régulation de l'expression du comportement sexuel mâle (Bonthuis et al., 2012). Ils décrivent que les souris mâles qui ont deux chromosomes X (après modification génétique) sont plus performantes sexuellement. Par ailleurs, une étude a montré que l'influence des gènes sur les différences sexuelles cérébrales et comportementales ne semblait pas être limitée aux chromosomes sexuels (Xu et al., 2012).

Les données qui seront obtenues à travers ces études émergentes apporteront sans aucun doute des éléments de réponses complémentaires au modèle parallèle. Toutefois, jusqu'à aujourd'hui il était considéré que la différenciation sexuelle cérébrale était principalement due à une organisation différentielle des circuits neuronaux.

Pendant de nombreuses années, l'idée première était que les différences comportementales étaient sous contrôle périphérique. En effet, les effets de la castration observés chez le bétail et les travaux réalisés entre 1849 et 1947 (Berthold, 1849 ; Nissen, 1929 ; David et al., 1935, Beach, 1942 ; Jost, 1947) ont permis la reconnaissance d'un facteur commun à l'apparition et l'expression des dimorphismes sexuels, une hormone gonadique, appelée testostérone.

Ce n'est qu'en 1959, que Phoenix et ses collaborateurs suggérèrent pour la première fois que le cerveau était à l'origine indifférencié. Des travaux de l'équipe de Phoenix émergent trois notions: i) Les différences neuroanatomiques sont établies par des hormones gonadiques pendant une période de sensibilité au cours du développement. ii) Ces hormones agissent de manière irréversible et iii) de manière réversible à l'âge adulte pour réguler l'expression des comportements et des réponses neuroendocrines (Phoenix et al., 1959).

Cette hypothèse proposée est à l'origine d'un modèle dit « classique » ou « linéaire » schématisé en Figure 1. Ce modèle a orienté pendant près d'un demi siècle la majorité des travaux réalisés jusqu'à maintenant, accordant un rôle prépondérant aux hormones stéroïdes gonadiques dans la différenciation sexuelle du cerveau.

La majeure partie de l'étude bibliographique qui suit est consacrée à présenter l'état des connaissances concernant le rôle de la testostérone dans la différenciation sexuelle des différentes régions (cérébrales et spinales) impliquées

dans l'expression du comportement sexuel chez la souris mâle. Ainsi, nous verrons que les mécanismes d'action mis en jeu par la testostérone restent encore à établir. La contribution des gènes dans la différenciation sexuelle du système nerveux ne sera pas développée d'avantage dans l'état de l'art, n'étant pas l'orientation de mon projet de thèse.

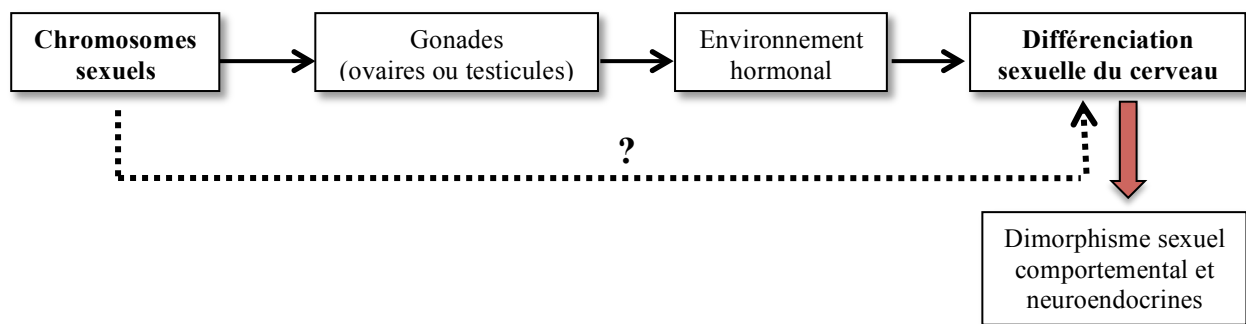


Figure 1 : Le processus de différenciation sexuelle du cerveau selon le modèle classique versus parallèle.

Le modèle classique (flèches pleines →) suppose dans cet ordre que l'information génétique située sur les chromosomes sexuels oriente le développement des gonades (ovaires ou testicules). Une fois différenciées ces dernières vont synthétiser des hormones stéroïdes sexuelles, notamment la testostérone identifiée comme étant l'hormone responsable des différences entre sexe. L'environnement hormonal ainsi créé influence le développement des circuits neuronaux qui gouvernent les réponses neuroendocrines et comportementales spécifiques d'un sexe. Le modèle parallèle (flèche en pointillée ->) propose l'implication directe des gènes chromosomiques sexuels sur le processus de différenciation du cerveau.

Perturbation des effets de la testostérone

Un grand nombre d'études épidémiologiques ont mis en avant, dans les pays industrialisés, une augmentation régulière de l'incidence de plusieurs pathologies de la fonction de reproduction (baisse de la fertilité, anomalies du tractus génital). À l'époque d'une industrialisation grandissante, les quantités et la nature des polluants environnementaux sont en constante évolution. Parmi ces polluants, certains sont des molécules pouvant avoir une activité hormono-mimétique et donc contribuer à l'apparition de ses diverses pathologies. Ce sont les perturbateurs endocriniens.

Le Bisphénol A (BPA), initialement un œstrogène de synthèse ensuite utilisé dans l'industrie du plastique, compte parmi les perturbateurs endocriniens les plus répandus et étudiés ces dernières années. En effet, le BPA est utilisé dans les plastiques qui composent de nombreux objets de la vie courante (par exemple les biberons, qui ont fait l'objet d'une forte médiatisation), avec une production mondiale estimée à environ 3 millions de tonnes par an (Burrige, 2003). Or le BPA est relargué dans les aliments. Différentes activités hormono-mimétiques du BPA ont été mises en évidence. Depuis ces dernières décennies, ceci soulève des inquiétudes vis à vis de ce perturbateur endocrinien auquel nous sommes exposés dans notre vie de tous les jours et représente désormais un enjeu de santé publique.

Parmi les nombreuses études menées jusqu'à aujourd'hui, la plupart font état d'effets délétères d'une exposition à de faibles doses de BPA à différents niveaux. Notamment au niveau central, il a récemment été mis en évidence des effets organisationnels à long terme, en réponse à une exposition au BPA au cours du développement chez des animaux de laboratoire (Pour revues, Richter et al., 2007; Li et al., 2008). Des perturbations des comportements sexuellement dimorphiques ont été décrites, dont les comportements émotionnels, cognitifs et parentaux.

Cependant, il y a très peu de données, ou alors elles sont controversées, sur des effets potentiels sur le comportement sexuel mâle, ainsi que sur les mécanismes moléculaires mis en jeu.

L'état de connaissance actuelle sur le BPA et ses effets au niveau central sera développé dans le dernier chapitre de l'étude bibliographique.

L'objectif de ma thèse a été, dans un premier temps, **d'étudier les mécanismes d'action mis en jeu par la testostérone dans la régulation du comportement sexuel chez la souris mâle**. Pour cela, j'ai utilisé deux modèles de souris génétiquement modifiées avec la technique de mutagenèse conditionnelle Cre-loxP. L'état de l'art qui s'en suit porte donc essentiellement sur le comportement sexuel chez la souris mâle.

Dans un deuxième temps, j'ai **étudié les conséquences organisationnelles et comportementales d'une perturbation de l'action de la testostérone au niveau central**. Pour cela, j'ai participé à une étude menée par notre équipe visant à caractériser les effets d'une exposition, en période périnatale ou à l'âge adulte, à de faibles doses de BPA sur la différenciation et l'activation du comportement sexuel.

État de l'art

CHAPITRE I.

DIFFÉRENCIATION SEXUELLE DU SYSTÈME NERVEUX PAR LES HORMONES GONADIQUES CHEZ LE MÂLE

Chez les mammifères, l'émergence de deux phénotypes mâle et femelle est un mécanisme sous le contrôle d'une cascade d'évènements complexes. Ce processus est régi par l'expression de nombreux gènes spécifiques portés par des chromosomes sexuels, qui régulent la différenciation gonadique. Le développement subséquent du tractus reproducteur dans un sens mâle ou femelle, puis les dimorphismes sexuels, dépendent du statut hormonal de l'embryon, qui commence à exercer son effet *in utero* et devient de première importance autour de la naissance.

Dans ce chapitre, nous verrons que, chez le mâle, le déterminisme génétique du sexe est à l'origine des variations des taux d'androgènes au cours du développement. La différenciation sexuelle du système nerveux se fait alors pendant la période de sensibilité à ces hormones. Les variations de ces dernières exercent une forte influence sur l'organisation irréversible des circuits neuronaux, permettant l'expression de comportement sexuel et de réponses neuroendocrines, qui seront en accord ou non avec le sexe phénotypique déterminé par les chromosomes sexuels.

I. Différenciation sexuelle du tractus uro-génital

Chez les mammifères, les chromosomes sexuels permettent la différenciation sexuelle des gonades très tôt au cours du développement embryonnaire. En effet, les mâles possèdent les chromosomes sexuels XY et les femelles les chromosomes sexuels XX. Sur le bras court du chromosome sexuel Y est localisé le gène *SRY* (Sex-determining region of Y chromosome), un facteur de détermination testiculaire (TDF), dont l'expression est nécessaire et suffisante à l'induction de la différenciation des gonades en testicules (Berta et al., 1990; Koopman et al., 1991).

Dès 1947, les travaux d'Alfred Jost ont démontré le rôle de la testostérone dans la différenciation du tractus génital et des tissus périphériques (Jost, 1947). En effet, les ébauches embryonnaires des appareils reproducteurs mâle et femelle coexistent chez l'embryon au stade sexuellement indifférencié. Les structures embryonnaires acquièrent des caractères mâles sous l'action de la sécrétion de testostérone par les cellules de

Leydig à partir de 12,5 jour post coïtum (jpc) chez la souris (O'Shaughnessy et al., 2009). Ceci va favoriser la stabilisation des canaux de Wolff à l'origine du tractus urogénital mâle. D'autre part, la synthèse de l'hormone anti-Müllerienne par les cellules de Sertoli entraînera la résorption des canaux de Müller à l'origine du tractus femelle (Figure 2).

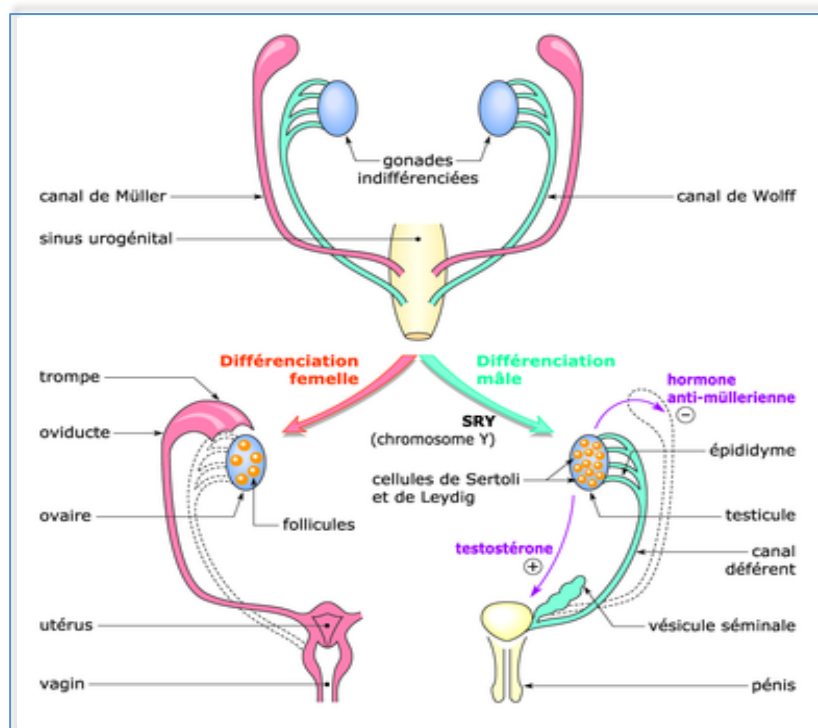
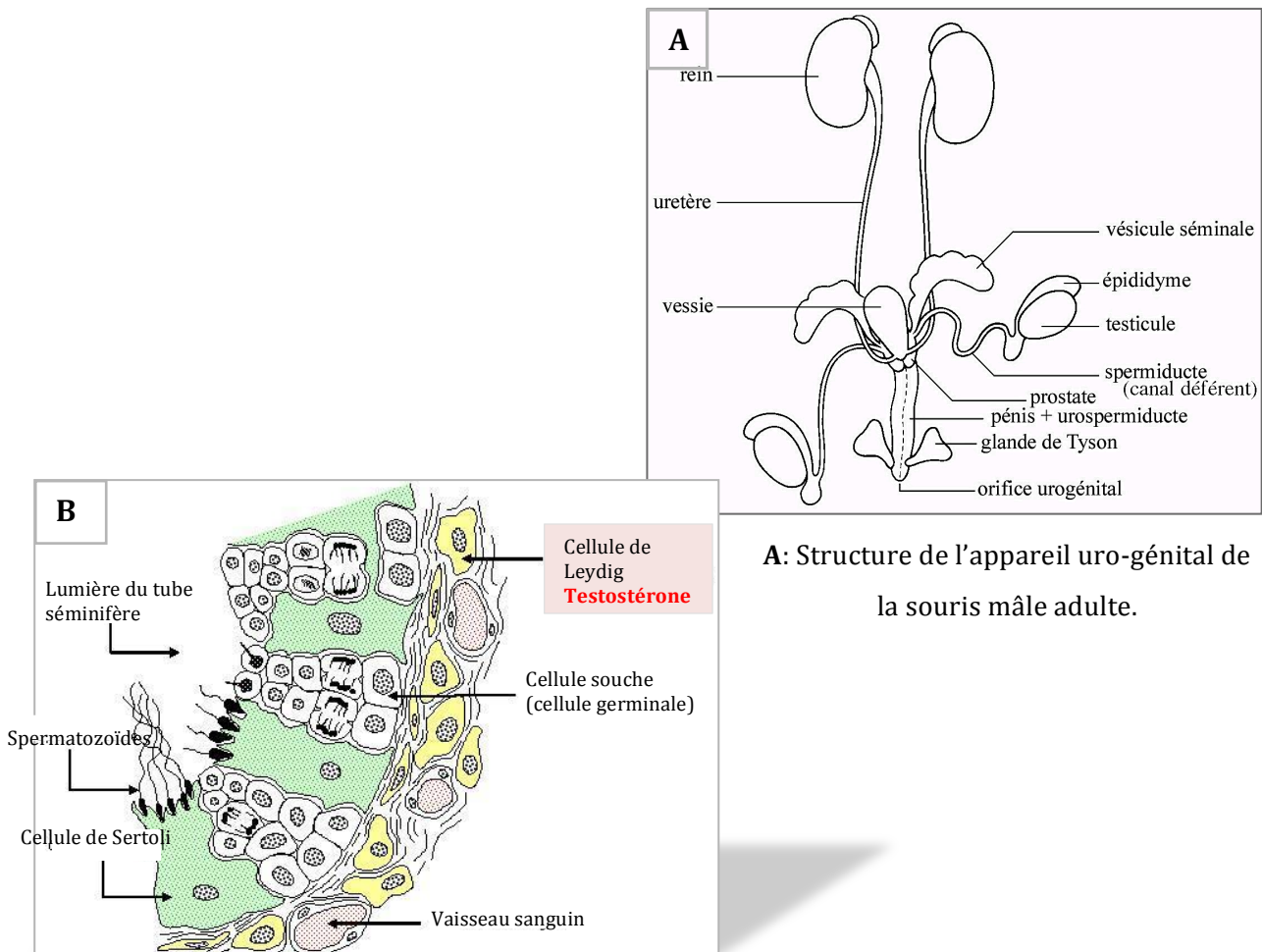


Figure 2 : Principe de la différenciation sexuelle du tractus uro-génital chez les mammifères.

À l'origine, les mâles et femelles possèdent une paire de gonades indifférenciées et deux paires de canaux excréteurs, les canaux de Müller et les canaux de Wolff. Le gène SRY, localisé sur le chromosome sexuel Y, induit la différenciation des gonades en testicules. Ainsi, les cellules de Leydig synthétisent de la testostérone et les cellules de Sertoli l'hormone anti-Müllerienne (AMH). La testostérone stabilise les canaux de Wolff alors que l'AMH induit la régression des canaux de Müller. Chez la femelle, en absence du gène SRY, les gonades évoluent en ébauches ovariennes.

Chez la femelle, en absence du gène SRY, un programme longtemps considéré « par défaut » entraîne le développement des ovaires. En effet, l'absence d'androgènes au cours du développement provoque la régression des canaux de Wolff tandis que les canaux de Müller se développent. Ces derniers se différencient en trompes de Fallope, utérus et partie supérieure du vagin (Figure 2). Mais grâce au développement d'outils génétiques et d'approches transcriptomiques, il est aujourd'hui mis en avant que la différenciation des gonades femelles est un processus dynamique comme chez le mâle. Des cascades géniques agiraient simultanément sur l'activation de la voie femelle et

l'inactivation de la voie mâle (Baillet et al., 2011; Baillet et Mandon-Pepin, 2012).



A: Structure de l'appareil uro-génital de la souris mâle adulte.

B: Coupe d'un tube séminifère

Figure 3 : Organisation du tractus uro-génital mâle.

A: L'appareil génital chez la souris mâle à l'âge adulte est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales de la femelle. Il comprend :

- deux testicules qui assurent deux fonctions essentielles : la production des spermatozoïdes, et la synthèse/sécrétion d'hormones stéroïdes (les androgènes, essentiellement la testostérone).
- d'un système de conduction avec l'épididyme, le spermiducte (ou canal déférent) qui assurent le transport des spermatozoïdes jusqu'à l'extrémité du pénis.
- des glandes accessoires avec les vésicules séminales et la prostate qui synthétisent les sécrétions qui composent le sperme. Les glandes de Tyson sécrètent des phéromones sexuelles libérées à l'extrémité du pénis.
- du tractus uro-génital représenté par l'urètre s'ouvrant à l'extérieur par l'orifice urogénital.

B: Agrandissement d'une coupe d'un tube séminifère, constituant le testicule, où sont produit les spermatozoïdes. La spermatogenèse s'effectue dans la lumière des cellules de Sertoli. Le tissu conjonctif interstitiel, richement vascularisé, est formé de cellules de Leydig sécrétant la testostérone.

Chez les mâles comme chez les femelles, le développement des caractères sexuels secondaires dépend de la présence d'hormones stéroïdes sexuelles spécifiques, androgènes et œstrogènes respectivement, synthétisées par les testicules et les ovaires.

II. Variations des taux circulants des hormones stéroïdes gonadiques

II.1. La testostérone et ses métabolites

Chez le bétail, la castration a pour effet d'abolir les comportements sexuels et agressifs. L'élément responsable de cet effet fut décrit en 1849 comme un facteur testiculaire transporté par le sang (Berthold, 1849) qui lorsqu'il est injecté restaure le comportement sexuel d'un animal adulte castré (Nissen, 1929). Ce facteur fut ensuite identifié et nommé testostérone (David et al., 1935).

La synthèse de la testostérone se fait à partir de cholestérol, dans les cellules de Leydig situées dans les espaces interstitiels des cordons séminifères (Figure 3) (Habert et Picon, 1984; Gnessi et al., 2000; Tang et al., 2004). Il s'agit d'une chaîne de biosynthèse qui met en jeu un système enzymatique en cascade : au niveau de la mitochondrie a lieu le clivage de la chaîne latérale du cholestérol pour obtenir de la pregnénolone qui sera ensuite métabolisée en testostérone dans le réticulum endoplasmique lisse (Figure 4). Ainsi chez le mâle, la majeure partie de la testostérone est produite par le testicule (95%) mais une petite quantité est aussi produite par les glandes surrénales.

Si la testostérone est l'hormone gonadique majoritaire chez le mâle, elle n'est pas la seule à être synthétisée et capable d'agir sur les tissus cibles. Dans le testicule, le système nerveux et dans d'autres tissus, la testostérone peut être réduite en 5α -dihydrotestostérone par la 5α -réductase (Shimazaki et al., 1965). L'œstradiol est également synthétisé chez le mâle, suite à la conversion de la testostérone par l'aromatase cytochrome P450 (Ryan et al., 1972; Simpson et al., 1994). Les taux circulants d'œstradiol proviennent à 15% de la conversion au sein du testicule, le reste provenant de la conversion en périphérie (Simpson, 2000) (Figure 4). Ainsi, nous verrons (Chapitre III) que la testostérone et ses métabolites peuvent chacun jouer un rôle dans la différenciation sexuelle du système nerveux.

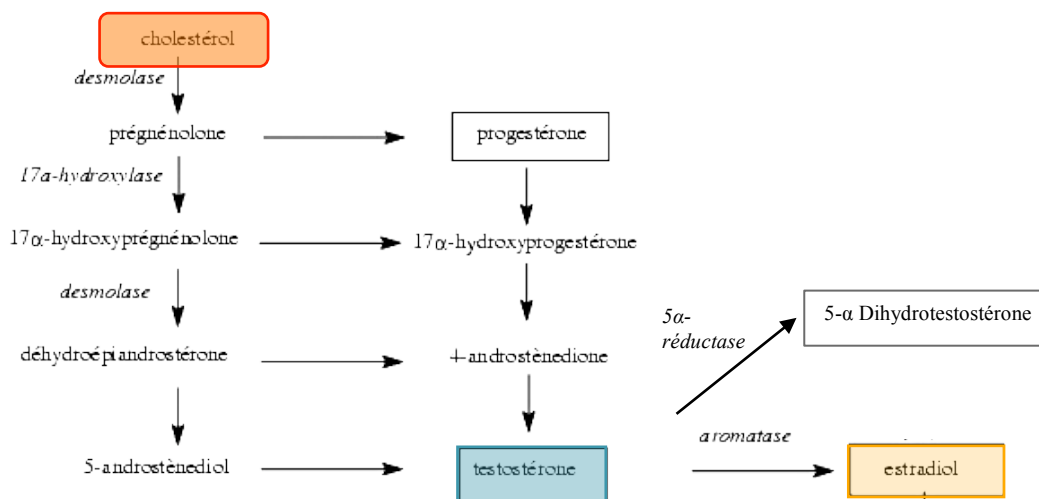


Figure 4 : Chaîne de biosynthèse de la testostérone et de ses métabolites.

La première étape de la stéroïdogénèse est la production de prégnénolone à partir du cholestérol, le précurseur commun pour toutes les hormones stéroïdes. Elle est ensuite métabolisée par différentes étapes enzymatiques pour produire la testostérone. Cette dernière peut ensuite être réduite en 5 α -Dihydrotestostérone par la 5 α -réductase ou converti en œstradiol par l'aromatase.

À l'inverse, chez la femelle c'est l'œstradiol qui est l'hormone stéroïde gonadique majoritaire, bien que les androgènes soient également détectables. Les hormones stéroïdes sont produites dans deux compartiments distincts au sein du follicule ovarien. Dans les cellules de la thèque a lieu la synthèse d'androsténone (un androgène), qui est ensuite converti par l'aromatase en œstrogènes dans la granulosa (Bremer, 2010; Young et McNeilly, 2010).

II.2. Les variations des taux d'hormones stéroïdes sexuelles au cours de la vie

Les taux d'hormones gonadiques évoluent différemment tout au long de la vie d'un individu. Chez le mâle, en période périnatale surviennent deux pics de testostérone qui jouent un rôle primordial dans la différenciation sexuelle du système nerveux. En effet, la fin de la différenciation des testicules marque le début de libération de testostérone. Les taux augmentent à partir de 14^{ème} jour embryonnaire (E), et sont responsables de la différenciation sexuelle du tractus génital. Un premier pic de testostérone est atteint à E18-19 (Salgueiro et Reyss, 2002), suivi d'un second pic quelques heures après la naissance (Pang et Tang, 1984; Motelica-Heino et al., 1988; Corbier et al., 1992). Par la

suite, les taux de testostérone diminuent et restent faibles jusqu'à la puberté. Les taux augmentent ensuite progressivement à partir du 35-40^{ème} jour postnatal chez la souris (Clarkson et al., 2012). Cette nouvelle augmentation est responsable de l'acquisition des caractères physiques secondaires et du déclenchement de la spermatogenèse. Enfin entre le 50^{ème} et le 60^{ème} jour postnatal les taux se stabilisent et vont atteindre à l'âge adulte environ 1 ng/ml chez le rongeur (Jean-Faucher et al., 1978; O'Shaughnessy et al., 2009) (Figure 5).

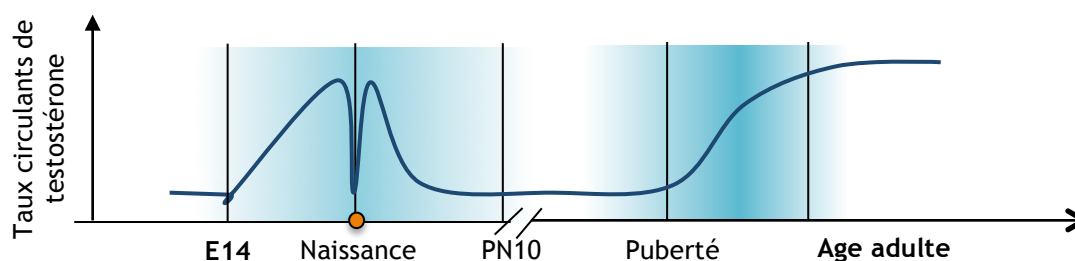


Figure 5 : Les variations des taux de testostérone chez le mâle au cours de la vie.

Chez le mâle, les taux circulants de testostérone déterminent deux périodes critiques (les zones bleues): la période périnatale comprenant les deux pics de testostérone, et l'âge adulte avec des taux stables autour de 1 ng/ml.

Chez le mâle, étant donné les processus possibles de conversion et d'aromatisation, la testostérone mais aussi ses métabolites dihydrotestostérone et œstradiol, sont les trois acteurs potentiels pouvant agir au cours du développement sur l'organisation des circuits neuronaux.

A contrario, chez le rongeur femelle, les ovaires sont silencieux et aucune synthèse d'hormones stéroïdes n'est observée au cours de la vie fœtale. Les taux d'œstradiol croissent progressivement à partir du 7^{ème} jour postnatal (Lamprecht et al., 1976; Greco et Payne, 1994) jusqu'à la puberté où la synthèse d'œstradiol devient cyclique entre les 40^{ème} et 50^{ème} jour postnatal (Kauffman, 2009) (Figure 6). En revanche, chez certaines espèces dont l'humain une synthèse transitoire d'œstrogènes est observée au cours de la vie fœtale (George et Wilson, 1978).

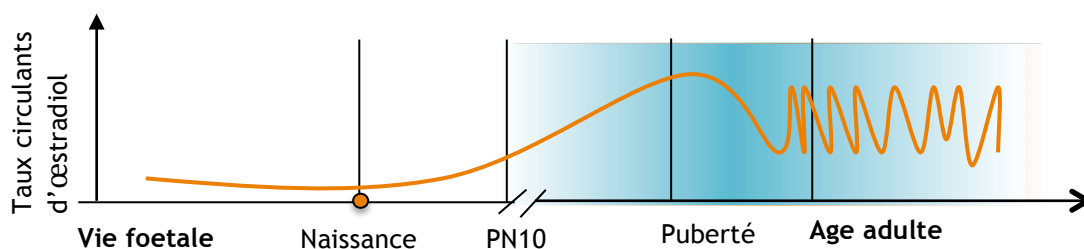


Figure 6 : Les variations des taux d'œstradiol chez la femelle au cours de la vie.

Chez la femelle, il n'y a aucune synthèse d'œstradiol pendant la vie foetale. Les taux circulants d'œstradiol augmentent progressivement pendant la puberté pour devenir cycliques à l'âge adulte.

III. Les dimorphismes neuroendocrines et comportementaux liés au comportement sexuel

III.1. L'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope

La synthèse et la libération des hormones stéroïdes sexuelles sont sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope (HPG). Les variations des taux d'hormones stéroïdes montrent des profils nettement différents entre mâle et femelle, dès la vie foetale et persistant à l'âge adulte. Ceci reflète un dimorphisme dans la régulation neuroendocrine.

À la puberté, l'apparition de la libération pulsatile de l'hormone gonadolibérine (ou GnRH pour Gonadotropin Releasing Hormone) dans le système porte hypothalamo-hypophysaire stimule la sécrétion pulsatile des gonadotropines de l'anté-hypophyse : la LH (luteinizing hormone) et la FSH (folliculo-stimulating hormone) (Tilbrook et Clarke, 2001) (Figure 7). Chez le mâle, la FSH stimule indirectement la spermatogenèse dans les testicules, la LH stimule la sécrétion de la testostérone par les cellules interstitielles au niveau des cellules de Leydig (Coquelin et Bronson, 1979). Des pics spontanés de testostérone apparaissent 4 fois par jour chez la souris mâle (Coquelin et Desjardins, 1982; James et al., 2006). De plus, les mâles ont une libération réflexe de testostérone, en présence de phéromones issues de femelles, de mâles intrus et après l'éjaculation (Coquelin et Bronson, 1980; James et al., 2006; Gleason et al., 2009).

Chez la femelle, la GnRH stimule la production de FSH et de LH, qui stimulent , à leur

tour, la production d'œstrogènes par les cellules de la thèque interne et de la granulosa du follicule ovarien, et progestérone par les cellules luthéales ovariennes.

Les stéroïdes sexuels contrôlent, en retour, la libération des gonadotropines. Cette rétroaction peut être de nature inhibitrice ou activatrice. Mâles et femelles répondent au rétrocontrôle inhibiteur, mais seules les femelles répondent au rétrocontrôle positif (Figure 7). En effet, pendant la majeure partie du cycle œstrien, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH hypothalamique, et les taux de LH sont bas chez la femelle. Mais lorsque les niveaux libérés par les follicules ovariens arrivant à maturité atteignent un pic, le rétrocontrôle exercé par l'œstradiol devient positif sur la libération de GnRH et par conséquent de LH. On parle de décharge ovulante de LH qui est nécessaire au déclenchement de l'ovulation et de la réceptivité chez la femelle. La perte de ce rétrocontrôle positif chez les mâles est un bon exemple de déféminisation des circuits neuronaux qui gouvernent la neurosécrétion de la GnRH.

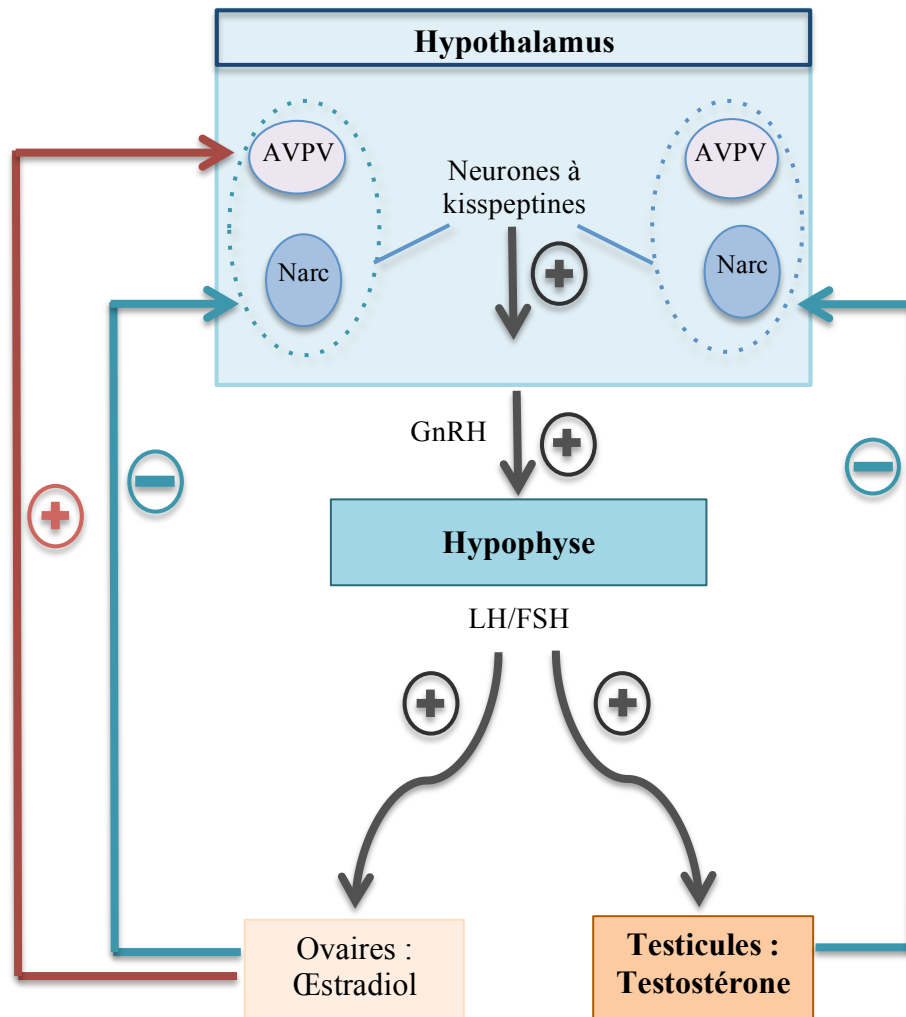


Figure 7 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadotrope (HPG) chez le mâle et la femelle. La libération pulsatile de GnRH stimule la libération des hormones LH et FSH de l'hypophyse qui à leur tour stimulent la sécrétion d'hormones stéroïdes (œstradiol et testostérone) par les gonades (ovaires et testicules respectivement). Chez le mâle et la femelle, les hormones gonadiques exercent un rétrocontrôle négatif au niveau des neurones à kisspeptine situés dans le Narc hypothalamique afin de réguler l'axe HPG. Chez la femelle, lorsque les concentrations plasmatiques d'œstradiol provenant du follicule en croissance restent élevées pendant plusieurs heures, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif au niveau des neurones à kisspeptine dans l'AVPV. Celui-ci se traduit par une libération massive de la GnRH qui stimule la libération de LH et déclenche de la décharge ovulante.

Le mode de sécrétion des neurones GnRH est également sexuellement dimorphique. Les mâles de plusieurs espèces exhibent une fréquence de décharge des neurones GnRH supérieure à celle observée chez les femelles alors que l'amplitude des pics est similaire (Levine, 2003). Des neurones sécrétant les kisspeptines ont été localisés dans le noyau arqué (NArc) et la région antéroventrale périventriculaire (AVPV). Ces neurones seraient les cibles potentielles des stéroïdes sexuels pour la régulation de la sécrétion de GnRH (Dungan et al., 2006; Roa et al., 2008; Oakley et al., 2009). Ces neurones envoient des projections sur les neurones à GnRH qui expriment le récepteur GPR54 des kisspeptines (Smith et al., 2006). Les neurones à kisspeptines localisés dans l'AVPV sont impliqués dans le rétrocontrôle positif de l'axe HPG chez la femelle (Gu et Simerly, 1997; Smith et al., 2006), tandis que la population présente dans le NArc participerait au rétrocontrôle négatif de la sécrétion de GnRH par les stéroïdes gonadiques chez les deux sexes de nombreuses espèces, dont le rongeur (Smith et al., 2005a, 2005b) (Figure 7).

L'administration centrale ou périphérique de kisspeptine augmente la libération de gonadotropines chez la femelle (Smith et al., 2006). La maturation de leur récepteur GPR54 chez l'Homme ou la souris résulte en un hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003; Funes et al., 2003). Des études montrent, chez la souris et chez l'Homme, que le manque du GPR54 fonctionnel entraîne un défaut d'apparition de la puberté (Dungan et al., 2006).

III.2. Le comportement sexuel

Lors de l'accouplement, mâles et femelles exhibent des postures très spécifiques à chacun, dont le déroulement et la durée peuvent varier selon les espèces. Les différentes études de comportement sexuel menées chez les rongeurs ont permis d'en avoir une description détaillée.

Le comportement sexuel mâle, chez les rongeurs, s'exprime en continu pendant la période de reproduction. Il est initié dès que le mâle est mis en présence d'une femelle réceptive. Il est composé de deux phases (Hull et Rodríguez-Manzo, 2009):

- Une phase pré-copulatoire qui correspond à la phase d'excitation du mâle. Ce dernier réalise des vocalisations ultrasonores et marque à l'urine le territoire. Le mâle renifle

activement les parties ano-génitales de la femelle en soulevant son arrière train avec son museau et ses pattes avant. En effet chez le rongeur, les stimuli olfactifs jouent un rôle essentiel dans le déclenchement du comportement reproducteur.

- Une phase copulatoire (ou consommatoire), qui débute dès les premières tentatives de montées qui sont accompagnées de mouvements pelviens rapides. La latence de la première montée est le reflet de l'état de motivation du mâle. Les montées sont accompagnées de mouvements de va-et-vient appelés « thrust ». Les mouvements pelviens ralentissent ensuite et sont de plus forte amplitude lorsque le mâle parvient à faire des montées avec intromissions (autrement dit quand le pénis est placé avec succès dans le vagin de la femelle). Après chaque montée avec intromissions, le mâle réalise une toilette génitale témoin de l'activité érectile. L'accouplement se termine par l'éjaculation, caractérisée par la chute sur le côté et l'immobilité complète du mâle pendant 20 à 30 secondes. Après quoi les deux animaux passent plusieurs minutes à se toiletter chacun de leur côté. La souche et l'expérience sexuelle du mâle participent à la variabilité dans la durée totale d'un accouplement, qui est en moyenne de 30 min pour un mâle naïf et diminue avec l'expérience. La durée de l'accouplement et le nombre d'intromissions renseignent sur la performance sexuelle du mâle.

Le temps nécessaire pour manifester un deuxième accouplement, appelé intervalle post-éjaculatoire, varie selon la souche de souris (Burns-Cusato et al., 2004).

Le comportement sexuel femelle ne s'exprime que pendant une période restreinte dans le temps, correspondant à l'augmentation transitoire de la sécrétion d'œstradiol suivie de celle de la progestérone pendant l'œstrus. Au cours de cette période, dite de réceptivité, la femelle participe activement à l'accouplement en manifestant un comportement appétitif et motivant afin de favoriser les montées du mâle. Pendant la phase copulatoire, le comportement sexuel de la femelle est défini par sa réceptivité. Cette dernière peut être mesurée chez le rongeur par la position, dite de lordose, adoptée lors des montées réalisées par le mâle. La lordose se caractérise par l'immobilité, la cambrure du dos, l'élévation de la tête et de la queue qui est déviée pour faciliter les intromissions réalisées par le mâle. La manifestation de cette posture est relativement courte, avec des durées variables selon l'espèce étudiée (Pfaff, 1973; Blaustein et Erskine, 2002).

IV. Les périodes de mise en place des dimorphismes

La variation des taux circulants de testostérone chez le mâle permet de distinguer deux périodes critiques : i) la période périnatale correspondant à la période de développement juste avant et après la naissance, quand surviennent les deux premiers pics de testostérone et ii) l'âge adulte avec les taux constants de testostérone. Le cerveau est à l'origine indifférencié et bipotent. L'hypothèse prédominante depuis un demi siècle (Phoenix et al., 1959) est que la testostérone organise de façon permanente le système nerveux central au cours de la période périnatale. À l'âge adulte, la testostérone est nécessaire pour activer de manière transitoire les circuits neuronaux impliqués dans l'expression du comportement sexuel mâle.

IV.1. La période périnatale, l'organisation permanente des circuits neuronaux

L'organisation normale du système nerveux mâle implique deux processus distincts induits par la testostérone : la **masculinisation** des substrats neuronaux qui a pour but de potentialiser l'expression des comportements typique mâles à l'âge adulte et la **défémisation** entraînant la perte de la capacité des mâles à exhiber un comportement de type femelle. En effet, la célèbre étude de Phoenix et ses collaborateurs (Phoenix et al., 1959) a montré que le traitement en période prénatale de femelles cochon d'inde avec de la testostérone entraîne la masculinisation et la défémisation de leur comportement sexuel. En effet, ces femelles traitées montrent, à l'âge adulte, peu ou pas de comportement sexuel femelle et une augmentation du comportement sexuel mâle contrairement aux femelles non traitées. Cette étude a permis de montrer que la modification de la réponse aux hormones était visible longtemps après la fin du traitement à la testostérone, à l'âge adulte. Ce qui implique que la testostérone organise de **manière irréversible** les circuits neuronaux.

La castration de souris mâles en période postnatale entraîne un déficit significatif de leur comportement sexuel mâle à l'âge adulte (Quadagno et al., 1975). Ces déficits sont irréversibles car ne peuvent pas être corrigé à l'âge adulte avec l'apport de testostérone exogène (Figure 8). Inversement, le comportement mâle est augmenté chez des femelles traitées avec de la testostérone pendant la période (Beatty, 1979) (Figure 8).

La période de traitement par la testostérone conditionne ses effets à long terme. On parle alors de **période critique de sensibilité**, qui a une étendue plus ou moins variable selon l'espèce considérée (Goy, 1966; Beatty, 1979). Les femelles cochon d'inde traitées avec de la testostérone plusieurs jours après la naissance ou à l'âge adulte, ne répondent pas à la testostérone (Phoenix et al., 1959). Ainsi, chez le cochon d'inde la testostérone agit essentiellement au cours de la période prénatale. Chez le rat ou la souris, c'est la période postnatale qui serait principalement impliquée dans l'organisation du comportement sexuel (Beatty, 1979; Baum et al., 1990; Rubinow et Schmidt, 1996).

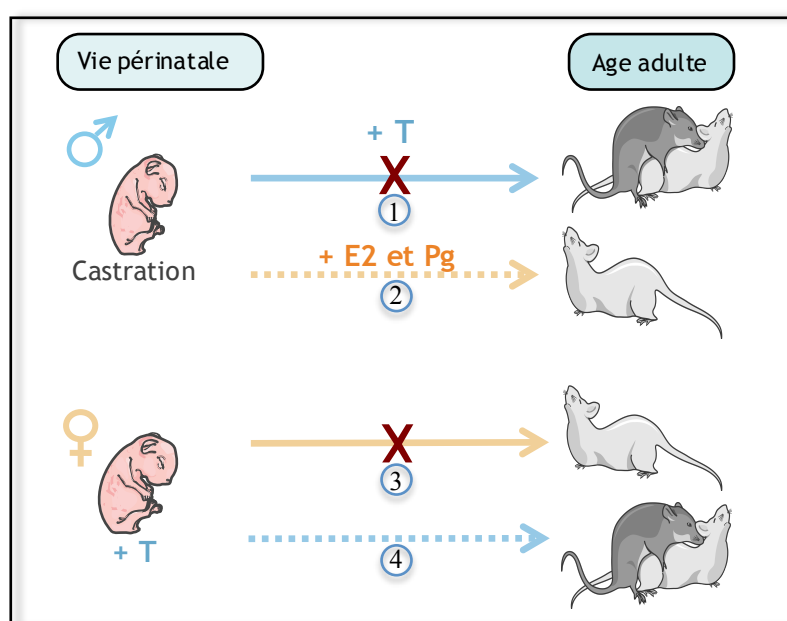


Figure 8 : Démonstration des effets organisationnels de la testostérone en période périnatale.

Les effets d'un traitement hormonal pendant la période périnatale sur le comportement sexuel chez la souris mâle ou femelle à l'âge adulte : La castration de mâle en période néonatale induit la perte totale de leur capacité à exprimer un comportement sexuel mâle à l'âge adulte ($\rightarrow 1$). Le phénotype n'est pas sauvé par une injection de testostérone (T) à l'âge adulte. Chez ces animaux castrés, l'administration séquentielle d'hormones femelles (œstradiol (E2) et progestérone (Pg))* provoque un comportement femelle à l'âge adulte ($\rightarrow 2$). À l'inverse, le traitement des femelles à la testostérone en période périnatale a pour conséquence de diminuer l'expression du comportement sexuel femelle ($\rightarrow 3$) et d'augmenter l'expression du comportement sexuel mâle ($\rightarrow 4$).

*Ce mode d'administration d'hormones femelle permet de mimer l'augmentation séquentielle d'œstradiol et progestérone, appelé pic de réceptivité, qui survient en période de réceptivité au cours du cycle œstrien.

L'absence d'hormones chez les femelles en période périnatale est généralement suffisante à expliquer le développement « par défaut » du cerveau femelle. Or, celles-ci peuvent être soumises à l'influence de l'œstradiol pendant la vie fœtale, provenant de la mère ou de la conversion des androgènes produits par les fœtus frères.

Il a été montré que la présence de l' α -fœtoprotéine (Afp), en plus de l'inactivité des gonades femelles, protège le système nerveux central femelle de l'effet masculinisant de l'œstradiol environnant pendant la période prénatale (Bakker, 2006). L'Afp est une protéine synthétisée par le foie fœtal à de forte concentration durant la vie embryonnaire. La concentration d'Afp diminue rapidement au cours des premières heures qui suivent la naissance. Cette protéine disparaît quasiment complètement dès la 3^{ème} semaine postnatale chez la ratte et la souris (Raynaud, 1973; Nayak et Mital, 1977; Esumi et al., 1982; Tilghman et Belayew, 1982). Elle a une très forte affinité pour l'œstradiol (Savu et al., 1981) avec lequel elle forme un complexe avec l'œstradiol ce qui l'empêche de pénétrer dans les cellules cérébrales. Les souris femelles invalidées pour l'Afp sont infertiles, n'ont pas d'ovulation, ni de comportement de lordose à l'âge adulte (Gabant et al., 2002; Bakker, 2006). En revanche, l'Afp a une faible affinité pour la testostérone. Ainsi, la testostérone peut entrer sans difficulté dans les neurones et être convertie en œstradiol dans les cellules cibles chez le mâle (Puts et al., 2006).

Pendant la période postnatale, lorsque les ovaires s'activent, il semblerait que l'œstradiol d'origine gonadique soit impliqué dans la féminisation du cerveau femelle (Bakker et Baum, 2008). En effet, les femelles ovariectomisées à la naissance montrent une diminution du comportement de lordose à l'âge adulte (Lisk, 1969; Gerall et al., 1973). Les mêmes observations ont été faites chez les souris femelles invalidées pour le gène codant l'aromatase (Bakker et al., 2003). L'administration d'œstradiol entre la naissance et la puberté restaure l'expression de la lordose à l'âge adulte (Dunlap et al., 1973).

IV.2. À l'âge adulte, activation transitoire des circuits neuronaux

L'hypothèse organisationnelle/activationnelle implique aussi que la testostérone active transitoirement le système nerveux central à l'âge adulte. En effet, chez de nombreuses espèces, dont les rongeurs, la castration à l'âge adulte a pour conséquence l'abolition rapide des comportements reproducteur et agressif. Mais l'ajout exogène de testosté-

rone est nécessaire et suffisant pour réverser l'effet de la castration et permettre l'expression d'un comportement sexuel complet (jusqu'à éjaculation) (Simon, 2002; Hull et al., 2002). Alors que l'administration d'œstradiol ne permet qu'une restauration partielle (peu ou pas d'éjaculation) (Dalterio et al., 1979; Edwards et Burge, 1971; Simon et Gandelman, 1978) (Figure 9).

De la même façon chez la femelle, l'ovariectomie entraîne la disparition du cycle œstrien et par conséquent abolit tout comportement sexuel de type femelle. Mais un traitement séquentiel en œstradiol et progestérone permet de le restaurer (Figure 9).

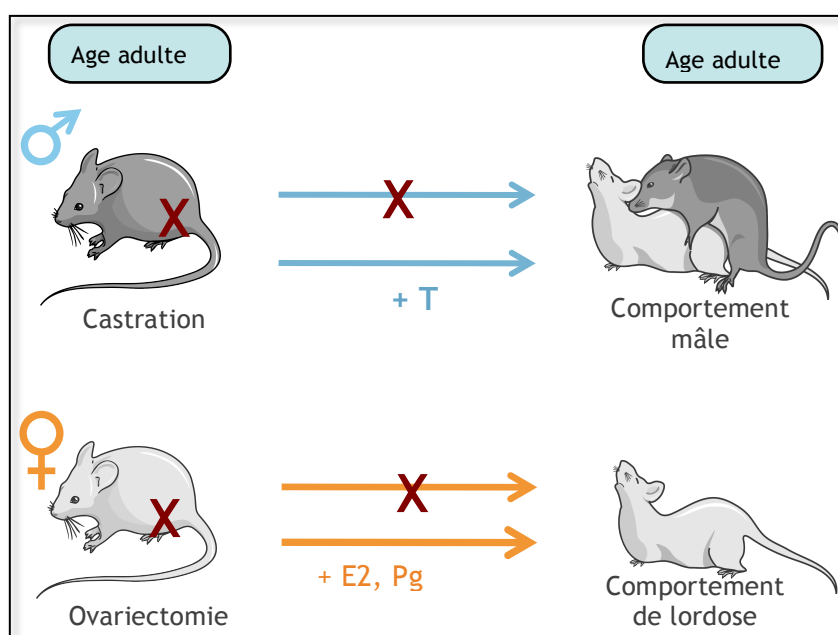


Figure 9 : Démonstration des effets activationnels de la testostérone chez la souris adulte.

Les effets d'une gonadectomie et d'un traitement hormonal à l'âge adulte révèlent la nécessité des hormones gonadiques pour activer le comportement sexuel : Chez le mâle, la castration à l'âge adulte abolit le comportement sexuel mâle. Il est rétabli avec un traitement de testostérone. De la même façon, chez la femelle, l'absence d'hormones ovariennes par l'ovariectomie provoque l'absence de comportement sexuel femelle (lordose), qui peut être restauré avec un traitement séquentiel d'œstradiol et progestérone.

IV.3. La puberté, une autre période de maturation

Dans les années 80, Arnold et Breedlove proposèrent que la distinction entre les effets d'organisation et d'activation ne soit pas toujours clairement délimitée et que les effets organisationnels potentiels ne sont pas restreints au développement neuronal précoce (Arnold et Breedlove, 1985).

Depuis, quelques études ont suggéré que les modifications endocrines qui surviennent à la puberté constitueraient une seconde vague d'organisation neuronale dépendante de la testostérone pour compléter l'organisation périnatale. Elles joueraient un rôle important dans la maturation des comportements reproducteurs (Clarkson et al., 2009; Ojeda et Skinner, 2006; Schulz et al., 2004). Notamment, les travaux de Schultz sur le hamster syrien démontrent une organisation du comportement (sexuel, agressif et le marquage urinaire du territoire) dépendant des hormones pendant la puberté (Schulz et al., 2004, 2009).

Chez de nombreuses espèces, la puberté survient plus tôt chez la femelle que chez le mâle (Fechner, 2002; Grumbach, 2002; Foster et al., 2006). Le déclenchement de la puberté serait dû à un changement de la pulsativité (épisodes brefs de sécrétion intense séparés par de longs intervalles de plusieurs heures pendant lesquels la sécrétion est interrompue) des neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de la sécrétion des hormones gonadiques (Ojeda et al., 2003). Cependant, les phénomènes permettant le déclenchement de la puberté ne sont pas clairement décrits à ce jour.

V. Les autres facteurs impliqués dans la différenciation sexuelle du cerveau

En plus des éventuels effets génétiques mentionnés dans l'introduction, il semblerait que d'autres facteurs soient impliqués dans la différenciation sexuelle du cerveau. Il a été mis en évidence que les hormones gonadiques ne sont pas produites uniquement en périphérie (par les testicules ou les ovaires), mais que le cerveau est également stéroïdogénique. Autrement dit, il est lui-même capable de synthétiser *de novo* des hormones stéroïdes sexuelles. En effet, il a été démontré que des régions cérébrales, comme l'hippocampe, contiennent les enzymes nécessaires à la synthèse d'œstradiol à partir de cholestérol (Lenz et al., 2012; Hojo et al., 2004). De plus, des taux d'hormones variables ont été mesurés entre certaines régions du cerveau ce qui va à l'encontre du concept d'un niveau d'hormone uniforme chez le mâle (Amateau et al., 2004). De même, des variations de taux d'hormones observées dans le cortex, l'hippocampe et l'hypothalamus chez le nouveau-né ne montrent pas de corrélation avec les niveaux d'hormones plasmatiques (Konkle et McCarthy, 2011), suggérant une synthèse d'hormones stéroïdes sexuelles de manière région spécifique.

Des études supplémentaires permettraient de déterminer si cette synthèse au niveau du cerveau peut participer à la mise en place des dimorphismes centraux. Cependant la fiabilité des techniques utilisées pour mesurer les taux d'hormones à des stades très précoces reste encore limitée. De ce fait, l'éventuelle contribution d'une synthèse d'hormones stéroïdes locale à la différenciation sexuelle et à la physiologie du cerveau reste à l'heure actuelle une hypothèse.

D'autre part, de nombreuses études démontrent le rôle crucial de l'environnement social et maternel au cours de la vie précoce (Moore, 1992). Chez le rat, une séparation complète avec la mère et une privation de léchage au cours des 10 premiers jours qui suivent la naissance a montré de sérieuses conséquences à long terme ; notamment dans la différenciation sexuelle des circuits neuronaux et des comportements à l'âge adulte (Lenz et Sengelaub, 2009; Moore, 1984). Par exemple, la toilette génitale maternelle, via la stimulation des afférences sensorielles, participerait au développement du noyau spinal bulbocaverneux (un noyau de motoneurons impliqué dans le contrôle de l'érection, qui sera décrit par la suite) (Lenz et Sengelaub, 2009).

Les phénomènes épigénétiques tels que la modification de l'acétylation des histones ou la méthylation des promoteurs des récepteurs nucléaires, pourraient sous-tendre ces effets. Ils sont aussi désignés comme précurseurs potentiels de différences sexuelles cérébrales (McCarthy et al., 2009).

CHAPITRE II.

ORGANISATION DES CIRCUITS NEURONAUX IMPLIQUÉS DANS L'EXPRESSION DU COMPORTEMENT SEXUEL

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la testostérone a deux rôles majeurs au niveau du système nerveux central : d'une part organiser de manière permanente les circuits neuronaux et d'autre part réguler l'activation de ces circuits. Ainsi apparaîtront les différences sexuelles qui sous-tendent les dissemblances entre mâles et femelles.

Ce chapitre sera consacré, dans un premier temps, à décrire la manière dont la testostérone peut moduler plusieurs processus cellulaires, de façon région spécifique, afin de façonner les circuits neuronaux impliqués dans l'expression du comportement sexuel. Puis nous verrons, les différentes voies d'action possible intervenant dans les effets de la testostérone.

I. Les différentes régions cérébrales et spinales impliquées dans l'expression du comportement sexuel et la régulation de l'axe HPG

I.1. Les régions cérébrales impliquées dans le comportement sexuel

Les régions sont présentées en suivant le circuit neuronal sous-tendant le comportement sexuel, allant des centres intégrateurs au centre exécutif (Figure 10 et tableau 1).

Le système olfactif

Il est clairement établi que les phéromones secrétées par le partenaire jouent un rôle primordial dans la régulation du comportement sexuel chez les rongeurs. En effet, les signaux chimiosensoriels sont indispensables pour initier le comportement sexuel, qui peut être profondément altéré en cas de lésion du système olfactif (Baum, 2009; Lévy et Keller, 2009). Les mâles et les femelles ont une sensibilité et une préférence olfactive différentes pour de nombreux composés chimiques. Les mâles préfèrent les phéromones de femelles réceptives par rapport aux phéromones mâles. Inversement, les femelles préfèrent les odeurs issues de mâles (Baum, 2009; Keller et al., 2009).

Les afférences olfactives convergent vers les neurones GnRH hypothalamiques, permettant aux phéromones de moduler les réponses endocrines (McClintock, 2002;

Keverne, 2005). Chez la femelle, il y a des modulations du cycle œstrien par les phéromones (réceptivité, puberté, période de fertilité). Chez le mâle, les phéromones peuvent influencer le déclenchement du comportement sexuel par libération d'un pic de testostérone ou encore le comportement agressif, selon qu'il s'agit de phéromones de femelles réceptives ou de mâles respectivement (Keverne, 2005).

Les informations olfactives sont détectées par deux groupes anatomiquement distincts de neurones chemosensoriels (Brennan et Zufall, 2006) (Figure 10):

- Le système olfactif principal (SOP), composé de l'épithélium olfactif (MOE) qui projette ses afférences vers les bulbes olfactifs principaux (MOB).
- Le système olfactif accessoire (SOA), composé de l'organe voméronasal (VNO) qui projette ses afférences vers les bulbes olfactifs accessoires (AOB).

Le SOP est sensible aux odeurs dites volatiles, comme la nourriture, la litière qui peuvent être senties à grande distance. Le VNO lui est sensible aux odeurs dites non-volatiles, soit les phéromones. Ces dernières, présentes dans les liquides biologiques, doivent être reniflées et sont impliquées dans la communication inter-individuelle permettant notamment l'identification et l'attraction de partenaires (Dulac et Torello, 2003; Brennan et Keverne, 2004). Depuis quelques années, il a été mis en évidence que les deux systèmes olfactifs sont capables de détecter les deux types d'odeurs (Dorries et al., 1997; Trinh et Storm, 2003).

Plusieurs dimorphismes sexuels ont été constatés dans l'organisation neuronale et la répartition des récepteurs au sein du système olfactif. Le VNO est plus volumineux chez le rat mâle que la femelle (Segovia et Guillamón, 1982). Le AOB contient plus de cellules mitrales et leur arborisation dendritique est plus dense chez le rat mâle (Pérez-Laso et al., 1997). De plus, la préférence olfactive face aux phéromones, provenant de mâle ou femelle, est différente entre mâle et femelle suggérant que le traitement de ces informations est sexuellement dimorphique.

Deux types de récepteurs couplés aux protéines G exprimés au sein du VNO des rongeurs ont pu être identifiés, les V1R (Meredith et O'Connell, 1979) et les V2R (Touhara et Vosshall, 2009).

L'ablation génétique du canal *Trpc2*, un composant essentiel dans la fonction du VNO, conduit à une diminution de la discrimination et du comportement reproducteur chez le mâle et la femelle. Ceci suggère que le VNO joue un rôle essentiel dans

l'identification sexuelle (Kimchi et al., 2007). De plus, une étude a suggéré que la délétion du gène codant pour le canal *Trpc2*, pouvait altérer la différenciation du comportement sexuel. En effet des souris femelles invalidées pour ce récepteur montrent des montées lorsqu'elles sont mises en présence de femelle. Selon les auteurs, le VNO réprimerait les circuits neuronaux impliqués dans l'expression du comportement sexuel mâle, normalement présent chez la femelle (Kimchi et al., 2007). Ceci remettait en question l'hypothèse organisationnelle et activationnelle de la testostérone. Or ces femelles mutantes montrent, de façon surprenante, des taux circulants de testostérone élevés qui pourrait expliquer ce comportement puisque l'administration de testostérone à des femelles adultes, sans lésion du VNO, suffit à induire des montés (Martel et Baum, 2009).

Le SOP compte de nombreux gènes codant les récepteurs olfactifs (Niimura et Nei, 2007) présents sur les neurones de l'épithélium olfactif de la cavité nasale. Chaque neurone de l'épithélium olfactif projette vers un glomérule spécifique dans le bulbe olfactif principal (Zufall et Leinders-Zufall, 2007). Au sein de l'épithélium olfactif, une minorité de neurones olfactifs expriment les récepteurs associés aux traces d'amines (TAARs) dont certains répondent à des amines volatiles contenues dans les urines (Liberles et Buck, 2006; Fleischer et al., 2007).

Les systèmes olfactifs principal et accessoire utilisent des mécanismes de transduction du signal distincts, mais projettent tous deux vers les régions impliquées dans le comportement reproducteur, qui sont décrits ci-après (l'amygdale médiane, le noyau du lit de la strie terminale, la région préoptique localisée dans l'hypothalamus) (Figure 10).

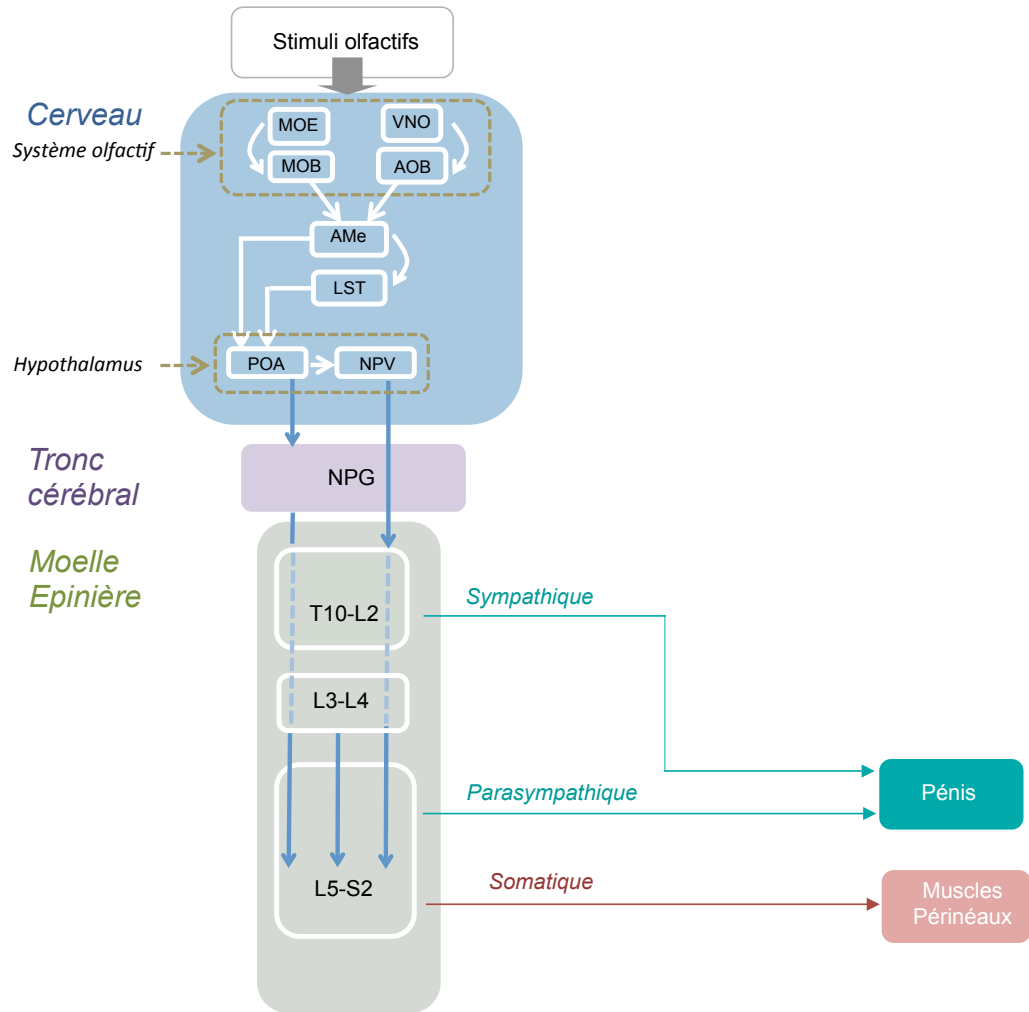


Figure 10 : Schéma du circuit neuronal impliqué dans la détection des stimuli olfactifs et le comportement sexuel mâle, chez la souris.

Le système olfactif principal (MOE et MOB) et accessoire (VNO et AOB) détectent tous deux les informations olfactives, qui sont intégrées au niveau cérébral par l'amygdale médiane (AMe), puis relayées vers certaines régions hypothalamiques telles que : le lit de la strie terminale (LST) et l'aire préoptique médiane (POA). Il y a également un relais vers la moelle épinière par le noyau paraventriculaire (NPV). Le pénis est innervé par deux systèmes autonomes sympathique et parasympathique. Les muscles périnéaux sont innervés par le système somatique situé dans la région lombaire L5-S2, comprenant le Noyau Spinal Bulbocaverneux (NSB). Ce dernier est également innervé par le « centre éjaculateur » localisé dans la région lombaire L3-L4. (Adapté d'après la revue Raskin et Mhaouty-Kodja, 2011)

L'amygdale médiane (AMe)

Elle intègre les informations relayées par le AOB et par les stimuli provenant des organes génitaux (Hull et Rodríguez-Manzo, 2009). Chez le mâle, des lésions de cette région altèrent la motivation et la performance sexuelles (McGregor et Herbert, 1992; Dominguez et al., 2001), ainsi que les réponses érectiles (Kondo et al., 1998; Kondo et Sachs, 2002).

Le volume de ce noyau est plus grand chez le mâle que chez la femelle (Cooke et al., 1999; Mizukami et al., 1983) (Tableau 1). La taille des corps cellulaires et la densité synaptique dans l'AMe postéro-dorsale sont plus grandes chez le rat mâle que chez la femelle (Staudt et Dörner, 1976; Nishizuka et Arai, 1981).

Une récente étude rapporte l'expression de neurones à kisspeptine dans l'AMe, chez le rat et la souris. Cette expression est observée chez les deux sexes, mais le niveau d'expression est plus important chez le mâle que chez la femelle (Kim et al., 2011). Le rôle des neurones à kisspeptines dans cette région est inconnu à l'heure actuelle.

Le noyau du lit de la strie terminale (LST)

Il reçoit des afférences depuis l'AMe antérieure mais aussi directement de l'AOB. Le LST projette ensuite vers l'aire préoptique (POA) et en retour vers l'AMe (Segovia et Guillamón, 1982). Il est impliqué dans l'expression du comportement sexuel et la libération de LH. Chez le rongeur, ce noyau peut être subdivisé en 4 régions (Segovia et Guillamón, 1993). Selon la région lésée, l'impact sur les comportements diverge (Finn et Yahr, 2005). Ce noyau est plus large chez le mâle que chez la femelle (Chung et al., 2000) (Tableau 1).

L'aire préoptique médiane (POA)

Elle reçoit des afférences d'une multitude de régions sensorielles, vers lesquelles elle projette réciproquement (Simerly et Swanson, 1986). Cette région cérébrale est majoritairement impliquée dans la régulation du comportement mâle. En effet, chez le mâle, la lésion de la POA altère sévèrement le comportement copulatoire et la motivation sexuelle (Hull et Rodríguez-Manzo, 2009).

Plusieurs différences anatomiques ont été décrites entre mâle et femelle (Hull et Rodríguez-Manzo, 2009). La différence sexuelle la plus spectaculaire concerne un noyau appelé noyau sexuellement dimorphique (SDN-POA). Il est 5 fois plus large chez les rats en comparaison avec les rattes en raison d'un nombre de neurones plus élevé (Tableau 1) (Gorski et al., 1978, 1980).

La POA contient également une densité importante en épines dendritiques chez le mâle par rapport aux femelles (Raisman et Field, 1973; McCarthy et al., 2009), ce qui témoigne probablement d'une plus grande plasticité synaptique. Une corrélation nette a

pu être mise en évidence entre la densité des épines dendritiques et le niveau d'expression du comportement sexuel mâle (Wright et al., 2008).

Par ailleurs, l'équipe de Sickel fut la première à montrer la présence d'un cluster de neurones exprimant la calbindine dans le SDN-POA (calb-SDN) (Sickel et McCarthy, 2000). Cette protéine de fixation du calcium (Ca^{2+}) est probablement impliquée dans la régulation du stock intracellulaire de Ca^{2+} . Ce cluster est plus large chez le mâle que chez la femelle (Edelmann et al., 2007; Büdefeld et al., 2008; Bodo et Rissman, 2008; Orikasa et Sakuma, 2010; Gilmore et al., 2012). De ce fait la calbindine est utilisée comme un marqueur du SDN-POA (Sickel et McCarty, 2000). Bien que le rôle de cette différence ne soit pas très bien comprise, il semble que les stéroïdes sexuels aient des effets organisationnels sur ce cluster chez le rat (Sickel et McCarthy, 2000) et la souris (Orikasa et Sakuma, 2010; Gilmore et al., 2012).

1.2. Les régions spinales impliquées

Le noyau spinal bulbocaverneux (NSB)

Chez les mammifères, la réponse érectile est déclenchée pendant la phase motivationnelle par les stimuli olfactifs, visuels ou tactiles. Au moment de l'éjaculation, l'information est intégrée tout d'abord au sein de régions cérébrales limbiques, l'amygdale et les régions hypothalamiques (la POA et le NPV) (Hull et Rodríguez-Manzo, 2009; Raskin et Mhaouty-Kodja, 2011), puis relayée vers la moelle épinière au sein des voies nerveuses spinales :

- autonomes innervant le pénis, pour y concentrer les fluides séminaux
- et somatiques contrôlant l'activité des muscles striés périnéaux bulbocaverneux (BC) et levator ani (LA) (Figure 10), formant un anneau à la base du pénis, dont la contraction permet l'émission de l'éjaculat et participe au maintien de l'érection (Sachs, 1982; Holmes et Sachs, 1994; Steers, 2000).

Chez les mâles de nombreuses espèces, les motoneurones (MTN) du noyau spinal bulbocaverneux (NSB) (noyau d'Onuf chez l'Homme), présents au niveau L5-S1 de la moelle épinière, innervent les muscles BC et LA et le sphincter annal externe (SAE) (Hart, 1972; Schrøder, 1980; Breedlove et Arnold, 1980; Sengelaub et Forger, 2008) (Figure 11).

Ce noyau spinal découvert pour la première fois par Marc Breedlove, fût l'un des premiers décrits dans le système nerveux pour son dimorphisme sexuel anatomique (Breedlove et Arnold, 1980). Chez les mâles de nombreuses espèces, le nombre et la taille de ces motoneurones sont plus importants que chez les femelles. Ces dernières ne possédant pas de muscles BC et LA, leur MTN dans le NSB innervent exclusivement le SAE (McKenna et Nadelhaft, 1986) (Figure 11) (Tableau 1).

L'arborisation dendritique des MTN est également plus importante chez le mâle et jouerait un rôle majeur dans l'intégration fonctionnelle des signaux spinaux et supra-spinaux (Breedlove et Arnold, 1980; Wee et Clemens, 1987; Wagner et Clemens, 1989; Breedlove, 1992; Park et al., 2002, 1999; Zuloaga et al., 2007; Forger, 2009).

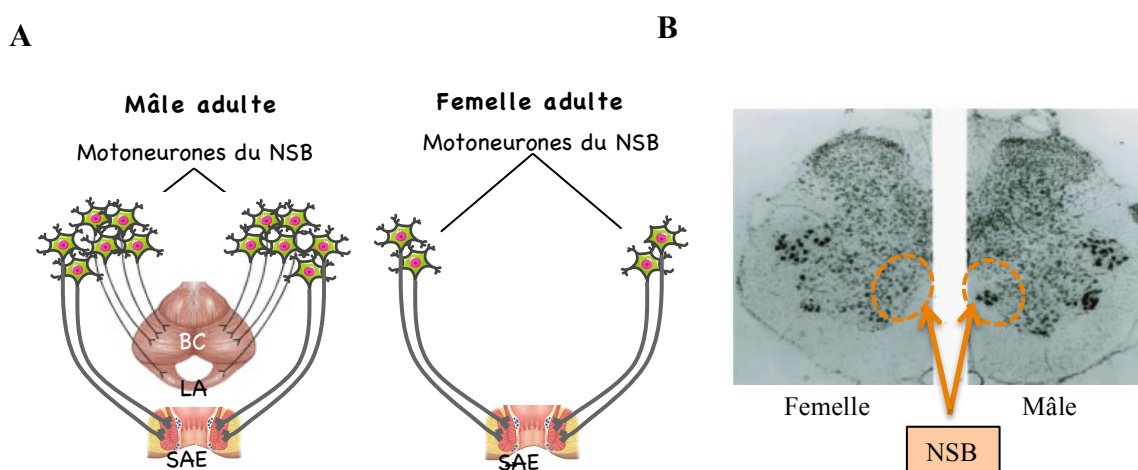


Figure 11: Organisation des motoneurones dans le NSB chez le mâle versus la femelle.

A : Chez le mâle, les motoneurones du noyau spinal bulbocaverneux (NSB) innervent les muscles bulbocaverneux (BC) et levator ani (LA). Une partie de ces motoneurones innervent également le sphincter anal externe (SAE). Chez la femelle, ne possédant pas de muscles BC et LA, les motoneurones innervent exclusivement le SAE. **B :** Le nombre de motoneurones dans le NSB est plus important chez le mâle que chez la femelle. (Breedlove et Arnold, 1983).

Par ailleurs, des lésions musculaires BC/LA empêchent une érection efficace (Sachs, 1982; Holmes et Sachs, 1994), alors qu'une section de la moelle au niveau thoracique, chez les animaux et l'Homme, n'empêche pas l'éjaculation. Ceci suggère que la moelle lombaire est capable à elle seule d'induire ce processus. Récemment un « centre éjaculateur » a été décrit dans la partie antérieure des lombaires (dans le segment L3-L4) (Truitt et Coolen, 2002). Dans cette région les mâles possèdent plus de neurones exprimant la galanine/cholecystokinine ou le peptide de libération de la

gastrine (GRP) (Newton et Phan, 2006; Sakamoto et al., 2008, 2009a). Ces neurones envoient des projections vers le thalamus et le NSB (Truitt et al., 2003; Sakamoto et al., 2008). Il a été montré que la castration entraîne une importante diminution de l'expression de GRP au bout de 28 jours (Sakamoto et al., 2009a), susceptible d'être en lien avec les effets connus de la castration sur le comportement copulatoire. Cet effet peut être évité si les mâles castrés sont traités avec de la testostérone propionate (Sakamoto et al., 2009a).

De plus, les études pharmacologiques montrent que, dans cette région lombaire, le blocage des récepteurs de la gastrine (GRP-R) par un antagoniste diminue les réflexes érectiles et l'éjaculation chez le rat (Sakamoto et al., 2008), alors qu'un agoniste les restaure chez le rat castré (Sakamoto et al., 2008). Par ailleurs, les rats mâles exposés à un stress montrent une diminution du contenu et de la distribution axonale des GRP-R dans la région lombaire, qui a pour conséquence de diminuer les réflexes érectiles in vivo (Sakamoto et al., 2009b), l'administration d'un agoniste les restaure (Sakamoto et al., 2009b)

Régions cérébrales	Caractéristiques	Morphologiques		
AMe	volume	mâles	>	femelles
LST	volume	mâles	>	femelles
SDN-POA	volume	mâles	>	femelles
AVPV	volume	mâles	<	femelles
NArc	volume, densité synaptique	mâles	<	femelles
Et spinale				
NSB	nombre, taille, arborisation dendritique	mâles	>	femelles

Tableau 1: Récapitulatif des régions sexuellement dimorphiques.

1.3. Les régions cérébrales impliquées dans la régulation de l'axe HPG

L'aire antéro-ventrale périventriculaire (AVPV)

Cette aire est localisée dans la région préoptique de l'hypothalamus, il y parvient une multitude d'afférences. Elle projette vers le noyau périventriculaire, le NArc, le noyau paraventriculaire et la POA. Plus volumineuse chez les femelles rats et souris (Simerly, 2002) (Tableau 1), elle est impliquée dans le rétrocontrôle positif de l'axe HPG chez la femelle (Gu et Simerly, 1997; Smith et al., 2006).

Les neurones exprimant la kisspeptine dans cette aire sont plus nombreux chez la femelle que chez le mâle qui n'en possède quasiment aucun (Gu et Simerly, 1997; Hrabovszky et al., 2010; Clarkson et al., 2009; Clarkson et Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007). De plus, les femelles possèdent deux fois plus de neurones exprimant la tyrosine-hydroxylase (TH) que les mâles (Simerly et Swanson, 1986). La fonction de cette population de neurones dopaminergiques n'est pas bien connue, mais une récente étude montre qu'une sous population de neurones à kisspeptine qui innerve les neurones GnRH dans l'aire préoptique rostrale, exprime la TH (Clarkson et Herbison, 2011).

Le noyau arqué (NArc)

Il représente un site important pour l'intégration neuroendocrine et contient une variété de neurones qui contrôlent la sécrétion d'hormones. Ce noyau a un volume et une densité synaptique plus élevés chez la ratte que chez le rat (García-Segura et al., 1994) et contient une seconde population de neurones à kisspeptine (Tableau 1). Le noyau arqué envoie des projections sur d'autres parties de la zone périventriculaire de l'hypothalamus (Simerly, 2002 ; Li et al., 1999) et joue un rôle central dans des fonctions gonadotrope, somatotrope et neuroendocrines.

II. Les différents processus de la différenciation sexuelle du système nerveux

Divers processus cellulaires peuvent être impliqués dans les effets organisationnels ou activationnels de la testostérone (Figure 13).

En période périnatale, il semble que ce soit le nombre, la taille des corps cellulaires, la densité synaptique et la migration cellulaire qui sont modulés pour générer les dimorphismes structuraux. L'un des mécanismes les plus significatifs par lequel la testostérone façonne les structures nerveuses, est la modulation de la survie et la mort cellulaire.

À l'âge adulte, la testostérone est nécessaire pour maintenir les dimorphismes anatomiques (Zhou et al., 1994). Pour cela des modifications morphologiques, comme la modulation de la taille des corps cellulaires, de l'arborisation dendritique ou encore la formation ou l'élimination de synapses, peuvent être mises en place. L'effet activationnel de la testostérone sur la régulation du comportement sexuel et l'axe HPG peut égale-

ment résulter de la modulation différentielle de la neurotransmission dans les régions neuronales impliquées dans ces réponses.

II.1. Modulation du nombre de neurones par de la mort cellulaire ou la neurogenèse

La testostérone peut causer des dimorphismes sexuels dans le nombre de cellule en régulant plusieurs événements développementaux, dont la neurogenèse, la migration et la mort cellulaire. Cette dernière est la plus décrite pour générer des différences sexuelles. Environ la moitié des neurones générés à l'origine pendant le développement du système nerveux des vertébrés meurt au cours d'une période où se produit naturellement la mort cellulaire (Oppenheim, 1991). La testostérone est un facteur clé pour augmenter ou diminuer la proportion de mort cellulaire dans certaines régions cérébrales (Forger, 2006).

Le dimorphisme du système olfactif semble être dépendant de l'œstradiol, provenant de l'aromatisation de la testostérone, au cours du développement embryonnaire (Mizukami et al., 1983; Collado et al., 1993). En effet, une castration chez le rat mâle nouveau-né réduit le nombre de cellules mitrales présentes au sein de BOA, alors qu'une injection d'œstradiol le rétablit (Pérez-Laso et al., 1997).

Chez la ratte, le traitement prénatal de testostérone augmente le volume du SDN, mais pas la tendance à montrer un comportement mâle à l'âge adulte (Davis et al., 1996; Ito et al., 1986). Le traitement prénatal des mâles avec un inhibiteur d'aromatase réduit le volume du SDN (Houtsmuller et al., 1994), mais n'a peu ou pas d'effet sur le comportement mâle (Brand et al., 1991). De la même manière la région calb-SDN est dépendante des hormones gonadiques. La castration des mâles à la naissance entraîne une réduction du volume chez le rat (Sickel et McCarthy, 2000) et la souris (Gilmore et al., 2012).

La gonadectomie des souris mâles et le traitement des femelles avec de la testostérone le jour de la naissance reverse la différence sexuelle dans le calb-SDN, alors que les manipulations hormonales à l'âge adulte n'ont pas d'effet (Orikasa et Sakuma, 2010). Cependant certaines études indiquent une différence en nombre (Edelmann al., 2007; Orikasa et Sakuma, 2010) alors que d'autres trouvent une différence dans la localisation de ces cellules (Büdefeld et al., 2008; Hamada et Sakuma, 2010; Orikasa et al., 2010). Cette confusion est probablement due à un manque de délimitation claire de la zone.

Le différence sexuelle dans les neurones à kisspeptines de l'AVPV est induit par les hormones stéroïdes. L'administration de testostérone à des femelles rats à la naissance, ou rapidement après la naissance, induit une diminution du nombre de neurones atteignant un nombre similaire aux mâles à l'âge adulte (Kauffman et al., 2007). La castration de rats nouveaux-nés conduit à une augmentation de l'expression de kisspeptine à l'âge adulte comparé aux mâles intacts (Homma et al., 2009). Par ailleurs, l'injection néonatale d'œstradiol est capable de masculiniser le nombre de neurones à kisspeptines dans l'AVPV, suggérant une implication de la voie œstrogénique dans ce processus (Homma et al., 2009; Patisaul et al., 2009). Néanmoins, une récente étude rapporte le rôle important de l'œstradiol dans l'augmentation de l'expression des neurones à kisspeptines dans une sous région de l'AVPV (RP3V), qui a lieu pendant la puberté chez la souris mâle (Clarkson et al., 2012).

Le dimorphisme en nombre de MTN dans le NSB est dû à l'effet organisationnel de la testostérone. En effet, avant la naissance le nombre de MTN dans le NSB croît chez les deux sexes, atteignant un maximum juste avant la naissance. Chez le mâle, la présence de testostérone permet la survie de 75% des MTN du NSB. Chez la femelle, l'absence d'hormones, on observe une mort des MTN plus importante dans le NSB. Les MTN restants (30%) innervent exclusivement le sphincter annal externe (Nordeen et al., 1985; Sengelaub et Arnold, 1986). Chez les femelles nouveaux-nés traitées à la testostérone, la mort cellulaire est réduite dans le NSB et le nombre MTN est significativement augmenté à l'âge adulte (Sengelaub et Arnold, 1986). À l'inverse, les mâles castrés à la naissance ont un nombre de MTN diminué dans ce noyau (Breedlove et Arnold, 1983).

En général, la testostérone a un effet anti-apoptotique dans les noyaux plus larges chez les mâles et pro-apoptotique dans les noyaux plus développés chez les femelles (Arai et al., 1994). La régulation par la testostérone de ces processus apoptotiques impliquerait la régulation de protéines appartenant à la famille des protéines Bcl-2 (Merry et Korsmeyer, 1997; Tsukahara, 2009). En effet, des souris mâles sur-exprimant le gène anti-apoptotique *Bcl2* présentent une plus grande densité cellulaire dans l'AVPV et moins de neurones dans le NSB, que les mâles contrôles (Zup et al., 2003). Ces résultats suggèrent que Bcl-2 est impliqué dans la différenciation de ces deux régions, mais la testostérone augmente l'expression de ce gène dans l'AVPV et la diminue dans le NSB. À l'inverse, des souris invalidées pour le gène pro-apoptotique *Bax* ne présentent

plus de différence en nombre de cellules dans l'AVPV, le LST (Forger et al., 2004) et le NSB (Jacob et al., 2005). En revanche cette mutation n'a pas d'effet le nombre de cellules cal-SDN (Gilmore et al., 2012), suggérant que Bax n'est pas impliqué dans la différenciation de cette population neuronale.

Les hormones stéroïdes seraient également capables d'induire la neurogenèse à la puberté. Elle participerait à la maturation et au maintien des dimorphismes sexuels au sein de l'AVPV, SDN-POA et l'AMe chez le rat (Ahmed et al., 2008).

II.2. Modulation de la taille des corps cellulaires et l'arborisation dendritique

Les modifications morphologiques, telles que des variations de la taille des corps cellulaires et de l'arborisation dendritique, peuvent être les facteurs des effets organisationnels et activationnels de la testostérone.

Pour exemple des effets organisationnels, des nouveaux-nés castrés ont des MTN dans le NSB plus petits même avec un traitement en testostérone à l'âge adulte. Inversement, des femelles traitées à la testostérone pendant la vie périnatale ont des MTN plus gros à l'âge adulte (Breedlove et Arnold, 1983). L'arborisation dendritique du NSB se complexifie dans les 4 premières semaines postnatales chez le rongeur, puis se rétracte pour atteindre sa longueur adulte au bout de la 7^{ème} semaine de vie post-natale (Goldstein et al., 1990). La castration des mâles en période périnatale abolit cette organisation dendritique (Goldstein et al., 1990).

La testostérone peut aussi induire des changements réversibles à l'âge adulte de la taille des corps cellulaires. En effet, la castration de mâles adultes induit la diminution de la taille des MTN du NSB (Breedlove et Arnold, 1981) et une supplémentation avec de la testostérone la restaure (Zuloaga et al., 2007; Verhovshek et al., 2010a, 2010b; Hamson et al., 2009) (Figure 12). Ces effets activationnels de la testostérone peuvent être illustrés par la variation saisonnière de la taille des MTN du NSB décrite chez plusieurs espèces sauvages (Forger et Breedlove, 1987; Hegstrom et al., 2002). Une plasticité dendritique est visible dans le NSB à l'âge adulte (Kurz et al., 1991; Rand et Breedlove, 1995).

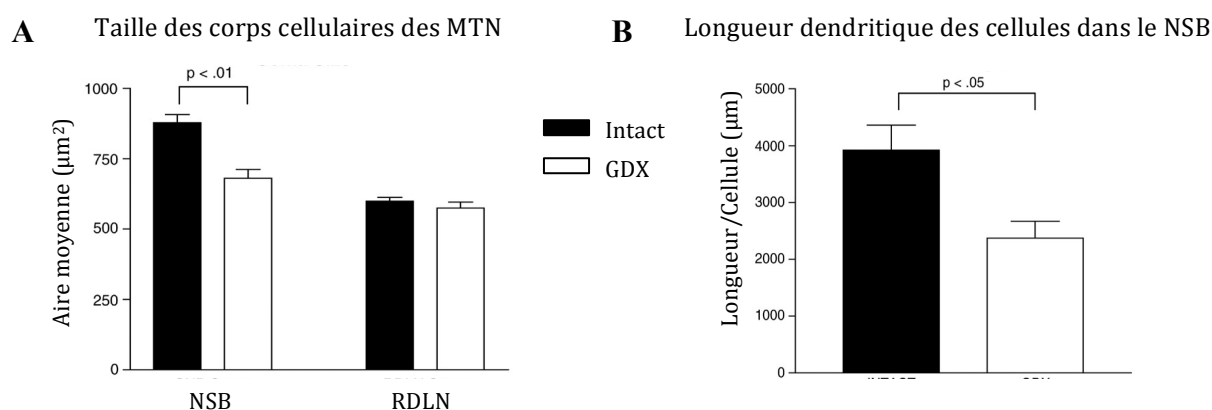


Figure 12 : Effets de la castration à l'âge adulte chez la souris mâle sur les MTN du NSB.

A : L'absence de testostérone chez les mâles après gonadectomie (GDX), diminue la taille des corps cellulaires des MTN dans le NSB par rapport aux mâles intacts. Ceci n'est pas observé pour les motoneurones du noyau rostradorsolatéral (RDLN), pour lequel aucun dimorphisme n'est décrit entre mâle et femelle. **B :** De la même façon, l'absence de testostérone à l'âge adulte diminue de manière significative la longueur dendritique des MTN du NSB. (Zuloaga et al., 2007).

Une diminution de l'arborisation des MTN est également observée après la castration à l'âge adulte chez la souris (Zuloaga et al., 2007; Park et al., 2002) (Figure 12). Il a été suggéré que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, BDNF (brain derived-neurotrophic factor), interagit avec la testostérone pour maintenir l'arborisation dendritique à l'âge adulte (Yang et al., 2004; Verhovshek et al., 2010a). Ce facteur est exprimé à la fois dans les motoneurones et les muscles BC/LA (Ottem et al., 2007; Verhovshek et al., 2010a).

II.3 Modulation de la morphologie des astrocytes

La glie joue un rôle majeur dans la différenciation et la maturation neuronale et dans la modulation de la transmission synaptique (Araque et al., 1999). Pendant le développement il fournit l'échafaudage nécessaire pour la migration des neurones et la croissance des axones (Kimmelberg, 1983).

Parmi les cellules gliales, les astrocytes sont la cible des hormones stéroïdes et la modulation de leur fonction est spécifique à chaque région (Amateau et McCarthy, 2002). Les œstrogènes affectent la morphologie des astrocytes (Torres-Aleman et al., 1992) dans plusieurs régions cérébrales. Très tôt en période postnatale, les mâles

présentent une morphologie astrocytaire plus riche et plus complexe que chez les femelles dans le NArC (Mong et al., 1996). De la même façon ce dimorphisme a pu être observé dans la POA (Amateau et McCarthy, 2002).

II.4. Modulation de la neurotransmission

Les effets activationnels de la testostérone mettent en jeu de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides dont la dopamine, l'ocytocine, la sérotonine ou les mélanocortines (Hull et Rodríguez-Manzo, 2009; Argiolas et Melis, 2005; Hellstrom, 2008). En particulier, les effets facilitateurs de la dopamine (DA) et de l'ocytocine dans l'expression du comportement sexuel mâle et dans l'érection, sont aujourd'hui bien documentés (Hull et Rodriguez-Manzo, 2009; Argiolas et Melis, 2005). En effet, l'administration de la dopamine ou de ses analogues (L-DOPA, apomorphine) dans la circulation générale restaure partiellement le comportement sexuel chez le rat castré (Scaletta et Hull, 1990) et déclenche l'érection et la toilette génitale (Rampin et al., 2003; Hull et al., 2004). Inversement, l'administration d'antagonistes du récepteur à la dopamine réduit le comportement sexuel chez le rat, en augmentant les latences à la première intromission et à l'éjaculation (Hull et Rodriguez-Manzo, 2009; López et Ettenberg, 2002). De plus, la DA est libérée dans plusieurs sites impliqués notamment dans les composantes motivationnelle et copulatoire du comportement sexuel (Hull et Dominguez, 2006). Il est observé, chez le rat, une augmentation de la libération de DA dans l'aire préoptique médiane après exposition à une femelle réceptive. Cette libération continue à augmenter pendant l'accouplement.

L'administration systémique ou intracérébroventriculaire d'ocytocine diminue la latence à l'éjaculation (Hull et Rodriguez-Manzo, 2009). Inversement, les antagonistes de l'ocytocine diminuent ou abolissent la copulation chez les rats mâles sexuellement expérimentés en altérant l'érection (Argiolas et Melis, 2005).

Des interactions étroites entre ocytocine et dopamine ont été mises en évidence dans le contrôle de l'érection (Baskerville et Douglas, 2008; Lee et al., 2009). Ainsi, la DA augmente la libération d'ocytocine par les neurones du noyau paraventriculaire qui, à leur tour, participent à la réponse érectile (Argiolas et Melis, 2005).

Les mécanismes d'action de ces neuropeptides semblent impliquer le monoxyde d'azote (NO), gaz produit grâce à l'activité des NO synthases neuronales (nNOS) (Argiolas et

Melis, 2005). Au niveau périphérique, il est connu pour jouer un rôle crucial dans l'initiation et le maintien de la pression intra-caverneuse (Toda et al., 2005) puisque son inhibition altère l'érection et l'émission séminale (Melis et al., 1998; Hull et Dominguez, 2006). La nNOS est exprimée dans les régions impliquées dans les comportements sexuels, en particulier l'AMe, le NPV et la moelle épinière (Hull et Dominguez, 2006).

Cependant, la libération et l'action de ces neuropeptides et neurotransmetteurs sont sous le contrôle de la testostérone (Malmnäs, 1976; Scaletta et Hull, 1990; Melis et al., 1994; Hull et Dominguez, 2006; Panzica et al., 2006). Aucun des neurotransmetteurs ou neuropeptides décrits ci-dessus ne peut restaurer, à lui seul, le comportement sexuel après castration (Hull et Rodriguez-Manzo, 2009). Tous nécessitent l'action préalable de la testostérone. Pour exemple, la dopamine ne restaure que partiellement le comportement sexuel chez des rats mâles castrés (augmentation du nombre de montées et d'intromissions) (Malmnäs, 1976; Scaletta et Hull, 1990). La libération de dopamine dans l'aire préoptique médiane est sous le contrôle de la testostérone et de ses métabolites (Hull et al., 1997; Hull et Dominguez, 2006). Ainsi, la pose d'implants locaux de testostérone dans l'aire préoptique médiane permet la restauration partielle du comportement sexuel d'animaux castrés (Hull et Dominguez, 2007). De façon analogue, le déclenchement de l'érection par l'ocytocine nécessite l'action concomitante de la testostérone (Melis et al., 1994) ce qui est à corrélérer à la présence de récepteurs de la testostérone dans les neurones à ocytocine du noyau paraventriculaire (Gimpl et Fahrenholz, 2001; Zuloaga et al., 2007). La testostérone régulerait l'expression de la nNOS à la fois dans l'aire préoptique médiane et dans le noyau paraventriculaire, permettant à son tour la libération de dopamine et d'ocytocine respectivement (Argiolas et Melis, 2004; Panzica et al., 2006).

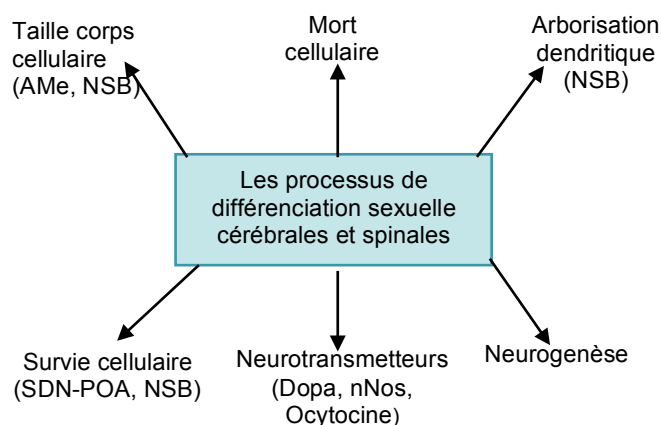


Figure 13: Les processus par lesquels les dimorphismes sexuels neuroanatomiques peuvent être établis, au niveau cérébral et spinal.

Ces processus sont régions spécifiques (cérébrale ou spinale) et se produisent pendant des périodes critiques limitées pendant le développement ou à l'âge adulte (Inspirée de la revue Lenz et al., 2012).

III. Les mécanismes d'action de la testostérone dans le système nerveux

III.1. Les récepteurs nucléaires, un mécanisme d'action génomique lent

Les actions génomiques de la testostérone sont généralement lents, de quelques heures à quelques jours. La testostérone active le récepteur des androgènes (AR) (Chang et al., 1988; Lubahn et al., 1988). Elle peut également être convertie en œstrogène grâce à l'activité de l'aromatase cytochrome P450 (Cf Chapitre I - II.1). La testostérone peut donc activer indirectement les récepteurs des œstrogènes α (ER α) et β (ER β) (Green et al., 1986; Kuiper et al., 1996; Revankar et al., 2005). Ces trois récepteurs sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes.

Structure des récepteurs nucléaires

L'AR est une protéine de 110 kDa, codée par un gène localisé sur le chromosome sexuel X. Les récepteurs ER α et ER β sont des protéines de 66 et 54 kDa respectivement, codées par des gènes localisés respectivement, sur les chromosomes 10 et 12 chez la souris (Sluysers et al., 1988; Tremblay et al., 1997).

Ces récepteurs partagent des degrés d'homologie variant selon les espèces. Néanmoins, ils ont une structure moléculaire commune, organisée en plusieurs domaines fonctionnels (Figure 14) :

- **Le domaine N terminal (NTD)**, le domaine le plus variable, contient une région d'activation transcriptionnelle (**AF1**) et se trouve être impliqué dans l'interaction avec de nombreuses protéines co-régulatrices et divers facteurs de transcription participant à la répression ou à l'activation de gènes cibles (Kumar et Thompson, 2003). L'interaction de co-facteurs avec l'AF1, ou encore la fixation du récepteur nucléaire sur l'ADN, provoque des changements de conformation permettant l'exposition de sites de fixation.
- **Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)** est composé de deux groupes de quatre cystéines, chacun lié à un atome de Zinc. Ils forment des structures tertiaires contenant des hélices α , appelé doigts de zinc, qui interagissent avec l'ADN. La première hélice permet l'interaction spécifique avec les séquences correspondant aux AREs (Androgen Responsive Elements) et EREs (Estrogen Responsive Elements), alors que le second doigt de zinc est responsable de la dimérisation du récepteur (Kumar et al., 2004).
- **Le domaine de liaison au ligand (LBD)** situé sur la région C-terminale contient des régions transactivatrices (**AF2**) importantes pour l'interaction avec différents co-régulateurs et pour la fixation des protéines chaperonnes.

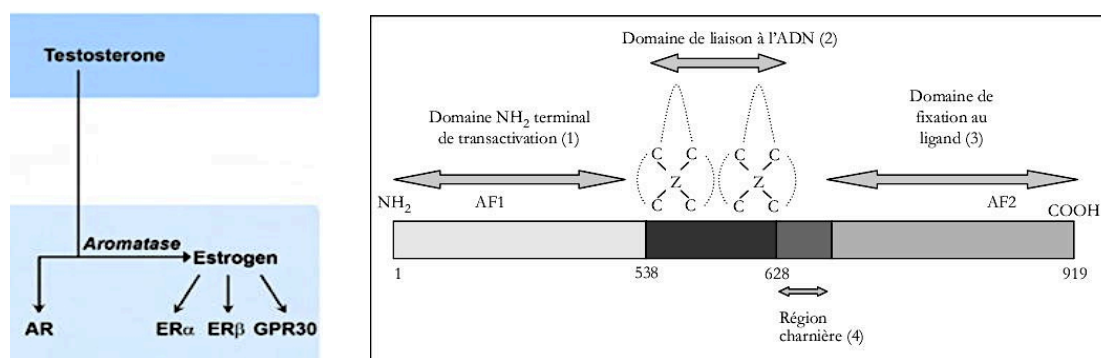


Figure 14 : Les différents récepteurs activés par la testostérone et leur structure.

A : La testostérone peut agir directement en activant l'AR ou indirectement via les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β après conversion en œstradiol par l'aromatase. **B :** Les différents domaines fonctionnels retrouvés pour chacun des récepteurs AR et ERs.

Fonctionnement des récepteurs nucléaires

À l'état basal, en l'absence d'hormones, l'AR et les ERs sont liés à un complexe multiprotéique qui les maintient à l'état inactif et les confinent dans le compartiment cytoplasmique. La liaison de l'hormone au récepteur induit la libération et la translocation du récepteur dans le noyau sous forme de dimère (Weigel et Moore, 2007). Ce dernier se lie alors à l'ADN, en association avec des co-régulateurs, sur des séquences nucléotidiques spécifiques ARE ou ERE (Androgen ou Estrogen responsive elements, respectivement) localisées dans les régions promotrices ou activatrices de la transcription de gènes cibles. Dans certains cas, ces récepteurs peuvent s'associer en hétérodimères AR/GR (récepteur aux glucocorticoïdes) ou ER α /ER β ou encore interagir avec d'autres facteurs de transcription comme STAT5, AP1, sp1 ou NF κ B (Stoecklin et al., 1999; Moggs et Orphanides, 2001; Lee et Chang, 2003; Safe et Kim, 2004; Lee et Pfaff, 2008; Tan et al., 2008). Le complexe ligand/récepteur peut alors recruter la machinerie transcriptionnelle et des co-activateurs ou co-répresseurs spécifiques qui jouent un rôle majeur dans l'activation ou la répression de la transcription (Matsumoto et al., 2003; Charlier et Balthazart, 2005).

Parmi les co-activateurs : SRC-1 et CREB-binding protéine (CBP) semblent importantes pour le comportement sexuel induit par les hormones stéroïdes, chez le rat adulte (Apostolakis et al., 2002; Molenda et al., 2002). La réduction de l'expression de ces deux co-activateurs via injection d'ARN antisens interfère avec la différenciation sexuelle du comportement sexuel. Un effet est décrit sur la déféminisation via l'ER et non sur la masculinisation (Auger et al., 2000). Le traitement œstradiol augmente l'expression de SRC-1 chez le rat femelle adulte et de CBP dans la culture de tissus cérébraux. Les co-activateurs SRC-1 et CBP sont également fortement exprimés dans les MTN du NSB (Tetel, 2009).

La plupart des effets de la testostérone mettent en jeu des mécanismes lents. Par exemple, une diminution du volume de l'AMe est observée chez les mâles castrés à l'âge adulte, atteignant le volume des femelles après 4 semaines de castration (Morris et al., 2008). Le même délai est nécessaire pour observer une diminution sur la taille et l'arborisation des MTN du NSB chez le rat adulte (Matsumoto, 1997). Chez la souris, 4 à 6 semaines, selon les études, sont nécessaires pour observer cette diminution (Park et al., 2002; Zuloaga et al., 2007) (Figure 12).

III.2. Les mécanismes d'action rapide

Les mécanismes d'action rapide des récepteurs nucléaires reposent sur l'activation d'une grande variété de signaux intracellulaires. Ainsi, peuvent être mises en jeu les voies menant à l'augmentation des taux intracellulaires de calcium, la protéine kinase C, la phosphatidylinositol 3 kinase, la voie des « extracellular signal regulated kinase » (Erk) et des « mitogen-activated-protein (MAP) kinases », ou encore celles impliquant la protéine CREB (cAMP Response Element Binding Protein) (Micevych et Dominguez, 2009).

Les effets rapides de l'œstradiol ont été montrés dans la régulation de la phosphorylation de plusieurs protéines kinases pour contrôler la signalisation cellulaire (Micevych et Mermelstein, 2008). Des effets sur certaines fonctions cérébrales sont également connus depuis de nombreuses années. Il a été montré que l'œstradiol module l'activité électrique des neurones GnRH préoptiques chez la femelle rat (Kelly et al., 1976). Il est impliqué dans la plasticité des épines dendritiques de l'amygdale, de l'hypothalamus ventromédian et de la région CA1 de l'hippocampe, chez le rat et la souris (Woolley, 2007; Vasudevan et Pfaff, 2008).

Les mécanismes d'action non génomiques de l'œstradiol impliquent leurs récepteurs ERs, le GPR30, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (Walter et al., 1985; Kuiper et al., 1996; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005) ou encore des protéines associées à la membranes comme ER-X et le STX-binding protein (STX-BP). Les récepteurs nucléaires de l'œstradiol peuvent s'associer à la membrane et interagir avec des protéines couplées aux protéines G (Micevych et Dominguez, 2009). Bien que l'implication de GPR30 dans les effets centraux rapides de l'œstradiol ne soit pas encore documentée, les études de localisation rapportent son expression dans le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus chez le rat et la souris (Brailoiu et al., 2007; Isensee et al., 2009; Hazell et al., 2009).

De nombreux mécanismes d'action rapides de la testostérone, via l'activation de l'AR, ont été décrits en périphérie (Sarkey et al., 2008), et les stéroïdes gonadiques sont ainsi capables de restaurer partiellement les montées chez les rongeurs castrés en moins d'une heure (Hull et Rodriguez-Manzo, 2009 ; James et Nyby, 2002 ; Gleason et al., 2009). Chez des rats mâles préalablement castrés, l'injection d'œstradiol augmente la chemo-investigation anogénitale et la fréquence des montées. Cependant, elle ne permet

pas de restaurer les intromissions ou l'éjaculation (Cross et Roselli, 1999). L'injection d'inhibiteurs de l'aromatase empêche l'induction rapide des montées et des intromissions chez la souris mâle (Taziaux et al., 2007) et l'action rapide de l'œstradiol pour faciliter le comportement de lordose chez la ratte (Kow et Pfaff, 2004; Dewing et al., 2007; Micevych et Dominguez, 2009). En effet il a été montré un lien entre la modulation de l'activité de l'aromatase et le contrôle rapide de la concentration d'œstradiol en rapport avec les effets rapides observés au niveau comportemental (Cornil et al., 2006 ; Cornil et Charlier, 2010).

De plus, des activations transcriptionnelles des récepteurs stéroïdes nucléaires en absence d'hormones ont été observées (Denner et al., 1990; Power et al., 1991; Auger, 2001). Cette forme d'activation est appelée activation ligand-indépendant ou stéroïde-indépendant. Les androgènes peuvent activer rapidement les cascades de signalisation intracellulaire indépendamment de l'activation de l'AR. L'intérêt fonctionnel de cette activité pour le comportement sexuel mâle reste à être élucidé (Sun et al., 2006).

III.3. Les sites d'expression des récepteurs

Chacun de ces récepteurs est exprimé dans le système nerveux en période périnatale. L'expression de l'AR apparaît clairement à partir de P4 dans l'AMe, le LST et la POA pour atteindre un niveau d'expression comparable à l'adulte à partir de P7, mais l'expression de l'ER α et de l'ER β sont abondantes dès la naissance (Juntti et al., 2010).

Ces récepteurs sont notamment exprimés dans les régions impliquées dans le contrôle des comportements typiquement mâles et dans la régulation de l'axe HPG (Shah et al., 2004 ; Merchenthaler, 2004 ; Simerly et al, 1990 ; Brailoiu, 2007 ; Meisel et Sachs, 1994), notamment l'AMe, le LST et la POA (Mitra et al., 2003) (figure 15). Ils sont également exprimés dans des régions impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage comme la région CA1 de l'hippocampe et le cortex. L'expression des enzymes qui catalysent la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone ou en œstradiol a été rapportée dans le cerveau de rongeurs, en particulier dans les régions mentionnées (POA, AMe, LST) (Lauber et Lichtensteiger, 1994; Wagner et Morrell, 1996; Melcangi et al., 1998).

Chacun de ces récepteurs a une expression dominante de façon région et sexe spécifiques. De cette façon, chez la souris, l'expression de l'AR est plus importante dans le LST des mâles que des femelles (Wersinger et al., 1997; Shah et al., 2004).

L'expression de l'ER α est prédominante dans les régions du cerveau associées à la fonction de reproduction comme le LST, POA et le NArc ; alors que l'expression de l'ER β est prédominante dans les régions cognitives comme le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Figure 15). Ainsi, l'ER α et l'ER β pourraient affecter de manière différentielle les comportements (Handa et al., 2012).

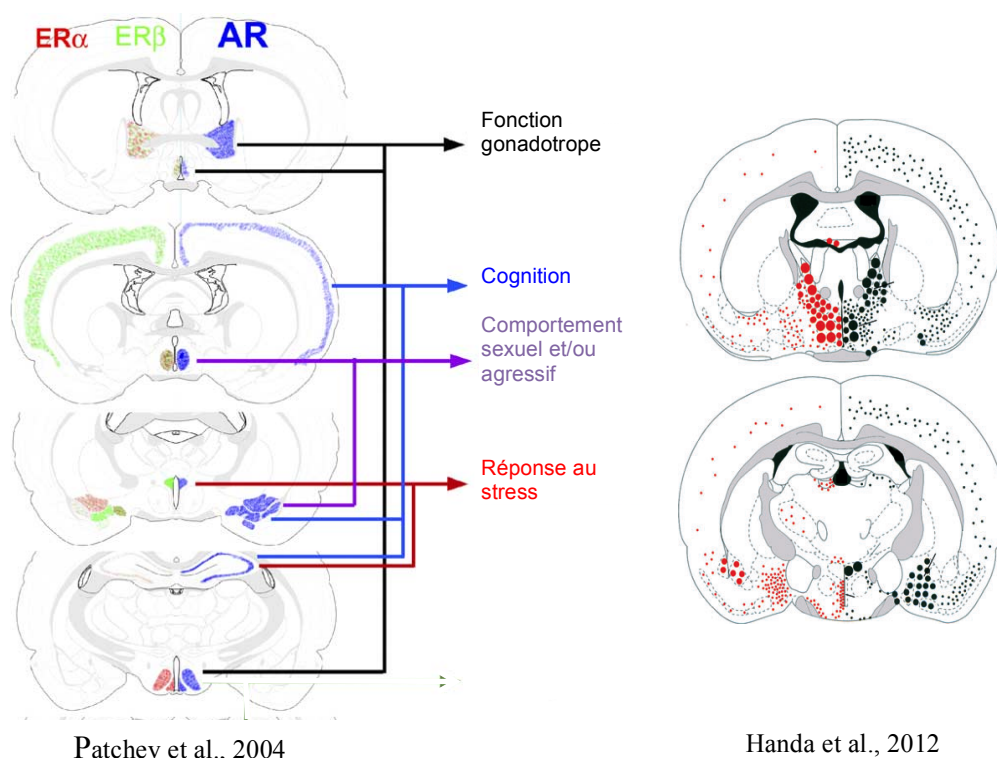


Figure 15: Distribution neuroanatomique de l'expression des récepteurs des androgènes (AR) et des œstrogènes (ER α et ER β) dans les différentes régions cérébrales.

A : Distribution des différents récepteurs et leur implication physiologique et comportementale selon les régions cérébrales. B : Comparaison de l'expression de l'ARNm de l'ER α (rouge) et ER β (noire) dans les régions hypothalamiques.

Chez le rat, l'expression de l'ER α dans l'AVPV semble être plus importante chez la femelle (De Vries et Simerly, 2002; Simerly et al., 1990; Cao et Patisaul, 2011), alors que les rats des deux sexes ont un nombre similaire de neurones exprimant l'ER β dans l'AVPV. Ces cellules sont localisées d'avantage dans la partie latérale de l'AVPV chez la femelle (Orikasa et al., 2002). Ce dimorphisme de localisation pourrait provenir d'une

différence sexuelle dans la migration cellulaire au cours du développement, contrôlé par les hormones stéroïdes, comme cela a pu être observé dans l'aire préoptique et l'hypothalamus (Sakuma, 2009).

Chez les mammifères, le dimorphisme sexuel observé dans le rétrocontrôle de l'axe HPG reposerait sur une différence de sensibilité des neurones GnRH aux hormones stéroïdes. Chez de nombreuses espèces, les neurones à kisspeptines, impliqués dans le rétrocontrôle de l'axe HPG, expriment les récepteurs des hormones stéroïdes. De plus, la régulation de l'expression de la kisspeptine dans le noyau arqué semble être dépendante des ERs chez la femelle, et à la fois par les AR et ERs chez le mâle (Smith et al., 2005a, 2005b). Cette découverte est en accord avec le rôle des kisspeptines dans le rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH.

La testostérone et ses métabolites agissent également au niveau de multiples noyaux spinaux, dont le noyau spinal bulbocaverneux (Hamson et al., 2004; Merchenthaler et al., 2004; Patchev et al., 2004; Vanderhorst et al., 2005, 2009; Bingham et al., 2006; Normandin et Murphy, 2008). Les effets hormonaux sur les motoneurones du NSB sont spécifiques des androgènes puisque le blocage de la synthèse d'œstrogènes ou le traitement de mâles castrés avec de l'œstradiol n'a aucun effet sur ce noyau (Forger et al., 1992; Verhovshek et al., 2010a). Effectivement, les MTN du NSB expriment fortement l'AR (Jordan et al., 1997; Zuloaga et al., 2007; Smith et al., 2012) mais pas les ERs à l'âge adulte (Breedlove et Arnold, 1980; Sengelaub et Forger, 2008). Il a été montré, chez la souris, que l'AR commence à être exprimé dans le NSB quelques jours après la naissance (4^{ème} jour postnatal) et atteint un niveau d'expression équivalent à celui de l'âge adulte à partir du 7^{ème} jour postnatal (Smith et al., 2012). Ceci est en accord avec les données précédemment décrites chez le rat (Jordan et al., 1997).

CHAPITRE III.

L'IMPLICATION DES DIFFÉRENTS RÉCEPTEURS DANS LA RÉGULATION DU COMPORTEMENT SEXUEL PAR LA TESTOSTÉRONE

Nous avons vu précédemment que, chez les mâles, la testostérone peut agir selon plusieurs voies en activant soit l'AR, l'ER α ou l'ER β . De nombreuses études ont tenté de déterminer l'implication relative de chacune de ces voies de signalisation, dans les effets organisationnels et activationnels de la testostérone sur le système nerveux. Pour cela différentes stratégies ont été utilisées.

Ce chapitre a pour but de présenter les différentes données obtenues à ce jour à partir des différents modèles. Nous verrons que les résultats sont parfois divergents en raison des limites des approches et des phénotypes complexes des animaux.

I. Les études pharmacologiques

Ces études ont consisté à comparer les effets d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de l'AR et des ERs ou d'inhibiteurs de l'aromatase, administrés à des rongeurs. Les conséquences sur l'organisation des comportements liés à la reproduction ont été évaluées.

1.1. Les études comportementales

Les effets organisationnels de la testostérone, de la dihydrotestostérone ou de l'œstradiol sur le comportement sexuel ont fait l'objet de nombreuses études chez le rat, mais sont plus rares chez la souris (Campbell et McGill, 1970; Vale et al., 1974; Quadagno et al., 1975). Les quelques travaux disponibles sont divergents. Selon le fond génétique étudié, des souris mâles adultes castrées recouvrent les différentes composantes du comportement sexuel grâce à l'administration séparée ou concomitante d'œstradiol et de dihydrotestostérone (Edwards, 1971; Edwards et Burge, 1971; Luttge et Hall, 1973; Wallis et Luttge, 1975; Sato et al., 2004; Burns-Cusato et al., 2004). En revanche, le traitement à la dihydrotestostérone de femelles nouveau-nés suggère que l'AR ne joue aucun rôle dans la régulation du comportement sexuel mâle, mais serait juste impliqué dans la masculinisation de la préférence olfactive (Bodo et Rissman, 2008).

1.2. Les études neuroanatomiques

Selon des études classiques de castration et de supplémentation effectuées surtout chez le rat, c'est l'ER qui serait impliqué dans la différenciation sexuelle de la majorité des régions impliquées dans les comportements liés à la reproduction. Dans certaines régions comme l'amygdale médiane ou le lit de la strie terminale, les deux voies de signalisation AR et ER seraient impliquées (Patchev et al., 2004; Morris et al., 2004; Garcia-Falgueras et al., 2005; Zuloaga et al., 2008).

Au niveau spinal, la différenciation sexuelle du nombre de MTN du NSB impliquerait exclusivement l'AR. Le traitement périnatal au flutamide, un antagoniste spécifique de l'AR, féminise le nombre de MTN chez les mâles (Breedlove et Arnold, 1983). De plus, l'administration périnatale d'œstradiol à des femelles n'altère pas le nombre de cellules dans le NSB (Breedlove et al., 1982; Goldstein et Sengelaub, 1994; Breedlove, 1997). De même, l'injection d'un inhibiteur de l'aromatase ne perturbe pas la masculinisation du NSB chez le mâle. En revanche, les femelles traitées avec la dihydrotestostérone pendant la vie périnatale ont des MTN plus gros à l'âge adulte (Breedlove et Arnold, 1983; Ward et al., 1996). Ceci suggère donc que l'AR est également impliqué dans l'acquisition du dimorphisme relatif à la taille des MTN. L'effet de la testostérone sur la taille des MTN à l'âge adulte est également AR-dépendant, puisque ni le traitement à l'œstradiol (Forger et al., 1992) ni l'injection d'inhibiteurs de l'aromatase (Burke et al., 1997) n'ont d'effet.

II. Les modèles génétiques d'invalidation ubiquitaire

Le développement d'animaux transgéniques invalidés de manière ubiquitaire, ou knockout (KO), pour l'un des récepteurs a beaucoup contribué à l'avancée dans la détermination de leur rôle individuel dans les mécanismes de différenciation sexuelle, notamment pour les comportements liés à la reproduction. Pour chaque modèle, les études neuroanatomiques et comportementales seront présentées.

Très peu de travaux ont été effectués pour évaluer l'effet de l'invalidation de ces récepteurs sur la déféminisation du comportement sexuel.

II.1. Les animaux Tfm et ARKO

Modèle Tfm et développement du modèle ARKO

Des mutations spontanées de l'AR, découvertes pour la première fois chez l'humain, sont responsables de l'insensibilité partielle ou complète aux androgènes (SIA) (Morris, 1953). Elles comprennent une variété de délétions, d'insertions, de mutations non sens ou faux sens (Kerkhofs et al., 2009). L'impact sur la fonction de l'AR varie donc en fonction du type de mutation. Le syndrome d'insensibilité aux androgènes (testicular feminization mutation, Tfm) existe aussi chez les rongeurs (Lyon et Hawkes, 1970). Chez la souris, il s'agit de la délétion d'une base au sein de l'exon 1 (Charest et al., 1991; Gaspar et al., 1991; He et al., 1991). Le codon stop précoce généré par le décalage de la phase ouverte de lecture produit un transcrit incomplet et instable chez la souris (He et al., 1991). Par conséquent les souris sont totalement insensibles aux androgènes (Drews, 1998).

Les mâles Tfm sont infertiles. Le gène *AR* étant porté par le chromosome X, seules les femelles hétérozygotes peuvent transmettre la mutation. Le système de mutagenèse conditionnelle Cre-loxP a donc été privilégié pour invalider l'AR de manière ubiquitaire (AR knockout : ARKO) (Kerkhofs et al., 2009). Pour cela, une Cre recombinase (Morozov et al., 2003) sous le contrôle de divers promoteurs ubiquitaires (CMV, PGK ou β -actin) a été utilisée. Deux modèles de souris ARKO ont été générés, l'un invalidé pour l'exon 1 (Matsumoto et al., 2003; Sato et al., 2004), l'autre pour l'exon 2 (Yeh et al., 2002; De Gendt et al., 2004).

Phénotypes urogénital et endocrine

Les animaux Tfm et ARKO de génotype XY ont l'apparence externe de femelle. Les glandes accessoires sont absentes (Bardin et al., 1970; Lyon et Hawkes, 1970; Yeh et al., 2002; Sato et al., 2004; Yang et al., 2010) et des taux circulants de testostérone très faibles sont détectés à l'âge adulte (Yeh et al., 2002; Sato et al., 2004). Les niveaux de LH se révèlent être augmentés chez les individus Tfm (Murphy et O'Shaughnessy, 1991) et ARKO (Sato et al., 2004).

Étude neuroanatomique

La majeure partie des études neuroanatomiques ont été réalisées sur le rat Tfm. Ces animaux présentent une altération partielle du volume de l'AMePD, du NSD-POA (Morris et al., 2005) et du LST postéromédian (Durazzo et al., 2007).

Aucune différence n'a été observée dans la population TH-positive de l'AVPV (Simerly et al., 1997).

Les mâles Tfm présentent un nombre de MTN dans le NSB semblable à celui des femelles, en raison d'une diminution des taux de testostérone entraînant une mort cellulaire importante pendant la période périnatale (Breedlove et Arnold, 1980; Sengelaub et al., 1989). Néanmoins, en raison de l'invalidation ubiquitaire de l'AR, il est difficile de distinguer entre les effets de l'AR central vs musculaire.

Étude du comportement sexuel

En raison de l'absence de pénis, seules les montées et les thrusts peuvent être mesurés chez ces animaux. Il est généralement décrit une augmentation des latences et une diminution du nombre de montées et de thrusts chez les rats et souris Tfm (Ohno et al., 1974; Shapiro et al., 1976; Beach et Buehler, 1977; Olsen, 1979; Bodo et Rissman, 2007). Une seule étude rapporte une restauration complète de la latence et du nombre de montées par l'œstradiol chez les souris Tfm (Bodo et Rissman, 2007). Par ailleurs, dans la seule étude publiée sur les souris ARKO, aucune tentative de montée n'a été observée (Sato et al., 2004) (Tableau 2). La préférence olfactive est profondément altérée chez les souris Tfm (Bodo et Rissman, 2007), contrairement aux rats (Zuloaga et al., 2008; Hamson et al., 2009).

Les mâles ARKO et Tfm ne montrent pas de comportement de lordose lorsqu'ils sont imprégnés de manière séquentielle avec de l'œstradiol et progestérone (Ohno et al., 1974; Sato et al., 2004) (Tableau 2).

II.2. Les animaux AroKO

Développement du modèle

La lignée knockout de l'aromatase (AroKO) a été créée par recombinaison homologue du gène Cyp19, responsable de la production d'aromatase. L'excision de différents exons (1 ou 2) ont permis de générer différents modèles (Fisher et al., 1998; Honda et al., 1998;

Toda et al., 2001). Les animaux ainsi générés n'ont plus aucune synthèse d'œstradiol dans tout l'organisme. Ce modèle permet d'évaluer les effets des œstrogènes, l'effet de la mutation pouvant être reversée par injection d'œstradiol.

Phénotype urogénital et endocrine

Les mâles AroKO ont un développement anatomique normal, mais présentent une spermatogenèse et une fertilité peu (Fisher et al., 1998) ou fortement altérée (Honda et al., 1998; Robertson et al., 2001; Toda et al., 2001).

Chez les mâles AroKO, la testostérone n'est plus convertie en œstradiol entraînant une augmentation des taux de testostérone et LH plasmatique (Fisher et al., 1998).

Étude neuroanatomique

Peu d'études neuroanatomiques ont été réalisées pour ce modèle. Une étude rapporte une diminution du volume et du nombre de neurones dans la région LST chez les mâles AroKO, qui est restauré par injection d'œstradiol (Tsukahara et al., 2011). Les auteurs suggèrent ainsi que la masculinisation du LST chez la souris implique l'action de l'œstradiol.

Étude comportementale

Les mâles AroKO effectuent moins de montées et d'intromission que des mâles contrôles et ne parviennent pas ou rarement à l'éjaculation (Honda et al., 1998; Bakker et al., 2002). L'administration d'œstradiol aux mâles adultes restaure le comportement sexuel, avec une augmentation des actes copulatoires et du nombre d'animaux parvenant à l'éjaculation (Toda et al., 2001; Bakker et al., 2004) (Tableau 2).

La préférence olfactive est diminuée chez les mâles AroKO (Honda et al., 1998; Bakker et al., 2002). L'injection d'œstradiol à l'âge adulte ne rétablit pas la préférence olfactive (Bakker et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'activité aromatasase et par conséquent l'œstradiol produit *in situ* à partir de testostérone participe à l'organisation périnatale du système olfactif et à l'activation adulte des autres paramètres du comportement sexuel.

II.3. Les animaux ER α KO et ER β KO

Développement des modèles

En 1993, les souris ER α KO sont générées pour la première fois (Lubahn et al., 1993). Pendant des années un seul récepteur aux estrogènes était décrit, appelé ER. Suite à la découverte de l'ER β dans l'ovaire et la prostate en 1996 (Kuiper et al., 1996), les souris ER β KO furent générées (Krege et al., 1998). Les exons 2 et 3 furent ciblés pour l'ER α et l'ER β respectivement. Des souris double KO ER $\alpha\beta$ ont également été générés par croisement des deux lignées précédentes (Ogawa et al., 2000).

Phénotype urogénital et endocrine

Les individus ER α KO et ER β KO de génotype XY sont de phénotype mâle avec un tractus urogénital complètement développé. Les mâles ER β KO ont une fertilité identique à celle des animaux contrôles (Ogawa et al., 1999; Temple et al., 2003) contrairement aux mâles ER α KO qui présentent une altération de la spermatogenèse et sont infertiles (Hess et al., 1997; Hess, 2000; Antonson et al., 2012).

Les niveaux circulants de testostérone sont légèrement augmentés chez les mâles ER α KO (Eddy et al., 1996; Rissman et al., 1997). Le rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone ne s'en trouve pas altéré puisque les taux circulants de LH sont similaires entre animaux mutants et contrôles (Eddy et al., 1996; Wersinger et al., 1999).

Étude du comportement sexuel

Chez les mâles ER α KO, les études rapportent toutes une diminution du comportement sexuel. Seul un faible pourcentage d'animaux s'accouple et les latences à la première montée sont augmentées (Ogawa et al., 1997, 1998; Wersinger et al., 1997). Selon les études, aucune (Wersinger et al., 1997; Sato et al., 2004) ou peu d'éjaculation (Eddy et al., 1996; Ogawa et al., 1997) ont été observées chez les mâles ER α KO (Tableau 2). Un rôle important dans la masculinisation du comportement sexuel chez la souris a donc été attribué à l'ER α (Rissman et al., 1997, 1999; Scordalakes et al., 2002).

Une altération de la préférence olfactive pour les femelles réceptives est observée pour ces animaux, malgré l'induction de c-fos lorsqu'ils sont exposés à des odeurs femelles réceptives (Wersinger et Rissman, 2000; Gore et al., 2000). Par ailleurs, il a été rapporté

que les mâles ER α KO présentent, en général, un déficit de l'interaction sociale (Imwalle et al., 2002).

Les mâles ER β KO présentent un comportement sexuel mâle normal (Ogawa et al., 1999; Temple et al., 2003). Des effets transitoires de la mutation ont été toutefois observés sur ce comportement à la puberté. En effet, la puberté est significativement retardée chez les mâles ER β KO qui parviennent à l'éjaculation à un âge tardif par rapport aux contrôles (Temple et al., 2003).

Aucun défaut de préférence olfactive n'est décrit (Ogawa et al., 1996, 1999).

Le comportement sexuel est complètement aboli chez les mâles double mutants ER α β KO (Ogawa et al., 2000).

Contrairement aux mâles ARKO et Tfm, les mâles ER β KO castrés et imprégnés d'hormones femelles sont capables de montrer un comportement de lordose. Ces résultats suggèrent donc que l'ER β est nécessaire à la déféminisation du comportement sexuel (Ogawa et al., 2000). Par ailleurs, aucune analyse similaire n'a été effectuée sur les modèles AroKO et ER α KO (Tableau 2).

Étude neuroanatomique

Très peu d'études ont été réalisées sur les modèles ER α KO et ER β KO. Quelques travaux rapportent une augmentation du nombre de neurones TH-positif dans l'AVPV des mâles ER α KO, ER β KO (Bodo et al., 2006; Simerly et al., 1997) et une étude décrit la diminution du volume du LST pour les deux modèles (Tsukahara et al., 2011).

	Tfm	ARKO	ER α KO	ER β KO	AroKO
Phénotype externe	femelle	femelle	mâle	mâle	mâle
Fertilité	infertile	infertile	diminuée	normale	diminuée
Comportement sexuel mâle	diminué	aucun	diminué	normal	diminué
Lordose	non	non	Pas testé	oui	Pas testé
Préférence Olfactive	altérée		altérée	normal	altérée

Tableau 2: Récapitulatif des différents modèles knockout et leur phénotype.

Une récente étude révèle qu'un certain nombre de gènes ont une forme d'expression spécifique du sexe et de la région observée qui est régulée par les hormones gonadiques (Xu et al., 2012). De plus, cette étude montre que les souris mutantes pour 4 des 16 gènes identifiés, présentent des déficits dans plusieurs comportements sexuellement dimorphiques, dont le comportement sexuel mâle. Ils proposent donc que différents éléments des comportements sexuellement dimorphiques soient gouvernés non seulement par les hormones gonadiques, mais également par des programmes génétiques indépendants.

En conclusion, les données convergent vers un rôle majeur de l'ER α dans la masculinisation par la testostérone des comportements males. En revanche, un rôle mineur ou majeur est attribué à l'AR, selon les études, dans l'organisation et le maintien du comportement sexuel. Le phénotype femelle et l'absence de pénis rendent impossible l'analyse précise du comportement sexuel mâle des modèles ARKO et Tfm. Par ailleurs, l'implication de l'ER β dans la déféminisation du système nerveux central n'a été rapportée que par une seule étude.

III. Les modèles génétiques d'invalidation conditionnelle

Afin d'étudier les mécanismes d'action de la testostérone sans altérer ses fonctions périphériques, il a été généré des souris invalidées pour l'AR sélectivement dans le système nerveux grâce au système Cre-*loxP*. Ces souris ont fait l'objet de deux études à ce jour dont la première au sein de notre laboratoire.

III.1. Obtention de la lignée invalidée pour l'AR spécifiquement dans le système nerveux

La technique de mutagenèse conditionnelle, Cre-*loxP* consiste à utiliser la recombinaison Cre, qui reconnaît des séquences d'ADN appelés sites *loxP* et excise le fragment d'ADN situé entre deux sites *loxP* de même orientation grâce à ses propriétés de catalyser des cassures et des ligations d'ADN (Tronche et al., 2002).

Les souris invalidées pour l'AR spécifiquement dans le système nerveux ont été obtenues en croisant deux lignées. La première lignée exprime la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur et de l'enhancer neuronal du gène de la nestine (Nes). Cette

dernière est une protéine des filaments intermédiaires s'exprimant dès E10,5 au cours du développement dans les précurseurs des cellules gliales et neuronales (Tronche et al., 1999). Ceci permet de diriger l'expression de la Cre recombinase très tôt au cours du développement dans les précurseurs des cellules neuronales et gliales. Dans la seconde lignée, l'allèle AR endogène a été remplacé par recombinaison homologue par une séquence identique contenant l'exon 2 flanqué de deux sites *loxP* (De Gendt et al., 2004). Cette modification n'interfère pas avec l'activité normale du gène. Les souris mâles AR^{fl} et femelles AR^{fl}/AR^{fl} ont un phénotype semblable aux souris sauvages (De Gendt et al., 2004). Ainsi, seules les cellules exprimant la Cre, dans le système nerveux porteront l'allèle AR^{fl} excisé, bien avant la différenciation des gonades. Le choix de l'exon 2 repose sur le modèle de mutation naturelle de l'AR chez la souris *Tfm* qui génère une protéine tronquée et instable (He et al., 1991; Hellwinkel et al., 1999). Ainsi, le croisement entre des mâles hétérozygotes pour le transgène *NesCre* et des femelles AR^{fl}/AR^{fl} a permis d'obtenir les mâles contrôles (AR^{fl}/Y) et mutants (AR^{fl}/Y , *Nes-Cre* appelé AR^{NesCre}) (Figure 16) au sein des mêmes portées. Ces animaux ont été obtenus et caractérisés en fond mixte C57BL6j et 129SvEv (Raskin et al., 2009).

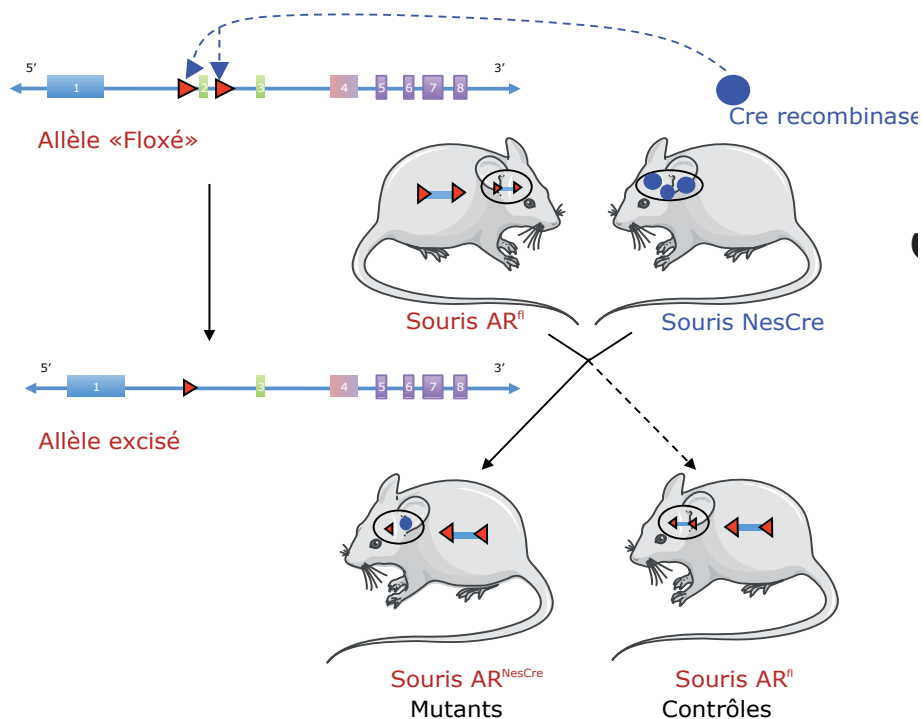


Figure 16 : Schéma du croisement pour l'obtention de la lignée AR^{NesCre} .

III.2. Caractérisation de la lignée AR^{NesCre}

Restriction de l'inactivation au système nerveux central

Des études d'immunohistochimie utilisant un anticorps spécifique de l'AR dans plusieurs tissus et régions cérébrales ont permis de confirmer que l'inactivation de l'AR était bien restreinte au système nerveux. En effet, l'ensemble des régions cérébrales connues pour exprimer le récepteur sont dépourvues d'AR chez les mâles mutants AR^{NesCre} contrairement aux contrôles (Figure 17). Cela comprend notamment les régions impliquées dans l'expression du comportement sexuel, dont diverses régions de l'hypothalamus par exemples. L'AR est toujours détecté dans le muscle squelettique, le testicule ou l'hypophyse.

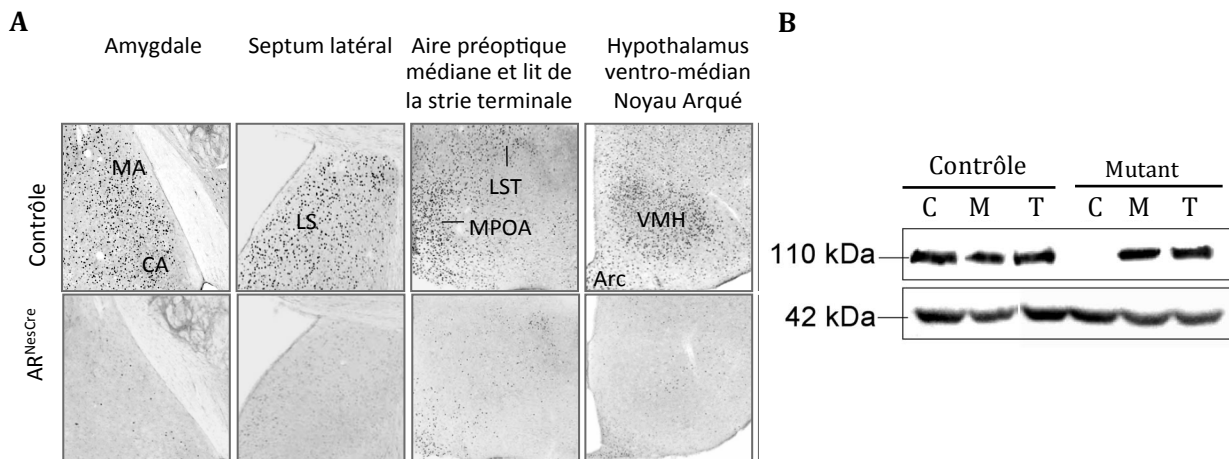


Figure 17 : Inactivation de l'AR spécifiquement dans le système nerveux.

A : Immunohistochimie de l'AR dans les diverses régions cérébrales impliquées dans l'expression du comportement sexuel. **B :** Immunoblot de l'AR (110 kDa) dans le cerveau (C), le muscle (M) et le testicule (T) et de l'actine (42 kDa). (Raskin et al., 2009).

Phénotype morphologique et neuroendocrine

Les mâles mutants conditionnels AR^{NesCre} ont un phénotype externe mâle avec un tractus uro-génital complet et normal (Figure 18 A et B). Ils sont capables de se reproduire malgré une baisse de la fertilité (Raskin et al., 2009).

Des niveaux circulants élevés de testostérone ont été mesurés chez les souris AR^{NesCre} . Ils sont jusqu'à 4 fois plus élevés que chez les mâles contrôles et s'accompagne d'une augmentation des taux de LH et des métabolites dihydrotestostérone et œstradiol. De

plus, le poids des vésicules séminales, glandes androgène-dépendantes, est significativement augmenté pour les mâles mutants (Figure 18C). Ceci indique que l'AR central est important dans le rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone sur l'axe HPG.

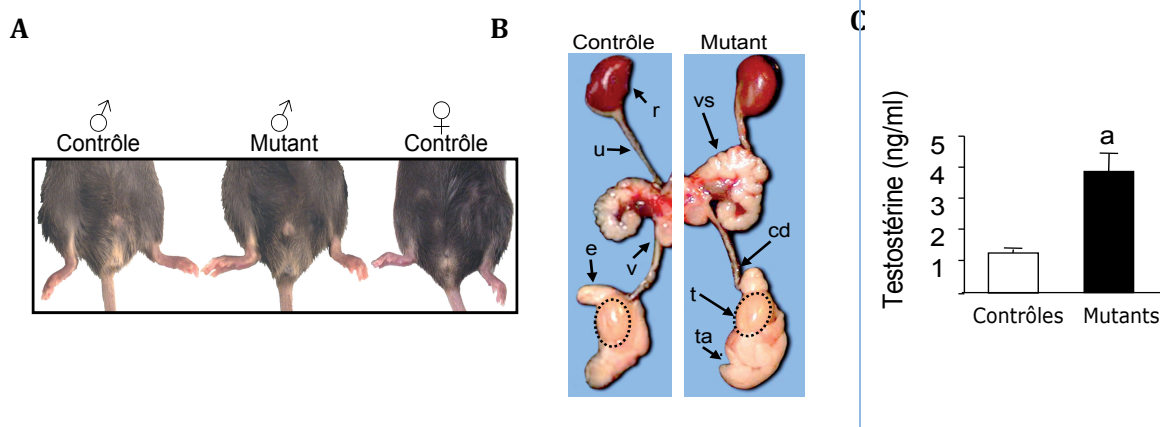


Figure 18 : Phénotype mâle et statut endocrinien des mâles contrôles et AR^{NesCre}.

A : Présence de pénis et distance ano-génitale normale typiquement mâle, pour les mâles contrôles et mutants, comparés à la femelle. **B :** Développement du tractus uro-génital intact. Rein (r), urtère (u), vésicule séminale (vs), épидидyme (e), canaux déférents (cd), testicule (t) et graisse (ta). **C :** Taux circulants de testostérone chez les mâles contrôles et mutants. (Raskin et al., 2009).

Phénotype comportemental

Une importante altération du comportement sexuel mâle a été observée chez les mâles mutants. Dans les tests classiques de comportement sexuel, lorsque 55% des mâles contrôle manifestent un comportement sexuel complet, soit de la première montée jusqu'à l'éjaculation, aucun mâle mutant ne manifeste de comportement sexuel dans les 30 minutes de test. Or, ces derniers sont capables de se reproduire, lorsqu'ils sont mis en accouplement continu avec des femelles. Cette observation a conduit à réaliser des tests de durée plus importante, soit 10 heures. Ceci a permis de décrire de manière détaillée le comportement sexuel complet des mutants avec une baisse de la motivation et de la performance sexuelle. En effet, alors que la totalité des mâles contrôles montrent un comportement sexuel complet, seuls 55% des mâles mutants manifestent des montées, montrées avec intromissions et thrusts et seuls 33% d'entre eux parviennent à l'éjaculation. Les animaux restants ne montrent aucun comportement au cours des 10 heures de test. De plus, les mâles AR^{NesCre} qui montrent un comportement sexuel complet présentent des latences pour les premiers événements et une durée totale de

l'accouplement significativement augmentées par rapport aux mâles contrôles (Figure 19).

La perturbation de la performance sexuelle constatée chez les mâles mutants était associée à une diminution du rapport d'intromission et à une augmentation de la latence à l'érection et à une réduction du temps total passé à la toilette génitale, réalisée après chaque montée avec intromission.

Ces perturbations sont associées à une modification de la préférence olfactive normale pour les femelles réceptives. De plus, l'expression de *c-fos* est correctement induite après exposition à des stimuli olfactifs issus de femelles réceptives, pour les deux génotypes. D'autre part, l'expression de l'ER α dans les régions neuronales impliquées dans les comportements liés à la reproduction n'était pas affectée.

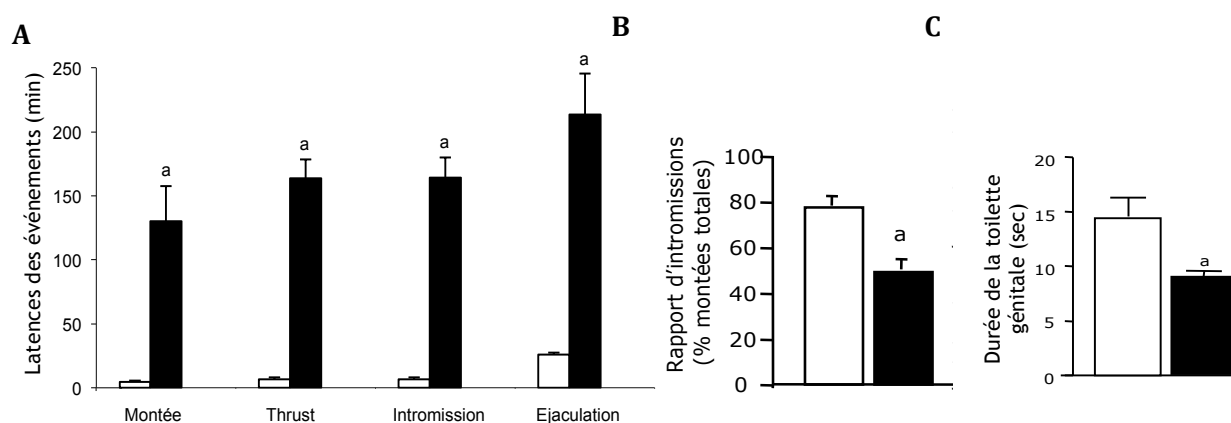


Figure 19 : Le comportement sexuel mâle chez les mâles contrôles et AR^{NesCre}.

A : Les latences des différents événements du comportement sexuel mâle, pour des mâles contrôles et mutants castrés et supplémentés en testostérone. **B :** Le rapport d'intromission, reflétant la proportion de montées efficaces. **C :** La durée de la toilette génitale, reflétant l'activité érectile. (Raskin et al., 2009).

L'altération du comportement sexuel a été maintenue après normalisation des taux de testostérone entre les mâles contrôles et mutants, par la castration et la supplémentation avec de la testostérone (Figure 19). Ces résultats nous ont conduit à proposer des rôles complémentaires pour l'AR et les ERs dans les effets centraux de la testostérone.

III.3. Deuxième modèle d'invalidation conditionnelle et comparaison des deux études

Par une approche identique et en utilisant les mêmes lignées de souris, Juntti et coll ont développé le même modèle de souris nommé ARNsDel en fond génétique C57BL6J/129SvEv également (Juntti et al., 2010). De la même façon, un phénotype externe mâle est décrit. De manière surprenante, ces animaux ne montrent pas de défaut neuroendocrine, contrairement à la première étude. En effet, il est décrit des taux circulants de testostérone augmentés, qui ne sont pas significativement différents de ceux des mâles contrôles avec des erreurs standards à la moyenne assez élevées. Les poids des vésicules séminales sont également inchangés par rapport aux contrôles.

Un déficit du comportement sexuel mâle a été également observé. Néanmoins, la courte durée des tests réalisés (30 min) ne permettait pas de faire une comparaison complète du comportement sexuel entre les deux génotypes (Juntti et al., 2010). En effet, seulement 42% des mâles contrôles ou mutants montraient un comportement sexuel. Comme chez les mâles AR^{NesCre}, les tests de préférence olfactive ne montrent aucune altération.

En conclusion, les deux études montrent des degrés variables d'altération du comportement sexuel et de l'axe HPG. Les mâles invalidés pour l'AR au niveau central étant capables d'initier un comportement sexuel, l'équipe de Shah en a conclu que l'AR était impliqué dans l'activation du comportement sexuel et non dans l'organisation de celui-ci au cours du développement. Or, ce mode d'invalidation ne permet pas de distinguer entre l'implication de l'AR dans les effets organisationnels et activationnels. L'équipe de Shah justifie cette interprétation par le fait que l'AR n'est pas exprimé au cours de la période périnatale, dans l'AMe, le LST et la POA. Ainsi, les auteurs suggèrent que la testostérone agit principalement comme précurseur des œstrogènes pour organiser les circuits neuronaux en période périnatale et via l'AR pour contrôler le niveau d'expression du comportement sexuel à l'âge adulte. Néanmoins l'expression du comportement sexuel implique aussi bien des régions cérébrales que spinales, comme l'illustre les déficits observés (Figure 19).

CHAPITRE IV.

LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET LA TESTOSTÉRONE

Plusieurs études épidémiologiques réalisées chez l'Homme ont permis de signaler un lien potentiel entre l'augmentation de la fréquence des anomalies des fonctions de reproduction et l'accroissement de l'utilisation des produits chimiques ; tels que les molécules appelées perturbateurs endocriniens (PE).

Certains de ces PE, notamment le Bisphénol A (BPA), sont pointés du doigt et font l'objet de nombreuses études. L'effet perturbateur à long terme de faibles doses de BPA, a été bien étudié chez des animaux de laboratoire. Des études comportementales ont notamment pu montrer des effets sur l'activité locomotrice (Ishido et al., 2004; Masuo et al., 2004; Rubin et al., 2006), l'état d'anxiété (Farabollini et al., 1999; Ryan et Vandenberg, 2006; Patisaul et Bateman, 2008; Rubin et al., 2006; Cox et al., 2010; Matsuda et al., 2012) et les performances cognitives (Xu et al., 2010; Nakamura et al., 2012; Jašarević et al., 2011). Néanmoins, jusqu'à présent, certains effets du BPA restent encore peu connus notamment sur l'organisation périnatale et l'activation à l'âge adulte des comportements mâles, ainsi que sur les mécanismes moléculaires qui les sous-tendent.

I. Le BPA, un perturbateur endocrinien répandu

I.1. Définition d'un perturbateur endocrinien

La notion de perturbateur endocrinien (PE) est apparue à la fin du 20^{ème} siècle pour définir, selon la Communauté Européenne : « ***toute molécule ou agent chimique, interférant avec les fonctions du système hormonal d'un organisme vivant, et qui risque d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones naturelles*** ». Ces molécules sont donc susceptibles d'avoir des effets indésirables sur la santé en altérant des fonctions telles que la croissance, le développement, le comportement, les fonctions liées à la reproduction et l'apparition de certains cancers.

Il existe plusieurs variétés de PE qui peuvent être d'origine naturelle comme les phytoestrogènes (germe de blé, soja, bière/houblon) ou d'origine artificielle comme certains médicaments ou encore les plastifiants (Tableau 3).

Origine	Classe	Substances	Sources
Naturelle	- Phyto-estrogène	Génistéine	Plantes légumineuses
	- Hormones stéroïdes	Oestrone- Oestriol	Stéroïdes gonadiques
Artificielle	- Molécule de synthèse	Distilbène, Tamoxifène	Médicament
	- Produit chimique	Atrazine	Agriculture
		Tributylétain	Domestique
		BPA - Phtalate	Industrie du plastique

Tableau 3 : Classification des différentes substances à effets perturbateurs endocriniens.
(Inspiré de Birkett et Lester, 2003)

Le BPA est un xénoestrogène, composé de deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone, appartenant à la famille des diphenylamines hydroxylés, ou bisphénols (Figure 20). Synthétisé pour la première fois en 1891 par Alexandre P. Dianin, les scientifiques découvrent ses propriétés œstrogéno-mimétiques en 1930 (Dodds et al., 1936). Mais cette molécule ne fût jamais utilisée comme tel chez l'Homme du fait de ses propriétés hormonales jugées insuffisantes et fût remplacée par le diéthylstilbestrol (ou distilbène) en 1938. Ce dernier est l'un des PE aux effets délétères des plus avérés chez l'Homme. Ce médicament était prescrit en France entre 1948 et 1970 aux femmes enceintes afin de prévenir les risques d'avortement spontanés (Giusti et al., 1995). Son utilisation fût interdite en France en 1977 suite à l'apparition d'importantes anomalies génitales chez les enfants exposés *in utero*.

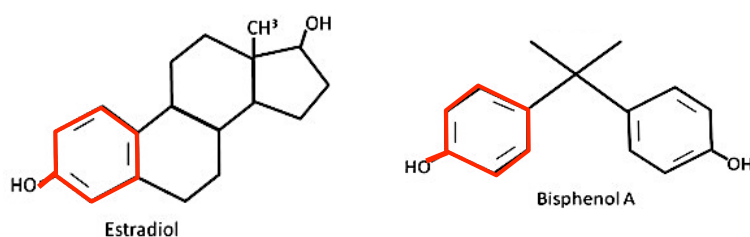


Figure 20: Structure chimique de l'œstradiol et du Bisphénol A.

Représentation de la structure chimique du Bisphénol A, qui a une structure proche de celle de l'œstradiol naturel, notamment par la présence de groupements phénol (en rouge). Ce groupement lui confère une activité œstrogéno-mimétique, de par sa capacité à se lier aux récepteurs aux œstrogènes.

1.2. Les sources de production de BPA

Le BPA est aujourd'hui utilisé comme monomère dans la fabrication des plastiques de type polycarbonates et des résines époxy. Les polycarbonates sont des plastiques transparents, très résistants, isolants, capables de supporter des chaleurs élevées et de se déformer sans se rompre. C'est pour cela qu'ils sont utilisés dans de nombreux domaines d'objets courants (Figure 21): les disques compacts (CD), les lunettes (verres et montures), certaines bouteilles d'eau et de lait recyclables, des conteneurs d'eau réutilisables, des biberons, ainsi que de la vaisselle pour four à micro-ondes. Le BPA est également utilisé dans les canalisations d'adduction d'eau potable et le papier thermique (ticket de caisse). Les résines époxy-phénoliques sont présentes dans le revêtement intérieur des canettes et des boîtes de conserve, ainsi que sous les couvercles métalliques des pots et bouteilles en verre et pour les amalgames dentaires.

La présence du BPA dans les plastiques peut être repérée par les chiffre **3** (PVC), **7** (autres) ou **PC** (polycarbonate) situés au centre ou en dessous du symbole de recyclage sur les emballages (Figure 21). Ainsi, le BPA est largement présent dans notre environnement quotidien, avec une production mondiale estimée à environ 3 millions de tonnes par an (Burridge et al., 2003).

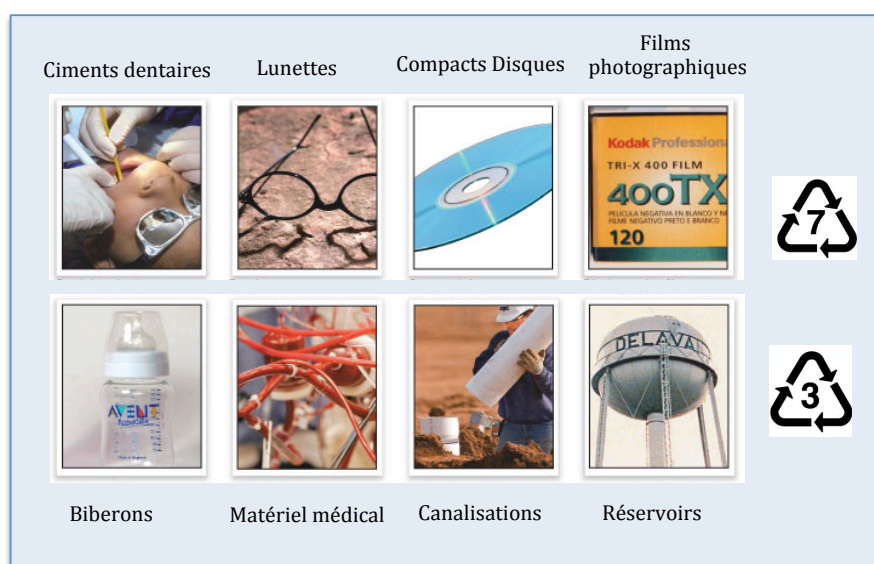


Figure 21: Photos représentant les objets contenant du BPA présents dans notre environnement et les symboles de recyclage permettant de les identifier.

1.3. Les différents modes d'exposition au BPA

Les plastiques en polycarbonates ont longtemps été considérés comme des matières inertes. On sait aujourd'hui que le BPA peut migrer depuis les contenants dans les produits alimentaires, même dans des conditions normales d'utilisation. La chaleur, le contact avec des composés acides ou basiques accélèrent l'hydrolyse de la liaison ester du bisphénol A au polycarbonate ou à la résine époxy (Vandenberg et al., 2007). De ce fait, le BPA est très largement répandu dans l'environnement (air, eau, sol) et les sources d'exposition sont diverses :

- La **voie orale** est la **principale source d'exposition**, via les aliments ou les boissons contaminés. Les amalgames dentaires en font également partie. En effet, des concentrations élevées en BPA ont été détectées dans des prélèvements de salive après application d'amalgames composés de bis-glycidylméthacrylate et de bisphénol A-diméthylacrylate (Olea et al., 1996; Joskow et al., 2006). Néanmoins, l'exposition au BPA dans cette condition reste ponctuelle, par rapport aux expositions chroniques avec l'ingestion d'aliments contaminés.
- La **voie cutanée**, jusqu'à présent négligée, est de plus en plus discutée aujourd'hui. La contamination se fait via les papiers d'impression thermique, utilisés pour les tickets de caisse ou les relevés bancaires (Biedermann et al., 2010; Zalko et al., 2011; Demierre et al., 2012).
- L'**inhalation** serait également une voie d'exposition. Des travaux récents indiquent que les poussières domestiques peuvent contenir une quantité non négligeable de BPA (Fu et Kawamura, 2010). À ce jour ce mode d'exposition est considéré comme négligeable.

Des études récentes ont montré que dans les pays industrialisés, la contamination orale par le BPA concerne la majeure partie de la population (Calafat et al., 2005; Vandenberg et al., 2007). Le BPA a été détecté dans 95% des échantillons urinaires analysés ainsi que dans le liquide amniotique, le plasma fœtal et maternel, le placenta (Schönfelder et al., 2002) et le lait maternel (Sun et al., 2004). L'exposition journalière au BPA est estimée chez l'adulte en moyenne à 1,5 µg/kg de poids corporel (EFSA 2006; 2008; Lim et al., 2009). Les enfants, en particulier les nourrissons, sont plus sensibles à l'exposition au BPA, du fait de leur plus faible poids corporel. Selon un rapport du Centre

pour l'Évaluation des Risques pour la Reproduction Humaine américaine, datant de 2008, l'exposition au BPA chez les enfants de moins de 11 mois est évaluée à 1 à 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ et à 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ chez les femmes enceintes (Center for Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTP-CERHR, 2008)).

1.4. Le métabolisme du BPA

Le métabolisme, étroitement lié à la voie d'exposition, est un facteur essentiel à l'évaluation de la toxicité du BPA. Il doit être pris en compte dans la discussion des possibles transpositions des effets observés chez l'animal à l'espèce humaine. Le BPA a une demi-vie d'environ 4-6 heures chez l'Homme et l'élimination est complète en 24 heures (Völkel et al., 2002). En revanche chez le rat, les données indiquent une demi-vie comprise entre 24 et 48 heures (Kurebayashi et al., 2003; Upmeier et al., 2000).

Le métabolisme du BPA chez l'Homme comporte encore de nombreuses zones d'ombre. De manière générale, le métabolisme du BPA met en jeu des réactions enzymatiques dont la glucuronidation, qui consistent à ajouter un groupement généralement hydrosoluble (un acide glucuronique ou dérivés sulfatés) par l'enzyme UDP glucuronosyltransférase (UGT) (Upmeier et al., 2000; Kurebayashi et al., 2003; Völkel et al., 2002; Inoue et al., 2003; Pottenger et al., 2000; Yokota et al., 1999). Les UGTs sont des enzymes présentes majoritairement dans le foie mais sont également retrouvées dans de nombreux autres tissus dont l'intestin (Radomska-Pandya et al., 1998) et le placenta (Collier et al., 2002). Ainsi, le principal métabolite du BPA est le BPA-glucuronide (BPA-G), dépourvu d'activité œstrogénique (Matthews et al., 2001). Le BPA-G est rapidement éliminé de la circulation générale et excrété dans les urines. Le métabolisme de biotransformation du BPA en BPA-G représente donc un mécanisme de détoxification de l'organisme.

Chez les rongeurs, le métabolisme est différent. Après glucuronidation dans le foie, le BPA-G est excrété dans la bile et retourne à l'intestin. Il est hydrolysé en BPA par des bactéries intestinales possédant une activité β -glucuronidase et réabsorbé pour subir un nouveau cycle, ou bien éliminé dans les fèces (Sakamoto et al., 2002; Inoue et al., 2003). Ce processus n'est pas décrit chez l'Homme, mais la possibilité d'une dissociation du BPA-G au niveau de plusieurs tissus périphériques ne peut être exclue ; du BPA libre

étant retrouvé dans les urines. En effet, l'enzyme β -glucuronidase, responsable de la déconjugaison du BPA-G est présente dans la plupart des tissus humains, en particulier dans le placenta et le foie fœtal (Ginsberg et Rice, 2009).

Néanmoins, il semble que le métabolisme entre les rongeurs et les primates soit assez similaire. En effet, une étude récente a comparé les niveaux sériques de BPA libre et de BPA-G chez le singe Rhésus mâle et femelle, et que chez la femelle souris, après une administration orale de BPA (Taylor et al., 2011). Ils décrivent une cinétique de dégradation du BPA libre similaire entre le singe et la souris, suggérant que la souris est un bon modèle pour prédire les niveaux de BPA-G dans le sérum après une exposition au BPA chez l'humain.

Il existe une seconde voie moins documentée dans le métabolisme du BPA ; la sulfatation. Elle génère du métabolite BPA-sulfate, en quantité minoritaire, qui ne possède pas d'activité oestrogénique (Pritchett et al., 2002).

D'autre part, la possibilité de réactions enzymatiques d'oxydation a également été étudiée *in vitro*, mettant en jeu des enzymes de la famille des cytochromes P450, principalement la sous-famille des CYP2C chez l'Homme (Niwa et al., 2001). La métabolisation du BPA par les cytochromes P450 conduit à la formation de métabolites, dont l'isopropenylphenol qui aurait une activité oestrogénique équivalente à celle du BPA (Nakamura et al., 2011).

Le BPA est capable de traverser la barrière placentaire (Zalko et al., 2003). Compte tenu de l'immaturation du système hépatique de détoxification et d'élimination de substances telles que le BPA chez le fœtus, la période périnatale est considérée comme la période à risque. En effet, l'expression des UGTs est limitée chez le fœtus et pendant les premiers jours de la vie (Rubin et al., 2001 ; Taylor et al., 2010) . Cependant, des données suggèrent que les UGTs sont suffisamment actives pour métaboliser de faibles doses de BPA. En effet, des glucuro-G un métabolite du BPA ayant ont détectés dans les urines de nourrissons prématurés (Calafat et al., 2009).

II. Les mécanismes d'action du BPA

Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation sur lesquels agit le BPA sont encore inconnus. Ceci limite la compréhension de l'impact d'une exposition au BPA. Il

est probable que le BPA altère de multiples voies de signalisation. A l'heure actuelle, le manque de modèles génétiques animaux appropriés ne permet pas de conclure sur ces mécanismes d'action.

II.1. Activité œstrogénique

Le BPA, de conformation chimique apparentée à l'œstradiol (Figure 20) peut agir comme un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (SERM). La capacité de liaison du BPA aux ERs nucléaires a été montrée pour l'ER α et l'ER β (Gould et al., 1998; Kuiper et al., 1997; Matthews et al., 2000). Pourtant, le BPA présente plusieurs milliers de fois moins d'affinité pour les ERs que l'œstradiol (Kuiper et al., 1998), avec néanmoins une affinité pour l'ER β 10 fois supérieure à celle pour l'ER α (Matthews et al., 2001).

Plus récemment, il a été montré que le BPA pouvait se lier et activer les ERs de type membranaire, les GPR30 (Thomas et Dong, 2006), à des concentrations de l'ordre du picomolaire au nanomolaire (Wozniak et al., 2005) (Figure 22).

II.2. Activité anti-androgénique

Bien que la première activité décrite pour le BPA soit œstrogénique, une activité antagoniste pour le récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Figure 22) a également été montrée *in vitro* (Sohoni et Sumpter, 1998; Paris et al., 2002; Lee et al., 2003; Xu et al., 2005; Li et al., 2010). Ceci avec une affinité de l'ordre du micromolaire. Cependant, la manière dont le BPA exerce son activité anti-androgénique n'est pas clairement définie. Le BPA pourrait interférer avec la T ou la DHT et bloquer leurs liaisons à l'AR.

II.3. Autres activités

Quelques études récentes dévoilent les multiples capacités du BPA à modifier plusieurs systèmes en se fixant sur différents récepteurs. L'équipe de Takeda a montré que le BPA se lie au récepteur nucléaire estrogen-related receptor gamma (ERR γ) avec une probabilité 80 fois supérieure à l'ER α (Takayanagi et al., 2006). Ce récepteur fait partie de la famille des estrogen-related receptor (ERR), fortement exprimé chez les mammifères

dans le cerveau et le placenta (Takeda et al., 2009), sans pouvoir lier l'œstradiol. Il pourrait donc participer à l'accumulation du BPA dans le placenta et augmenter le risque d'exposition.

De plus une étude très récente indique que le BPA a la capacité de se fixer aux récepteurs des glucocorticoïdes (Prasanth et al., 2010), avec une activité agoniste similaire à la cortisol. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour étudier les effets à long terme du BPA sur l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA). De même pour les interactions décrites avec le récepteur à l'hormone thyroïdienne (Kitamura et al., 2002).

Enfin, la modification du niveau d'expression des récepteurs aux hormones stéroïdes est l'un des effets possibles du BPA. Il a été observé à l'âge adulte, suite à un traitement périnatal au BPA, une surexpression des ERs, dans les neurones de diverses régions, dont l'aire préoptique de l'hypothalamus (Ramos et al., 2003).

III. La position réglementaire actuelle

Compte tenu de l'utilisation à l'échelle mondiale du BPA, de sa capacité de migration vers les aliments et les boissons et les effets délétères observés sur certaines fonctions de l'organisme, des mesures réglementaires doivent être prise pour l'évaluation du risque sanitaire.

En toxicologie réglementaire, la sélection des valeurs toxicologiques de référence d'un produit (dose journalière admissible (DJA) pouvant être ingérée quotidiennement sans danger pour l'homme) est obtenue sur la base de la dose expérimentale sans effet nocif constaté chez l'animal (No Observed Adverse Effect Level ou NOAEL), après application d'un facteur d'incertitude (généralement 100) tenant compte de la variabilité inter-individuelle et de la différence inter-espèce. Pour le BPA, la NOAEL a été définie à partir d'études effectuées sur des fonctions sensibles à l'œstradiol. Elle a été fixée par les agences sanitaires européennes à 5 mg/kg/j, et la DJA à 50µg/kg/j (EFSA, 2006).

Les études les plus récentes alertent cependant les autorités sanitaires sur des effets du BPA observés à des doses égales et inférieures aux doses de référence (Cf. les différents effets présentés dans la partie IV). Le nombre d'études montrant des effets du BPA à de très faibles doses (inférieures à la DJA) est croissant. En octobre 2009, l'EFSA a été sollicitée par la Commission Européenne pour évaluer les nouvelles preuves scienti-

fiques susceptibles d'avoir un impact sur les précédentes estimations des doses de références. L'avis définitif a été rendu en septembre 2010 et maintient la DJA à sa valeur actuelle de 50µg/kg/j.

Les mesures prises à partir de ces données ont été très différentes selon les pays. Certains pays n'ont pas attendus une révision de la valeur de la DJA pour prendre des mesures. Le Canada est le premier pays à avoir interdit le BPA dans les biberons, en octobre 2008, interdiction qui est entrée en vigueur en mars 2010. La France a interdit la fabrication et la commercialisation de biberons contenant du BPA en juin 2010 dans la Loi Grenelle 2, et l'Union Européenne a décidé en novembre 2010 de l'interdire également. En effet, la Directive européenne 2011/8/EU bannit la fabrication des biberons contenant du BPA (interdiction entrée en vigueur en mars 2011) ainsi que l'importation ou la mise sur le marché de biberons contenant du BPA (dès juin 2011). Mais la France va plus loin, par le vote de ses députés le 12 octobre dernier. Dès 2013 la fabrication et la commercialisation des emballages de produits destinés aux enfants de moins de trois ans sera suspendu. Et à partir du 1er janvier 2014, la fabrication et la commercialisation de tout conditionnement en contact avec des aliments et contenant du bisphénol A (BPA) seront bannies.

Néanmoins, à ce jour le BPA reste encore très fabriqué et utilisé dans le monde, d'autant que la France n'est pas un pays producteur de ce composé.

En réponse à la restriction du BPA, le bisphénol S (BPS), un composé de la même famille que la première, a été introduit comme élément de remplacement dans le plastique, notamment dans les biberons (Simoneau et al., 2011). Mais une étude récente montre, par des tests de transactivations, que le BPS a une activité œstrogénique comparable au BPA (Grignard et al., 2012). En attendant que les industriels et les scientifiques trouvent un composé de substitution, nous continuons à être exposés quotidiennement au BPA.

IV. Les effets observés du BPA sur les fonctions centrales de la testostérone

L'industrie considère les polycarbonates comme très intéressants en raison de leurs duretés et de leurs longévités. Plusieurs études ont pointé l'effet perturbateur du BPA de la santé animale et humaine, en lien avec ses propriétés œstrogéniques. Par exemple, les fonctions de la barrière intestinale, particulièrement sensible aux estrogènes, se trou-

vent diminuées après une exposition chronique à l'âge adulte et en période périnatale au BPA chez le rat, et de manière dose dépendante (Braniste et al., 2010).

Or, de part ses diverses activités décrites précédemment (Figure 22), le BPA est susceptible de perturber les effets centraux de la testostérone ; tout deux ayant pour cible l'AR et les ERs.

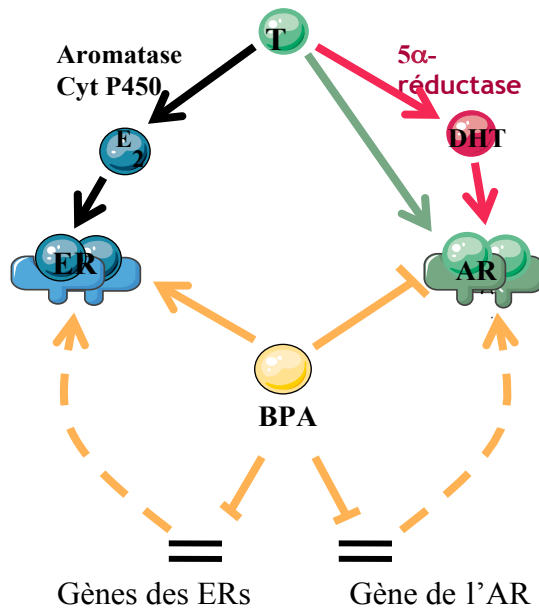


Figure 22: Mécanismes d'action potentiels du BPA.

La testostérone peut activer directement l'AR ou indirectement l'ERα ou l'ERβ après conversion en œstradiol. Ces récepteurs sont mis en jeu lors de l'action de la testostérone sur le système nerveux (organisation et activation). Le BPA est capable d'activer l'ERα et l'ERβ, d'inhiber le récepteur l'AR ou de modifier le niveau d'expression de ces récepteurs.

Dans un souci de clarté et de synthèse, principalement les études rapportant des effets sur l'axe HPG et le comportement sexuel mâle après une exposition à de faibles doses de BPA, soit inférieure ou égale à 5 mg/kg (poids corporel) de BPA administré (correspondant à la NOAEL) seront décrites et résumées (Tableau 4).

IV.1. Les effets sur l'axe HPG

Parmi les nombreuses études réalisées, certaines dénoncent des effets perturbateurs d'une exposition périnatale à des faibles doses de BPA, généralement comprises entre 0,2 et 20 µg/kg/jr. Par exemple, il a été constaté une augmentation du poids

corporel des rats mâles à l'âge adulte (Rubin et al., 2001), ainsi qu'une diminution du poids du tractus uro-génital (épididyme, des vésicules séminales et de la production de sperme) à l'âge adulte (vom Saal et al., 1998). Par ailleurs, il est parfois observé une diminution du taux de testostérone sérique et testiculaire chez les rats mâles exposés *in utero* sans qu'une baisse des taux de LH sérique n'y soit associée (Akingbemi et al., 2004; Kawai et al., 2003).

Des observations similaires ont été faites au niveau du tractus après une exposition à l'âge adulte à de faible (Al-Hiyasat et al., 2002) ou de fortes doses de BPA (Tohei et al., 2001; Takahashi et Oishi, 2001, 2003).

À l'inverse, certaines études, appliquant des doses de BPA de l'ordre de 200 µg/kg/jr (mais restant inférieure à la NOAEL), rapportent l'absence d'effet d'un traitement périnatal sur le poids corporel, le tractus urogénital qui est normal ou encore les taux de testostérone qui sont semblables à ceux des animaux contrôles (Cagen et al., 1999; Nagao et al., 2002; Kubo et al., 2001; Howdeshell et al., 2008)

IV.2. Les effets au niveau central

Comme indiqué dans deux récentes revues (Richter et al., 2007; Li et al., 2008), il semble évident qu'il y ait des effets organisationnels à long terme, en réponse à une exposition au BPA au cours du développement. Cependant, les effets observés montrent des différences selon les structures cérébrales, les fonctions, et les comportements étudiés.

Une étude toute récente alerte sur le caractère trans-générationnel des effets du BPA à faible dose (Wolstenholme et al., 2012). Des modifications des comportements sociaux et de la synthèse de certaines hormones chez la souris sont visibles jusqu'à la 4^{ème} génération.

La neuroanatomie

Au niveau neuroanatomique, les altérations dans l'organisation de neurones sexuellement dimorphiques, décrites après une exposition périnatale au BPA dépendent de la région étudiée et du sexe de l'animal.

Il a été rapporté que le nombre de neurones exprimant la tyrosine-hydroxylase (TH) dans l'AVPV est diminué chez les femelles, mais non modifié chez les souris mâles (Rubin et al., 2006). Une augmentation du volume du noyau sexuellement dimorphique

(SDN) a été décrite dans certaines études (Rubin et al., 2006; Kubo et al., 2001; He et al., 2012) mais pas dans d'autres (Farabollini et al., 2002). Par ailleurs, de récentes études rapportent l'augmentation des neurones kisspeptin-ir dans l'AVPV chez le rat mâle (Bai et al., 2011) et l'augmentation de l'ARNm de kisspeptine chez la souris mâle (Xi et al., 2011).

L'expression des gènes *ERs* semble être modifiée après une exposition périnatale au BPA chez le rat. En effet, plusieurs études rapportent une surexpression de l'ARNm codant pour l'ER α et une diminution de l'ER β après un traitement en période périnatale dans la POA (Ramos et al., 2003; Cao et al., 2012) et après un traitement à la puberté (Ceccarelli et al., 2007).

Il n'y a, à l'heure actuelle, aucune donnée sur l'éventuelle modification des niveaux d'expression des récepteurs après une exposition à l'âge adulte.

Le comportement sexuel mâle

À ce jour, les effets d'une exposition au BPA sur le comportement sexuel mâle ont été évalués uniquement chez le rat. Deux études ont rapporté des résultats contradictoires avec une diminution de la performance (latence et fréquence des intromissions) pour l'une (Farabollini et al., 2002) et aucun d'effet pour l'autre (Kubo et al., 2003). Une étude plus récente, rapporte elle une modification du comportement sexuel seulement chez les mâles expérimentés (Jones et al., 2011).

La seule étude s'intéressant aux effets d'un traitement adulte, ne montre aucune altération du comportement sexuel à de fortes doses de BPA administrés par injection (Tohei et al., 2001).

En conclusion, il apparaît donc que bon nombre d'études s'intéressent essentiellement à l'exposition en période périnatale, alors que peu de travaux s'attardent sur les effets d'une exposition au BPA à l'âge adulte.

Par ailleurs, beaucoup d'études ont été menées essentiellement chez le rat et peu concernent la souris. Les résultats obtenus chez le rat sont parfois contradictoires. Ceci est dû aux différences liées aux protocoles d'exposition utilisés, au fond génétique des animaux exposés, à la dose de BPA administrée, au mode et à la période d'administration ainsi qu'à l'unité d'analyse statistique (la portée ou le nouveau-né).

	Période d'exposition	Effets observés	Modèle animal	Dose et Mode d'administration	Durée du traitement	Références
Périphérique -Tractus génital mâle -Taux de T	Périnatale	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Poids corporel ↘ Poids du tractus ↘ Poids du testicule ↘ Testostérone testiculaire, poids des vésicules séminales et des testicules 	Rat Souris Souris Rat	0,1 ou 1,2 mg/kg - boisson 2-20 µg/kg - oral 2-20 ng/kg - oral 2,4 µg/kg - oral	JG6 à JP21 JG11 à JG17 JG11 à JG17 JG12 à JP21	Rubin et al., 2001 Vom Saal et al., 1998 Kawai et al., 2003 Akingbemi et al., 2004
		Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet	Souris Souris Rat Rat	0,2-200 µg/kg - oral 2-200 µg/kg - oral 1,5 mg/kg - boisson 2-200 µg/kg - oral	JG11 à JG17 JG11 à JP21 JG1 à JP21 JG7 à JP 18	Cagen et al., 1999 Nagao et al., 2001 Kubo et al., 2001 Howdeshell et al., 2008
	Adulte	↘ Poids du tractus	Souris	5-100 µg/kg - oral	4 semaines	Al-Hiyasat et al., 2002
Central -Neuroanatomie -Niveau d'expression des récepteurs	Périnatale	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Volume SDN ↗ Neurones Kiss 	Rat Rat	2,5-25 µg/kg - oral 2 µg/kg - S.C	JG6 à JP21 JG10 à JP7	He et al., 2012 Bai et al., 2011
		Neurones TH inchangé chez les mâles	Souris	250 ng/kg - S.C	JG8 à JP16	Rubin et al., 2006
		↗ ERα et ↘ ERβ	Rat Rat	25-250 µg/kg - S.C 50 mg, 50 µg/kg - S.C	JG7 à JP22 JG0 à JP10	Ramos et al., 2003 Cao et al. 2012
	Adulte	↗ ERα	Rat	40 µg/kg	JP23 à JP30	Caccarelli et al., 2007
AUCUNE DONNÉE						
Comportement sexuel	Périnatale	Pas de modification	Rat	30-300 µg/kg- oral	JG1 à JP21	Kubo et al., 2003
		↘ Performance	Rat	40 µg/kg - oral	JG1 à la naissance	Farabollini et al., 2002
		↘ Pour les animaux expérimentés	Rat	50 µg/kg - oral	JG7 à JP14	Jones et al., 2011
	Adulte	Pas de modification	Rat	1 mg - S.C	14 jours	Tohei et al., 2001

S.C : injection ou implant en Sous Cutanée ; JG : jour de gestation ; JP : jour postnatal

Tableau 4: Récapitulatif des effets d'une exposition à de faibles doses de BPA (inférieure ou égale à la DJA), selon les conditions de traitement.

CHAPITRE V.

ÉTUDES RÉALISÉES AU COURS DE MA THÈSE

Mon projet de thèse a consisté à poursuivre l'étude des mécanismes d'action mis en jeu par la testostérone, l'hormone endogène et par un perturbateur endocrinien dans l'expression du comportement sexuel mâle. Il s'est articulé autour de 3 axes complémentaires :

I. Étude de l'implication de l'AR dans l'organisation et l'activation par la testostérone du comportement sexuel mâle

Pour cela, j'ai utilisé la lignée de souris invalidée pour l'AR spécifiquement dans le système nerveux, précédemment décrite dans le chapitre III - *III.1*. La première caractérisation de cette lignée a été faite en fond génétique mixte (Raskin et al., 2009). Or, en comparant le comportement sexuel de différentes souches de souris, McGill avait rapporté de meilleures performances pour le fond génétique C57Bl6J (McGill, 1962). De plus, les données obtenues en fond mixte à l'issue de l'étude de la même lignée sont différentes entre notre équipe (Raskin et al., 2009) et l'équipe américaine de Shah (Juntti et al., 2010). Nous avons donc croisé en retour cette lignée de souris en fond C57Bl6J, afin de mener nos études sur un fond génétique homogène et couramment utilisé dans l'étude des fonctions de reproduction.

Plusieurs études ont été réalisées :

- Des mesures des taux circulants de testostérone et du poids des organes du tractus uro-génital
- Des tests de comportement sexuel mâle et femelle afin d'évaluer s'il y a respectivement un défaut de la masculinisation et de la déféminisation du comportement sexuel, en absence de l'AR central.
- Une évaluation de l'organisation neuro-anatomique de la POA, une région qui intègre le signal final nécessaire à l'expression du comportement sexuel. Mais aussi du NSB jouant un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité érectile.

Les résultats obtenus sont présentés dans les **articles 1 et 2**.

II. Effets perturbateurs d'une exposition périnatale et adulte à de faibles doses de bisphénol A et mécanismes impliqués

Pour cela nous avons mené une caractérisation, des effets d'une exposition à de faibles doses de BPA, chez les mâles C57BL6J. Le BPA ayant les mêmes cibles potentielles que la testostérone, selon la période d'exposition en périnatale ou à l'âge adulte, nous avons évalué les défauts d'organisation ou d'activation du système nerveux par la testostérone. Cette étude constitue la première partie d'un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). La seconde partie ayant pour but de déterminer les mécanismes d'actions impliqués dans les effets centraux du BPA, en utilisant des modèles de souris conditionnelles. Ce projet a impliqué un traitement quotidien des souris, auquel j'ai participé.

Plusieurs études ont été réalisées :

- Des mesures des taux circulants de testostérone.
- Le suivi du développement corporel et du tractus uro-génital
- Des tests de comportements sexuel mâle et femelle afin d'évaluer s'il y a respectivement un défaut de la masculinisation et de la déféminisation du comportement sexuel.
- Une évaluation de l'organisation neuro-anatomique des régions cérébrales sexuellement dimorphiques impliquées dans l'expression du comportement sexuel.
- Les données obtenues ont été comparées avec les effets de l'inactivation de l'AR central, afin d'identifier une voie d'action du BPA.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'**article 3**.

III. Étude de l'implication de l'ER β dans la régulation du comportement sexuel mâle par la testostérone

Pour cela j'ai généré et initié la caractérisation de souris invalidées pour l'ER β sélectivement dans le système nerveux. Cette lignée de souris, appelée ER β^{NesCre} , a été générée selon le même principe décrit précédemment dans le chapitre III - III.1. La lignée ER β^{NesCre} a été directement obtenue en fond génétique C57Bl6J.

Plusieurs études ont été réalisées :

- Caractérisation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope avec des dosages des taux circulants de testostérone
- Études neuroanatomiques des régions sexuellement dimorphiques sous-tendant le comportement sexuel
- Tests de comportements sexuels mâle et femelle

Les résultats obtenus sont présentés dans **l'article 4**.

Résultats

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Sont présentés ici les principaux tests et techniques utilisés au cours de ma thèse. La plupart des techniques étaient mises en place et utilisées en routine dans le laboratoire à mon arrivée, mais l'étude du NSB a nécessité la mise au point d'une nouvelle technique.

Obtention des lignées AR^{NesCre} et ER β ^{NesCre}

Les croisements

Les souris AR^{NesCre} ont été croisées en retour en fond génétique C57BL6J sur au moins 9 générations. Le croisement a été réalisé comme décrit précédemment (Raskin et al., 2009) illustré figure 15.

Les souris ER β ^{NesCre} ont été obtenues directement en fond génétique C57BL6J, selon le même principe décrit chapitre III - III.1. Des femelles portant l'exon 3 (collaboration avec le Pr. Chambon, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Ilkirch (Antal et al., 2008)) flanqués de 2 sites loxP ont été accouplées avec des mâles de la lignée transgénique Nes-Cre (Figure 15).

Le génotypage

Pour chacune des études, le génotypage des animaux a été réalisé au sevrage de chaque portée, grâce à l'utilisation de la technique de PCR.

Extraction de l'ADN génomique. Un centimètre de queue de souris, âgées de 25 jours au moment du sevrage, a été digéré la nuit avec 20 μ l de protéinase K (10 mg/ml) dans 750 μ l de tampon de digestion [NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, SDS 1%]. Les protéines ont été précipitées avec 250 μ l de NaCl saturé puis les tubes ont été centrifugés 5 min à 10000 rpm. L'ADN contenu dans le surnageant a ensuite été précipité avec 500 μ l d'isopropanol. Après centrifugation de 5 min à 10000 rpm, les culots d'ADN ont été lavés avec 500 μ l d'éthanol 70% puis remis en suspension la nuit à 4°C dans 100 μ l de TE (pH 7,5). Cet ADN a ensuite été dilué 50X dans de l'eau.

Réactions d'amplification. Les réactions ont été réalisées sur 5 μ l d'échantillon dilué (dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 3 mM, primers 0,4 mM, Taq Polymerase 5 U/ μ l Promega, tampon de réaction 1X Promega) en utilisant des primers sens et antisens encadrant la séquence

d'intérêt et selon le programme d'amplification. Les différents primers utilisés ont permis de distinguer entre les allèles floxé, sauvage et excisé du gène AR et ERβ. L'identification des animaux contrôles et mutants a été faite également par détection de la Cre par PCR.

Le protocole de traitement au BPA

Nous avons réalisé une exposition chronique à de faibles doses de BPA (Dose journalière acceptable: 0.050 mg/kg (DJA) and No-Observed Adverse Effect Level (NOAEL = 100 x DJA)). Une distinction a été faite entre une exposition en période périnatale (précoce) *versus* adulte (tardive). L'exposition périnatale a été fait via l'administration de BPA à la mère qui le transmet à ses petits par le placenta pendant la gestation et par le lait maternel pendant la période de lactation.

Afin de mimer la voie de contamination humaine (principalement par l'alimentation), le traitement a été fait par voie orale (gavage). Le traitement périnatal consiste à administrer aux femelles gestantes du BPA dissout dans de l'huile de sésame de la mi-gestation (14^{ème} jour de gestation) jusqu'au sevrage (21^{ème} jour postnatal). Le traitement à l'âge adulte concerne des mâles adultes pendant une durée d'un mois (Figure 23). Plusieurs analyses ont ensuite été effectuées chez les mâles à l'âge adulte.

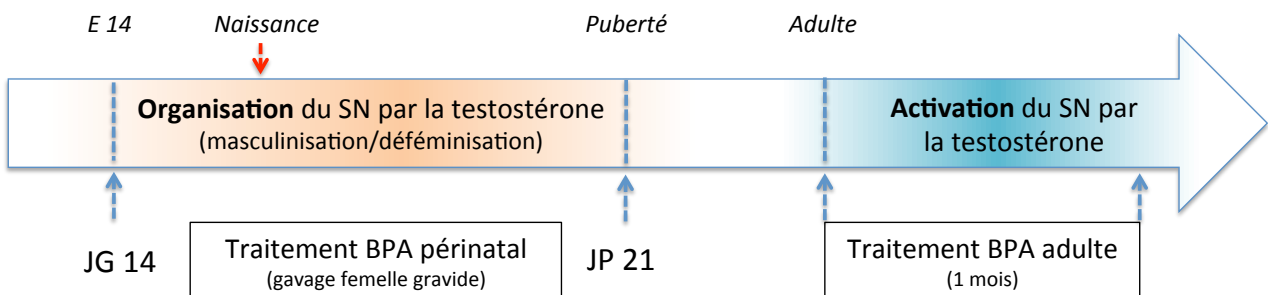


Figure 23 : Schéma du protocole de traitement au BPA.

Nous avons réalisé deux périodes d'exposition au BPA : Le traitement en période périnatale (du 14^{ème} jour de gestation = JG 14 au 21^{ème} jour postnatal = JP 21) qui couvre la période où apparaissent les deux pics de testostérone autour de la naissance (flèche rouge), responsables de l'organisation permanente du système nerveux (SN). Le traitement adulte, qui dure 1 mois, est réalisé pendant la période d'activation du SN par la testostérone.

Neuroanatomie

Immunohistochimie

Les différents protocoles sont détaillés dans les Matériels et Méthodes des papiers présentés ci-après.

Marquage rétrograde

Nous avons mis au point la technique de marquage rétrograde afin de cibler spécifiquement les motoneurones innervant le muscle BC. Pour cela, nous avons utilisé la toxine de choléra (CT) couplée à la peroxydase (HRP). Les animaux ont été injectés avec la CT-HRP dans le pied (pour avoir un contrôle interne) et dans le muscle BC, 5 semaines après castration ou castration et supplémentation en testostérone. La morphologie des motoneurones (nombre, taille et arborisation dendritique) marqués dans le NSB a été analysé 48 heures après injection. La région lombosacrée (L5-S1) de la moelle épinière a été extraite des animaux après perfusion. Le marquage a été révélé par un traitement au tetraméthylbenzidine (TMB) (Mesulam et al., 1978).

Les tests comportementaux

1- comportements typiques mâles

Gonadectomie des mâles: Des mâles naïfs ont été gonadectomisés sous anesthésie générale (Kétamine/ Xylazine) à l'âge de 2 mois et implantés en sous-cutané avec des tubes SILASTIC contenant 10 mg de testostérone (Sigma) 2 semaines avant les tests.

Comportement sexuel mâle:

Les souris mâles sont placées dans des cages individuelles pendant 3 jours avant le test. Les animaux subissent une phase d'habituation à la pièce où s'effectuent les tests pendant 2 h. Les tests commencent 2 h après l'extinction des lumières et durent 10 h après l'introduction de la femelle réceptive, sous lumière rouge. Les différents événements réalisés par le mâle sont analysés: les latences (temps mis pour réaliser l'événement) de la première montée, thrust (mouvements de va et vient), intromission et éjaculation; la durée totale de l'accouplement, le nombre de thrust, le nombre de montées sans intromissions, le nombre de montées avec intromissions et le rapport d'intromission (nombre de montées avec intromissions sur le nombre total de montées). Les femelles réceptives sont ovariectomisées, implantées avec un implant SILASTIC contenant 50 µg d'œstradiol dans 30 µl d'huile de sésame et injectés en sous-cutané avec 1 mg de progestérone (Sigma-Aldrich) dans 100 µl d'huile de sésame 4-5 heures avant le

début du test. La réceptivité des femelles est vérifiée avec un mâle sexuellement expérimenté, avant le début du test.

Les tests pour les mâles expérimentés sont réalisés avec un intervalle de 14 jours.

Érection comportementale:

Une érection est comptabilisée lorsque la souris mâle est redressée sur ses pattes arrière, la tête baissée pour atteindre son pénis et réalise la toilette de la partie génitale. La latence pour la première érection, le temps passé en érection après chaque montée avec intromission, la fréquence d'érection (nombre de fois que le mâle se trouve en érection après une intromission) et la fréquence des thrusts (nombre de thrusts par seconde pendant l'intromission) au cours de la copulation sont mesurés.

Préférence olfactive:

Le test a lieu dans un Y-maze en plexiglas, sous lumière rouge 2 h après l'extinction des lumières. Les mâles sont préalablement habitués au dispositif vide pendant 5 min, pendant 2 jours consécutifs. Le jour du test, la souris est placée pendant 5 min dans l'Y-maze où il a le choix entre de la litière souillée par des femelles réceptives ou des mâles ou bien entre un mâle ou une femelle réceptive anesthésiés, disposés au bout de chaque bras du dispositif. Le temps passé à renifler chaque bras est compté.

2- Comportement sexuel femelle

Comportement de lordose:

Préparation des animaux à tester. Les souris mâles ont été gonadectomisés. Le test comportemental débute quatre semaines après l'opération. Toutes les souris reçoivent une injection séquentielle en sous-cutanée d'œstradiol (1 µg) et de progestérone (1 mg) dilué dans 100 µl d'huile de sésame, respectivement 48 h et 4 h avant le début du test pour induire la réceptivité. Le test est effectué deux fois à 14 jours d'intervalle.

Test. Des souris mâles C57BL6J, sexuellement expérimentées et présélectionnées pour leur motivation sexuelle, ont été habituées aux cages de test pendant 2 h. La souris à tester (mâle contrôle, mâle mutant ou femelle) est introduite dans la cage du mâle expérimenté. Le test est arrêté au bout de 20 montées reçues ou après 20 min si aucun comportement n'a eu lieu (Kudwa et al., 2005). Le coefficient de lordose (nombre de positions de lordose/ nombre de montées) est calculé pour chaque animal. La position de lordose est déterminée à partir des éléments suivants: les quatre pattes sont au sol; la tête est relevée, le dos arqué et la queue dirigée vers le haut.

LES ARTICLES

Partie I : Implication de l'AR dans l'organisation et l'activation par la testostérone du comportement sexuel mâle

Résumé article 1: The androgen receptor in the nervous system of male mice is required for sexual behavior, but not for partner preference. En préparation

Marie-Luce Clarisse, Raskin Kalina, Monin Marion and Mhaouty-Kodja Sakina

Il est maintenant clairement établi, qu'au cours du développement chez le mâle, la testostérone joue un rôle crucial dans la différenciation sexuelle des circuits neuronaux gouvernant les comportements et fonctions neuroendocrines liés à la reproduction. Elle est également nécessaire à l'activation et au maintien de ces réponses à l'âge adulte. L'expression d'un comportement sexuel mâle complet et efficace dépendent ainsi fortement des effets organisationnels et activationnels de la testostérone dans le système nerveux. Cependant, la testostérone ayant plusieurs voies d'actions possibles, soit en activant le récepteur des androgènes AR ou soit via les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β , l'implication relative de ces différentes voies de signalisation dans les effets centraux de la testostérone reste à préciser. Les études effectuées sur la voie œstrogénique grâce à l'invalidation ubiquitaire de l'aromatase ou du récepteur ER α sont consistantes et suggèrent fortement la prédominance de cette voie dans les effets centraux de la testostérone (Wersinger et al., 1997; Ogawa et al., 2000; Bakker et al., 2002; Kudwa et al., 2005). Concernant l'AR, jusqu'à maintenant les données issues des modèles génétiques ubiquitaires ne permettaient pas de déterminer son rôle dans la régulation par la testostérone des comportements mâles. Cela vient du fait que les animaux Tfm et ARKO ont un phénotype complexe.

Au cours d'une précédente étude, réalisée dans notre laboratoire, des souris mâles invalidées pour l'AR spécifiquement dans le système nerveux ont été générés par mutagenèse conditionnelle. Cette lignée permet d'étudier les fonctions centrales de l'AR, sans interférer avec ses fonctions périphériques. Ces souris mâles AR^{NesCre} obtenues en fond génétique mixte sont de phénotype externe mâle avec un tractus urogénital complet et fonctionnel (Raskin et al., 2009). Les données obtenues à partir de ce nouveau modèle ont permis de montrer l'implication de l'AR dans le rétrocontrôle négatif

exercé par la testostérone sur l'axe HPG et dans la régulation de l'expression du comportement sexuel mâle. En effet, une forte altération de la motivation et de la performance sexuelle a pu être mise en évidence, et ce sans modification de la préférence olfactive et de l'état d'anxiété ou de l'activité locomotrice.

Suite aux résultats obtenus avec les mâles AR^{NesCre}, nous avons croisé en retour la lignée en fond génétique C57BL6J. Les premières études ont été réalisées chez des animaux intacts. Les mâles mutants présentent toujours un poids élevé des vésicules séminales. Les dosages des niveaux circulants de la testostérone ont permis de confirmer que les mâles mutants avaient des taux élevés de testostérone par rapport aux mâles contrôles. Ceci confirme donc que l'AR central participe au rétrocontrôle dans la régulation de l'axe HPG.

Sur le plan comportemental, ils manifestent également des perturbations de la motivation et de la performance du comportement sexuel mâle. Les résultats obtenus sur ces animaux sont présentés dans l'article 3.

Par la suite, nous avons gonadectomisé et supplémenté les mâles contrôles et mutants avec de la testostérone. Ceci nous a permis d'étudier les effets de l'invalidation de l'AR chez des animaux ayant des taux comparables de testostérone, que nous avons contrôlés avec le poids des vésicules séminales et des mesures des taux circulants de testostérone par dosage RIA.

Notre but était de déterminer l'implication de l'AR central dans la régulation par la testostérone de l'expression du comportement sexuel mâle et l'organisation de la POA.

Méthodologie : Dans ce premier article, bientôt soumis, nous avons réalisé des tests de comportement sexuel mâle, avec des mâles naïfs d'une part, puis avec des mâles expérimentés afin d'évaluer la capacité de l'expérience sexuelle à restaurer les déficits comportementaux. Afin d'évaluer la fonctionnalité de la voie de l'œstradiol et vérifier si elle pouvait restaurer le comportement sexuel, nous avons réalisé des tests de comportements sexuels après administration d'œstradiol à la place de la testostérone. Des tests de préférence olfactive ont été menés afin d'évaluer la capacité des mâles à distinguer entre un mâle et une femelle réceptive. Enfin une étude neuroanatomique de la région POA a été menée. Cette région, fortement impliquée dans l'expression du comportement sexuel, présente des populations de neurones TH, kisspeptine et calbindine sexuellement dimorphiques que nous avons quantifié pour les deux génotypes.

Les résultats obtenus montrent qu'à des taux équivalents de testostérone, les mutants présentent un comportement sexuel mâle altéré. En effet, il a été observé une diminution de la motivation caractérisée par des latences élevées pour les différents paramètres de la copulation (montée, thrust, intromission et éjaculation), et une perturbation de la performance illustrée par la diminution du nombre de thrusts et du rapport d'intromissions. Cependant, nous avons constaté moins de variabilité dans le degré d'altération, comparé aux mutants en fond génétique mixte (Raskin et al., 2009). Une diminution du temps passé en érection a été également constatée après chaque intromission témoignant d'une baisse de l'activité érectile. Par ailleurs, le comportement sexuel ne s'améliore pas avec l'expérience chez les mâles mutants contrairement à leurs frères contrôles, alors même que l'expérience améliore leur préférence olfactive. À l'âge adulte, l'administration d'œstradiol seul induit un comportement partiel et incomplet sans différences entre les deux génotypes. Ce qui indique que chez les animaux mutants la voie de l'œstradiol est fonctionnelle mais insuffisante pour compenser l'absence de l'AR.

Sur le plan neuroanatomique, aucune modification du nombre de neurones TH (Figure 24), kisspeptine et calbindine (article 3) n'a été observée

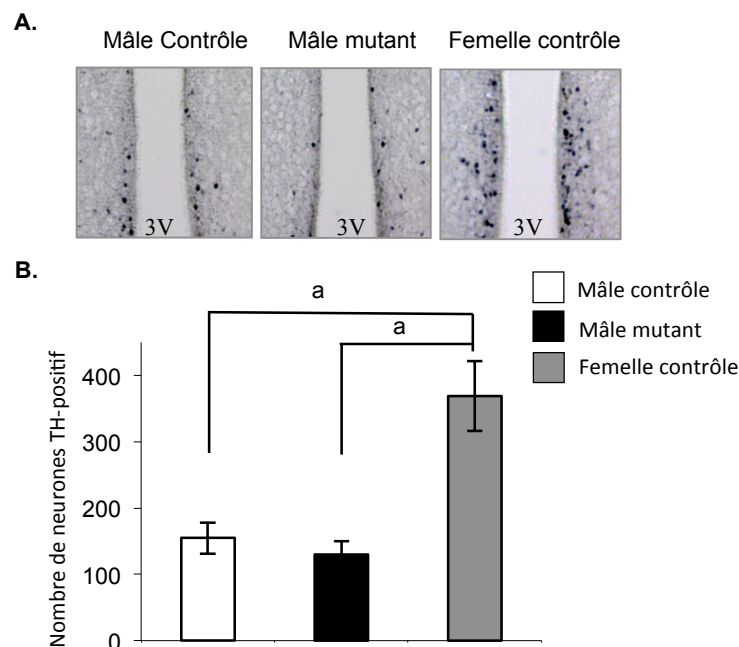


Figure 24 : Quantification des neurones Tyrosine-hydroxylase (TH) dans l'AVPV.

A, Représentation de l'immunomarquage anti-TH dans la région antéroventrale-périvericulaire (AVPV), chez les mâles contrôles et mutants AR^{NesCre} . 3V, troisième ventricule. **B**, Quantification du nombre de neurones, exprimé en valeurs moyennes \pm S.E.M de neurones TH-positif ($n = 4$ par génotype et par sexe) ($^*p < 0.05$).

En conclusion, l'AR dans le système nerveux est nécessaire à l'expression du comportement sexuel mâle; la voie de l'œstradiol n'étant pas suffisante bien que fonctionnelle. En revanche, l'AR n'est pas nécessaire à la préférence olfactive. Ceci indique que les perturbations comportementales proviennent d'un défaut d'intégration du signal en aval du système olfactif. La différenciation sexuelle des populations neuronales hypothalamiques, impliquées dans le comportement sexuel, n'est pas affectée. Cela suggère que l'AR au niveau cérébral n'est pas impliqué dans les effets organisationnels de la testostérone, mais serait plutôt important dans les effets activationnels à l'âge adulte.

ARTICLE 1

Title page

Title: The androgen receptor in the nervous system of male mice is required for sexual behavior, but not for partner preference

Abbreviated title: Nervous system AR is essential for mating

Authors: Clarisse Marie-Luce, Kalina Raskin, Marion Monin and Sakina Mhaouty-Kodja

Corresponding author: Sakina Mhaouty-Kodja

Address: CNRS UMR 7224, Université P. & M. Curie, 9 quai St Bernard Bât A 2ème étage, 75005 Paris CEDEX 05

e.mail: sakina.mhaouty-kodja@snv.jussieu.fr

Acknowledgments

We thank Prof. G Verhoeven for providing the floxed AR mouse line. This work was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université P. & M. Curie (Paris 6)* and a research grant from the ANR (*Agence Nationale de la Recherche*).

Abstract

In the nervous system, testosterone (T) acts directly through androgen receptors (AR) or indirectly, via estrogen, after metabolization into estradiol (E2). We investigated the role of central AR in the T-mediated regulation of male sexual behavior, in a conditional mouse line lacking *AR* in the nervous system, backcrossed onto the C57BL/6J strain. Naive gonadectomized mutant males on T supplementation took longer to mount, thrust, intromit and ejaculate than their control littermates. This higher latency was associated with fewer mountings with intromission, fewer thrusts and less time spent on post-intromission genital grooming. By contrast, E2 supplementation induced partial and incomplete behavior in a similar manner in both genotypes. The estrogenic pathway was therefore functional but insufficient to compensate for the absence of AR in mutant mice. Sexual experience did not restore the behavior of T-supplemented mutant mice, but decreased the time to ejaculation in control males. Instead, latency to first incidence of a particular behavior was greater in mutant mice. However, in olfactory discrimination tasks, sexually experienced males, regardless of genotype, preferred to investigate female-soiled bedding rather than male-soiled bedding and estrus females rather than intact males. This study highlights the role of central AR in the first expression and experience-dependent improvement of sexual behavior. It also indicates that AR is unnecessary for olfactory and partner preference, but possibly required in neural regions located downstream from the olfactory bulb. We discuss these findings in the context of current controversy concerning the role of AR in male mating.

Introduction

Testosterone (T) plays a key role in perinatal organization and adult activation of the neural circuitry involved in the expression of male sexual behavior. In the central nervous system, T acts either directly, by stimulating androgen receptor (AR), or indirectly, through estrogen receptor (ER) activation after aromatization into 17- β estradiol (E2). AR and ERs belong to the nuclear receptor superfamily; they regulate the transcription of target genes (Matsumoto *et al.*, 2003).

Many studies of rodents, and of rats in particular, have shown that E2 generated from T by neural aromatization is an important regulator of male sexual behavior. This has been confirmed by genetic studies in mice lacking either aromatase or ERs (Ogawa *et al.*, 1997; Wersinger *et al.*, 1997; Bakker *et al.*, 2002). By contrast, the role of AR in the expression of male sexual behavior remains a matter of debate. In genetic studies of rats and mice carrying a spontaneous testicular feminization mutation (Tfm) or a mouse line with a ubiquitous AR knockout, AR has been reported to play either a major (Olsen *et al.*, 1979; Sato *et al.*, 2004) or a minor role (Bodo and Rissman, 2007). Furthermore, sexual behavior is limited to mounts and thrusts in these models, as genetic (XY) males have female external genitalia and an undifferentiated urogenital tract.

We re-evaluated the role of central AR in the expression of male sexual behavior, by generating a conditional knockout mouse line lacking *AR* in the nervous system (Raskin *et al.*, 2009). The mutant mice develop male external genitalia and a functional urogenital tract, making it possible to analyze all components of male sexual behavior. Only a small proportion of mutants display full sexual behavior and the latency period to initiation of this behavior and the duration of copulation are longer in mutant than in wild-type mice (Raskin *et al.*, 2009). These alterations were observed in intact mutant males, which had higher T levels than their control littermates. They persisted when T levels were normalized by gonadectomy and hormonal supplementation. A recent study on an identical conditional mouse line reported a weaker effect of *AR* invalidation on masculine behavior (Juntti *et al.*, 2010). These two studies were performed on mice of mixed genetic background. Thus, the effects of *AR* gene disruption

on male sexual behavior may be modified by background strain, as reported for other genes (Dominguez-Salazar *et al.*, 2004; Le Roy *et al.*, 2000).

The principal aim of this study was the analysis of sexual behavior in mice with a nervous system knockout of *AR* backcrossed onto C57BL/6J, a strain widely used in reproductive behavior studies (Burns-Cusato *et al.*, 2004). Sexual behavior was compared between gonadectomized control and mutant males receiving T or E2 supplementation. We then investigated whether mating deficiencies in T-supplemented mutants could be overcome by sexual experience. As mating is induced by olfactory cues in rodents, we investigated whether the disrupted sexual behavior of mutant males could be accounted for by deficiencies in olfactory and partner preference.

Materials and Methods

Animals. AR^{NesCre} mice were initially obtained in a mixed genetic background (C57BL/6J and 129SvEv), by crossing floxed AR mice (De Gendt *et al.*, 2004) and transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of rat nestin (Nes), as previously described (Raskin *et al.*, 2009). This mouse line was backcrossed for at least 9 generations onto the C57BL/6J strain. Mice were weaned at 24-26 days of age and housed in groups in conditions of controlled photoperiod (12 h light/12 h dark cycle - lights on at 7 am) and temperature (22°C), with free access to food and water. Genotyping was performed, as previously described (Raskin *et al.*, 2009).

Adult males (2-3 months of age) were anesthetized with xylazine/ketamine, gonadectomized and implanted with Silastic® tubes containing either 10 mg of T or 5 µg of E2-benzoate (Sigma-Aldrich), as previously described (Raskin *et al.*, 2009). C57BL/6J females were ovariectomized, implanted with Silastic® implants filled with E2-benzoate and subcutaneously treated with progesterone (Sigma-Aldrich) 4-5 h before the tests, to obtain females in estrus, as previously reported (Raskin *et al.*, 2009). Female receptivity was assessed, with sexually experienced males, before the experiments began. All experiments were conducted in accordance with guidelines for care and use of laboratory animals (NIH Guide).

Male sexual behavior. Two weeks after implantation, animals were housed individually. Tests were conducted in Plexiglass cages, under red-light illumination 2 h after lights off. Each naive male was tested in its home cage for 10 h after the introduction of a female in estrus (naive group). Three days later, animals underwent a second trial (experienced group). Male sexual behavior was analyzed by scoring the latencies and frequency of mounts, intromissions, thrusts, ejaculation and genital grooming, as previously described (Raskin *et al.*, 2009).

Olfactory and mate partner preferences. The olfactory and partner preferences of males were assessed before (naive group) and after (experienced group) the first sexual behavior evaluation. Tests were conducted in an enclosed Plexiglas Y-maze, under red-light illumination 2 h after lights off. Mice

were initially allowed to become familiar, for 5 minutes on each of two consecutive days, with the experimental paradigm, but with no stimulus in the goal boxes. On the day of the test, mice were offered the choice between bedding soiled by males or females and between a female in estrus and a male with intact gonads. Male-soiled bedding was obtained from animals placed in a cage with clean bedding 24 h before the test. Female-soiled bedding was obtained from a group of five stimulus females. The time spent sniffing each goal box was scored over the five-minute test. The maze was cleaned with 10% ethanol between trials.

Statistics. Data are expressed as means \pm SEM. Repeated-measurement analyses were carried out by two-way ANOVA for the main effects of genotype and bedding/animal or genotype and test day, respectively, as factors. Bonferroni tests were then performed for *post hoc* comparisons. Non-repeated measurements were analyzed by one-way ANOVA or Student's *t* test for unpaired data. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results

Seminal vesicle weight in intact and gonadectomized hormone-treated males

Seminal vesicles are highly sensitive to androgens and their weight changes with the levels of circulating T. Seminal vesicle weight was significantly higher (+100%) in mutant males than in their control littermates (Fig. 1). This probably reflects higher circulating T concentrations, due to the altered negative feedback exerted by T on the hypothalamus-pituitary-gonad axis, as previously reported in the mixed genetic background (Raskin *et al.*, 2009). Control and mutant males were therefore gonadectomized and supplemented with similar amounts of hormones, to ensure that behavioral analyses were carried out in animals with similar hormone levels. In these conditions, seminal vesicle weight was similar in control and mutant males supplemented with T (Fig. 1). As expected, the weight of seminal vesicles remained very low in E2-supplemented males (Fig. 1).

Copulatory behavior of control and AR^{NesCre} males supplemented with T

All tested control males mounted, performed pelvic thrusts, intromitted and ejaculated, whereas only 82% of AR^{NesCre} males displayed mounting, intromissions and thrusts and only 70% ejaculated. The remaining mutant males did not attempt any type of sexual behavior within the 10 hours of the test. Analyses of mice displaying the full range of sexual behavior showed that the latent periods to mounting, pelvic thrusting, intromission and ejaculation were significantly greater in mutant males than in their control littermates (Fig. 2A). In addition, AR^{NesCre} males displayed fewer mounts with intromissions during mating and a lower intromission ratio, total number of thrusts and thrusting train (Table 1). Mutant males also had more attempts at intromission per mount (Table 1), suggesting that they were unable to maintain intromission during thrusting. Consistent with these data, the total time spent on genital grooming, which reflects erection efficiency, was significantly shorter in AR^{NesCre} mice (Table 1). No difference in the duration of mating was observed between control and mutant males.

E2 induced similar behavior in control and AR^{NesCre} males

The disrupted behavior of AR^{NesCre} mice may result principally from a decrease in the conversion of neural T into E2, as androgens have been shown to regulate aromatase expression (Yamada *et al.*, 1993; Roselli *et al.*, 1997). Alternatively, AR invalidation may interfere with ER expression. We checked the functionality of the ER signaling pathway in the AR^{NesCre} mouse line, by subjecting control and mutant males to gonadectomy and E2 supplementation. All males, regardless of genotype, displayed incomplete sexual behavior, as they did not ejaculate during the 10 hours of the test. The latencies to first mounting, thrusting and intromission (Fig. 2B) and the total numbers of mounts (152 ± 44 and 139 ± 72 for controls and mutants, respectively) and thrusts (720 ± 176 and 761 ± 200 for controls and mutants, respectively) did not differ significantly between control and AR^{NesCre} males.

Sexual behavior was enhanced by sexual experience in control, but not in mutant males

Sexual experience improves mating efficiency, as it reduces the time to initiation of sexual contact and the amount of stimulation required for ejaculation (Pfeiffer and Johnston, 1994). We investigated whether experience could restore the sexual behavior of mutant males, by subjecting T-supplemented animals to a second test of sexual behavior. In these conditions, all control males displayed complete sexual behavior with a significantly shorter time to ejaculation (Fig. 2A). In addition, the number of mounts with intromissions and the time spent in genital grooming were also decreased, whereas the thrusting train increased (Table 1). By contrast, the percentage of mutant males displaying sexual behavior decreased to 70% for mounts and 41% for thrusts and intromissions. Only 35% of mutant males ejaculated and those displaying no attempt at sexual behavior in the first test did not mate in the second test either. Moreover, the latencies to thrusting, intromission and ejaculation were significantly longer than those in the first test (Fig. 2A). This opposite pattern in behavior changes between mutant and control males resulted in a large difference in the mean duration of mating (Table 1).

Sexual experience enhanced olfactory/partner preference in both control and mutant males

We investigated whether the disrupted sexual behavior of AR^{NesCre} mice could be explained by a deficiency in olfactory and partner preference. We investigated the chemoinvestigatory behavior of control and mutant mice, by studying their preferences for male-soiled or female-soiled bedding and

for an intact male or a female in estrus. Time spent sniffing the bedding or stimulus was determined and is expressed as a percentage of the total time devoted to chemoinvestigation. The total time devoted to chemoinvestigation did not differ significantly between males, regardless of genotype or experience state (- 90 s). Naïve males of the two genotypes displayed no behavioral discrimination, as they spent similar amounts of time investigating male and female targets (Fig. 3). By contrast, sexually experienced males showed a preference for female-soiled bedding and females in estrus over male-soiled bedding and intact males, respectively (Fig. 3A, B). There were no significant differences between the two genotypes in the time spent investigating male or female pheromones (Fig. 3A, B).

Discussion

A role for ER signaling pathways in the regulation of male sexual behavior by T is largely accepted. However, the role of AR in male sexual behavior remains a matter of debate. We show here that nervous system AR is required for the initiation and maintenance of sexual behavior in male C57BL/6J mice.

By comparison to our previous data for mice of mixed genetic background (Raskin *et al.*, 2009), a higher percentage of T-supplemented AR^{NesCre} males of the C57BL/6J strain initiated mating (82% *versus* 60%) and reached ejaculation (70% *versus* 33%). Nevertheless, sexual motivation and performance were still altered by AR invalidation, as demonstrated by the longer latencies to first sexual behavior and the smaller numbers of intromissions, thrusts and erectile behavioral activity. Similar disruptions were seen in gonadally intact mutant males (data not shown). Thus, AR disruption in the nervous system clearly interferes with the sexual behavior of C57BL/6J mice.

The significant decrease in mating behavior, but not its total abolition, following AR invalidation suggests that the ER signaling pathway was functional in AR^{NesCre} mice. This was confirmed by the demonstration that E2 induced a similar pattern of mating in control and AR^{NesCre} males, a finding consistent with the normal numbers of ER α -immunoreactive cells in the various neural regions involved in the expression of sexual behavior (Raskin *et al.*, 2009). Although functional, ER signaling was not sufficient to compensate for the absence of AR, as demonstrated by the partial restoration of sexual behavior in E2-supplemented males. The lack of ejaculation of E2-supplemented males must be due, at least partly, to a specific requirement for AR stimulation by androgens at spinal and peripheral sites involved in erection and ejaculation.

These findings are in consistent with published data showing that a complete recovery of sexual behavior requires stimulation of both the AR and ER signaling pathways in rat (Cooke *et al.*, 2003) and BALB/c AnN mice (Arteaga-Silva *et al.*, 1997; Bodo *et al.*, 2004) also found no differences in mounting and thrusting behavior between E2-supplemented wild-type and Tfm mice in the C57BL/6J strain, and concluded that AR was not essential for sexual behavior. These findings could be re-

interpreted in light of the results of this study comparing the effects of both T and E2 in a pertinent model in which all components of male sexual behavior can be tested.

We also found that the low level of motivation of AR^{NesCre} males had little to do with their olfactory and partner preference, because sexually experienced mutant males showed a preference for female chemosignals similar to that of their control littermates. These findings conflict with those of previous studies on mice in the same C57BL/6J background. Wild-type females treated with the nonaromatizable 5- α -dihydrotestosterone (DHT) at birth displayed a male-typical preference (Bodo and Rissman, 2008) and Tfm mice displayed female-typical preference behaviors (Bodo and Rissman, 2007). It has been shown since these studies that DHT does not exclusively activate AR, as it can be metabolized to 5 α -androstane-3 β , which binds ERs (Handa *et al.*, 2008). It is thus possible that the activation of this pathway contributed, at least partly, to the reported DHT-induced expression of male-typical behavior in adult females. Indeed, studies of mice with knockouts of aromatase (Bakker *et al.*, 2002) and ER α (Wersinger and Rissman, 2000) have clearly demonstrated the masculinizing effect of E2 and its receptor on olfactory and partner preference. Moreover, in line with our data, Tfm rats have been reported to display a masculinized partner preference (Hamson *et al.*, 2009). These differences between AR^{NesCre} mice and Tfm rats on the one hand, and Tfm mice on the other, may reflect differences in circulating T concentrations and, thus, in the amount of E2 derived from the neural aromatization of T that the developing brain is exposed to in these models. AR^{NesCre} males have high levels of circulating T (Raskin *et al.*, 2009, this study) and Tfm rats were found to have circulating T levels in the high male range (Roselli *et al.*, 1987). By contrast, the testicular feminization mutation in mice reduces androgen levels. If this decline occurs during the critical postnatal or pubertal periods of brain sensitivity to T, it could interfere with the E2-induced sexual differentiation of the olfactory system.

Sexual experience did not restore the mating behavior of mutant males, but it did reinforce their olfactory and partner preferences for female chemosignals. In similar conditions, sexual experience enhanced both the sexual behavior and partner preference of control mice, as previously reported in rodents (Swaney *et al.*, 2007). This indicates that AR is required in neuronal regions located downstream from the olfactory bulb (medial amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, medial preoptic nucleus), to trigger sexual behavior. The observation of even poorer sexual behavior in sexually experienced mutant males, as demonstrated by the longer latencies and duration of mating, suggests that the lack of AR in the nervous system interferes not only with the expression of sexual behavior, but also with the adaptive processes enabling male mice to improve their sexual behavior between two consecutive tests. The mechanisms underlying these experience-dependent changes in behavior remain unknown. However, recent data for rats indicate that sexual activity triggers changes in AR and ER expression in the neural circuitry (medial amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, medial preoptic nucleus) involved in the expression of sexual behavior (Fernandez-Guasti *et al.*, 2003; 2010).

In conclusion, the data presented here provide evidence that the central AR signaling pathway is essential for the first expression and experience-dependent refinement of sexual behavior. However, this signaling is not required for the masculinization and/or activation of olfactory/partner preference. A comparison of our data with those obtained in mice deficient in aromatase or in ER α in the same C57BL/6J background strongly suggests that the estrogenic pathway plays a key role in the olfactory bulb, whereas both AR and ER signaling pathways are required in chemosensitive areas located downstream from the olfactory bulb to trigger sexual behavior. Our data also highlight the similarity between male mice and rats in terms of the role played by AR in partner preference and copulation. In this context, the conditional genetic model studied here provides a unique opportunity to improve our understanding of the contribution of AR to the T-induced regulation of both the motivational and consummatory components of male sexual behavior.

References

- Arteaga-Silva M, Rodriguez-Dorantes M, Baig S, Morales-Montor J (2007) Effects of castration and hormone replacement on male sexual behavior and pattern of expression in the brain of sex-steroid receptors in BALB/c AnN mice. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147:607-615.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2002) Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm Behav* 42:158-171.
- Bodo C, Rissman EF (2007) Androgen receptor is essential for sexual differentiation of responses to olfactory cues in mice. *Eur J Neurosci* 25:2182-2190.
- Bodo C, Rissman EF (2008) The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinol* 149: 4142-4150.
- Burns-Cusato M, Scordalakes EM, Rissman EF (2004) Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol Behav* 83:217-232.
- Cooke BM, Breedlove SM, Jordan CL (2003) Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm Behav* 43:336-346.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1327-32
- Dominguez-Salazar E, Bateman HL, Rissman EF (2004) Background matters: the effects of estrogen receptor α gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. *Horm Behav* 46:482-490.
- Fernandez-Guasti A, Areteaga-Lopez P, Antonio-Cabrera (2010) Copulation modifies AR and ER α mRNA expression in the male rat brain. *Physiol Behav* 101:738-745.
- Fernandez-Guasti A, Swaab D, Rodriguez-Manzo G (2003) Sexual behavior reduces hypothalamic androgen receptor immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 28: 501-512.

- Handa RJ, Pak TR, Kudwa AE, Lund TD, Hinds L (2008) An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Horm Behav* 53:741-752.
- Hamson DK, Csupity AS, Ali FM, Watson NV (2009) Partner preference and mount latency are masculinized in androgen insensitive rats. *Physiol Behav* 98:25-30.
- Juntti SA, Tollkuhn J, Wu MV, Fraser EJ, Soderborg T, Tan S, Honda S, Harada N, Shah NM (2010) The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron* 66:260-272.
- Le Roy I, Pothion S, Mortaud S, Chabert C, Nicolas L, Cherfouh A, Roubertoux PL (2000) Loss of aggression, after transfer onto a C57BL/6J background, in mice carrying a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Behav Genet* 30:367-373.
- Lyon MF, Hawkes SG (1970) X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227:1217-1219.
- Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato Sb (2003) Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:95-99.
- Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1997) Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1476-1481.
- Olsen KL (1979) Induction of male mating behavior in androgen-insensitive (tfm) and normal (King-Holtzman) male rats: effect of testosterone propionate, estradiol benzoate, and dihydrotestosterone. *Horm Behav* 13:66-84.
- Ono S, Geller LN, Lai EV (1974) Tfm mutation and masculinization versus feminization of the mouse central nervous system. *Cell* 3:235-242.
- Pfeiffer CA, Johnston RE (1994) Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiol. Behav* 55:129-138.
- Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, Tronche F, Mhaouty-Kodja S (2009) Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci* 29:4461-4470.

- Roselli CE, Salisbury, RL., Resko, JA. (1987) Genetic evidence for androgen-dependent and independent control of aromatase activity in the rat brain. *Endocrinol* 121:2205-2210.
- Roselli CE, Abdelgadir SE, Resko JA (1997) Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Res Bull* 44:351–357.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., et al. (2004). Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1673–1678.
- Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL (2009) Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* 55:597-604.
- Scordalakes EM, Rissman EF (2004) Aggression and arginine vasopressin immunoreactivity regulation by androgen receptor and estrogen receptor alpha. *Genes Brain Behav* 3:20-26.
- Swaney TW, Curley JP, Champagne FA, Keverne EB (2007) Genomic imprinting mediates sexual experience-dependent olfactory learning in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6084-6089.
- Wersinger SR, Sannen K, Villalba C, Lubahn DB, Rissman EF, De Vries GJ (1997) Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. *Horm Behav* 32:176-183.
- Wersinger SR, Rissman EF (2000) Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemoinvestigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J Neuroendocrinol* 12:103-110.
- Yamada K, Harada N, Tamaru M, Takagi Y (1993) Effects of changes in gonadal hormones on the amount of aromatase messengerRNA in mouse brain diencephalon. *Biochem Biophys Res Commun* 195:462– 468.

Figure Legends

Figure 1. Seminal vesicle weight in intact and gonadectomized (GDX) control and mutant males supplemented with testosterone (T) or estradiol (E2). Mean values \pm SEM, expressed as a percentage of body weight, are shown for 12 males per genotype, ^a $p < 0.05$ vs control males.

Figure 2. Latencies to the first sexual behavior of control and mutant mice. **A**, Latencies to mounting (M), thrusting (Th), intromission (I) and ejaculation (E) in testosterone (T)-supplemented sexually naive and experienced male mice displaying complete sexual behavior in the first test (n = 12-14). There was a significant effect of genotype for M ($F_{(1,25)} = 20.83, p = 0.0001$), Th ($F_{(1,25)} = 26.5, p < 0.0001$), I ($F_{(1,25)} = 26.28, p < 0.0001$) and E ($F_{(1,25)} = 26.9, p < 0.0001$), and of experience for Th ($F_{(1,25)} = 7.5, p = 0.011$), I ($F_{(1,25)} = 6.2, p = 0.020$) and E ($F_{(1,25)} = 6.3, p = 0.019$). *Post hoc* analysis showed a lower latency to ejaculation in controls (^a $p < 0.05$) and a higher latency to thrusting, intromission and ejaculation in mutants (^b $p < 0.05$). **B**, Mean values \pm SEM for sexually naive control and mutant males (n= 8 per genotype) supplemented with estradiol (E2).

Figure 3. Olfactory preference of sexually naive and experienced (Exp) males supplemented with testosterone. **A**, Time spent chemoinvestigating male-soiled or female-soiled-bedding (n = 12 per genotype). A significant effect of bedding ($F_{(1,28)} = 15.14, p = 0.0006$), but not of genotype, was found for sexually experienced mice; *post hoc* analysis showed differences in the time spent sniffing male vs female arms of the maze (^a $p < 0.05$). **B**, Time spent chemoinvestigating gonad-intact males or females in estrus (n = 12 per genotype). A significant effect of stimulus ($F_{(1,36)} = 40.8, p < 0.0001$), but not of genotype, was found for sexually experienced animals; *post hoc* analysis showed differences in the time spent sniffing male vs female arms of the maze (^a $p < 0.05$).

Table Legend

Table 1. Quantification of the sexual behavior displayed by naive and sexually experienced males supplemented with testosterone. The mean values \pm SEM for 14 control and 6 AR^{NesCre} males displaying complete sexual behavior in the two tests are shown. There was a significant effect of genotype for MI number ($F_{(1,18)} = 4.5, p = 0.047$), intromission ratio ($F_{(1,18)} = 12.3, p = 0.002$), thrusts ($F_{(1,18)} = 8.5, p = 0.009$), thrusting train ($F_{(1,18)} = 28.1, p < 0.0001$), intromissive episodes per MI ($F_{(1,18)} = 9.65, p < 0.01$), genital grooming ($F_{(1,18)} = 9.0, p = 0.008$) and mating duration ($F_{(1,18)} = 8.8, p = 0.007$). An effect of experience was found for MI number ($F_{(1,18)} = 6.5, p = 0.020$) and thrusting train ($F_{(1,18)} = 17.5, p = 0.0006$). ^a $p < 0.05$ vs control males; ^b $p < 0.05$ vs naive males.

Table 1

	Naive		Experienced	
	Controls	AR ^{NesCre}	Controls	AR ^{NesCre}
Number of Mounts without intromissions (M)	20.0 ± 8.7	15.5 ± 2.8	8.4 ± 2.6	11.7 ± 4.5
Number of Mounts with intromissions (MI)	46.4 ± 5.5	22.7 ± 10.3 ^a	25.2 ± 4.4 ^b	17.0 ± 3.7
Intromission ratio (MI/M+MI)	78.6 ± 3.7	52.0 ± 5.8 ^a	79.3 ± 3.6	69.0 ± 9.2
Number of Thrusts	734.0 ± 41.0	299.0 ± 92.0 ^a	617.0 ± 79.0	454.0 ± 115.0
Thrusting train (Hz)	1.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.1 ^a
Intromissive episodes per MI	1.6 ± 0.2	2.6 ± 0.5 ^a	1.8 ± 0.2	3.1 ± 0.4 ^a
Genital grooming (% ML)	17.0 ± 0.7	9.5 ± 1.1 ^a	12.5 ± 1.6 ^b	9.6 ± 3.5
Mating duration (ML) (min)	41.0 ± 4.0	57.0 ± 9.1	27.0 ± 5.0	173.0 ± 65.2 ^{ab}

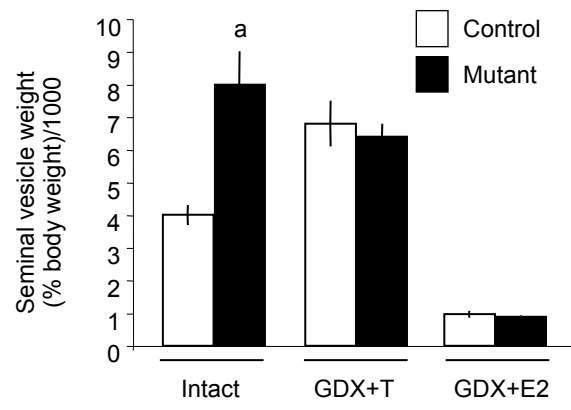


Figure 1.

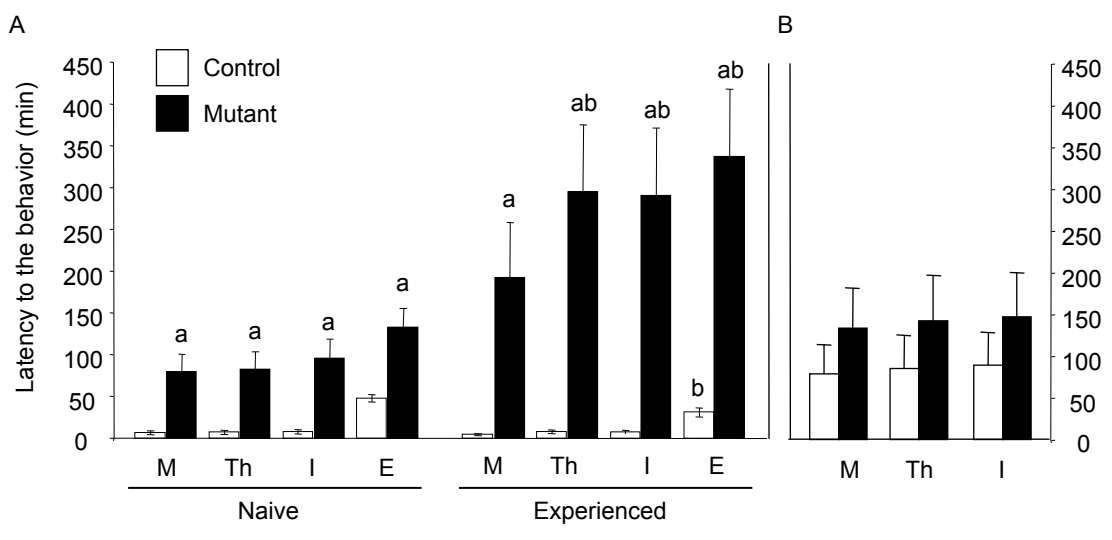


Figure 2.

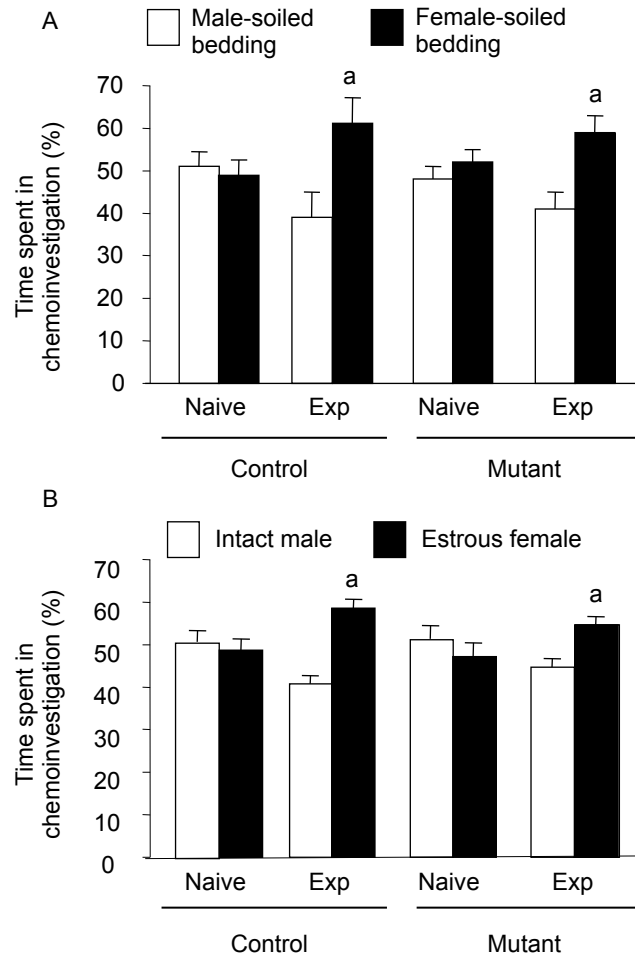


Figure 3.

ARTICLE 2

Résumé article 2 : Characterization of the spinal nucleus of the bulbocavernosus neuromuscular system in male mice lacking androgen receptor in the nervous system.

*Raskin Kalina**, **Marie-Luce Clarisse***, *Picot Marie, Bernard Véronique, Mailly Philippe, Hardin-Pouzet Hélène, Tronche François, Mhaouty-Kodja Sakina*

* Contributed equally to this work

L'altération de la performance sexuelle et l'hypofertilité chez les mâles mutants, nous a conduit à nous intéresser au système neuromusculaire assurant la contraction des muscles du périnée. En effet, la performance copulatoire dépend directement de la fonction érectile. Les muscles périnéaux bulbocaverneux (BC) et levator ani (LA) sont attachés à la base du pénis, et leur contraction participe au maintien de l'érection et à l'émission de l'éjaculat chez le rat et la souris. Ces muscles sont innervés par une population de motoneurones sexuellement dimorphique regroupée dans le noyau spinal bulbocaverneux (NSB) situé dans le segment L5-S1 dans la moelle épinière. Ce système neuromusculaire est l'un des modèles les plus étudiés pour sa sensibilité aux hormones stéroïdes sexuelles. Les motoneurones du NSB sont plus nombreux, ont un soma plus large et ont une arborisation dendritique plus importante chez le rongeur mâle que la femelle. La différenciation sexuelle au cours du développement et l'activation de ce noyau à l'âge adulte sont induits par la testostérone via l'AR. Or l'AR est à la fois exprimé dans le muscle BC et dans le NSB (Fishman et al., 1990; Jordan et al., 1997). Le traitement prénatal des muscles BC-LA avec du flutamide, un antagoniste de l'AR, bloque la masculinisation des motoneurones chez le rat mâle (Breedlove et Arnold, 1983). Or, la surexpression de l'AR humain dans les fibres musculaires de rat Tfm ne suffit pas à restaurer la masculinisation du NSB (Niel et al., 2009). De ce fait, persiste la question concernant l'implication de l'AR musculaire *versus* spinal dans l'organisation du nombre de motoneurone dans le NSB.

Notre but était de déterminer la contribution relative de l'AR au niveau central dans l'organisation et l'activation du NSB par la testostérone. Notre lignée de souris AR^{NesCre} est un très bon outil permettant de répondre à cette question.

Méthodologie : Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'invalidation était spécifique à la moelle épinière sans affecter l'expression de l'AR au niveau musculaire. Une analyse du nombre, de la taille et de l'arborisation dendritique des motoneurones

du NSB a été menée en utilisant deux techniques. Tout d’abord, l’immunomarquage avec un anticorps spécifique des motoneurones, mais qui ne différencie pas entre les motoneurones innervant le sphincter anal externe et les muscles périnéaux BC/LA. Ensuite, le marquage rétrograde afin de quantifier spécifiquement les motoneurones innervant les muscles BC/LA. Deux groupes d’animaux ont été testés : un groupe de mâles contrôles et mutants castrés et supplémentés avec de la testostérone et un groupe de mâles contrôles et mutants castrés uniquement afin de différencier entre les régulations organisationnelles et activationnelles de la testostérone.

Les résultats obtenus montrent que les mâles mutants présentent un poids des muscles BC/LA inchangé et des jonctions neuromusculaires acetylcholine nicotinic receptor (AChR) identiques à celles des mâles contrôles. Une diminution de la masse musculaire BC/LA a été observée pour les deux génotypes après castration à l’âge adulte indiquant que l’invalidation de l’AR dans le système nerveux ne perturbe pas le développement et la sensibilité du BC à la testostérone. L’AR central n’est pas nécessaire à la différenciation en nombre, les mâles mutants ayant le même nombre de motoneurones dans le NSB que les mâles contrôles. En revanche, nous avons constaté une taille des motoneurones diminuée pour le groupe d’animaux castrés, mais également pour le groupe d’animaux supplémentés en testostérone. La comparaison de ces différences entre les génotypes et les traitements révèle un rôle de l’AR central dans la différenciation de la taille en période périnatale et dans son maintien à l’âge adulte. De la même façon, une réduction de l’arborisation dendritique des motoneurones dans le NSB a été observée pour le groupe de mâles mutants castrés, ainsi que pour les animaux supplémentés en testostérone, révélant le rôle de l’AR central dans l’organisation de l’arborisation dendritique.

En conclusion, aucune perturbation dans l’organisation en nombre de motoneurone dans le NSB n’a pu être observée chez les mâles mutants. Ceci indique que l’AR musculaire et non l’AR spinal est impliqué dans l’organisation périnatale en nombre de motoneurone, comme cela avait été suggéré chez le rat. En revanche, nous avons constaté une diminution de la taille et l’arborisation dendritique des motoneurones du NSB. Ainsi, notre modèle permet de montrer pour la première fois que l’AR spinal joue un rôle dans l’organisation de la taille et l’arborisation dendritique au cours du développement, ainsi qu’au maintien de la taille du soma à l’âge adulte. L’arborisation

dendritique semble être maintenue indirectement par la testostérone à travers l'AR au niveau des muscles BC/LA à l'âge adulte.

Characterization of the Spinal Nucleus of the Bulbocavernosus Neuromuscular System in Male Mice Lacking Androgen Receptor in the Nervous System

Kalina Raskin,* Clarisse Marie-Luce,* Marie Picot, Véronique Bernard, Philippe Mailly, Hélène Hardin-Pouzet, François Tronche, and Sakina Mhaouty-Kodja

Centre National de la Recherche Scientifique (R.K., M.-L.C., P.M., B.V., M.P., H.-P.H., T.F., M.-K.S.), Unité Mixte de Recherche 7224 and Université Pierre et Marie Curie (R.K., M.-L.C., P.M., B.V., M.P., H.-P.H., T.F., M.-K.S.), Departments of Behaviors and Neuroendocrinology of Reproduction (R.K., M.-L.C., P.M., H.-P.H., M.-K.S.), Glutamatergic Transmission in Normal and Pathological Conditions (B.V.), and Molecular Genetics, Neurophysiology, and Behavior (T.F.), 75005 Paris, France

Motoneurons in the spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) and their target bulbocavernosus (BC) and levator ani (LA) muscles play a role in male copulation and fertility. Testosterone (T) induces sexual differentiation of this SNB neuromuscular system during development and maintains its activation in adulthood. In the rat, T-induced effects mostly involve the androgen receptor (AR). However, the role of central AR in T-induced effects remains to be studied with pertinent genetic models. We addressed this question by using specific motoneuron immunolabeling and retrograde tracing in mice selectively disrupted for *AR* in the nervous system. This work reveals that nervous system AR is not required either for T-induced development of BC-LA muscles and perinatal sparing of SNB motoneurons from atrophy or for adult sensitivity of BC-LA muscles to T. By contrast, loss of *AR* expression in the nervous system resulted in SNB motoneurons having smaller somata and shorter dendrites than controls. We studied the effects of adult castration and T supplementation on SNB cell morphology in control and mutant males; these experiments showed that central AR is involved in the developmental regulation of soma size and dendritic length and in the adult maintenance of soma size of SNB motoneurons. T seemed to act indirectly through BC-LA muscles to maintain dendritic length in adulthood. Our results also suggest that central AR functions may contribute to normal activity of SNB motoneurons and perineal muscles because mutant mice displayed diminished copulatory behavior and fertility. (*Endocrinology* 153: 3376–3385, 2012)

The spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) neuromuscular system is one of the most extensively studied models of sex hormone-dependent regulation of neuronal morphology and function. SNB motoneurons in the lower lumbar segment of the spinal cord innervate the striated bulbocavernosus (BC) and levator ani (LA) muscles and the external anal sphincter. Perineal BC-LA muscles, attached to the penis base, contribute to penile erection and sperm emission in rat and mouse (1, 2). SNB motoneurons are more numerous and have larger soma and more extensive dendritic arborization in rodent males

than females (3–5). Also, BC-LA muscles involute during the first postnatal week in the female rat (6).

Testosterone (T) acts during development to organize the SNB neuromuscular system permanently and in adulthood to activate it transiently. In rat, the survival of SNB motoneurons and target BC-LA muscles requires perinatal T. T also contributes to determining soma size (3, 7) and dendritic length (5). In adulthood, motoneuron soma size, dendritic arborization, and BC-LA muscle mass are all lower in castrated than control rats (8, 9), indicating that SNB motoneurons and their target muscles remain sensi-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2012-1001 Received December 31, 2011. Accepted April 26, 2012.
First Published Online May 14, 2012

* R.K. and M.-L.C. contributed equally to this work.

Abbreviations: AchR, Acetylcholine nicotinic receptor; AR, androgen receptor; BC, bulbocavernosus; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; α -BTX, α -bungarotoxin; CT, cholera toxin; HRP, horseradish peroxidase; LA, levator ani; Nes, nestin; NMJ, neuromuscular junction; PFA, paraformaldehyde; RDLN, retrodorsolateral nucleus; SNB, spinal nucleus of the bulbocavernosus; T, testosterone; Tfm, testicular feminization mutation.

tive to T. In mice, similar developmental effects of T on the number and soma size of SNB motoneurons have been described. However, the regulatory effects of T seem to depend on the genetic background (10–12).

The mechanisms underlying the effects of T have been studied only in the rat. Male rats carrying a testicular feminization mutation (Tfm), a ubiquitous mutation that causes androgen insensitivity, or treated perinatally with an androgen receptor (AR) antagonist have a feminine SNB system (7, 8). SNB motoneurons and BC-LA muscles express AR (13) and thus both are potential sites of T action. It has been suggested that T operates indirectly in the neuromuscular periphery to spare motoneurons through AR (14, 15) and influence SNB dendritic length through estrogens (16, 17) during development and also to regulate dendritic length in adulthood by binding to AR (18). SNB motoneuron AR was reported to play a role only in adult regulation of soma size (19).

We report the first investigation in mice of the involvement of central AR in T-induced regulation of the SNB neuromuscular system. We used transgenic mice in which AR is selectively disrupted in the nervous system (20). Unlike Tfm animals, conditional mutant mice develop male external genitalia and functional urogenital tract (20). First, we compared spinal and muscular AR expression, BC-LA weight, and the junctional acetylcholine nicotinic receptor (AChR) area between control and mutant males backcrossed into C57BL6J strain. We then studied the number, soma size, and dendritic length of SNB motoneurons by immunohistochemistry and retrograde tracing in castrated males with and without T administration. Finally, we compared copulatory behavior and fertility between control and mutant males.

Materials and Methods

Animals and genotyping

Control males with a floxed AR allele (AR^{f/Y}) and their mutant littermates (AR^{f/Y}, Nes-Cre; AR^{NesCre}) expressing Cre recombinase under the control of the promoter and the nervous system enhancer of nestin (*Nes*) gene were obtained as previously described (20). The AR^{NesCre} mouse line was then backcrossed for at least nine generations into strain C57BL6J. Control and mutant males obtained in the same litters were weaned at 24–26 d of age and group housed under a controlled photoperiod (12 h light, 12 h dark cycle; lights on at 0700 h) and temperature (22 C) and given free access to food and water. The Cre transgene and floxed or excised AR alleles were identified by PCR analysis as previously described (20, 21). All studies were performed in accordance with the guidelines for care and use of Laboratory animals [National Institutes of Health (NIH) Guide] and French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC).

Gonadectomy and T supplementation

Adult control and mutant males (8–10 wk of age) were castrated under general anesthesia (xylazine/ketamine). At the time of castration, all males received 1 cm sc SILASTIC implants (3.18 mm outer diameter × 1.98 mm inner diameter; Dow Corning, Midland, MI), either empty or filled with 10 mg of T (Sigma-Aldrich, St.-Quentin Fallavier, France), and sealed at each end with SILASTIC adhesive. Animals were killed five weeks later.

Circulating levels of T were measured, as previously described (20), in both castrated/T-supplemented males and intact mice ($n = 8$ males per genotype and treatment). In the castrated/T-supplemented group, T was in the high physiological range and similar between controls (8.8 ± 0.31 ng/ml) and mutants (9 ± 1.8 ng/ml) by comparison with the intact group (2 ± 0.5 ng/ml for controls and 6.5 ± 1.6 ng/ml for mutants, $P < 0.05$).

Western blot analysis

Spinal cord (L5-S1 region) and BC-LA muscles were dissected and stored at -80 C. Tissues were homogenized in buffer (2% sodium dodecyl sulfate; 50 mM dithiothreitol; 62.5 mM Tris, pH 6.8; 10% glycerol) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Samples were then centrifuged at $7500 \times g$ for 10 min at 4 C. Supernatants were collected and protein concentrations were determined using a Bradford assay (22). Samples were boiled for 5 min, and aliquots of 15 μ g were then run on 10% polyacrylamide precast gels (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The proteins were transferred onto nitrocellulose membrane. The resulting blot was probed with polyclonal antibody directed against AR (diluted 1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or antiactin antibody (1:5000; Sigma-Aldrich) and then with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000; Amersham Bioscience, Saclay, France). Bound antibody was visualized by using a Super Signal detection kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) or an ECL Plus detection kit (GE Healthcare, Hatfield, UK). Signals were quantified with ImageJ software (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD), and AR immunoreactivity was normalized to respective actin.

Neuromuscular junction (NMJ) labeling

Mice were perfused transcardially with 2% paraformaldehyde (PFA). BC muscle was dissected out and fixed overnight in 2% PFA. Bundles of 20 muscle fibers were teased out, and treated free-floating. NMJ were identified by the presence of AChR as revealed by α -bungarotoxin (α -BTX) coupled to Alexa 488 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Briefly, after perfusion-fixation, muscle fibers were incubated in Alexa 488-coupled α -BTX (30 nM) for 1 h, washed in PBS, and mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). An apotome microscope (Carl Zeiss France, S.A.S., France) was used to observe NMJ at $\times 63$, and ImageJ software (NIH) was used to measure the area and size of α -BTX-labeled NMJ. Eight to 14 NMJ were analyzed per animal.

Immunohistochemistry for AR and SMI-32

Animals were killed and transcardially perfused with a solution of 4% PFA in phosphate buffer. To study nonphosphorylated antineurofilament H (SMI-32) immunoreactivity, spinal cords (L5-S1 region) were postfixed overnight in 4% PFA, sliced into 30- μ m coronal sections on a Vibratome (Leica, Nanterre, France) and directly mounted on Superfrost Plus slides (Thermo

Scientific, Leuven, Belgium). The spinal sections were rehydrated and heated for 5 min in 0.01 M citrate buffer (pH 6) in a microwave oven for antigen retrieval and then probed for SMI-32 immunoreactivity.

Spinal cords tested for AR immunoreactivity were postfixed for 15 min and transferred to 18% sucrose overnight. They were then cryomounted, sliced into 30- μ m coronal sections using a cryotome (Leica CM 300), directly mounted on superfrost slides, and stored at -20°C before analysis.

The sections were rinsed in Tris-buffered saline or PBS, treated with 3% H_2O_2 for 30 min, and then blocked for 2 h with 5% normal goat serum (Sigma-Aldrich) in Tris-buffered saline/0.1% Triton X-100. They were incubated at 4°C for 48 h with rabbit anti-AR (Santa Cruz Biotechnology), diluted 1:200 or overnight with mouse anti-SMI-32 (Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD), and diluted 1:1000. The samples were then incubated with biotinylated goat antirabbit (1:400; Vector Laboratories) or antimouse (1:1000) antibody for 2 h. Bound antibodies were visualized by 1 h incubation with the biotin-streptavidin complex reagent (avidin biotin complex kit; Vector Laboratories), followed by color development with the chromogenic substrate, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich).

Retrograde labeling

To label retrogradely SNB motoneurons innervating the BC muscle, we used the cholera toxin (CT) B subunit conjugated to horseradish peroxidase (HRP; List Biological Laboratories, Charlotte, NC) as previously described (11, 12). The morphology of the retrolabeled SNB motoneurons (number, size, and dendritic arbor) was analyzed 5 wk after castration or castration plus T supplementation. Control and mutant males were anesthetized with xylazine/ketamine, and the right side of their BC muscle was exposed and injected with CT-HRP (0.2% in 1.5 μ l per injection); the ventral surface of the left foot was similarly injected with CT-HRP (0.2% in 1 μ l per injection) to label retrogradely the retrodorsolateral nucleus (RDLN).

Forty-eight hours after injection, animals were given an overdose of pentobarbital and were perfused transcardially with saline solution followed by cold 1% PFA/1.25% glutaraldehyde. Lumbo-sacral portions of the spinal cord were dissected out and postfixed in the same solution for 5 h at 4°C . Tissues were then transferred to low melting-point agarose (4%) and sliced into 40- μ m coronal sections on a Vibratome (Leica). All sections were collected in order and incubated with tetramethylbenzidine for histological visualization of HRP according to Mesulam (23). Sections were then mounted onto gelatin-coated slides.

Cell counts and morphological analysis

Stained lumbo-sacral motoneurons in the SNB and RDLN were counted bilaterally on all sections using a high-resolution Nanozoomer Hamamatsu scanner (Hamamatsu Corp., Massy, France) at $\times 20$ (0.46 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). Only those motoneurons in which the nucleus was visible were included in SMI-32 counts. On each section, the size of the SNB soma was measured and all CT-HRP-labeled fibers were drawn using ImageJ software (NIH) (24). The mean dendritic length per SNB cell was calculated as the ratio of the total dendritic length to the total number of SNB soma.

Copulatory behavior

Animals castrated and supplemented with T were housed individually. Tests were conducted in Plexiglass cages, under red-light illumination 2 h after lights off. Each naive male was tested in its home cage for 10 h after the introduction of an estrus female. Male sexual behavior was analyzed by scoring the frequency of mounts, intromissions, thrusts, ejaculation and genital grooming, as previously described (20). Estrus C57BL6J females were ovariectomized, implanted with SILASTIC implants (Dow Corning) filled with estradiol-benzoate (Sigma-Aldrich) and sc treated with progesterone (Sigma-Aldrich) 4–5 h before the tests, as previously reported (20). Female receptivity was assessed, with sexually experienced males, before the experiments began.

Fertility study

Two-months-old males were mated with C57BL6J females for a period of 4 months. The total number of pups per male was recorded at birth.

Statistics

Data are expressed as means \pm SEM. Two-way ANOVA was used to analyze the main effects of genotype and treatment with Bonferroni tests for *post hoc* comparisons. One-way ANOVA or Student's *t* tests were used for unpaired data. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Characterization of AR invalidation in the SNB neuromuscular system of control and AR^{NesCre} males

In the SNB neuromuscular system, both SNB motoneurons and BC-LA muscles are sensitive to androgens and express AR. Therefore, we first assessed whether the disruption of the AR gene in the nervous system of our mice was restricted to SNB motoneurons.

DNA was extracted from the spinal L5-S1 region and BC and LA muscles. PCR analysis revealed the presence of an AR-deleted allele (404 bp) in the spinal cord of AR^{NesCre} mice, whereas the intact floxed allele (952 bp) was present in the spinal cords of control mice and in BC-LA muscles of both genotypes (Fig. 1A). Selective central AR gene inactivation was confirmed by immunoblot studies, which showed the presence of AR protein (110 kDa) in the BC-LA muscles of control and mutant males and in the spinal cord of control but not mutant males (Fig. 1A). AR immunoreactivity was demonstrated in motoneuronal nuclei of the SNB from controls but not mutant males (Fig. 1B).

Weight, AR protein amount, and NMJ of BC-LA muscles

In this AR^{NesCre} mouse model, AR exon 2 in the nervous system is excised by embryonic d 10.5 (25), before differ-

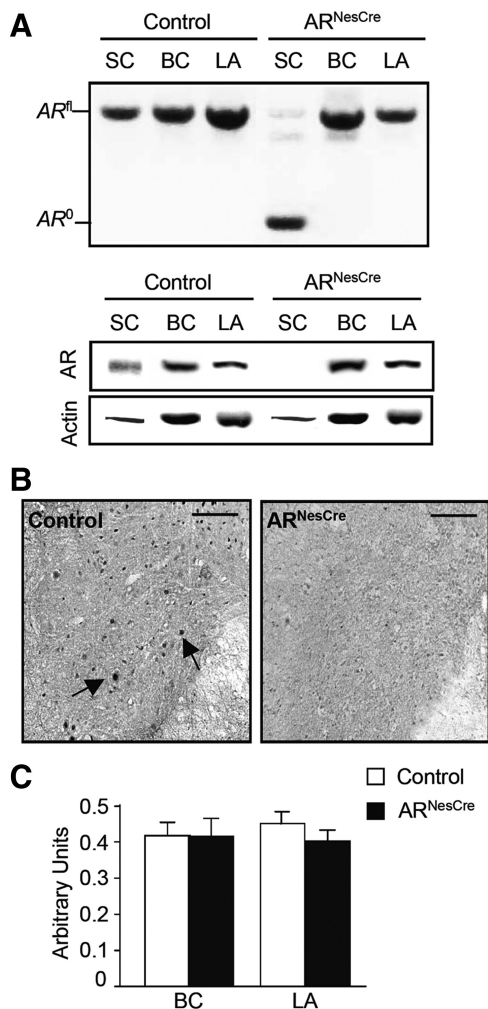


FIG. 1. Characterization of AR expression in the SNB neuromuscular system of control and AR^{NesCre} mice. **A**, PCR amplification of floxed (AR^f) and excised (AR⁰) alleles (*top panel*) and Western blotting of AR and actin proteins (*bottom panel*) in the L5–S1 region of the spinal cord (SC) and BC–LA muscles of control and mutant (AR^{NesCre}) males. **B**, Representative AR immunostaining in motoneuronal nuclei of the control but not mutant SNB. *Arrows* point to labeled SNB nuclei. *Scale bar*, 25 μm . **C**, Quantification of AR protein in BC–LA muscles of control and mutant males supplemented with similar amount of testosterone ($n = 12$ males per genotype).

entiation of the SNB neuromuscular system (26–28). We therefore examined whether the AR^{NesCre} mutation interfered with BC–LA muscular development. Adult AR^{NesCre} males exhibit higher levels of circulating T than controls (20). To analyze BC–LA muscles at similar hormone levels, adult males of both genotypes were castrated and supplemented with similar amounts of T.

There was no difference in BC–LA muscle weight between adult control and mutant males (Table 1). The amount of AR protein in BC and LA muscles was also similar in the two genotypes (Fig. 1C). The mean junctional area and size in BC muscle, determined from α -BTX labeling of postsynaptic muscular nicotinic AchR, were also comparable in the two genotypes (Fig. 2 and Table 1).

Quantification of number and soma size of SMI-32 labeled motoneurons in the SNB of control and AR^{NesCre} males

We used anti-SMI-32 to compare the total number and mean size of SNB motoneurons between control and AR^{NesCre} males; this antibody selectively labels motoneurons (29, 30). As controls, we also analyzed, in parallel, the female SNB and the androgen unresponsive RDLN, which innervates the flexor digitorum brevis muscles of the foot (Fig. 3A).

Number of SNB motoneurons

As previously described, the number of SMI-32-labeled motoneurons in the SNB in males was double that in females, whereas no difference was found between the sexes for the RDLN (Fig. 3B). In mutant males, the number of SNB motoneurons was similar to that of their control littermates (Fig. 3B).

Soma size

The mean soma size of SNB motoneurons was significantly smaller (–32%) in females than in control males; again no sex difference was observed in the RDLN (Fig. 3C). The mean soma size in the mutant SNB was also smaller (–23%) than that in control littermates. Analysis of the frequency distribution of SNB soma size indicated a sex-differentiated pattern with a narrow peak of small motoneurons (soma size at 150 μm^2) for control females and a more dispersed pattern for control males (maximum at 350 μm^2) (Fig. 3D). The size distribution of AR^{NesCre} SNB motoneuron somata was more similar to the female than male pattern (with a peak around 200 μm^2).

Number, soma size, and dendritic length of CT–HRP labeled SNB motoneurons in control and AR^{NesCre} males

Anti-SMI-32 labeled all SNB motoneurons, including those innervating the external anal sphincter. We therefore used CT–HRP for retrograde labeling of only SNB motoneurons projecting to the sexually dimorphic BC (Fig. 4A). RDLN motoneurons were labeled after injections into the plantar surface of the foot (Fig. 4A). In addition, to discriminate between perinatal permanent (organizational) and adult transient (activational) roles of AR in the regulation of the SNB neuromuscular system by T, we also studied a group of adult castrated males for each genotype. Castration in the absence of any T supplementation was used to exclude activational effects of T at BC–LA muscles and SNB motoneurons in controls, and at BC–LA site in mutants.

Seminal vesicle weight was substantially lower in males deprived of T for 5 wk than in animals administered T

TABLE 1. Effects of nervous system AR disruption on the weight of seminal vesicles (n = 4–8 males per treatment and per genotype) and BC-LA muscles (n = 16 males per treatment and per genotype) and α -BTX-labeled NMJ (n = 3 males per treatment and per genotype)

	Castrated + T		Castrated	
	Controls	AR ^{NesCre}	Controls	AR ^{NesCre}
Tissue weight				
Seminal vesicle weight (% body weight \times 10)	18.4 \pm 0.9	20.3 \pm 1.0	2.5 \pm 0.2 ^a	3.0 \pm 0.8 ^a
BC-LA muscle weight (% body weight \times 10)	2.8 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.08 ^a	1.0 \pm 0.03 ^a
NMJ				
Area (μm^2)	639.7 \pm 34.7	662.2 \pm 22.4	409.5 \pm 24.5	372.8 \pm 13
Size (μm)	102.4 \pm 3.1	105.2 \pm 2.2	81.5 \pm 2.4	81.0 \pm 1.2

Values are means \pm SEM for castrated control and mutant (AR^{NesCre}) male mice supplemented or not with testosterone.

^a $P < 0.05$ vs. the same genotype in the T-supplemented group.

(–86% in controls and –85% in mutants) (Table 1). A similar loss of androgenic stimulation was observed for BC-LA muscle mass and junctional AchR area and size, without any difference between control and mutant males (Fig. 2 and Table 1).

Number of SNB motoneurons

The number of CT-HRP-labeled SNB motoneurons in control males supplemented with T was consistent with reports by other groups (31). Two-way ANOVA showed no effect of genotype or treatment on the number of RDLN motoneurons (Fig. 4B). The number of SNB motoneurons was also unrelated to AR^{NesCre} mutation status and adult changes in T levels (Fig. 4B).

Soma size

Hormone treatment [$F_{(1,17)} = 19$, $P = 0.0004$] and genotype [$F_{(1,17)} = 15$, $P = 0.001$] had significant effects on SNB motoneuron soma size, whereas the morphology of the sexually nondimorphic RDLN was indistinguish-

able between the four groups studied (Fig. 4C). *Post hoc* analyses indicate that in the absence of any adult activation by T, soma size of SNB motoneurons was significantly lower (–10%) in mutants than in controls. This shows that nervous system AR is involved in early organizational regulation of SNB motoneurons soma size by T. Cell body size was significantly greater (+23%) in control animals administered T than controls males deprived of T. The mean soma size of SNB motoneurons in mutant males supplemented with T was also larger (+13%) than that in untreated mutant controls. However, the activational effect of T in mutant males was smaller ($P < 0.05$) than that in AR controls, probably because T acted at only BC muscles in mutant males and at both SNB and BC sites in control littermates.

Size-frequency analysis of retrogradely labeled SNB cells revealed the presence of a high percentage of small motoneurons in castrated mutant males (350 μm^2) and larger motoneurons in T-supplemented control males (450–500 μm^2) (Fig. 4D). The size frequency distributions for castrated control and T-supplemented mutant motoneurons were intermediate with a plateau of soma cell size around 300–450 μm^2 .

Dendritic length

Both hormone treatment [$F_{(1,8)} = 80$, $P < 0.0001$] and genotype [$F_{(1,8)} = 40$, $P < 0.0002$] were found to be associated with length of SNB motoneuron dendrites (Fig. 4E). *Post hoc* analyses indicate that in adult animals deprived of T, the mean dendritic length was shorter in AR mutant than control males (–28%), implicating central AR in the early effects of T. The mean dendritic length was significantly greater in both AR mutant (+52%) and control (+33%) mice administered T than in the corresponding untreated genotypes. It is of interest to note that T supplementation did not trigger a more important increase in dendritic length in control males, although it could act at both central sites and BC-LA muscles. This suggests that

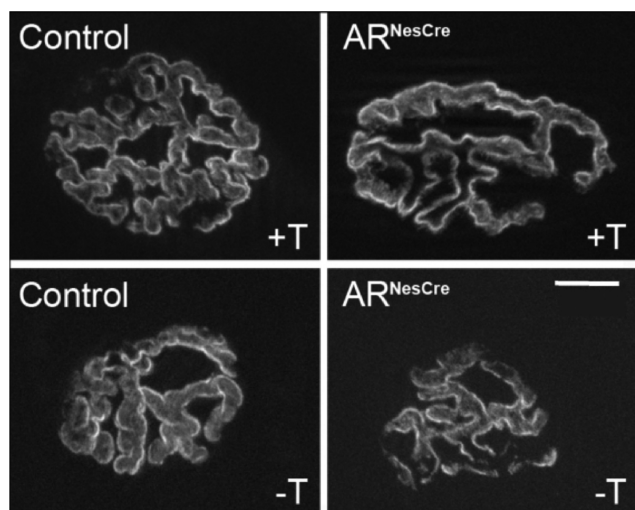


FIG. 2. Representative α -bungarotoxin labeling of neuromuscular junctions in the BC. Castrated control and AR^{NesCre} males were supplemented (+) or not (–) with T for 5 wk. Scale bar, 10 μm .

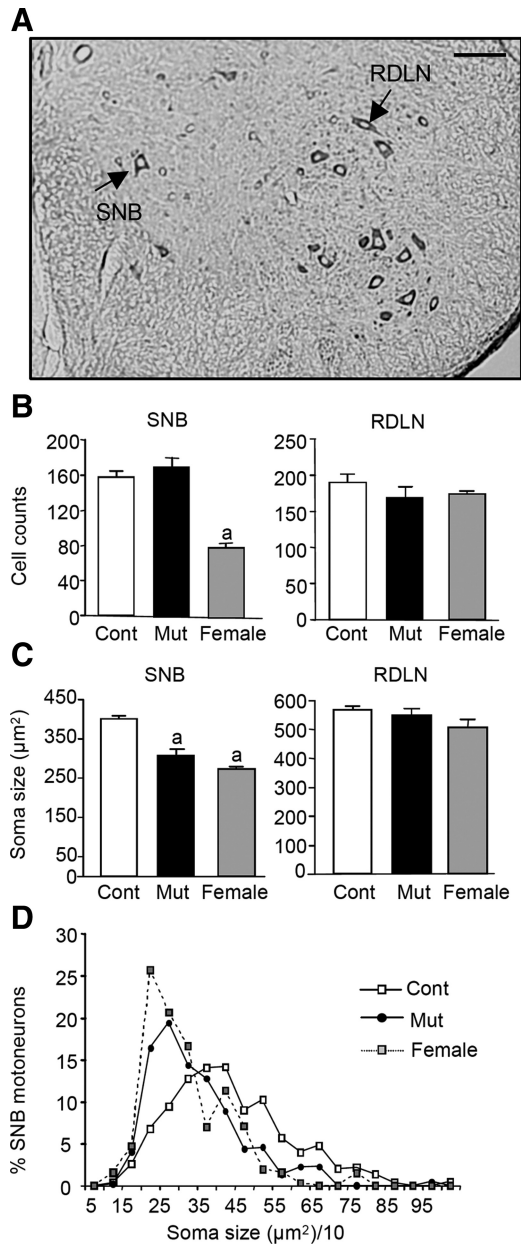


FIG. 3. Quantification of number and soma size of SMI-32-labeled SNB motoneurons. A, Representative SMI-32 labeling of motoneurons in the SNB and RDLN of control males. Scale bar, 25 µm. B and C, Quantification of motoneuron number (B) and soma size (C) in the SNB and RDLN of mutant males (Mut) compared with control males (Cont), supplemented with similar amount of T, and females. D, Frequency distribution of SNB soma size. Mean values ± SEM are shown for eight males per genotype and four females. a, $P < 0.05$ vs. control males.

T activation occurs primarily at the BC-LA site in control males.

The obtained results strongly suggest that nervous system AR is required for the organizational but not activation effects of T on SNB motoneuron dendritic length.

Copulatory behavior and fertility of AR^{NesCre} males

The effects of AR gene disruption on motoneuron soma size and dendritic length may have profound consequences

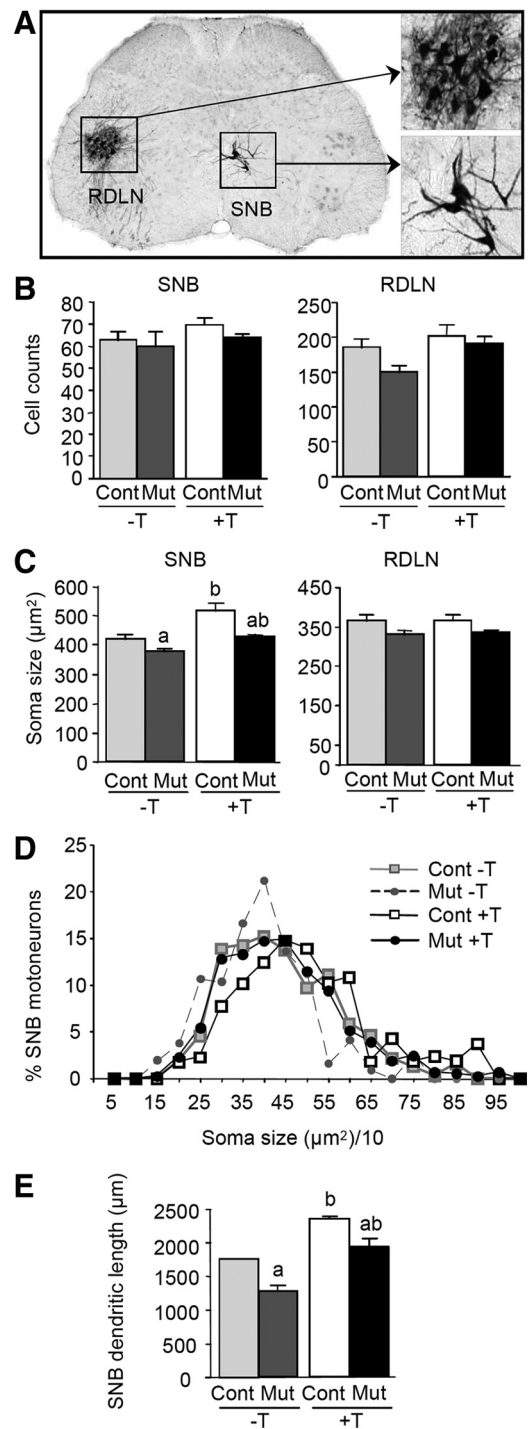


FIG. 4. Quantification of number, soma size, and dendritic length of retrogradely labeled SNB motoneurons. A, Representative CT-HRP retrograde labeling of motoneurons in the SNB and RDLN of control males. B and C, Quantification of motoneuron number (B) and soma size (C) in the SNB and RDLN of castrated control (Cont) and mutant (Mut) males supplemented (+) or not (-) with testosterone (T) for 5 wk (eight males per genotype). D, Frequency distribution of SNB cell soma size. E, Quantification of the mean dendritic length per SNB cell in castrated Cont and Mut males supplemented or not with T (eight males per genotype). a, $P < 0.05$ vs. control male mice subjected to the same treatment; b, $P < 0.05$ vs. castrated males of the same genotype.

for synaptic connectivity and neuronal function and therefore for penile erection and fertility. We have previously shown that AR^{NesCre} males, in a mixed genetic background, exhibit reduced sexual behavior and fertility (20). We thus reevaluated the impact of AR^{NesCre} mutation on mating and fertility of mice in the C57BL6J background.

In behavioral tests, all control males mounted, performed pelvic thrusts, intromitted, and ejaculated, whereas only 82% of the AR^{NesCre} males displayed mounting, intromissions, and thrusts, and only 70% ejaculated. Analyses of the mice displaying the full range of sexual behavior showed that AR^{NesCre} males displayed fewer mounts with intromissions during mating and a lower intromission ratio, total number of thrusts, and thrusting train (Table 2). Mutant males also had more attempts at intromission per mount (Table 2), suggesting that they were unable to maintain intromission during thrusting. They also showed longer interintromission intervals. Consistent with these data, the total time spent on postintromission genital grooming, which reflects erection efficiency, was significantly shorter in AR^{NesCre} mice (Table 2).

In continuous 4-month mating tests, intact AR^{NesCre} males were able to produce offspring but had a lower total number of pups than their control littermates (31.7 ± 2 vs. 44 ± 5 , $P < 0.05$).

Discussion

The present study is the first evaluation of AR involvement in T-dependent regulation of the SNB neuromuscular system in mice. Using a conditional genetic model, we show that nervous system AR participates in both morphological differentiation and adult activation of SNB motoneurons.

To study T-dependent regulation of the SNB neuromuscular system we needed a transgenic mouse strain as sensitive as the rat to T. Few studies have addressed SNB

motoneuron plasticity during adulthood in laboratory mice. Two involved C57BL6J mice (10, 12) and one B6D2F1 mice (11). Wee and Clemens (10) observed an effect in C57BL6J mice of adult castration on the number but not on the soma size of thionin-stained SNB motoneurons, even a long time after castration. Using retrograde tracing, a more sensitive technique extensively used in rat, Zuloaga *et al.* (12) described small SNB soma size and short dendrites 4 wk after castration. In B6D2F1 mice castration was found to affect soma size but not cell number or dendritic length as assessed 6–12 wk later (11). We used the same CT-HRP labeling method to confirm that castration of adult C57BL/6J males led to shrinkage of both SNB somata and dendritic length. It had no effect on their number, thereby indicating that the number of mouse SNB cells is determined during development, as in rat (32, 33). Castration also resulted in a substantial decrease in the BC/LA muscle mass as previously reported (11, 12). We also found that the postsynaptic AchR area was smaller in castrated C57BL6J mice. These various morphological changes in the SNB neuromuscular system after adult castration extend previous works (12) and confirm that C57BL6J mice are a pertinent strain for studying androgen-regulated motoneuron plasticity.

The number of SNB motoneurons in AR^{NesCre} mutants was not affected by early disruption of AR in the nervous system. In our conditional mouse line, AR exon 2 is excised in neural precursor cells at embryonic d 10.5 (25), which is earlier than gonadal differentiation and sexual differentiation of the SNB neuromuscular system (26–28). Our results provide evidence that T-mediated sparing of SNB motoneurons from atrophy during development in the mouse does not require central AR. In the rat, there is diverse evidence suggesting that BC-LA muscles are the sites of AR action for rescue of the SNB neuromuscular system. For instance, BC-LA muscles, but not SNB motoneurons, express AR during the first postnatal week (13, 34). A very recent characterization of AR expression in the

TABLE 2. Quantification of the copulatory behavior displayed by males supplemented with T

	Controls	AR ^{NesCre}
Number of mounts without intromissions (M)	21.1 ± 7.5	18.1 ± 4.3
Number of mounts with intromissions (MI)	47.1 ± 4.9	20.3 ± 6.1 ^a
Intromission ratio (MI to M+MI) × 100	78.6 ± 3.2	50.4 ± 3.7 ^a
Number of thrusts	745.3 ± 52.4	259.0 ± 57.2 ^a
Thrusting train (Hz)	1.3 ± 0.03	1.0 ± 0.04 ^a
Intromissive episodes per MI	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.3 ^a
Interintromission interval (sec)	38.4 ± 2.0	99.4 ± 12.1 ^a
Genital grooming (% mating duration)	17.0 ± 0.7	8.4 ± 0.8 ^a
Mating duration (min)	41.0 ± 4.0	57.0 ± 9.1

The mean values ± SEM for 17 control and 12 AR^{NesCre} males displaying complete sexual behavior are shown.

^a $P < 0.05$ vs. control males.

mouse SNB system also reports that AR is expressed in BC-LA muscles since embryonic d 15, before the critical period of T-induced cell survival, and in SNB motoneurons later by postnatal d 4 (28). The feminization of rat SNB nucleus induced by a Tfm mutation or prenatal treatment with the antiandrogen flutamide (3, 7) is probably due to the loss of BC-LA muscle sensitivity to T. However, expression of AR in Tfm skeletal muscle fibers was not sufficient to rescue the male phenotype of the rat SNB neuromuscular system (35). It therefore remains unclear which of muscle fibers or other BC-LA cell types are the targets of T.

We found no difference in BC-LA weight or sensitivity to T between control and mutant males. Our results are therefore also consistent with T acting directly on developing BC-LA muscles rather than on motoneurons to masculinize muscle size in mice.

Regulation of the soma of SNB motoneurons requires AR expression in the nervous system. The SNB motoneuron soma was smaller in mice in which the AR gene had been invalidated in the nervous system than in control mice. The size distribution revealed a population of motoneurons with small somata in T-supplemented mutants, as assessed by two different techniques. The difference found for both mean soma size and percentage between SMI-32 and CT-HRP results was probably due to the additional detection of the small SNB motoneurons innervating the external anal sphincter by SMI-32 but not by CT-HRP retrograde labeling.

To determine whether AR in the nervous system contributes to regulation of soma size during development or at the adult stage, we compared the effect of selective AR mutation in SNB motoneurons between males depleted of and supplemented with T. The results summarized in Fig. 5 indicate that AR was required in central sites for both developmental regulation and adult maintenance of SNB motoneuron soma size. The site(s) at which T acts for the developmental regulation of SNB cell size in the rat is(are) still unknown. In addition, SNB motoneurons have been reported to be a necessary and possibly the only site of T action in the adult rat (18, 19, 36), whereas our study suggests the contribution of BC muscle in adult male mice. This discrepancy could be related to specie differences. Alternatively, T may act through other AR-independent mechanisms in the nervous system.

Nervous system AR invalidation resulted also in significantly short SNB motoneuron dendrites. Comparison of the effects of the AR^{NesCre} mutation in T-depleted and T-supplemented male mice showed that AR is required in the nervous system for developmental regulation of SNB motoneuron dendritic length (Fig. 5). Although the possibility that the BC muscle is involved cannot be excluded,

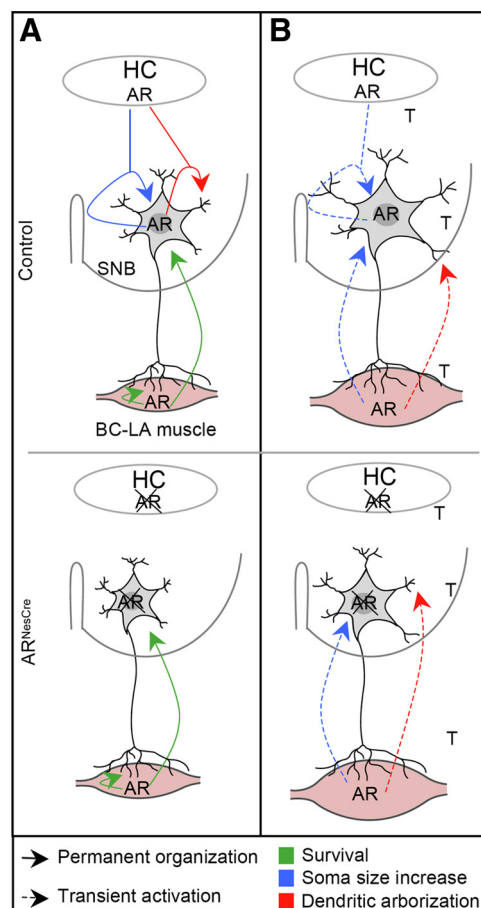


FIG. 5. AR disruption in the nervous system interferes with organizational and activational regulation of SNB motoneuron morphology by T in mice. A, Elimination of the activation effects (dashed arrows) of T by adult castration unmasked its organizational action (solid arrows) on the SNB neuromuscular system. AR disruption in central site(s) including SNB motoneurons and higher regulator centers (HC) but not in BC-LA muscles did not interfere with T-induced sparing of SNB motoneurons and muscle fibers from atrophy during development. It resulted, however, in SNB motoneurons having smaller soma and shorter dendrites than controls, thereby implicating SNB motoneuron AR in the regulation of both processes. B, T supplementation increased the size of soma cell bodies of SNB motoneurons through both BC muscle and SNB motoneurons in control males and only through BC muscle in AR^{NesCre} males. Maintenance of dendritic length appeared to depend solely on indirect activation by T at BC site(s).

our results argue against the exclusive involvement of estrogens at the BC-LA muscle site, as has been described in the rat (16, 17). In adulthood, central AR did not seem to mediate maintenance of SNB motoneuron dendritic length by T. These results are in accordance with work in rats showing that T acts mainly at BC-LA sites to regulate SNB dendritic length during adulthood (18).

We report the first demonstration that T acts centrally during development to regulate SNB motoneuron morphology, although our study does not exclude that the BC muscle could also be involved. SNB motoneurons could be the site at which T through AR acts to induce such regu-

lation in mice. The critical period for T action on soma size and dendritic length extends, respectively, to postnatal d 12 and 28 (5, 32), and AR immunoreactivity in SNB motoneurons is detected from postnatal d 7 in rat (13). A similar ontogeny of AR expression in SNB motoneurons has been recently reported in mice (28). Alternatively, other AR-containing neuronal or glial cell types located close to SNB motoneurons or in higher spinal and cerebral nuclei could mediate or participate in T-induced effects. Indeed, in our transgenic model, the promoter and the nervous system-specific enhancer of *Nes* drives *Cre* recombinase expression in neuronal and glial precursor cells in the whole nervous system (25). Further studies are needed to precisely define which of SNB motoneurons and/or other central sites are required for T-induced organization and activation of the SNB neuromuscular system in mice.

The reduced copulatory behavior of AR^{NesCre} males was probably due to deficiencies at both cerebral and spinal sites. In this context, the effects of *AR* gene disruption in the nervous system on SNB motoneuron soma size and dendritic length may contribute to the reduced sexual performance (diminished intromission ratio, thrusts, and behavioral erectile activity) and fertility of AR^{NesCre} males. Indeed, excision of the BC muscle reduced fertility and penile erection necessary to maintain intromission during thrusting in B6D2F1/J mice (2). Given that BC-LA muscle weight, AR expression and the density of postsynaptic AchR were not altered by the AR^{NesCre} mutation, the reduction in SNB motoneuron soma size and dendrites may affect the activity of the SNB neuromuscular system at the presynaptic level. It would be interesting to determine whether the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in SNB motoneurons of AR^{NesCre} males is altered. BDNF is one of the neurotrophic factors involved in the regulation of synaptic efficacy and neurotransmitter release (37). In the SNB neuromuscular system, BDNF was found to be expressed in both motoneurons and BC-LA muscles (38–40) and has been described as a potential mediator of the effects of T (41).

In conclusion, we show, for the first time in mice, that AR in the nervous system participates in the morphological regulation of SNB motoneurons but is not required for their perinatal sparing from atrophy. Central AR is needed for the developmental regulation of soma size and dendritic length and in the adult maintenance of soma size of murine SNB motoneurons by T. BC-LA muscles seem to play a major role in the perinatal masculinization of SNB motoneuron number and adult maintenance of dendritic length and contribute to adult regulation of soma size. Central AR functions may be important for normal activity of SNB motoneurons and perineal muscles in mice.

Their alteration by the AR^{NesCre} mutation may contribute to the diminished copulatory behavior and fertility of mutant males.

Acknowledgments

We thank Professor G. Verhoeven (Laboratory of Experimental Medicine and Endocrinology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium) for providing the floxed AR mouse line.

Address all correspondence and requests for reprints to: Sakina Mhaouty-Kodja, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7224, Université Pierre et Marie Curie, 9 Quai St. Bernard Bât B 2ème Étage, 75005 Paris CEDEX 05, France. E-mail: sakina.mhaouty-kodja@snv.jussieu.fr.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), and the Agence Nationale de la Recherche and Région Ile de France.

Disclosure Summary: The authors have nothing to declare.

References

1. Sachs BD 1982 Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation, and induction of pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil* 66:433–443
2. Elmore LA, Sachs BD 1988 Role of the bulbospongiosus muscles in sexual behavior and fertility in the house mouse. *Physiol Behav* 44:125–129
3. Breedlove SM, Arnold AP 1980 Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. *Science* 210:564–566
4. Forger NG, Breedlove SM 1987 Seasonal variation in mammalian striated muscle mass and motoneuron morphology. *J Neurobiol* 18:155–165
5. Goldstein LA, Kurz EM, Sengelaub DR 1990 Androgen regulation of dendritic growth and retraction in the development of a sexually dimorphic spinal nucleus. *J Neurosci* 10:935–946
6. Cihák R, Gutmann E, Hanzlíková V 1970 Involution and hormone-induced persistence of the M. sphincter (levator) ani in female rats. *J Anat* 106:93–110
7. Breedlove SM, Arnold AP 1983 Hormonal control of a developing neuromuscular system. I. Complete demasculinization of the male rat spinal nucleus of the bulbocavernosus using the anti-androgen flutamide. *J Neurosci* 3:417–423
8. Breedlove SM, Arnold AP 1981 Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. *Brain Res* 225:297–307
9. Kurz EM, Sengelaub DR, Arnold AP 1986 Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science* 232:395–398
10. Wee BE, Clemens LG 1987 Characteristics of the spinal nucleus of the bulbocavernosus are influenced by genotype in the house mouse. *Brain Res* 424:305–310
11. Park JJ, Zup SL, Verhovshek T, Sengelaub DR, Forger NG 2002 Castration reduces motoneuron soma size but not dendritic length in the spinal nucleus of the bulbocavernosus of wild-type and BCL-2 overexpressing mice. *J Neurobiol* 53:403–412
12. Zuloaga DG, Morris JA, Monks DA, Breedlove SM, Jordan CL 2007 Androgen-sensitivity of somata and dendrites of spinal nucleus

- of the bulbocavernosus (SNB) motoneurons in male C57BL/6J mice. *Horm Behav* 51:207–212
13. **Jordan C** 1997 Androgen receptor (AR) immunoreactivity in rat pudendal motoneurons: implications for accessory proteins. *Horm Behav* 32:1–10
 14. **Fishman RB, Breedlove SM** 1992 Local perineal implants of anti-androgen block masculinization of the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Brain Res Dev Brain Res* 70:283–286
 15. **Freeman LM, Watson NV, Breedlove SM** 1996 Androgen spares androgen-insensitive motoneurons from apoptosis in the spinal nucleus of the bulbocavernosus in rats. *Horm Behav* 30:424–433
 16. **Nowacek AS, Sengelaub DR** 2006 Estrogenic support of motoneuron dendritic growth via the neuromuscular periphery in a sexually dimorphic motor system. *J Neurobiol* 66:962–976
 17. **Sengelaub DR, Forger NG** 2008 The spinal nucleus of the bulbocavernosus: firsts in androgen-dependent neural sex differences. *Horm Behav* 53:596–612
 18. **Rand MN, Breedlove SM** 1995 Androgen alters the dendritic arbors of SNB motoneurons by acting upon their target muscles. *J Neurosci* 15:4408–4416
 19. **Watson NV, Freeman LM, Breedlove SM** 2001 Neuronal size in the spinal nucleus of the bulbocavernosus: direct modulation by androgen in rats with mosaic androgen insensitivity. *J Neurosci* 21:1062–1066
 20. **Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, Tronche F, Mhaouty-Kodja S** 2009 Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci* 29:4461–4470
 21. **De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heys W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G** 2004 A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1327–1332
 22. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
 23. **Mesulam MM** 1978 Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26:106–117
 24. **Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ** 2004 Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11:36–42
 25. **Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G** 1999 Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23:99–103
 26. **Pointis G, Latreille MT, Mignot TM, Janssens Y, Cedard L** 1979 Regulation of testosterone synthesis in the fetal mouse testis. *J Steroid Biochem* 11:1609–1612
 27. **Park JJ, Howell M, Winseck A, Forger NG** 1999 Effects of testosterone on the development of a sexually dimorphic neuromuscular system in ciliary neurotrophic factor receptor knockout mice. *J Neurobiol* 41:317–325
 28. **Smith MR, Hamson DK, Poort JE, Jordan CL, Breedlove SM** 2012 Ontogeny of androgen receptor expression in spinal nucleus of the bulbocavernosus motoneurons and their target muscles in male mice. *Neurosci Lett* 513:119–123
 29. **Bar-Peled O, Knudson M, Korsmeyer SJ, Rothstein JD** 1999 Motor neuron degeneration is attenuated in bax-deficient neurons in vitro. *J Neurosci Res* 55:542–556
 30. **Jacob DA, Bengtson CL, Forger NG** 2005 Effects of Bax gene deletion on muscle and motoneuron degeneration in a sexually dimorphic neuromuscular system. *J Neurosci* 25:5638–5644
 31. **Wagner CK, Clemens LG** 1989 Anatomical organization of the sexually dimorphic perineal neuromuscular system in the house mouse. *Brain Res* 499:93–100
 32. **Breedlove SM, Arnold AP** 1983 Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Neurosci* 3:424–432
 33. **Nordeen EJ, Nordeen KW, Sengelaub DR, Arnold AP** 1985 Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229:671–673
 34. **Fishman RB, Chism L, Firestone GL, Breedlove SM** 1990 Evidence for androgen receptors in sexually dimorphic perineal muscles of neonatal male rats. Absence of androgen accumulation by the perineal motoneurons. *J Neurobiol* 21:694–704
 35. **Niel L, Shah AH, Lewis GA, Mo K, Chatterjee D, Fernando SM, Hong MH, Chang WY, Vollmayr P, Rosen J, Miner JN, Monks DA** 2009 Sexual differentiation of the spinal nucleus of the bulbocavernosus is not mediated solely by androgen receptors in muscle fibers. *Endocrinology* 150:3207–3213
 36. **Yang LY, Arnold AP** 2000 Interaction of BDNF and testosterone in the regulation of adult perineal motoneurons. *J Neurobiol* 44:308–319
 37. **Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS** 2000 Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 3:323–329
 38. **Ottm EN, Beck LA, Jordan CL, Breedlove SM** 2007 Androgen-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Endocrinology* 148:3655–3665
 39. **Ottm EN, Poort JE, Wang H, Jordan CL, Breedlove SM** 2010 Differential expression and regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA isoforms in androgen-sensitive motoneurons of the rat lumbar spinal cord. *Mol Cell Endocrinol* 328:40–46
 40. **Verhovshek T, Buckley KE, Sergeant MA, Sengelaub DR** 2010 Testosterone metabolites differentially maintain adult morphology in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Dev Neurobiol* 70:206–221
 41. **Yang LY, Verhovshek T, Sengelaub DR** 2004 Brain-derived neurotrophic factor and androgen interact in the maintenance of dendritic morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *Endocrinology* 145:161–168

ARTICLE 3

II- Effets perturbateurs d'une exposition à de faibles doses de bisphénol A sur l'expression du comportement sexuel et mécanismes d'action

Résumé article 3 Adult exposure to oral bisphenol A phenocopies features of sexual disruption caused by neural inactivation of the androgen receptor in male mice.

En soumission

Picot M., Naulé L., Marie-Luce C., Martini MA., Raskin K., Grange-Messent V., Franceschini I., Keller M. and Mhaouty-Kodja S.

Le Bisphenol A (BPA) est un polymère massivement produit et utilisé dans la fabrication d'une très grande variété de contenants en polycarbonates, destinés au conditionnement et au stockage de produits et boissons alimentaires. Or, les polycarbonates ne sont pas aussi stables que l'on pensait. En effet, le BPA est libéré dans les produits alimentaires, même dans des conditions normales d'utilisation. Le BPA a été détecté dans 95% des échantillons urinaires analysés ainsi que dans le liquide amniotique, le plasma fœtal et maternel, le placenta (Schönfelder et al., 2002) et le lait maternel (Sun et al., 2004). Le BPA a largement été décrit pour son activité oestrogénique (Dodds et Lawson, 1936; Kuiper et al., 1997). Cependant, des études in vitro ont également révélé un rôle anti-androgénique à ce perturbateur (Sohoni et Sumpter, 1998; Paris et al., 2002; Lee et al., 2003b; Satoh et al., 2004; Xu et al., 2005; Sun et al., 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, la testostérone, libérée par les testicules pendant la période périnatale, joue un rôle primordial dans l'organisation permanente (masculinisation et déféminisation) des régions centrales gouvernant les réponses endocrines et comportementales typiquement mâle. La testostérone agit de manière transitoire à l'âge adulte pour activer et maintenir les circuits neuronaux impliqués dans la régulation du comportement sexuel. Dans le système nerveux, la testostérone peut agir à travers plusieurs voies ; directement via l'AR ou indirectement via l'ER α ou ER β après conversion en œstradiol. Nos résultats montrent que les deux voies de signalisation jouent des rôles complémentaires dans la régulation du comportement sexuel par la testostérone. Nous nous sommes donc demandés si l'exposition au BPA aux périodes critiques de sensibilité du système nerveux central à la testostérone pouvait interférer avec l'organisation et l'activation du comportement sexuel mâle. En effet, les effets

potentiels d'une exposition au BPA sur le comportement sexuel mâle restent controversés. Une diminution ou un comportement inchangé ont été rapportés chez le rat exposé au BPA pendant la période périnatale (Farabollini et al., 2002; Kawai et al., 2003; Jones et al., 2011). La seule étude évaluant les effets à l'âge adulte décrit aucune altération du comportement (Tohei et al., 2001).

Notre but était d'étudier les effets perturbateurs d'une exposition à de faibles doses de BPA sur l'organisation et l'activation par la testostérone du comportement sexuel et d'en comprendre les mécanismes d'action.

Méthodologie : Des souris mâles C57BL6J ont été traitées au BPA au cours du développement ou à l'âge adulte, selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. Plusieurs études ont été combinées afin d'évaluer les défauts d'organisation et d'activation par la testostérone du système nerveux. Des tests de comportements sexuel mâle ont été réalisés chez des animaux naïfs et expérimentés ; ainsi que des tests de lordose. Des tests de préférence olfactive ont été menés afin d'évaluer la capacité des mâles à distinguer entre un mâle et une femelle réceptive. Ensuite, une étude neuroanatomique de la région POA a été menée, afin d'évaluer l'organisation des neurones sexuellement dimorphiques kisspeptine et calbindine. Enfin le niveau d'expression de l'AR et de l'ER α a également été quantifié, afin de vérifier si ces voies de signalisations sont affectées ou non par le traitement au BPA.

Les résultats obtenus montrent que tous les mâles traités avaient un tractus urogénital normal et des niveaux de testostérone circulants normaux, quelque soit la dose et la période d'exposition.

Les mâles traités en période périnatale, pour les deux doses, présentent un comportement sexuel mâle et une préférence olfactive équivalente aux contrôles. Les tests de lordoses ont révélé une incapacité accentuée à montrer un comportement de type femelle chez les mâles traités. Au niveau neuroanatomique, nous n'avons trouvé aucun effet du traitement sur le nombre de neurones à kisspeptine dans la région AVPV, ni des neurones calbindine dans la MPOA.

Les mâles traités à l'âge adulte présentent un comportement sexuel mâle altéré (motivation et performance) lorsqu'ils sont naïfs et ce uniquement à la dose la plus faible de BPA. Nous n'avons pas observé d'amélioration avec l'expérience chez ces mêmes mâles. En outre, nous n'avons remarqué aucun défaut de la préférence olfactive, suggérant un défaut de signalisation en aval du système olfactif. Au niveau neuroanatomique, nous

avons observé une augmentation du nombre de neurones AR et ER α positif dans la MPOA impliqués dans le comportement sexuel.

Ces effets sont similaires à ceux observés pour les mâles invalidés pour l'AR dans le système nerveux. En effet, lors d'une étude précédente, nous avons montré que les mâles invalidés pour l'AR spécifiquement dans le système nerveux (lignée AR^{NesCre} présentée article 1) lorsqu'ils sont intacts présentent une altération du comportement sexuel mâle (motivation et performance) chez les souris mâles. Ce défaut est atténué mais non restauré avec l'expérience, associé à une préférence olfactive normale. Au niveau neuroanatomique, aucun défaut de différenciation sexuelle dans le nombre de neurones TH (article 1), kisspeptine et calbindine (article 3) n'a été constaté. Mais nous avons constaté de la même façon pour l'exposition adulte au BPA, une augmentation de l'expression de l'ER α dans l'AMe et la MPOA.

De plus, nous avons montré que de la voie impliquant l'AR était nécessaire à l'expression d'un comportement sexuel mâle complet puisque l'ajout d'œstradiol à des mâles gonadectomisés ne permet pas de restaurer un comportement sexuel complet contrairement à la testostérone.

En conclusions, nous montrons pour la première fois que le BPA n'interfère pas avec l'organisation, mais interfère avec l'activation par la testostérone des processus neuronaux qui sous tendent l'expression du comportement sexuel. Cet effet est observé uniquement à faible dose. De plus, le BPA pourrait interférer avec l'activation de la voie de signalisation du récepteur des androgènes dans le cerveau mâle.

Title Page

Classification: Biological Sciences

Title: Adult exposure to bisphenol A phenocopies features of sexual disruption caused by neural inactivation of the androgen receptor in mice

Short Title: BPA mimics neural AR mutation in adult males

Authors: Marie Picot^{abc}, Lydie Naulé^{abc}, Clarisse Marie-Luce^{abc}, Mariangela Martini^{def}, Kalina Raskin^{abc}, Valérie Grange-Messent^{abc}, Isabelle Franceschini^{def}, Matthieu Keller^{def}, Sakina Mhaouty-Kodja^{abc1}

^aCentre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 7224,

^bUniversité Pierre & Marie Curie, ^cBehaviors and Neuroendocrinology of Reproduction, 9 quai St Bernard, 75005 Paris, France; ^dInstitut National de la Recherche Agronomique UMR85, Physiologie de la Reproduction & des Comportements; ^eCNRS UMR7247, F-37380 Nouzilly, ^fUniversité François Rabelais, F-37000 Tours, France.

Corresponding author: ¹Sakina Mhaouty-Kodja

sakina.mhaouty-kodja@snv.jussieu.fr

Abstract

Bisphenol A (BPA) is a plastic monomer used in a wide variety of polycarbonate plastics. There are environmental and health concerns associated with extensive use of BPA-containing plastic, and in particular leaching of BPA into food and beverages. It remains unclear whether exposure to BPA interferes with the central control of male sexual behavior by testosterone. We therefore evaluated the effects of oral BPA on the perinatal organization and adult activation of mating in male mice. Perinatal exposure to BPA at doses equivalent to the tolerable daily intake (TDI, 50 mg/kg (body weight).day) and no-observed-adverse-effect-level (NOAEL, 5 mg/kg (body weight).day) did not affect the organization of sexual behavior. However, adult exposure to BPA at the TDI, but not NOAEL, dose interfered with the activation of sexual behavior: exposed males took longer to initiate mating and exhibited fewer intromissions and thrusts. This deficiency was not restored by sexual experience and was associated with normal olfactory chemoinvestigation and unchanged or increased androgen receptor (AR)- and estrogen receptor α -immunoreactive cell counts in brain areas underlying sexual behavior. The comparison of the sexual behavior of castrated males with testosterone and estradiol supplementation suggested that BPA may interfere with AR pathway activation. Neural disruption of *AR* resulted in alterations of sexual behavior similar to those induced by BPA, consistent with this possibility. These findings show that the sexual brain is highly vulnerable to low doses of BPA during adulthood and shed light on the potential effect of an insufficiently studied activity of BPA *in vivo*.

Introduction

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disrupter used in epoxy resins and a wide variety of polycarbonate containers for storage of foods and beverages. Environmental and health concerns about the extensive use of polycarbonate plastic have been raised, in particular concerning the leaching of BPA out of plastic. Most individuals in the populations of industrialized nations are contaminated by BPA (1, 2). Despite the recent banning of polycarbonates in baby bottles in some countries, BPA remains widely used in industry worldwide. The consequences of exposure to BPA for sexual behavior remain unclear. Rodents proved to be excellent models for investigating the tragic episode of the human diethylstilbestrol syndrome. However, data on the effects of BPA on male copulatory behavior in rodents are few and controversial. Both decreased and unchanged mating have been reported in male rats perinatally exposed to BPA (3–5) whereas no effect of adult exposure was observed (6). In mice, no data are available for BPA exposure. Documenting the effects of BPA in mice is important because genetically altered mice could be used to determine the *in vivo* mechanisms underlying BPA-induced effects.

Male sexual behavior in rodents is induced by olfactory cues. In rat and mice, pheromonal cues are transmitted from the main olfactory epithelium and vomeronasal organ to, respectively, the main and accessory olfactory bulbs, then to chemosensory responsive nuclei in the medial amygdala (MeA), bed nucleus of stria terminalis (BNST) and medial preoptic area (MPOA) where they are processed in behavioral responses. Testosterone (T), released by the fetal and neonatal testes, masculinizes (potentiates male features) and defeminizes (inhibits female features) these brain areas during the perinatal period (7). This involves regulation of cell number as evidenced by the numerous sexually dimorphic nuclei found along this circuitry. In adulthood, T acts transiently on these brain areas to initiate and maintain sexual behavior.

In the nervous system, T acts directly through the androgen receptor (AR) or indirectly via estrogen receptors (ERs) after its aromatization into estradiol. Work with genetically modified mice has demonstrated that the estrogenic pathway plays a key role in the neuroanatomical and behavioral masculinization and defeminization of male sexual behavior (8–11). Ubiquitous *AR* invalidation

interferes with sexual differentiation of the male urogenital tract. Consequently, we and others have generated conditional mice lines lacking *AR* in the nervous system (12, 13): both studies conducted in a mixed genetic background reported sexual abnormalities in the mutant males, albeit to different extents.

The estrogenic activity of BPA has been extensively described (14, 15), and *in vitro* studies have demonstrated that it has an anti-androgenic activity (16–21). We therefore investigated the consequences of perinatal and adult exposure to BPA for T-induced organization and activation of male sexual behavior in mice. In particular, we considered two levels of exposure: the Tolerable Daily Intake (TDI) and No-Observed Adverse Effect Level (NOAEL = 100 x TDI) doses. We report that adult, but not perinatal, exposure to BPA at the TDI dose reduced sexual behavior in naive C57BL6J males; these abnormalities were not abolished by sexual experience and were associated with normal levels of T and olfactory preferences, and with unchanged or increased numbers of AR and ER α -ir neurons in brain areas involved in the expression of sexual behavior. Comparisons of the contributions of AR- and ER-signaling pathways in the adult activation of male sexual behavior suggested that BPA may interfere with the activation of the AR signaling pathway. We therefore studied male mice lacking *AR* in the nervous system (AR^{NesCre}) and backcrossed into the C57BL6J background; we used these mice for a thorough behavioral and neuroanatomical analysis of sexually dimorphic populations to unravel the contribution of AR in the organizational *vs* activational effects of T. The similarities of the abnormalities displayed by BPA-exposed and AR^{NesCre} males strongly suggest that BPA, at TDI dose, acts as an anti-androgenic molecule in the neural circuitry underlying sexual behavior.

Results

Exposure to BPA had no effect on the urogenital tract and T levels

Dams were exposed daily to BPA at TDI or NOAEL doses from day 15 of pregnancy to weaning. There was no effect on the body growth of male offspring (Table 1; SI Fig. 1) and the development of testes and androgen-dependent seminal vesicles did not differ between vehicle and BPA-exposed males (Table 1). Similarly, daily exposure of adult males to TDI or NOAEL doses of BPA for 4 weeks did not affect body, testicular and seminal vesicle weight (Table 1). Consistent with these data, circulating levels of T in vehicle- and BPA-exposed males were similar, regardless of the dose and the period of exposure (Table 1).

Perinatal exposure to BPA did not reduce masculinization or defeminization of male sexual behavior

Masculinization of male sexual behavior

Ninety % of naive males treated perinatally with vehicle or BPA at TDI or NOAEL dose displayed a full range of sexual behavior. The latent periods to the first mount, pelvic thrust, intromission and to ejaculation were similar for the three treatment groups (Fig. 1A). The total numbers of mounts with or without intromissions and of thrusts were also comparable (Table 2). We then subjected male mice to a second test, with a two-week interval between Test 1 and Test 2. All groups exhibited sexual behavior with significantly shorter times to the first events and to ejaculation (Fig. 1B). This indicated that sexual experience improved their mating efficiency, as previously reported for both rats and mice (22, 23).

We then compared the ability of males to discriminate between male and female pheromones in olfactory preference tests using intact male *vs* estrus females and bedding soiled by males *vs* estrus females. Time spent sniffing the bedding or stimulus was determined and is expressed as a percentage of the total time devoted to chemoinvestigation. The total time devoted to chemoinvestigation did not differ significantly between males (around 100 s). All the males displayed a preference for female-soiled bedding and females in estrus over male-soiled bedding and intact males (Fig. 1C-D). There

were no significant differences between the three treatment groups in the time spent investigating male or female pheromones.

Defeminization of male sexual behavior

We tested the ability of males to exhibit lordosis behavior, the receptive posture that female rodents exhibit when approached from behind for insemination by courting males. Males exposed to vehicle or BPA at TDI and NOAEL doses were castrated and primed sequentially with estradiol and progesterone, the two hormones that induce female receptivity. As expected, males perinatally exposed to vehicle exhibited a low lordosis quotient in response to mounts of stud males in both Tests 1 and 2 (Fig. 1E). Similar results were obtained for males exposed to BPA-TDI, whereas a significantly lower lordosis quotient was observed for males exposed to the NOAEL dose of BPA. In accordance with these results, the males of these three groups displayed no olfactory preference towards male pheromones as they spent similar amounts of time investigating male and female targets (Fig. 1F).

Neuroanatomical analysis of the MPOA

We analyzed whether perinatal exposure to BPA altered the anatomical organization of two known sexually dimorphic neuronal populations in the MPOA. There are more kisspeptin-immunoreactive (ir) neurons in the anteroventricular nucleus (AVPV), a sub-region of the MPOA that plays a critical role in the positive hormonal feedback on LH secretion and thus ovulation, in females than males (24). By contrast, calbindin-ir neurons have been reported to be more numerous in male rats and mice (25, 26). Early exposure to BPA at TDI or NOAEL doses had no effect on the number of kisspeptin-ir neurons in the AVPV nucleus (Fig. 2A), or on the number of calbindin-ir neurons in the MPOA (Fig. 2B).

Adult exposure to BPA at the TDI dose reduced male sexual behavior

Male behavior

Similar percentages (80%) of adult males exposed daily to vehicle or BPA at TDI or NOAEL doses for 4 weeks displayed full sexual behavior. Naive males exposed to BPA-TDI exhibited significant

longer latencies to mounting, thrusting, intromission and ejaculation than the controls (Fig. 3A). In addition, they displayed fewer mounts with intromissions during mating and a smaller total number of thrusts (Table 2). There were no significant differences between males exposed to BPA at the NOAEL dose and controls (Fig. 3A). Even after a first sexual experience, males exposed to the TDI dose of BPA continued to display longer latencies to the first events of mating and fewer mounts and thrusts (Fig. 3B; Table 2). In similar conditions, mating of vehicle-exposed mice was improved after a first sexual experience, as evidenced by the shorter time to intromission and ejaculation (Fig. 3B).

In olfactory preference tests, all males, regardless of treatment or BPA dose, showed a preference for female-soiled bedding and females in estrus over male-soiled bedding and intact males, respectively (Fig. 3C-D).

The normal preference for female olfactory cues indicated that the sexual deficiency of BPA-exposed males was caused by altered neural function in chemosensory responsive regions downstream from the olfactory bulb.

Quantification of the number of AR- and ER α -ir neurons in the neuronal circuitry underlying sexual behavior

We examined whether adult exposure to BPA affected the expression of AR and ER α in the neuronal circuitry underlying male sexual behavior, downstream from the olfactory bulb. We compared the numbers of AR and ER α -ir neurons in the MeA, BNST and MPOA between vehicle- and BPA-exposed mice. The mean numbers of AR and ER α -ir cells in the MeA and BNST were unaffected by treatment with the TDI dose of BPA but were 30% higher the MPOA of treated than control mice (Fig. 4, SI Fig. 2). Similarly, the number of AR- and ER α -ir neurons was unaltered in the MeA and BNST but 45% higher than control values in the MPOA in males exposed to BPA at NOAEL dose (SI Fig. 3).

Comparison of T and estradiol in the initiation of male sexual behavior in adult mice

To understand how adult exposure to BPA disrupts male sexual behavior, we analyzed the relative contribution of the estrogenic and androgenic pathways of T in the activation of this behavior in

C57BL6J male mice. Adult males were subjected to gonadectomy and estradiol or T supplementation to activate only the ER signaling pathway or both the ER and AR signaling pathways, respectively. Estradiol-supplemented males displayed longer latencies to first mounting, thrusting and intromission than T-supplemented males (Fig. 5A). In addition, they exhibited incomplete sexual behavior, as they did not ejaculate during the 10 hours of the test, whereas the mean duration of mating (mount to ejaculation) was 39.5 ± 3.6 min in T-supplemented males. The activation of AR is thus required for complete and efficient mating by adult male mice.

Adult exposure to BPA at the TDI dose mimicked, at least in part, sexual alterations induced by the AR^{NesCre} mutation

We investigated whether the observed effects of adult BPA exposure on male sexual behavior were due to its anti-androgenic activity previously only reported *in vitro*. We used mice selectively lacking the *AR* gene in the nervous system (12) and backcrossed onto the C57BL6J strain to mimic the putative anti-androgenic effect of BPA.

Altered male sexual behavior of naive and sexually experienced AR^{NesCre} males

Naive AR^{NesCre} males exhibited significant longer latent periods to mounts, thrusts, intromission and ejaculation than their control littermates (Fig. 5B). They also displayed more ineffective mounts (without intromissions) and fewer total thrusts (Table 3). Sexual experience shortened the time to ejaculation and lowered the number of mounts with intromissions in control males (Fig. 5C, Table 3), but did not restore the mating behavior of AR^{NesCre} males: the latencies to intromission and ejaculation remained significantly longer and the number thrusts lower (Fig. 5C, Table 3). These alterations were associated with normal olfactory preference for estrus females over intact males (Fig. 5D-E).

AR^{NesCre} mutation did not affect the defeminization of sexual behavior and neuroanatomical organization of the MPOA

In AR^{NesCre} mouse model, *AR* exon 2 is excised from the gene in the nervous system by embryonic day 10.5, before differentiation of gonads and brain. We examined whether the deficiency in male sexual

behavior could be caused by alterations in the masculinization and defeminization processes underlying this behavior. We tested AR^{NesCre} males for their ability to show typical female behaviors when primed with estradiol and progesterone. Mutant males as their control littermates showed a low lordosis quotient and no olfactory preference towards males over females (Fig. 5F-G).

Next, we quantified the numbers of kisspeptin-ir neurons in the AVPV and calbindin-ir neurons in the MPOA. No difference between control and mutant males was observed (SI Fig. 4A-B).

AR^{NesCre} did not affect, or increased, the number of ER α -ir neurons in various parts of the neuronal circuitry underlying sexual behavior

We tested whether the ER α signaling pathway was altered in AR^{NesCre} mice: we compared the distribution and number of ER α -ir neurons between control and AR^{NesCre} mice. The selective disruption of AR in the nervous system did not affect the number of ER α -ir neurons in the BNST (SI Fig. 5) but increased the numbers in the MeA by 20% and in the MPOA by 30% (Fig. 6A-B).

Discussion

We report the first study of the consequences of BPA exposure on the perinatal organization and adult activation of male sexual behavior by T in mice. We describe *in vivo* mechanisms possibly underlying the BPA-induced effects.

The male urogenital tract is insensitive to BPA at TDI and NOAEL doses

Perinatal exposure to BPA did not affect the circulating levels of T. Consistent with this finding, there was no effect on the weight of the urogenital tract, and in particular on the highly androgen-sensitive seminal vesicles. Similar findings of unaltered adult levels of circulating T or testicular and seminal vesicle weights have been reported for different strains of mice (4, 27-29) and rat (30–32). The only reported deleterious effect of BPA exposure on circulating levels of T, without any alteration of testicular or seminal vesicles weight, was observed in CD1 mice perinatally exposed to BPA at doses 2.4- to 10-fold higher than the NOAEL dose (33).

BPA exposure during adulthood at TDI or NOAEL doses similarly had no effect on circulating T levels or on testicular or seminal vesicle weights, as previously reported in mice for low and high doses of BPA (28, 34). In rat, various effects depending on the dose, duration, and route of administration of BPA have been described (6, 34, 35).

It appears therefore that perinatal and adult exposure of male mice to low doses of BPA does not interfere with the development and function of the male urogenital tract or with testosterone levels.

The male neural circuitry underlying sexual behavior is vulnerable to adult but not perinatal exposure to BPA at TDI dose

Exposure to BPA interfered with the activation but not organization of male sexual behavior in C57BL6J mice. Indeed, perinatal exposition to BPA males did not inhibit the masculinization or defeminization processes underlying sexual behavior, regardless of the BPA dose. Indeed, the highest dose tested (the NOAEL dose) even increased the defeminization of male behavior as evidenced by the lower lordosis quotient in males. This contrasts with data available for rat indicating that perinatal exposure to BPA at similar low doses altered the sexual behavior of sexually experienced males (5).

At the neuroanatomical level, we found that the MPOA retained its sexually dimorphic organization for kisspeptin and calbindin neuronal populations. Similarly, BPA did not affect the number of tyrosine hydroxylase neurons, another sexually dimorphic neuronal population of the AVPV nucleus, in CD1 male mice (36). Again, these data contrast with reported effects of BPA on rat: the development of the kisspeptin cell population and of the sexually dimorphic nucleus has been reported by some, but not all, studies to be affected (3, 30, 37). This is consistent with the notion of differences between species in the vulnerability to BPA exposure. In mice, it seems unlikely that the low estrogenic activity of BPA disrupts the perinatal organization of male sexual behavior. This may be because neural aromatization of T into estradiol, necessary for the organization of sexual behavior (8–11, 38, 39), is extensive in the normal developing male brain during the perinatal period (40).

Adult exposure to BPA resulted in different effects depending on the dose administered. At the TDI dose, BPA reduced sexual motivation and performance, manifest as delayed mating and fewer numbers of events (MI and Th) than observed for vehicle-treated mice. This deficiency was not restored by sexual experience, suggesting that exposure to BPA at the TDI dose interferes with the adaptive processes enabling male mice to improve their sexual behavior between two consecutive tests. At the 100-fold higher dose, BPA had no effect on sexual behavior, which is consistent with the data emerging in the field of endocrine disruptors with effects observed at low relevant doses but not at high doses (41–44). A possible explanation is that low and high doses of BPA may differently interfere with T signaling pathways, thereby leading to differences in behavioral responses.

BPA at the TDI dose behaves like an anti-androgenic compound in the male neural circuitry underlying sexual behavior

The *in vivo* mechanisms of BPA action in the nervous system remain unclear. One possibility is that BPA alters the expression of AR and ER α in these brain areas. However, the densities of these receptors were similarly affected at both TDI and NOAEL doses whereas BPA interference with sexual behavior was only observed at the TDI dose: this is not consistent with the BPA-induced receptor modifications in the MPOA causing the behavioral alterations observed. It is likely that BPA

at the TDI dose decreased male sexual behavior by interfering with the AR pathway. Indeed, adult castration and hormonal supplementation of male mice showed that although ER signaling is involved in T-induced activation of sexual behavior it appears less important than the AR-signaling pathway as evidenced by the longer latencies to initiate mating. The lack of ejaculation of estradiol-supplemented males must be due, at least partly, to a specific requirement for AR stimulation by androgens at spinal and peripheral sites involved in erection and ejaculation. Moreover, behavioral and neuroanatomical characterization of *AR* conditional mutant mice implicates brain AR in the activational rather than organizational effects of T. The AR^{NesCre} mutation, which occurs early during development, did not disrupt the organization of olfactory preference or numbers of kisspeptin- or calbindin-ir neurons in the MPOA, or the defeminization of male sexual behavior. In addition, sexual alteration was not reversed by experience and seemed to be more related to deficient activation by T of the adult brain circuitry underlying sexual behavior. The number of ER α -ir neurons in the MPOA was higher than that in controls. These various similarities between BPA-exposed and AR^{NesCre} males strongly suggest that BPA and the AR^{NesCre} mutation share a common mechanism of action. We suggest that BPA at the TDI dose phenocopies, at least in part, the AR^{NesCre} mutation and acts as an anti-androgenic compound in the neuronal circuitry underlying sexual behavior. Several previous studies reported an anti-androgenic activity for BPA *in vitro* (16–21). Moreover, one previous study also showed that supplementation of castrated adult rats with T failed to increase the level of synaptogenesis in the hippocampal CA1 region of males concomitantly implanted with BPA (45). However, how exactly BPA exerts its putative anti-androgenic action *in vivo* remains to be determined. BPA may, for example, interfere with T binding to AR and block its activation or affect other steps of AR activation and function as reported *in vitro* (18).

In summary, our study sheds light on the still underestimated effects of chronic exposure to BPA during adulthood. The adult neural circuitry underlying sexual behavior is vulnerable to doses of BPA that do not affect hormonal levels or testicular and seminal vesicle weights. Our results support the idea that BPA at the TDI dose antagonizes the AR signaling required for the adult activation, but not perinatal masculinization and defeminization, of the brain circuitry underlying sexual behavior by T in

male mice. Although caution is required in extrapolating these findings in mice to other species, it is plausible that the putative anti-androgenic activity of BPA affects adult expression of mammalian reproductive behaviors. It is of interest that an association has been recently reported between urine BPA levels and both decreased sexual desire and more erectile difficulty in Chinese men exposed to BPA in the workplace (46). Further studies with mice are needed to explore whether adult exposure to BPA at the TDI dose alters, like the AR^{NesCre} mutation (47), the activation by T of the spinal nucleus of the bulbocavernosus neuromuscular system involved in penile erection and sperm emission. It would be also of interest to investigate the effects and mechanisms of adult exposure to BPA on other central functions involving the AR signaling pathway.

Methods

Animals and treatments. C57BL6J mice were purchased from Janvier. Mutant males (AR^{fl}/Y, expressing the Nestin-Cre transgene: AR^{NesCre}) and their control littermates (AR^{fl}/Y) were obtained as previously described (12). All animal studies were performed in accordance with the NIH guidelines for care and use of Laboratory animals (NIH Guide) and French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC).

Perinatal exposure to oral BPA (Sigma-Aldrich) was conducted on dams from day 15 of pregnancy to postnatal day 21. Adult exposure to BPA lasted 4 weeks. BPA was used at TDI (50 µg/kg body weight (bw).day) and NOAEL (5 mg/kg (bw).day) doses as described in *SI Materials and Methods*.

T measurements and weight of the urogenital tract. Sera were extracted and circulating levels of T were measured by RIA as described in *SI Materials and Methods*. Testes and seminal vesicles were removed and weighed for each animal.

Behavioral analyses. Tests were conducted under red-light illumination 2 h after lights off and videotaped for further analyses.

Male sexual behavior. Males were individually housed and tested twice for 10 h after the introduction of an estrus C57BL6J female. Sexual behavior was analyzed as described in *SI Materials and Methods*.

Lordosis behavior. Males, castrated and primed with estradiol and progesterone, were tested twice in the presence of intact stud males as previously described (10). The lordosis quotient was calculated as described in *SI Materials and Methods*.

Olfactory preference. Tests (5 min) were performed in an enclosed Plexiglas Y-maze and males were offered the choice between bedding soiled by males and by estrus females or between anesthetized estrus females and gonadally intact males. The time spent sniffing each goal box was scored over the test as described in *SI Materials and Methods*.

Immunohistochemistry. Animals were sacrificed and transcardially perfused with a solution of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer. Brains were post-fixed overnight in 4% PFA, cryoprotected in sucrose and stored until analyses. Immunodetection was performed with specific antibodies and immunolabeling was analyzed as described in *SI Materials and Methods*. For all quantifications,

sections were matched on anatomical landmarks and compared between animal groups by tallying the number of labeled cells in each region.

Statistics. Data are expressed as means \pm S.E.M. Two-way ANOVA was used to analyze the main effects of treatment and genotype with Bonferroni tests for *post hoc* comparisons. One-way ANOVA or Student's *t* tests were used for unpaired data. *P* values less than 0.05 were considered to be significant.

Acknowledgments

This work was supported by the “Contaminants-Ecosystèmes-Santé” program of the “Agence Nationale de la Recherche”, “Agence Nationale de Sécurité Sanitaire” and “Réseau Santé Environnement Toxicologie” of the “Région Ile de France”. We thank Prof. Guido Verhoeven (Laboratory of Experimental Medicine and Endocrinology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium) for providing the floxed AR mouse line. We thank Dr Alain Caraty (Laboratoire de Physiologie de la Reproduction & des Comportements, UMR 7247 INRA/CNRS/Université de Tours) for providing anti-kisspeptin antibody. We thank Hélène Hardin-Pouzet (UMR CNRS 7224-Université P. & M. Curie, Paris, France) for critical reading of the manuscript and the UPMC platform for taking care of the animals.

References

1. Calafat AM et al. (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113:391–395.
2. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24:139–177.
3. Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, Bianchi F, Dessì-Fulgheri F (2002) Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3:409–414.
4. Kawai K et al. (2003) Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 111:175.
5. Jones BA, Shimell JJ, Watson NV (2011) Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Horm Behav* 59:246–251.
6. Tohei A, Suda S, Taya K, Hashimoto T, Kogo H (2001) Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:216–221.
7. Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC (1959) Organizing Action of Prenatally Administered Testosterone Propionate on the Tissues Mediating Mating Behavior in the Female Guinea Pig. *Endocrinology* 65:369–382.
8. Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1997) Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1476–1481.
9. Wersinger SR et al. (1997) Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. *Horm Behav* 32:176–183.
10. Kudwa AE (2005) A previously uncharacterized role for estrogen receptor : Defeminization of male brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4608–4612.
11. Bakker J, Honda S-I, Harada N, Balthazart J (2002) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 22:9104–9112.
12. Raskin K et al. (2009) Conditional Inactivation of Androgen Receptor Gene in the Nervous System: Effects on Male Behavioral and Neuroendocrine Responses. *J Neurosci* 29:4461–4470.
13. Juntti SA et al. (2010) The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron* 66:260–272.
14. Dodds E, Lawson W (1936) Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.

15. Kuiper GG et al. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863–870.
16. Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158:327–339.
17. Paris F et al. (2002) Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 193:43–49.
18. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong E-Y, Ahn RS, Lee K (2003) Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 75:40–46.
19. Satoh K, Ohyama K, Aoki N, Iida M, Nagai F (2004) Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food Chem Toxicol* 42:983–993.
20. Xu L-C et al. (2005) Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216:197–203.
21. Sun H, Xu L-C, Chen J-F, Song L, Wang X-R (2006) Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food Chem Toxicol* 44:1916–1921.
22. Rabedeau RG, Whalen RE (1959) Effects of copulatory experience on mating behavior in the male rat. *J Comp Physiol Psychol* 52:482–484.
23. Swaney WT, Dubose BN, Curley JP, Champagne FA (2012) Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Horm Behav* 61:472–478.
24. Clarkson J, Herbison AE (2006) Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology* 147:5817–5825.
25. Lephart ED, Taylor H, Jacobson NA, Watson MA (1998) Calretinin and calbindin-D28K in male rats during postnatal development. *Neurobiol Aging* 19:253–257.
26. Oriyasa C, Sakuma Y (2010) Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J Comp Neurol* 518:3618–3629.
27. Cagen SZ et al. (1999) Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50:36–44.
28. Nagao T, Saito Y, Usumi K, Yoshimura S, Ono H (2002) Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. *Reprod Toxicol* 16:123–130.
29. Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF (2010) Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav* 58:754–761.

30. Kubo K et al. (2003) Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res* 45:345–356.
31. Cagen SZ et al. (1999) Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* 30:130–139.
32. Bai Y et al. (2011) Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge system in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology* 152:1562–1571.
33. Xi W et al. (2011) Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 31:409–417.
34. Takahashi O, Oishi S (2003) Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 41:1035–1044.
35. Takahashi O, Oishi S (2001) Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch Toxicol* 75:42–51.
36. Rubin BS et al. (2006) Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147:3681–3691.
37. Kubo K et al. (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett* 304:73–76.
38. Bodo C, Kudwa AE, Rissman EF (2006) Both estrogen receptor-alpha and -beta are required for sexual differentiation of the anteroventral periventricular area in mice. *Endocrinology* 147:415–420.
39. Simerly RB, Zee MC, Pendleton JW, Lubahn DB, Korach KS (1997) Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14077–14082.
40. Beyer C, Wozniak A, Hutchison JB (1993) Sex-specific aromatization of testosterone in mouse hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 58:673–681.
41. vom Saal FS et al. (1997) Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2056–2061.
42. vom Saal FS et al. (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14:239–260.
43. Jenkins S, Wang J, Eltoum I, Desmond R, Lamartiniere CA (2011) Chronic Oral Exposure to Bisphenol A Results in a Nonmonotonic Dose Response in Mammary Carcinogenesis and Metastasis in MMTV-erbB2 Mice. *Environ Health Perspect* 119:1604–1609.
44. Welshons WV et al. (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111:994–1006.

45. Leranath C, Szigeti-Buck K, Maclusky NJ, Hajszan T (2008) Bisphenol A prevents the synapto-genic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology* 149:988–994.
46. Li D-K et al. (2010) Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. *J Androl* 31:500–506.
47. Raskin K et al. (2012) Characterization of the spinal nucleus of the bulbocavernosus neuromus-cular system in male mice lacking androgen receptor in the nervous system. *Endocrinology* 153:3376–3385.

Figure Legends

Fig. 1. Effects of perinatal exposure to BPA on male sexual behavior. (*A* and *B*) Latencies to mount (Mo), thrust (Th), intromission (In), and ejaculation (Ej) of naive (*A*) and sexually experienced (*B*) males exposed to vehicle, or BPA at TDI or NOAEL doses (expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 26-38$ per treatment group). An effect of experience was found for Mo ($F_{(2,97)} = 19.29, p < 0.0001$), Th ($F_{(2,97)} = 22.16, p < 0.0001$), In ($F_{(2,97)} = 11.28, p = 0.0011$) and Ej ($F_{(2,97)} = 10.01, p = 0.0021$). *Post hoc* analysis showed a lower latency to Mo, Th, In and Ej for experienced than naive males ($^a p < 0.05$). (*C* and *D*) Time spent chemoinvestigating intact males (m) vs estrus females (f) (*C*) or male-soiled vs female-soiled bedding (*D*), expressed as percentage of total time spent sniffing m or f cues ($n = 17-28$ per treatment group). A significant effect of stimulus was found for intact animals ($F_{(2,66)} = 19.82, p < 0.0001$) and soiled bedding ($F_{(2,59)} = 27.03, p < 0.0001$); *post hoc* analysis showed differences in the time spent sniffing male vs female ($^a p < 0.05$). (*E*) Lordosis quotient of castrated males supplemented with estradiol and progesterone in Tests 1 and 2. Data are expressed as mean values \pm S.E.M for 13-25 males per treatment group. A significant effect of treatment was found ($F_{(2,36)} = 5.10, p < 0.0112$). *Post hoc* analysis showed a lower lordosis quotient for BPA-NOAEL-exposed males than for the vehicle group ($^a p < 0.05$). (*F*) Mean time spent in chemoinvestigating gonad-intact male (m) vs estrus female (f) or male-soiled vs female-soiled-bedding after castration and estradiol/progesterone supplementation ($n = 13-25$ per treatment group).

Fig. 2. Quantification of kisspeptin- and calbindin-ir neurons in males perinatally-exposed to BPA. (*A* and *B*) Representative anti-kisspeptin (*A*) and anti-calbindin (*B*) immunostaining in the anteroventral periventricular area and medial preoptic area, respectively. Arrowheads point to kisspeptin-positive neurons. The dotted ellipses show the location of the sexually dimorphic calbindin population. 3V: third ventricle. Quantitative data are reported as mean values \pm S.E.M of kisspeptin- (kiss) and calbindin- (cal) positive cells ($n = 3-6$ per treatment group).

Fig. 3. Effects of adult exposure to BPA on male sexual behavior. (*A* and *B*) Latencies to the first mount (Mo), thrust (Th), intromission (In), and ejaculation (Ej) of naive (*A*) and sexually experienced

(B) males exposed to vehicle, or to BPA at TDI or NOAEL doses. Data are expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 13-19$ males per treatment group. There was a significant effect of treatment for Mo ($F_{(2,46)} = 3.87, p = 0.0279$), Th ($F_{(2,46)} = 3.81, p = 0.0292$), In ($F_{(2,46)} = 4.10, p = 0.0228$) and Ej ($F_{(2,46)} = 3.79, p = 0.03$). *Post hoc* analysis showed a longer latency to Mo, Th, In and Ej for BPA-TDI than vehicle-exposed males ($^a p < 0.05$). There was an effect of experience in vehicle-exposed males for In ($F_{(1,12)} = 6.61, p = 0.0245$) and Ej ($F_{(1,12)} = 15.22, p = 0.0021$). *Post hoc* analysis showed a shorter latency to In and Ej in experienced than naive vehicle-exposed males ($^b p < 0.05$). (C and D), Time spent chemoinvestigating intact male (m) vs estrus female (f) (C) or male-soiled vs female-soiled bedding (D) expressed as percentage of total time spent sniffing m or f cues. Data are expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 10-16$ males per treatment group. A significant effect of stimulus was found for anesthetized animals ($F_{(2,38)} = 9.31, p = 0.0041$) and for soiled bedding ($F_{(2,41)} = 17.02, p = 0.0002$); *post hoc* analysis showed differences in the time spent sniffing male vs female cues ($^a p < 0.05$).

Fig. 4. Quantification of AR- and ER α -ir neurons in chemoresponsive brain areas of males exposed during adulthood to vehicle or BPA. (A and C) Representative anti-AR (A) and anti-ER α (C) immunostaining in the medial amygdala (MeA) and the medial preoptic area (MPOA). (B and D) Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M of AR- (B) and ER α - (D) positive cells ($n = 4$ per treatment group), $^a p < 0.05$ vs vehicle-exposed males. AC: anterior commissure, 3V: third ventricle.

Fig. 5. Characterization of male sexual behavior in wild-type and AR^{NesCre} mice. (A) Male sexual behavior in C57BL6J males castrated and supplemented with T or estradiol (E2). Latencies to the first mount (Mo), thrust (Th), intromission (In), and ejaculation (Ej) are expressed as mean values \pm S.E.M for 10-18 males per treatment. E2-supplemented males did not ejaculate (u : unobservable) during the 10 h of the test. $^a p < 0.05$. (B and C), Latencies to the first behaviors of naive (B) or sexually experienced (C) control and AR^{NesCre} males (expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 8-9$ per genotype). There was a significant effect of genotype for Mo ($F_{(1,13)} = 4.74, p = 0.0486$), Th ($F_{(1,13)} = 5.74, p = 0.0323$), In ($F_{(1,13)} = 7.18, p = 0.0189$) and Ej ($F_{(1,13)} = 7.77, p = 0.0154$). *Post hoc* analysis showed a longer latency to Mo, Th, In and Ej for AR^{NesCre} than for control males ($^a p < 0.05$). There was an effect

of experience in control males for Ej ($F_{(1,6)} = 10.84, p = 0.0166$). *Post hoc* analysis showed a shorter latency to Ej for experienced than naive control males ($^b p < 0.05$). (*D* and *E*), Time spent chemoinvestigating intact male (m) vs estrus female (f) (*D*) or male-soiled vs female-soiled bedding (*E*) expressed as percentage of total time spent sniffing m or f cues. Data are expressed as mean values \pm S.E.M for 6 males per genotype. A significant effect of stimulus was found for intact animals ($F_{(1,10)} = 22.26, p = 0.0008$) and soiled bedding ($F_{(1,9)} = 132.43, p < 0.0001$); *post hoc* analysis showed differences in the time spent sniffing male vs female cues ($^a p < 0.05$). (*F*) Lordosis quotients of control and AR^{NesCre} males castrated and supplemented with E2 and progesterone, expressed as mean values \pm S.E.M for 9 males per genotype. (*G*) Olfactory preference of control and AR^{NesCre} males, (n = 9 males per genotype).

Fig. 6. Effect of AR^{NesCre} mutation on ER α expression in chemoresponsive areas. (*A*) Representative anti-ER α immunostaining in the medial amygdala (MeA) and medial preoptic area (MPOA); AC, anterior commissure; 3V, third ventricle. (*B*) Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M for 3 to 4 males per genotype. $^a p < 0.05$ vs control mice.

Table Legends**Table 1.**

Mean values \pm S.E.M, expressed for testis and SV as a percentage of corresponding body weight, are shown for vehicle- and BPA-exposed males (n = 11-26 per treatment group).

Table 2.

The mean values \pm S.E.M of number of mounts without intromission (Mo), with intromission (In) or thrusts (Th) are reported for males displaying complete sexual behavior in the two tests (n = 19-29 per treatment group for perinatal exposure; n = 12-19 per treatment group for adult exposure). There was a significant effect of adult exposure for the number of In ($F_{(2,35)} = 3.29, p = 0.049$) and Th ($F_{(2,35)} = 4.23, p = 0.0226$). *Post hoc* analysis showed no significant difference between vehicle- and BPA-NOAEL-treated males and smaller numbers of In and Th for BPA-TDI-exposed males than for the vehicle group ($^a p < 0.05$). An effect of experience was found for the number of In ($F_{(2,35)} = 33.062, p < 0.0001$) and Th ($F_{(2,35)} = 17.42, p = 0.0002$); *post hoc* analysis indicated that experience decreased the number of In and Th. $^a p < 0.05$ vs. vehicle group; $^b p < 0.05$ vs. naive males subjected to the same treatment.

Table 3.

The mean values \pm S.E.M (n = 8-9 per genotype) for numbers of mounts without intromission (Mo), mounts with intromission (In) and thrusts (Th) are shown for males displaying a complete sexual behavior in the two tests. There was a significant effect of genotype on the numbers of Mo ($F_{(1,13)} = 16.50, p = 0.001$) and Th ($F_{(1,13)} = 15.53, p = 0.002$). *Post hoc* analysis showed more Mo and fewer Th for AR^{NesCre} males than controls ($^a p < 0.05$). An effect of experience was found for the number of In ($F_{(1,13)} = 6.30, p = 0.026$) and Th ($F_{(1,13)} = 5.71, p = 0.033$); *post hoc* analysis indicated that experience decreased the number of In and Th. $^a p < 0.05$ vs. vehicle group; $^b p < 0.05$ vs. naive males of the corresponding genotype.

Table 1

Exposure	Body weight (g)	Testis weight (% bw)	SV weight (% bw)	Testosterone levels (ng/ml)
PERINATAL				
Vehicle	27.54 ± 0.42	0.35 ± 0.01	0.76 ± 0.03	0.85 ± 0.33
BPA-TDI	26.36 ± 0.97	0.37 ± 0.01	0.75 ± 0.04	1.17 ± 0.26
BPA-NOAEL	27.96 ± 0.43	0.33 ± 0.01	0.82 ± 0.03	0.62 ± 0.09
ADULT				
Vehicle	27.01 ± 0.44	0.35 ± 0.01	0.71 ± 0.02	1.01 ± 0.22
BPA-TDI	26.24 ± 0.36	0.36 ± 0.01	0.73 ± 0.03	0.99 ± 0.26
BPA-NOAEL	26.54 ± 0.51	0.33 ± 0.02	0.70 ± 0.03	0.82 ± 0.17

Body weight (bw), testicular and seminal vesicle (SV) weights, and serum concentrations of testosterone in males exposed to BPA perinatally or during adulthood.

Table 2

Exposure	Number of Mo	Number of In	Number of Th
PERINATAL			
Naive			
Vehicle	4.75 ± 0.86	16.42 ± 1.95	378.63 ± 31.16
BPA-TDI	7.03 ± 1.07	19.31 ± 2.28	435.69 ± 33.16
BPA-NOAEL	5.50 ± 0.94	15.8 ± 2.43	381.8 ± 37.68
Experienced			
Vehicle	6.78 ± 1.09	17.22 ± 1.95	379.09 ± 33.51
BPA-TDI	8.07 ± 1.55	17.33 ± 2.56	376.19 ± 42.04
BPA-NOAEL	7.89 ± 1.44	17.53 ± 3.97	387.42 ± 49.91
ADULT			
Naive			
Vehicle	6.85 ± 1.60	29.92 ± 5.67	588.69 ± 54.35
BPA-TDI	3.80 ± 0.82	15.20 ± 1.99 ^a	390.40 ± 57.29 ^a
BPA-NOAEL	6.00 ± 0.97	20.71 ± 3.24	453.53 ± 50.79
Experienced			
Vehicle	5.25 ± 1.02	14.00 ± 2.34 ^b	365.33 ± 51.73 ^b
BPA-TDI	4.38 ± 0.68	8.23 ± 1.38 ^{a,b}	284.85 ± 33.21 ^{a,b}
BPA-NOAEL	4.33 ± 1.03	10.40 ± 1.73 ^b	305.67 ± 36.40 ^b

Quantification of the sexual behavior displayed by naive and sexually experienced males exposed to BPA during the perinatal period or during adulthood.

Table 3

	Number of Mo	Number of In	Number of Th
Naive			
Control	5.63 ± 2.02	37.13 ± 6.72	648.88 ± 49.55
AR ^{NesCre}	25.71 ± 5.63 ^a	30.00 ± 10.18	333.43 ± 87.58 ^a
Experienced			
Control	5.88 ± 1.37	28.00 ± 8.98 ^b	543.25 ± 93.52 ^b
AR ^{NesCre}	22.43 ± 4.19 ^a	12.57 ± 2.91 ^b	173.14 ± 3.77 ^{a,b}

Quantification of the sexual behavior displayed by naive and sexually experienced AR^{NesCre} males and their control littermates.

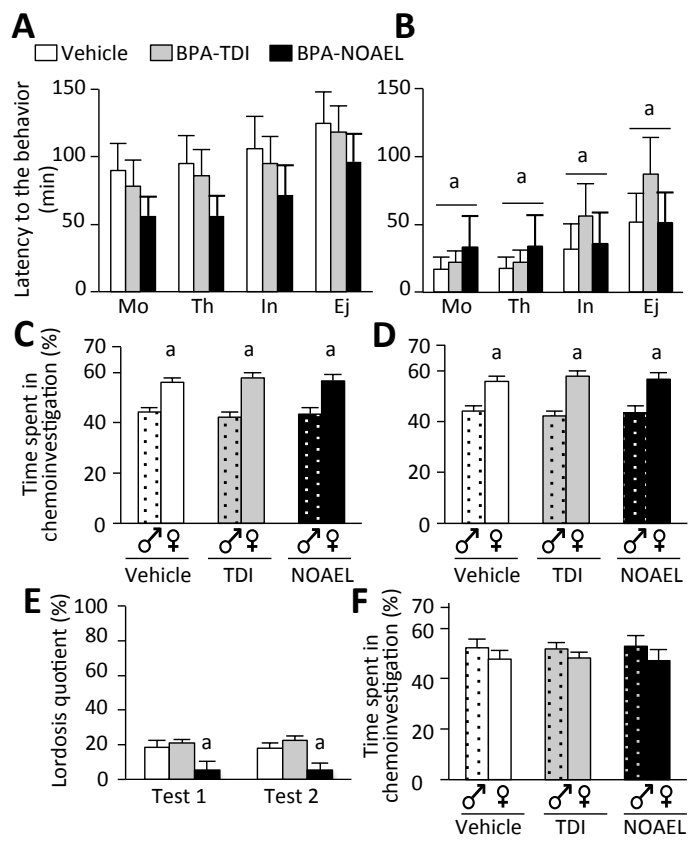


Figure 1

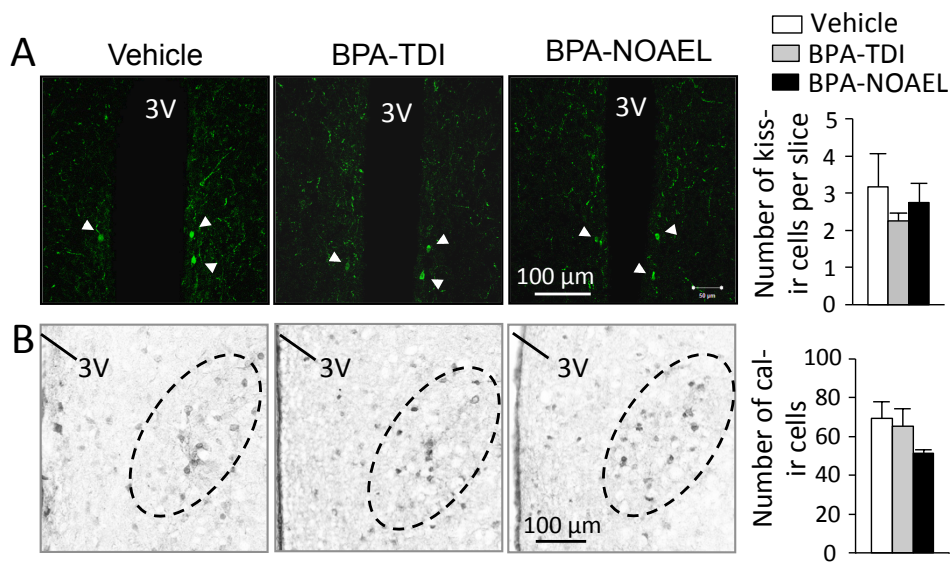


Figure 2

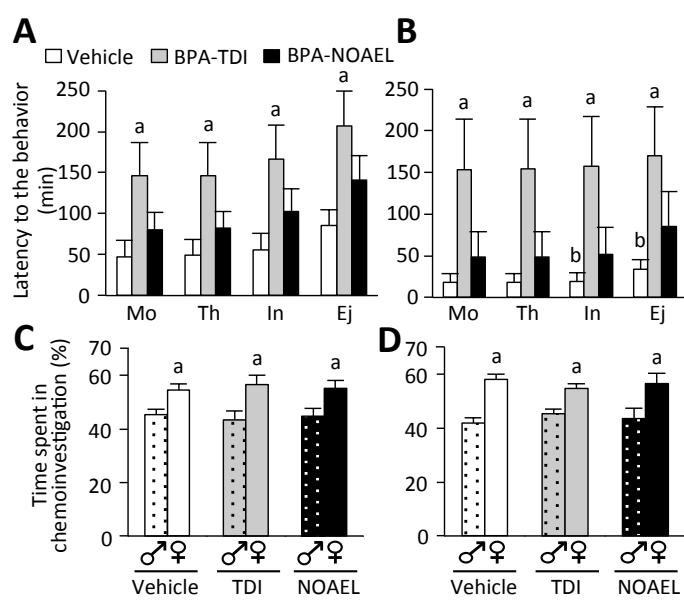


Figure 3

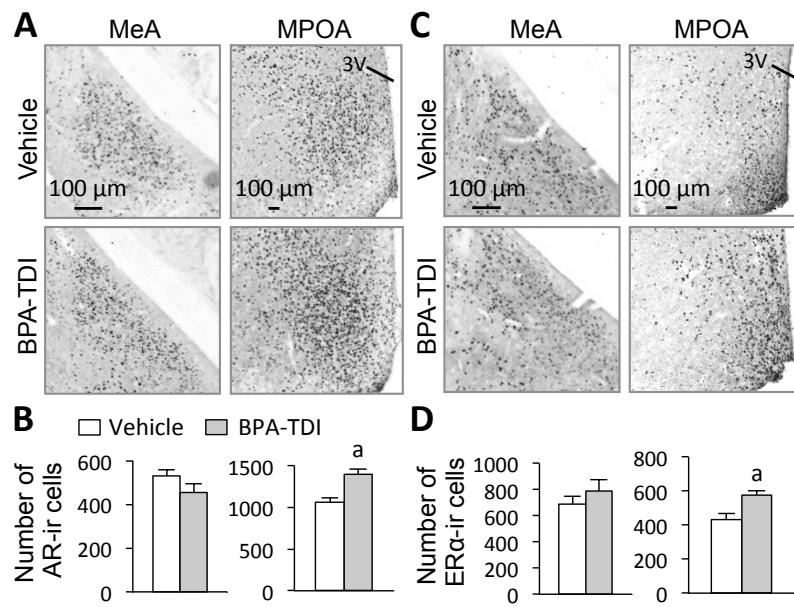


Figure 4

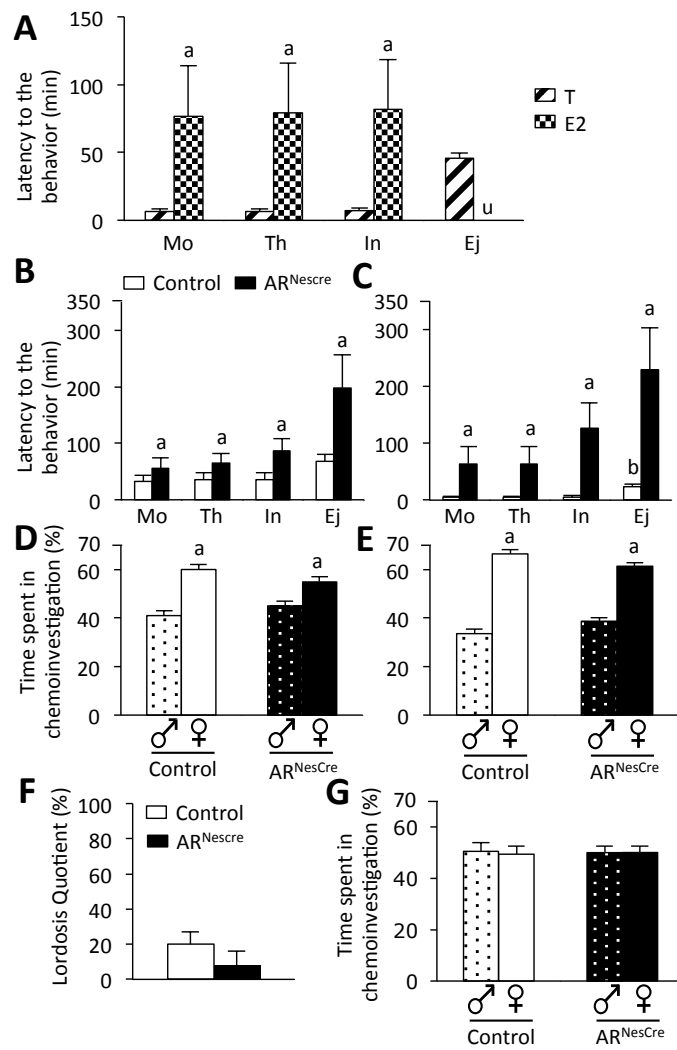


Figure 5

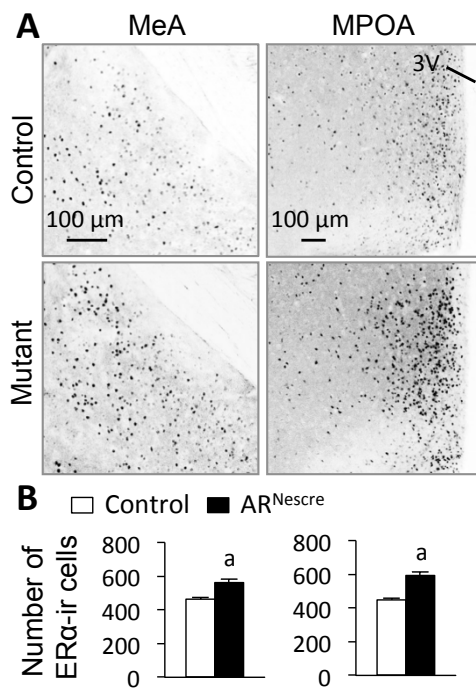


Figure 6

Supplementary Figures

SI Fig. 1. Growth curves for males perinatally exposed to vehicle or BPA at TDI or NOAEL doses. Males (n = 36-50 per treatment group) were weighed weekly. The growth curves are not significantly different.

SI Fig. 2. Quantification of AR- and ER α -ir cells in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) of males exposed during adulthood to vehicle or BPA at TDI dose. (A) Representative anti-AR and anti-ER α immunostaining in the BNST. (B) Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M of AR- and ER α -immunoresponsive (ir) cells (n = 4 per treatment group), ^a*p* < 0.05 vs vehicle-exposed males. AC: anterior commissure.

SI Fig. 3. Effects of adult exposure to BPA at NOAEL dose on the number of AR- and ER α -ir neurons in chemoresponsive brain areas. (A and C) Representative anti-AR (A) and anti-ER α (C) immunostaining in the medial amygdala (MeA), bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and medial preoptic area (MPOA). (B and D), Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M (n = 4 per treatment group) for AR- (B) and ER α - (D) positive cells. AC: anterior commissure, 3V: third ventricle. ^a*p* < 0.05 vs. vehicle-exposed mice.

SI Fig. 4. Quantification of kisspeptin- and calbindin-ir neurons in the medial preoptic area of control and AR^{NesCre} males. (A) Representative anti-kisspeptin and anti-calbindin immunostaining in the anteroventral periventricular area and medial preoptic area, respectively. The dotted ellipse shows the location of the sexually dimorphic calbindin population. (B) Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M (n = 4-5 per genotype) for kisspeptin- (kiss-) and calbindin- (cal-) positive neurons. 3V: third ventricle.

SI Fig. 5. Effect of AR^{NesCre} mutation on ER α expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). (A) Representative anti-ER α immunostaining in the BNST; AC, anterior commissure. (B) Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M for 3 to 4 males per genotype. ^a*p* < 0.05 vs control mice.

Supplementary Materials and Methods

Animals and Treatment. The AR^{NesCre} mouse line was back-crossed for at least nine generations into the C57BL6J strain. C57BL6J and AR^{NesCre} mice were group-housed under a 12:12-h light–dark cycle and maintained at 22°C. They were fed with a standard diet with free access to food and water.

Exposure of adult C57BL6J males involved daily oral gavage with sesame oil, as vehicle, containing BPA (Sigma) at 50 µg/kg body weight (bw).day (BPA-TDI), or BPA at 5 mg/kg (bw).day (BPA-NOAEL) as previously described (1). Perinatal exposure involve treating pregnant dams from day 15 of pregnancy to postnatal day 21. Male offspring were weaned, mixed to avoid litter effects and allowed to grow until 8 weeks of age. Adult exposure was conducted on another group of 8-week-old males and lasted 4 weeks. Body weight, followed throughout the period of BPA exposure, did not differ between the three treatment groups (mean of 25 ± 0.5 g the first day of treatment and 27 ± 0.5 g the last day of treatment).

Hormonal analysis and morphology of the genital tract. Males were sacrificed by decapitation to collect blood. Sera were extracted and circulating T concentrations were measured by RIA at the hormonal assay platform of the laboratory of behavioral & reproductive physiology (UMR 7247 INRA/CNRS/University of Tours) using ³H-Testosterone, as previously described (2, 3). The mean intra-assay coefficient of variation was 7% and assay sensitivity was 125 pg/ml.

Behavioral analyses. Tests were conducted under red-light illumination 2 h after lights off and videotaped for further analyses.

Male sexual behavior. Naive males were individually housed for 3 days before the first test. They were tested twice with an interval of 14 days. Each naive or sexually experimented male was tested in its home cage, and tests lasted 10 h after the introduction of the estrus female. Sexual behavior was analyzed by scoring the latency and frequency of mounts, intromissions, thrusts and ejaculation.

Estrus C57BL6J females were ovariectomized under general anesthesia (xylazine/ketamine) and implanted with SILASTIC implants filled with 50 µg of E2-benzoate (Sigma) in 30 µl of sesame oil. Four to five hours before the tests, females were given a s.c. injection of 1 mg of progesterone (Sigma) in 100 µl of sesame oil. Female receptivity was verified with sexually experienced males before the beginning of experiments.

C57BL6J males were castrated under general anesthesia (xylazine/ketamine) and implanted with SILASTIC tubes containing either 10 mg of T (T-supplemented group) or 5 µg of E2-benzoate (E2-supplemented group).

Lordosis behavior. Males were castrated under general anesthesia (xylazine/ ketamine). Four weeks after surgery, they were given a s.c. injection of E2-benzoate (10 μ g dissolved in 100 μ l of sesame oil). Two days after E2 injection, they were administered progesterone (1 mg in 100 μ l of sesame oil) and tested 4-5 h later. Animals were tested twice with an interval of 14 days. Sexually experienced C57BL6J males were used as testing partners. Tests were terminated when females received 20 mounts from the stud male (defined as both forepaws on the hind region) or after 20 min, whichever occurred first, as previously described (4). Lordosis was defined as follows: all four paws were grounded, the hind region was lifted off the floor of the test chamber, and the back was slightly arched. The lordosis quotient (lordosis number/number of mounts) was scored for each subject.

Olfactory preference. The olfactory preference of males was assessed one week after each sexual behavior test, in an enclosed Plexiglas Y-maze. Mice were initially allowed to become familiar, for 5 min on each of two consecutive days, with the experimental paradigm, but with no stimulus in the goal boxes. On the day of the test, mice were offered the choice between bedding soiled by males and females and between an anesthetized estrus female and a gonadally intact male. Male-soiled bedding was obtained from animals placed in a cage with clean bedding 24 h before the test. Female-soiled bedding was obtained from a group of five estrus females. The time spent sniffing each goal box was scored over the five-minute test. The maze was cleaned with 10% ethanol between trials.

Immunohistochemistry. Brains were sliced into coronal sections of 30 μ m using a cryotome (Leica CM 300). A representative sample of sections for each region of analysis was blocked for 2 h with 5% normal goat serum (NGS, Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS)-Triton 0.1%. They were then incubated overnight with polyclonal anti-kisspeptin (1:2000) for 72 h, anti-AR (1:200; Santa Cruz Biotechnology) or anti-ER α (1:400; Santa Cruz Biotechnology) for 72 h or 48 h, respectively, or with anti-calbindin monoclonal (Sigma) antibodies diluted 1:1000. Anti-kisspeptin AC053 was raised in lamb against a 14 amino acid (AA) peptide corresponding to the sequence close to the N terminus (N-ter) of mouse kisspeptin-52 (AA 5 to 18) according to a previously published immunization protocol (5). The resulting antiserum was affinity purified by Eurogenetech. Specificity was confirmed by pre-adsorption tests with mouse kisspeptin-52. Kisspeptin immunofluorescence labeling of free floating sections was adapted from a previously described protocol (6).

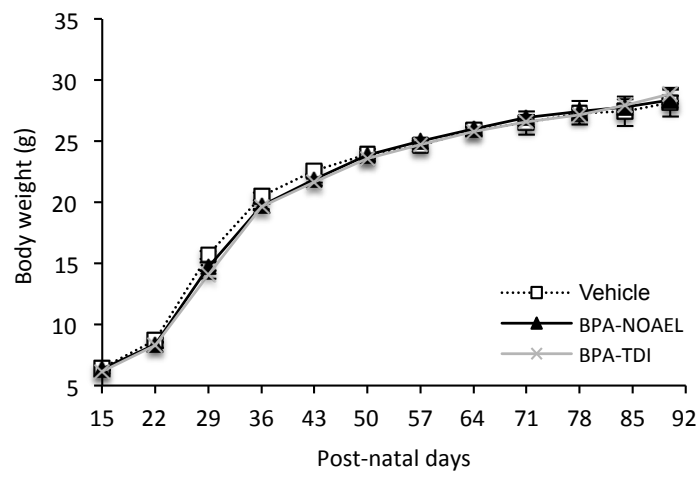
Kisspeptin immunostaining was performed using an alexafluor 488-conjugated donkey anti-sheep secondary antibody (1:500 for 2.5 hr at room temperature, Invitrogen) for detection and analyzed by confocal microscopy.

AR, ER α and calbindin immunostaining was performed with biotinylated goat anti-rabbit (1:500, Vector Laboratories) or anti-mouse (1:250, Vector Laboratories) antibodies for 2 h. Bound antibodies were visualized by 1 h of incubation with the biotin–streptavidin complex reagent (ABC kit; Vector Laboratories), followed by color development with the chromogenic substrate 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich). Sections were scanned using a high-resolution Nanozoomer Hamamatsu scanner (Hamamatsu corporation) and analyzed.

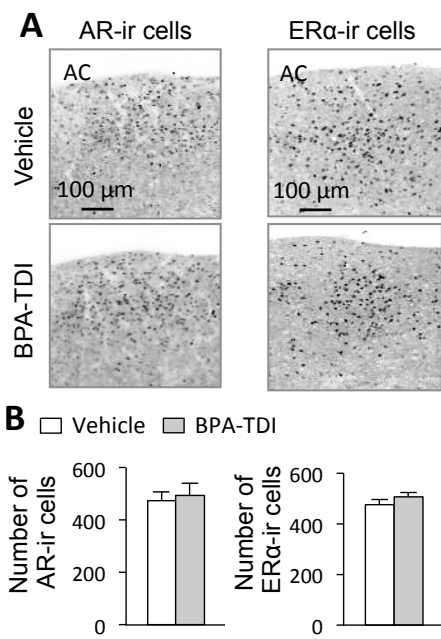
For all quantifications of immunoreactivity, stained sections were matched on anatomical landmarks and compared between animal groups by tallying the number of labeled cells in each region.

Supplementary references

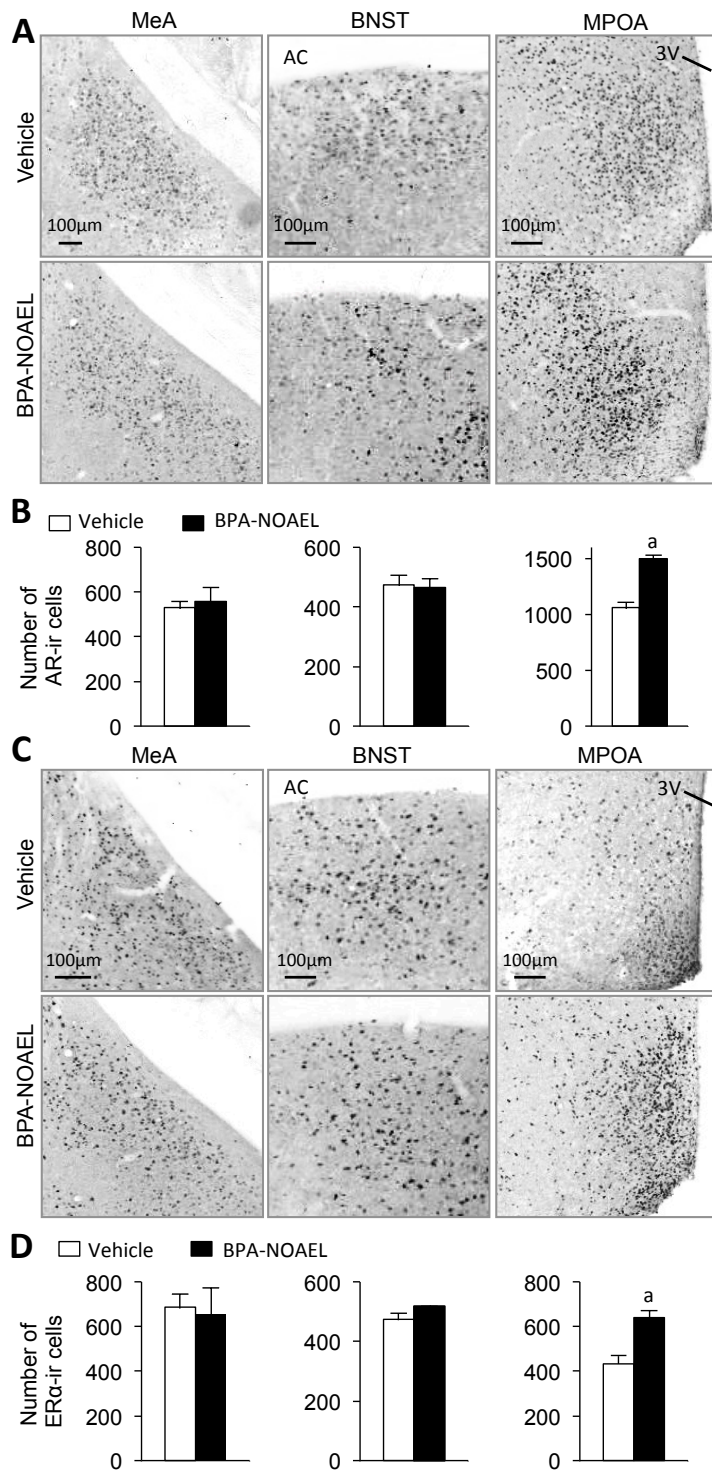
1. Braniste V et al. (2010) Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:448–453.
2. Raskin K et al. (2009) Conditional Inactivation of Androgen Receptor Gene in the Nervous System: Effects on Male Behavioral and Neuroendocrine Responses. *J Neurosci* 29:4461–4470.
3. Hochereau-de Reviere MT, Perreau C, Pisselet C, Fontaine I, Monet-Kuntz C (1990) Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domest Anim Endocrinol* 7:63–73.
4. Kudwa AE (2005) A previously uncharacterized role for estrogen receptor : Defeminization of male brain and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4608–4612.
5. Caraty A, de Reviere MM, Pelletier J, Dubois MP (1980) Reassessment of LRF radioimmunoassay in the plasma and hypothalamic extracts of rats and rams. *Reprod Nutr Dev* 20:1489–1501.
6. Desroziere E et al. (2012) Embryonic development of kisspeptin neurones in rat. *J Neuroendocrinol*. In press, available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22530935>.



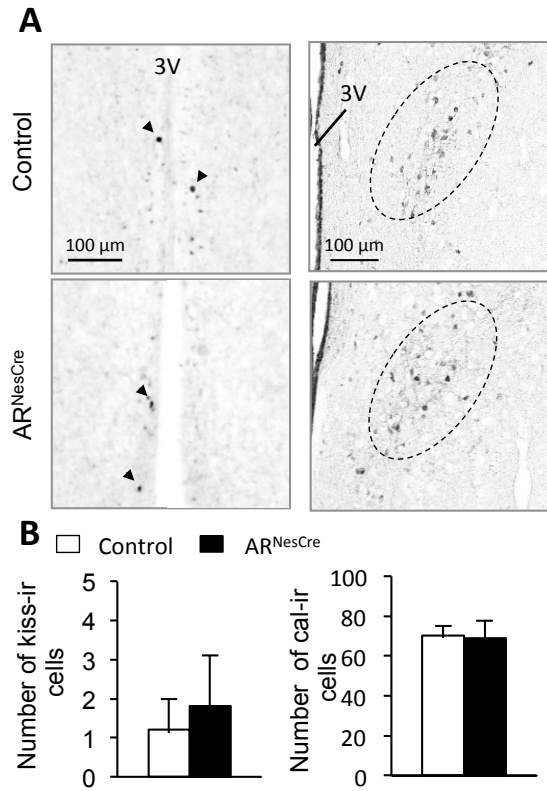
SI Figure 1



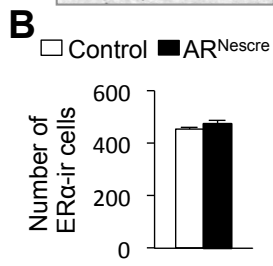
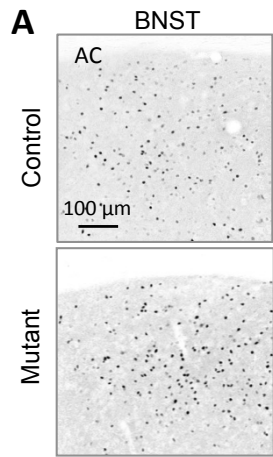
SI Figure 2



SI Figure 3



SI Figure 4



SI Figure 5

ARTICLE 4

III- Caractérisation de la lignée invalidée pour l'ER β dans le système nerveux

Résumé article 4 Characterization of male mice lacking *estrogen receptor beta* in the nervous system. En préparation

Marie-Luce C., Picot M., Albac C., Martini MA., Parmentier C., Keller M., Hardin-Pouzet H and Mhaouty-Kodja S.

Nous avons mis en évidence, grâce au modèle d'invalidation conditionnelle, le rôle important de l'AR central dans la régulation du comportement sexuel mâle par la testostérone. En particulier, nous avons montré que l'AR était nécessaire à l'expression efficace du comportement sexuel à l'âge adulte. S'il ne semble pas être nécessaire à l'organisation des populations neuronales sexuellement dimorphique au niveau cérébral, il joue en revanche un double rôle organisationnel et activationnel au niveau spinal. Il était donc important de poursuivre cette étude en utilisant la même stratégie afin de comparer la contribution relative des récepteurs AR et ERs dans les effets centraux de la testostérone. L'intérêt de ces modèles conditionnels est qu'ils n'interfèrent pas avec les effets périphériques de la testostérone.

Les études génétiques précédentes utilisant des souris KO de manière ubiquitaire pour l'ER α (Ogawa et al., 1997; Wersinger et al., 1997) suggèrent fortement l'implication de ce dernier dans la masculinisation du système nerveux central. La seule étude effectuée sur l'ER β attribue un rôle à ce récepteur dans la déféminisation du système nerveux central (Kudwa et al., 2005). En effet, les mâles ER β KO sont capables de manifester un comportement sexuel typiquement mâle (Ogawa et al., 1999; Temple et al., 2003; Bodo et al., 2006; Kudwa, 2006). En revanche, ils peuvent montrer un comportement sexuel femelle (lordose) lorsqu'ils sont supplémentés en œstradiol et progestérone (Kudwa et al., 2005). De plus, il a été rapporté une augmentation du nombre de neurones TH-positif dans l'AVPV des mâles ER β KO (Bodo et al., 2006).

Notre but était de vérifier l'implication de l'ER β dans le processus centraux de la testostérone, notamment dans la déféminisation des circuits neuronaux impliqués dans l'expression du comportement sexuel.

Méthodologie : Pour cela nous avons généré et caractérisé une lignée de souris invalidée pour l'ER β dans le système nerveux (ER β ^{NesCre}) que nous avons obtenus selon

la même technique de mutagenèse conditionnelle précédemment utilisée pour la lignée AR^{NesCre} et décrite dans la section Matériels et Méthodes.

Afin de vérifier chez les mâles mutants la spécificité de l'invalidation de l'ERβ dans le système nerveux, nous avons entrepris une analyse immunohistochimique en utilisant un premier anticorps dirigé contre l'ERβ (Upstate). Aucun marquage spécifique n'a pu être détecté dans des coupes de cerveau contrôle alors que la protéine AR a bien été détectée dans les mêmes conditions expérimentales comme le montrent les photos présentées en figure 25. Nous avons testé par la suite trois autres anticorps polyclonaux d'origines différentes appliqués à différentes dilutions, mais sans succès (Tableau 5 et Figure 25).

	Origine	Espèce	Dilution utilisée
Anticorps primaires			
Anti-AR	Santa-cruz	lapin	1/100
Anti-ERβ	Acris	lapin	1/500
	Genetech		1/500 et 1/1000
	Santa-cruz		1/500
	Upstate		1/7500-1/100

Tableau 5 : Récapitulatif des différents anticorps anti-ERβ utilisés.

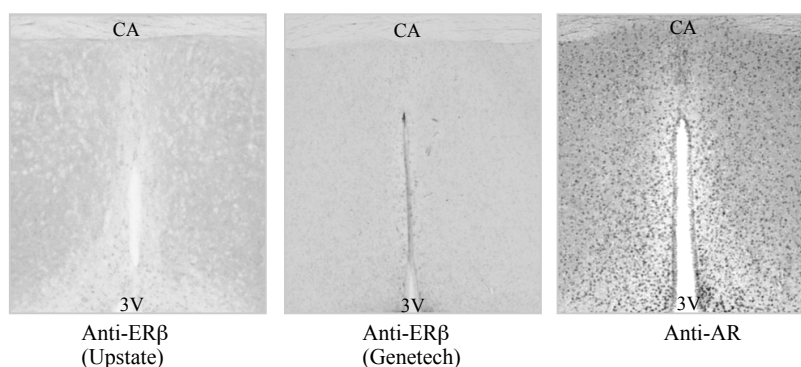


Figure 25 : Détection des neurones ERβ- et AR-positifs dans la région préoptique médiane hypothalamique par immunohistochimie. Des coupes coronales de cerveau (30 μm) ont été incubées avec l'anti-AR (1/100), l'anti-ERβ (1/500 ; Upstate ou Genetech) et révélées au DAB chez le mâle contrôle. CA, commissure antérieure ; 3V, troisième ventricule.

Après plusieurs recherches, nous nous sommes rendu compte qu'il n'existait malheureusement pas à l'heure actuelle un anticorps spécifique de l'ERβ. Nous avons entrepris la production d'anti-ERβ spécifique en collaboration avec une entreprise. En attendant,

nous avons initié la technique de RT-PCR afin de faire une première caractérisation de notre lignée de souris. Cette technique est actuellement en cours de mise au point par C. Parmentier.

Néanmoins, étant donné que nous utilisons le même transgène que pour la lignée AR^{NesCre}, et qui s'est bien révélé efficace par le passé dans la restriction de l'invalidation de plusieurs gènes au système nerveux, nous avons poursuivi la caractérisation de la lignée ER β ^{NesCre}.

Nous avons mesuré les taux circulants de testostérone afin de vérifier l'état de régulation de l'axe gonadotrope en absence d'ER β dans le système nerveux. Des tests de comportements sexuels mâle et femelle ont été réalisés afin d'évaluer le niveau de masculinisation et de déféminisation comportemental chez les mâles mutants. L'activité locomotrice a été testée afin de vérifier que l'invalidation n'a pas d'effet sur l'état émotionnel, ce qui pourrait influencer le comportement sexuel. L'organisation neuroanatomique de la POA a été analysée par immunomarquage des neurones kisspeptine, calbindine et TH.

Enfin le niveau d'expression de l'AR et de l'ER α a également été quantifié, afin de vérifier si ces voies de signalisations sont affectées ou non par l'invalidation de l'ER β .

Les premiers résultats montrent que les mâles invalidés pour l'ER β au niveau du système nerveux ont un tractus urogénital mâle parfaitement développé et fonctionnel ; car ils sont fertiles. Ils ont des taux circulants de testostérone inchangés en comparaison avec ceux des contrôles. Nous avons constaté que le comportement sexuel mâle n'était pas significativement altéré. En effet, les mâles mutants sont capables de manifester un comportement complet. Ceci est associé à une préférence olfactive normale. Aucun défaut de déféminisation du comportement sexuel n'a pu être mis en évidence chez les mâles invalidés pour l'ER β central, ces derniers étant incapables de manifester un comportement de lordose, tout comme les contrôles. Aucun défaut de l'activité locomotrice n'a été constaté. En lien avec l'absence de comportement sexuel femelle, la quantification des neurones kisspeptines et TH dans l'AVPV chez les mâles mutants a montré que le dimorphisme sexuel connu pour cette population neuronale entre les femelles et les mâles était préservé. La quantification des neurones calbindine est en cours. La quantification des niveaux d'expression des récepteurs AR et ER α n'a montré, chez les mâles mutants, aucune modification de l'AR dans les régions AMe, POA et LST,

de même pour l'ER α dans l'POA et l'AMe. Une augmentation significative de l'ER α a été constatée dans le LST.

En conclusion, les résultats obtenus ne décrivent pas de défaut de masculinisation ou de déféminisation significatifs au niveau comportemental et neuroanatomique. Nous supposons donc que chez le mâle l'absence de l'ER β dans le système nerveux, n'interfère ni avec l'organisation ou l'activation des circuits neuronaux par la testostérone, impliquées dans l'expression du comportement sexuel mâle.

Cette différence avec les résultats précédemment décrits chez les mâles invalidés de manière ubiquitaire pour l'ER β sera discutée ultérieurement.

Title page

Title: Characterization of sexual behavior in male mice lacking *estrogen receptor beta* in the nervous system

Authors: ¹²³Marie-Luce C., ¹²³Picot M., ¹²³Albac C., ⁴Martini MA., Franceschini I, ⁴Keller M. and ¹²³Mhaouty-Kodja S.

Affiliation: ¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 7224 and ²Université P. & M. Curie, ³Neuroplasticity of Reproductive Behaviors; 75005 Paris, France. ⁴Physiology of Reproduction & Behaviors, UMR 7247 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Nouzilly, France.

Abstract

Sex differences in mating are attributed to differential testosterone (T) exposure between male and female during development, as well as adult response to gonadal hormones. In the nervous system, T acts directly through the androgen receptor (AR) or indirectly via estrogens receptors ER α and ER β , after metabolization into estradiol (E2). In this context, the relative role of the ER β still needs to be documented. Based only on one finding in ubiquitously knockout (KO) mice, null for ER β , it has been hypothesized that ER β is involved in the defeminization processes of sexual behavior by T. The aim of this study was to thus investigate the role of ER β in T-mediated regulation of male sexual behavior by using a conditional mouse line lacking *ER β* in the nervous system. Mutant male mice have a complete and functional urogenital tract and unchanged levels of circulating T. In behavioral studies, they were able to show a complete sexual behavior despite a not significant reduced of number of thrusts. Sexual experience improved both their mating performance and olfactory preference towards estrus females as for their control littermates. When castrated and primed with female hormones, they did not exhibit any lordosis behavior. In correlation with these data, sexually dimorphic neuronal populations like kisspeptin-ir and tyrosine hydroxylase-ir neurons were correctly differentiated in mutant males. Together, the present study reports that ER β in the nervous system does not play a crucial role in T-induced organization and activation of male sexual behavior in mice. This discrepancy with ubiquitously KO mice is discussed in the discussion section.

Introduction

Gonadal hormones, androgen and estrogens, contribute significantly to several aspects of nervous system development, circuit formation and function. Differentiation of the nervous system during the perinatal period is an essential step promoting the exclusive expression of male typical behavior in adulthood (Phoenix et al., 1959). In males, this process is under the control of testosterone (T), which is responsible for two irreversible processes. The masculinization is the potentiation of neuroanatomical and behavioral patterns that are exhibited to a greater degree by males than females. The defeminization is the loss of the ability of males to display female-typical behaviors or endocrinological responses in adulthood, such as display of receptive mating posture, lordosis and the ovulatory luteinizing hormone (LH) surge. Depriving male neonates of T results in demasculinization and feminization of behavior (Corbier et al., 1992; Rubinow and Schmidt, 1996). During the perinatal period, T induces sexual differentiation of the neural circuitry underlying sexual behavior through regulation of cell number and morphology.

In the brain, T can activate directly the androgen receptor (AR) or act indirectly after its aromatization by the cytochrome P-450 aromatase into estradiol (E2), which can bind to oestrogen receptors ER α and ER β . These three nuclear receptors have been shown to be present in brain regions important in male reproductive behaviors such as the hypothalamic preoptic area (Patchev et al., 2004).

A role for ER signaling pathways in the regulation of male sexual behavior by T is largely accepted (Rissman et al., 1997, 1999; Hull et Dominguez, 2007; Bakker et al., 2004). Based on the numerous data obtained in ER α knockout (K.O) mice, it has been strongly suggested that this receptor is primarily responsible for the masculinization of sexual behavior (Ogawa et al., 1998; Wersinger et al., 1997; Rissman et al., 1997, 1999; Scordalakes et al., 2002). By contrast to ER α knockout mice, ER β KO males display normal sexual behavior (Ogawa et al., 1999; Temple et al., 2003; Bodo et al., 2006; Kudwa et al., 2005). It was thus suggested that ER β might underlie the defeminization processes triggered by T during the perinatal period on the basis of one behavioural study and one neuroanatomical characterization (Kudwa et al., 2005; Bodo et al., 2006).

In the present study, we studied the implication of nervous system ER β in T-induced regulation of sexual behavior. For this purpose, we generated and characterized male mice selectively invalidated for ER β in the nervous system (ER β^{NesCre}), by using Cre-LoxP technology as previously described (Raskin et al., 2009). We next measured the circulating levels of T, performed behavioral studies and compared the organization of known sexually dimorphic neuronal populations in the hypothalamic preoptic area between control and mutant male mice. Finally, the potential effects of ER β absence in the nervous system on AR and ER α expression were evaluated in the neural circuitry underlying sexual behavior.

Results

Nervous system *ERβ* invalidation did not affect the urogenital tract development and circulating levels of testosterone

$ER\beta^{NesCre}$ male mice have a male external phenotype (anogenital distance of 0.15 ± 0.00 mm in controls and 0.15 ± 0.01 mm in mutants; $n = 10$ per genotype) and a normally developed urogenital tract. The weights of testes (0.71 ± 0.02 % of body weight for control and 0.70 ± 0.04 % for mutant) and androgen-dependent seminal vesicles (0.70 ± 0.15 % of body weight for control and 0.80 ± 0.93 % for mutant) were also similar between control and mutant mice. In correlation with these studies, circulating levels of T were not statistically different between the two genotypes (0.92 ± 0.39 ng/ml for control and 1.35 ± 0.49 ng/ml for mutant).

Comparison of mating behavior between control and mutant males

86% of control and 81% of mutant naive males displayed a full range of sexual behavior. Comparison between the two genotypes showed no statistically significant differences in the latencies to the first mount, intromission, pelvic thrusting, and ejaculation (Fig. 1A). Quantification of the number of events during mating showed, however, a not significant lower number of thrusts in mutant males (Table 1). We then submitted male mice to a second test of sexual behavior two weeks later. In these conditions, all males regardless of their genotype exhibited an improved sexual behavior as evidenced by the shorter time to ejaculation (Fig. 1A). The comparison of the number of events in this second trial did not reveal any significant difference between the two genotypes.

Further, we measured the ability of males to exhibit a typical female posture after castration and priming with female hormones. The lordosis quotient (LQ) was counted in response to mounts received within the 20 min of the test. Control males exhibited, as expected, very few lordosis behavior as illustrated in Figure 1B. Similarly, mutant males showed a very low LQ (Fig. 1B).

Olfactory preference

In rodents, reproductive behaviors are activated by olfactory cues. We therefore tested the ability of males to discriminate between male and female pheromones in olfactory preference tests using either intact male *versus* estrus female. Time spent sniffing stimulus was determined and expressed as a percentage of the total time devoted to chemoinvestigation.

The total time spent sniffing male or female cues was not statistically different between sexually experienced control and ER β ^{NesCre} males (128.06 \pm 10.35 seconds for control and 150.38 \pm 12.93 seconds for mutant). There was a significant effect of stimulus, but not of genotype in the percentage of time spent chemoinvestigating either male or female (Fig. 1C). All males preferred sniffing female over male cues.

After castration and supplementation with female hormones, control and mutants spent equal total time to sniffing the two cues (117.97 \pm 9.03 seconds for control and 106.99 \pm 4.98 seconds for mutant) but the significant effect of stimulus was similarly lost for both genotypes (Fig. 1D).

Locomotor activity

Estrogens are known to have considerable regulatory influence on activity levels (Morgan and Pfaff, 2001; 2002). We thus compared the spontaneous activity between control and mutant males, recorded during 2 hours. No significant difference was observed in the horizontal and vertical activity between the two genotypes, with an accumulated activity analysis (394.7 \pm 53.18 arbitrary unit for control and 289.1 \pm 43.22 arbitrary unit for mutant) (Fig. 2A). The mutant males had, however, a significantly decreased horizontal activity in the 20 first minutes compared to their control littermates (Fig. 2B). The same results were found for the vertical activity after an accumulated (85.7 \pm 8.15 arbitrary unit for control and 112.20 \pm 24.13 arbitrary unit for mutant) (Fig. 2C) or detailed analysis (Fig. 2D).

Effects of the conditional invalidation on the neuroanatomical organization of the preoptic area

Pheromonal cues detected by the olfactory bulb are transmitted to chemosensory responsive nuclei in the medial amygdala (MeA), bed nucleus of stria terminalis (BNST) and finally to the hypothalamic

medial preoptic area (MPOA) where they are processed in behavioral responses. We therefore assessed the effects of *ERβ* invalidation in the nervous system on the perinatal organization of two known sexually dimorphic neuronal populations in the MPOA. The number of immunoreactive (ir) neurons for kisspeptin and for Tyrosine-hydroxylase (TH) was quantified by immunohistochemistry using specific antibodies. The number of kisspeptin-ir and TH-ir neurons in the anteroventricular nucleus (AVPV), a sub-region of the MPOA that plays a critical role in the positive hormonal feedback on LH secretion and thus ovulation, is greater in females (Clarkson and Herbison, 2006). This dimorphism was found between control female and control males (Fig. 3). There was no significant difference between control and mutant males for kisspeptin- and TH-ir neurons (Fig. 3B), indicating that both neuronal populations retained their sexual differentiation in the absence of *ERβ*.

Quantification of the number of AR- and *ERα*-immunoreactive neurons in brain areas involved in the expression of male sexual behavior

We evaluated whether central *ERβ* invalidation altered AR and *ERα* expression in the neuronal circuitry underlying sexual behavior, downstream from the olfactory bulb. For this purpose, we compared the number of AR and *ERα*-ir neurons between control and mutant male mice in the MPOA, MeA and BNST (Fig. 4A and 4C). Quantification showed that the number of AR-ir neurons was unchanged between control and mutant males in the three regions (Fig. 4B). We observed no significant differences in the number *ERα* -ir neurons between control and mutant male in the MPOA and MeA (Fig. 4D). It was, however significantly increased by 37% in the BNST of *ERβ*^{NesCre} male (Fig. 4D).

Discussion

The present study reports the first evaluation of the ER β involvement in the sexual differentiation of the neural circuitry underlying sexual behavior by using a conditional genetic model. We showed that ER β doesn't play an important role in the organization and activation of the sexual neural circuitry by T in male mice.

ER β invalidation in the nervous system did not impair the normal development of the male urogenital tract, nor the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. This is in adequacy with previous data on the minor role attributed to ER β in the HPG axis regulation (Temple et al., 2003). Although GnRH neurons express ER β , but not AR and ER α , we propose that the latter two receptors play an indirect role in the regulation of the HPG axis. Indeed several line of evidences suggest that T and estrogen effects may be transmitted to GnRH neurons in an indirect manner by ER α and AR (Wintermantel et al., 2006, Eddy et al., 1996; Rissman et al., 1997, Raskin et al., 2009, Raskin, Marie-Luce et al. 2012). High T levels were described in ER α KO mice and males invalidated for AR in the nervous system.

ER β invalidation in the nervous system did not impair the expression of male sexual behavior. Control and mutant males showed latencies to perform the various components of copulatory behavior not statistically different. Current analyses using another group of controls and mutants are under progress in order to confirm whether there are differences or not between the two genotype. However, the observed difference in the number of Th between naive control and mutant males was lost after a first sexual experience. It is thus possible that mutant males exhibit a slight sexual deficiency when naive and sexual experience restores and improves their behavior. This is different from the sexual alteration observed in mice lacking AR in the nervous system and which persists even after sexual experience (see paper 1).

This together with the normal preference towards female olfactory cues is in agreement with the previous studies showing that ER β KO male have a wild-type phenotype and normal male-typical sexual behavior (Ogawa et al., 1999 ; Temple et al., 2003).

ER β invalidation in the nervous system did not alter the defeminization of male sexual behavior as evidenced by the low LQ in mutant males as in their control littermates. In accordance with these behavioral studies, the early disruption of *ER β* in the nervous system did not affect the sexual differentiation of known sexually dimorphic neuronal populations in the MPOA. An unaltered number of kisspeptin- and TH-ir neurons were found in the conditional mutant model.

These results are in contradiction with the previous study performed on ER β KO mice showing a significantly higher level of receptivity as compared to wild-type males (Kudwa et al., 2005) and increased number of TH-ir neurons in the AVPV (Bodo et al., 2006).

This discrepancy between the two models could be due to the type of *ER β* invalidation between the two models; in one model the receptor is invalidated in the whole organism whereas in the other receptor invalidation is restricted to neural cells. In our model, ER α and AR expressing neurons are not reduced in conditional mutant males. There are, unfortunately, no informations on AR or ER α expression level in brain area involved in sexual behavior for the ubiquitous ER β KO model. The expression of ER α is maybe altered, which could explain the similar increased TH-ir neurons observed in ER α KO males (Simerly et al., 1997).

Based on the present data and previous studies performed on AR and ER α , we thus conclude that AR and ER α , but not ER β , play complementary roles in the regulation by T of sexual behavior in male mice. T acts primarily through ER α to masculinize and defeminize the brain circuitry underlying sexual behavior. First, unlike ER β , ER α is highly expressed in brain regions involved in sexual behavior (Mitra et al., 2003; Handa et al., 2012). Second, ER α KO male exhibit a severe sexual deficiency as evidenced by their lack of olfactory cues discrimination and inability to display a complete sexual behavior (Ogawa et al., 1997, 1998; Wersinger et al., 1997). Moreover, they

have increased number of TH-ir neurons in the AVPV (Simerly et al., 1997).

T might act through AR during the perinatal period to organize the spinal nucleus of bulbocavernosus involved in erectile activity and during adulthood to activate both brain and spinal areas as shown in males invalidated for *AR* in the nervous system (Raskin et al. 2009; Raskin, Marie-Luce et al., 2012; Picot et al. Marie-Luce et al.).

The role of ER β needs to be further identified. One study had described transient effects of ubiquitous ER β invalidation during puberty (Temple et al., 2003). It is in link with the several studies suggesting that hormonal modifications, which happen during puberty age, correspond to another critical period of neuronal organization by T. This second wave could play an important role in the maturation of mating behavior (Clarkson et al., 2009; Ojeda and Skinner, 2006; Schultz et al., 2004). Future studies will measure T levels and compare sexual behavior in pre-pubere and pubere ER β ^{NesCre} males. Alternatively, ER β could be involved in emotional and cognitive behaviors. Estrogens affect a variety of behavior in addition to sexual responses, some of them related to cognition and emotional reactivity (Imwalle et al., 2005, Krezel et al., 2001, Frye et al., 2008). It was described that female ER β KO mice exhibit increased anxiety-like behavior (Krezel et al., 2001) and the selective ER β agonist administered to ovariectomized female rats has an anxiolytic effect (Lund et al., 2005; Weiser et al., 2009). Furthermore, the anxiolytic effects of ER β agonists were not observed after administration in ER β KO mice compared to wild-type (Oyola et al., 2012; Walf et al., 2008). Interestingly, ER β expression is predominant in cognitive regions as the cortex and hippocampus (Mitra et al., 2003; Handa et al., 2012). The ER β mRNA and protein were shown to be highly expressed within neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in rat (Laflamme et al., 1998), the major integratory node of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.

Material and methods

Animals and Genotyping

Mutant male mice ($ER\beta^{fl}/ER\beta^{fl}$, Nes-Cre; $ER\beta^{NesCre}$) specifically lacking $ER\beta$ in the nervous system and their control ($ER\beta^{fl}/ER\beta^{fl}$) littermates were obtained from crossing NesCre males with ER^{fl}/ER^{fl} females, in a C57BL6J genetic background. Mice were weaned at 24-26 days of age and group-housed under a controlled photoperiod (12 h light/ 12 h dark cycle - lights on at 7 am) and temperature (22°C) and given free access to food and water. The presence of the $ER\beta^{fl}$ allele and Cre transgene was detected by PCR as previously described (Raskin et al., 2009), using estrogen receptor- β primers (5'-GAT-CCT-ATG-TTC-AGG-ATC-TTT-GAT-3' and 5'-CAC-GTA-GGC-TCT-TAA-ATG-TCA-GTC-3'). All studies were performed on 2-4 months old animals, in accordance with the guidelines for care and use of Laboratory animals (NIH Guide) and French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC).

Urogenital tract weight and measurement of testosterone levels

Males were sacrificed by decapitation to collect blood and to weigh testes and seminal vesicles for each animal. Circulating levels of T were measured for at least 19 control and 18 mutant males. Sera were extracted and circulating levels of T measured by RIA in the INRA platform (UMR-PRC) as previously described (Raskin et al., 2009; Hochereau-De Reviers et al., 1990).

Immunohistochemistry for AR, $ER\alpha$, Kiss and TH

Animals were sacrificed and transcardially perfused with a solution of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (PB). Brains were sliced into 30 μ m coronal sections in cryostat (Leica CM 300). Sections were blocked for 2 h with 5% normal goat serum (NGS, Sigma) in PB saline (PBS)-Triton 0.1%. They were then incubated with polyclonal anti-AR (1:200; Santa Cruz Biotechnology) or anti- $ER\alpha$ (1:400; Santa Cruz Biotechnology) for 72 h or 48 h, respectively, or with monoclonal anti-TH (1:1000; Chemicon), overnight. Anti-kisspeptin AC053 was raised in lamb against a 14 amino acid

(AA) peptide close to the N terminal (N-ter) mouse kisspeptin-52 (corresponding to AA 5 to 18) according to a previously published immunization protocol (Caraty et al., 1980). The resulting antiserum was affinity purified by Eurogenetech. Specificity was confirmed by pre-absorption tests with mouse kisspeptin-52. Kisspeptin immunochemistry procedure was adapted from a previously described protocol (Desroziers et al., 2012). Kisspeptin immunostaining was performed with fluoro-chrome-conjugated antibody (1:2000) for 72 h and analyzed by confocal microscopy. AR, ER α and TH immunostaining was performed with biotinylated goat anti-rabbit (1:500, Vector Laboratories) or anti-mouse (1:250, Vector Laboratories) for 2 h. Bound antibodies were visualized by 1 h of incubation with the biotin–streptavidin complex reagent (ABC kit; Vector Laboratories), followed by color development with the chromogenic substrate 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich). Sections were scanned using high-resolution Nanozoomer Hamamatsu scanner (Hamamatsu corporation) and analyzed. For all quantifications of immunoreactivity, stained sections were matched on anatomical landmarks and compared across animal groups by tallying the number of labelled cells in each region.

Reproductive behavior

All tests were conducted under red-light illumination 2 h after lights off and videotaped for further analyses.

Male sexual behavior

Intact animals were individually housed 3 days before the first test. Tests were conducted in Plexiglas cages. Each naive male was tested in its home cage for 10 h after the introduction of an estrus female. Male sexual behavior was analyzed by scoring the frequency of mounts, intromissions, thrusts, ejaculation and genital grooming, as previously described (Raskin et al., 2009). Estrus C57BL6J females were ovariectomized, implanted with SILASTIC implants filled with 50 μ g of estradiol-benzoate (E2) (Sigma-Aldrich) in 30 μ l of sesame oil and subcutaneously treated with 1 mg of progesterone (Sigma-Aldrich) in 100 μ l of sesame oil 4-5 hours before the tests, as previously reported

(Raskin et al., 2009). Female receptivity was assessed, with sexually experienced males, before the experiments began. This test was repeated after two weeks.

Female sexual behavior

ER β ^{NesCre} and control males were castrated under general anesthesia (xylazine/ ketamine). Four weeks later all mice were tested for female sexual behavior as previously described (Kudwa et al., 2005). Briefly, subjects received a subcutaneously injection of estradiol-benzoate (10 μ g dissolved in 100 μ l of sesame oil) 48 h prior to the test and with progesterone (1 mg in 100 μ l of sesame oil) 4-5 h before the experiment started.

Sexually experienced C57BL6J mice were used as testing partners. Behavioral tests ended after the subject received 20 mounts, after an ejaculation, or after 20 minutes, whichever occurred first. For each animal, the lordosis quotient (LQ; number of lordosis events per number of mounts) was scored. A lordosis event was counted when all four paws were grounded, the hind region was elevated off the floor of the test chamber, and the back was slightly arched. Animals were tested twice with an interval of 14 days.

Olfactory preference

The olfactory preference of males was assessed after the second sexual behavior (experienced group) and after lordosis test evaluation. Tests were conducted in an enclosed Plexiglas Y-maze. Mice were initially allowed to become familiar, for 5 min on each of two consecutive days, with the experimental paradigm, but with no stimulus in the goal boxes. On the day of the test, mice were offered the choice between anesthetized estrus female and a gonadally intact male. The time spent sniffing each goal box was scored over the five-minute test. The maze was cleaned with 10 % ethanol between trials.

Locomotor activity

Spontaneous activity was recorded for all animals in different rooms with the activity cages (13 \times 23 \times 13 cm; metal grilled floor). The locomotion was automatically monitored using a computer-driven

photocell apparatus (Imetronic, France) during 2 h, from 5 pm to 7 pm. The horizontal and vertical activities were analyzed.

Statistics

Data are expressed as means \pm S.E.M. Repeated-measurement analyses were carried out by two-way ANOVA for the main effects of genotype and test day, as factors. Bonferroni tests were then performed for *post hoc* comparisons. Non-repeated measurements were analyzed by one-way ANOVA or Student's *t* test for unpaired data. *P* values less than 0.05 were considered significant.

References

- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2004).** Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behav* *46*, 1–10.
- Bodo, C., Kudwa, A.E., and Rissman, E.F. (2006).** Both estrogen receptor-alpha and -beta are required for sexual differentiation of the anteroventral periventricular area in mice. *Endocrinology* *147*, 415–420.
- Caraty, A., de Reviere, M.M., Pelletier, J., and Dubois, M.P. (1980).** Reassessment of LRF radio-immunoassay in the plasma and hypothalamic extracts of rats and rams. *Reprod Nutr Dev.* *20*, 1489–1501.
- Clarkson, J., and Herbison, A.E. (2006).** Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* *147*, 5817–5825.
- Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R., and Herbison, A.E. (2009).** Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* *150*, 3214–3220.
- Corbier, P., Edwards, D.A., and Roffi, J. (1992).** The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* *100*, 127–131.
- Desroziers, E., Mikkelsen, J.D., Duittoz, A., and Franceschini, I. (2012).** Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region-specific manner across rat postnatal development. *J Neuroendocrinol.* *24*, 1154–1165.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1996).** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* *137*, 4796–805.
- Frye, C.A., Koonce, C.J., Edinger, K.L., Osborne, D.M., and Walf, A.A. (2008)** Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. *Hormones and Behavior.* *54*, 726–734.
- Handa, R. J., Ogawa, S., Wang, J. M., and Herbison, A. E. (2012).** Roles for oestrogen receptor β in adult brain function. *J Neuroendocrinol.* *24*, 160–173.
- Hull, E.M., and Dominguez, J.M. (2007).** Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav* *52*, 45–55.

Hochereau-de Reviers, MT., Perreau, C., Pisselet, C., Fontaine, I., and Monet-Kuntz, C. (1990). Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domest Anim Endocrinol.* 7, 63-73.

Imwalle, DB., Gustafsson, JA., and Rissman, EF. (2005). Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol Behav.* 84, 157-163.

Krezel, W., Dupont, S., Krust, A., Chambon, P., and Chapman, P.F. (2001). Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 12278-12282.

Kudwa, A.E., Bodo, C., Gustafsson, J.-A., and Rissman, E.F. (2005). A previously uncharacterized role for estrogen receptor beta: defeminization of male brain and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4608–4612.

Laflamme, N., Nappi, RE., Drolet, G., Labrie, C., and Rivest, S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol.* 36, 357-378.

Lund, T.D., Rovis, T., Chung, W.C., and Handa, R.J. (2005). Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology.* 146, 797-807.

Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144, 2055–2067.

Morgan, MA., and Pfaff, DW. (2002). Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. *Behav Brain Res.* 132, 85-93.

Morgan, MA., and Pfaff, DW. (2001). Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Horm Behav.* 40, 472-82.

Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1997). Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1476–1481.

Ogawa, S., Washburn, T.F., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1998). Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology* 139, 5058–5069.

Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and

female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12887–12892.

Ojeda, S.R., and Skinner, M.K. (2006). Chapter 38 - Puberty in the Rat. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (Third Edition), (St Louis: Academic Press), pp. 2061–2126.

Oyola MG, Portilla W, Reyna R, Foradori C, Kudwa A, Hinds L, Handa R, Mani S. (2012). Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor- β (ER β) activation by a selective ER β agonist in female mice. *Endocrinology*. 153, 837-46.

Patchev, A.V., Götz, F., and Rohde, W. (2004). Differential role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *FASEB J.* 18, 1568–1570.

Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A., and Young, W.C. (1959). Organizing Action of Prenatally Administered Testosterone Propionate on the Tissues Mediating Mating Behavior in the Female Guinea Pig. *Endocrinology* 65, 369–382.

Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., and Mhaouty-Kodja, S. (2009). Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J. Neurosci.* 29, 4461–4470.

Raskin, K., Marie-Luce, C., Picot, M., Bernard, V., Maily, P., Hardin-Pouzet, H., Tronche, F., and Mhaouty-Kodja, S. (2012). Characterization of the spinal nucleus of the bulbocavernosus neuromuscular system in male mice lacking androgen receptor in the nervous system. *Endocrinology*. 153, 3376-3385.

Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Fugger, H.N., and Foster, T.C. (1999). Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor alpha. *Brain Res.* 835, 80–90.

Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Taylor, J.A., and Lubahn, D.B. (1997). Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Behav* 31, 232–243.

Rubinow, D.R., and Schmidt, P.J. (1996). Androgens, brain, and behavior. *Am J Psychiatry* 153, 974–984.

Schulz, K.M., Richardson, H.N., Zehr, J.L., Osetek, A.J., Menard, T.A., and Sisk, C.L. (2004). Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Horm Behav* 45, 242–249.

Scordalakes, E.M., Imwalle, D.B., and Rissman, E.F. (2002). Oestrogen's masculine side: mediation of mating in male mice. *Reproduction* 124, 331–338.

Simerly, R.B., Zee, M.C., Pendleton, J.W., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1997). Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 14077–14082.

Temple, J.L., Scordalakes, E.M., Bodo, C., Gustafsson, J.A., and Rissman, E.F. (2003). Lack of functional estrogen receptor beta gene disrupts pubertal male sexual behavior. *Horm Behav* *44*, 427–434.

Walf AA, Koonce CJ, Frye CA. (2008). Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice. *Behav Neurosci.* *122*, 974–981.

Weiser, MJ., Wu, T.J., and Handa, R.J. (2009). Estrogen receptor-beta agonist diarylpropionitrile: biological activities of R- and S-enantiomers on behavior and hormonal response to stress. *Endocrinology.* *150*, 1817-1825.

Wersinger, S.R., Sannen, K., Villalba, C., Lubahn, D.B., Rissman, E.F., and De Vries, G.J. (1997). Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. *Horm Behav* *32*, 176–183.

Wintermantel, TM., Campbell, RE., Porteous, R., Bock, D., Gröne, HJ., Todman, MG., Korach, KS., Greiner, E., Pérez, CA., Schütz, G., and Herbison, AE. (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron.* *52*, 271-280.

Table 1

	TEST 1 (Naive)		TEST 2 (Experienced)	
	Controls	ER β ^{NesCre}	Controls	ER β ^{NesCre}
Number of mounts without intromissions (M)	4 \pm 0.70	4 \pm 0.98	5 \pm 0.95	4 \pm 0.95
Number of mounts with intromissions (MI)	16 \pm 3.22	8 \pm 1.81	16 \pm 3.00	14 \pm 2.48
Intromission ratio (MI/M+MI) X 100	77 \pm 4.27	70 \pm 6.15	72 \pm 5.34	81 \pm 4.63
Number of thrusts (Th)	327 \pm 51.06	184 \pm 29.67	408 \pm 56.27 ^b	448 \pm 99.44 ^b
Mating duration (min)	23.35 \pm 2.96	37.52 \pm 13.86	17.46 \pm 3.12 ^b	12.01 \pm 1.87 ^b

Quantification of the sexual behavior displayed by naive and sexually experienced males invalidated for ER β in nervous system (n = 17 control and 13 mutant males). The mean values \pm S.E.M of number of mounts without intromission (M), with intromission (MI), intromission ratio (MI/M+MI), number of thrusts (Th) or mating duration are shown for males displaying complete sexual behavior in test 1 and 2. There was not significant effect of ER β invalidation for the different components. *Post hoc* analysis showed no significant difference between control and mutants males and an effect of experience was found for Th (F (1,28) = 6.919, p = 0.0137) and mating duration (F (1,28) = 4.525, p = 0.0424); *post hoc* analysis showed a higher number of Th and lower mating duration. ^b p < 0.05 vs naive males of the corresponding genotype

Figure legends

Figure 1. Impact of central *ERβ* invalidation on male sexual behavior. **A.** Latencies to mounting (M), thrust (Th), intromission (MI), and ejaculation (Ej) of naive and sexually experienced control and mutant males (expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 17$ control and 13 mutant). An effect of experience was found for M ($F(1,28) = 11.241, p = 0.023$), MI ($F(1,28) = 12.404, p = 0.0015$), Th ($F(1,28) = 13.447, p = 0.0010$) and Ej ($F(1,28) = 14.730, p = 0.0006$). *Post hoc* analysis showed no significant difference between control and mutants males and a significant lower latency to M, TH, In and Ej for experienced males ($^a p < 0.05$). **B.** Lordosis quotient (LQ) of castrated males supplemented with E2 and progesterone (Pg) in tests 1 and 2. Data are expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 6$ control and 10 mutant males. No significant effect of invalidation was found. *Post hoc* analysis showed no difference between control and mutant males, and between two tests. **C and D.** Time spent chemoinvestigating gonad-intact male vs estrus female after sexual male behavior (**C**) or after castration and E2/Pg supplementation (**D**), expressed as percentage of total time spent sniffing male or female cues ($n = 9$ control and 10 mutant males). A significant effect of stimulus was found for intact animals ($F(1,17) = 5.461, p = 0.0319$); *post hoc* analysis showed differences in the time spent sniffing male vs female after male sexual behavior ($^a p < 0.05$).

Figure 2. Spontaneous locomotor activity. **A and C.** Accumulated horizontal or vertical activity. **B and D,** Representation in 10 min slice of horizontal or vertical activity during 2 hours. Data are expressed as mean values \pm S.E.M for $n = 10$ control and 12 mutant males. There was not significant effect of *ERβ* invalidation.

Figure 3. Quantification of TH and kisspeptin-ir neurons of males invalidated for *ERβ* in nervous system compared to female. **A.** Representative anti-TH and anti-kisspeptin immunostaining in the AVPV. Arrowheads point to TH or kisspeptin positive neurons. 3V: third ventricle. **B.** Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M of Thyrosine hydroxylase- (TH) and kisspeptin- (kiss) positive cells ($n = 4$ per genotype), $^a p < 0.05$ vs control females.

Figure 4. Quantification of AR- and ER α -ir neurons in chemoresponsive brain areas of control and mutant males. A and C. Representative anti-AR and anti-ER α immunostaining respectively in the medial amygdala (MeA), the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and the medial preoptic area (MPOA). **B and D.** Quantitative data expressed as mean values \pm S.E.M of AR- and ER α -positive cells (n = 3 per genotype), ^ap < 0.05 vs control males. AC: anterior commissure, 3V: third ventricle.

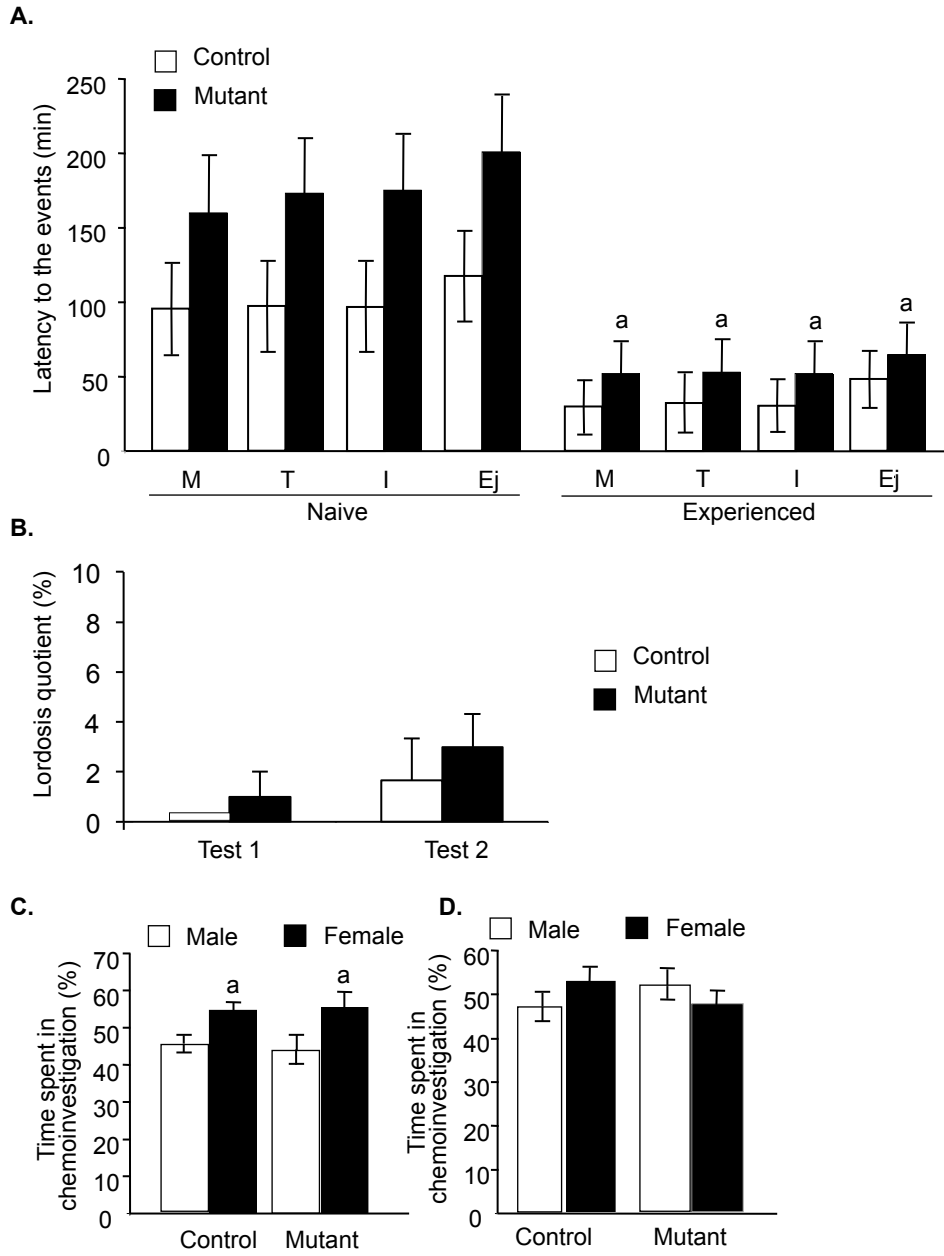


Figure 1

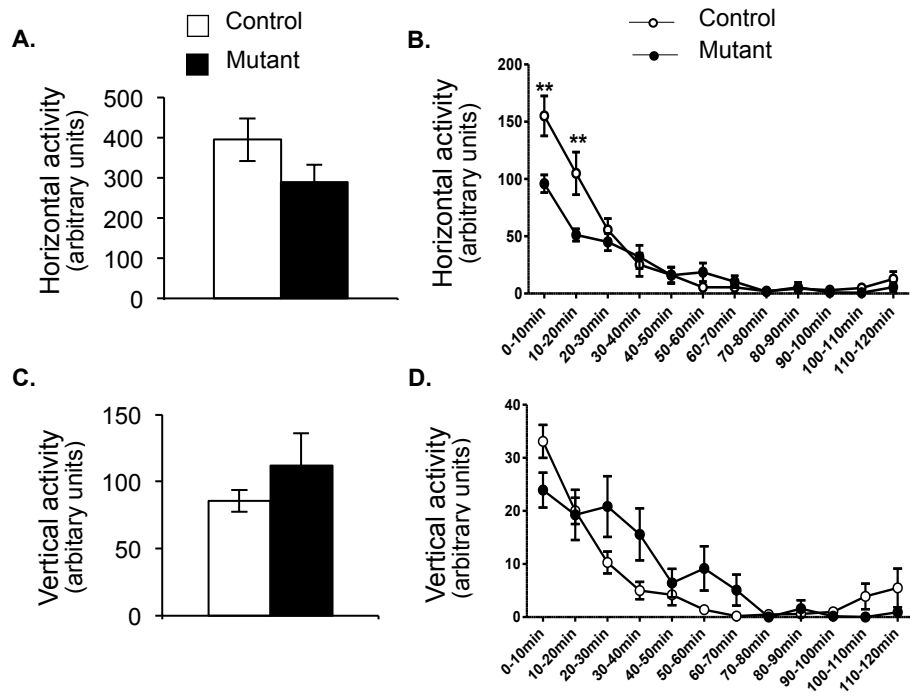


Figure 2

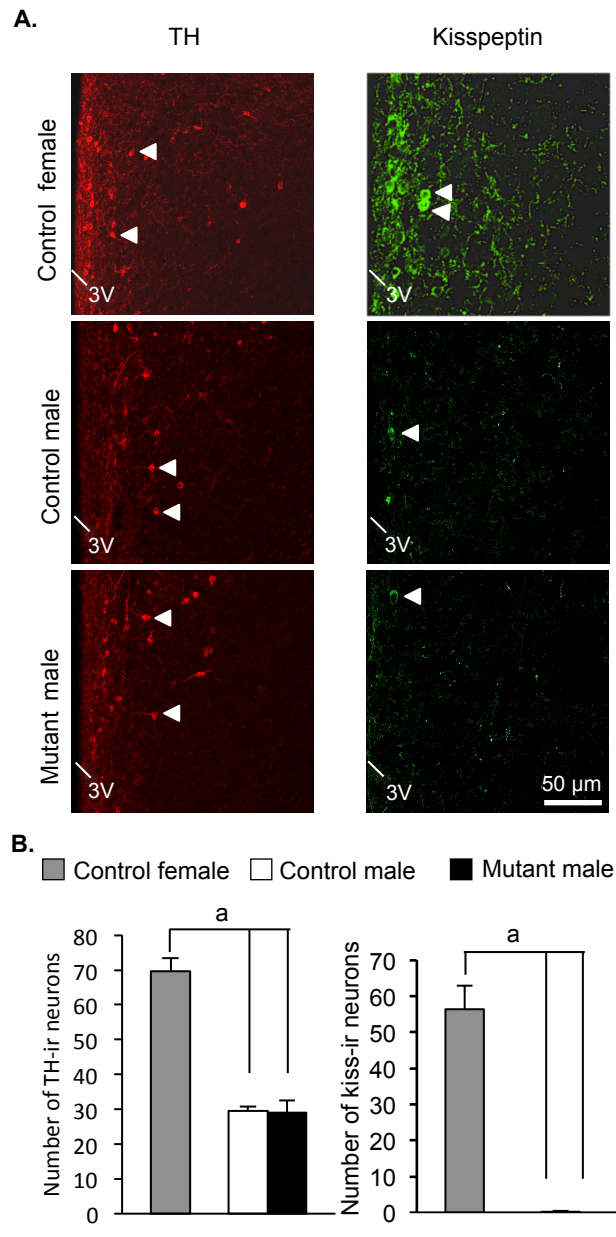


Figure 3

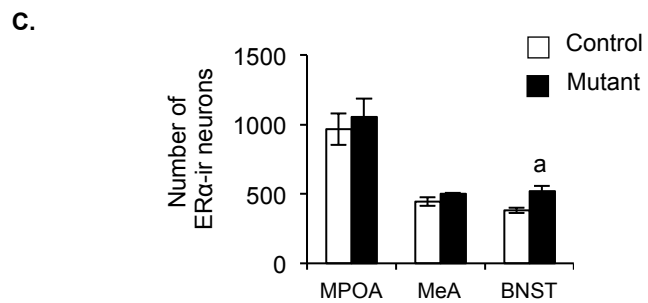
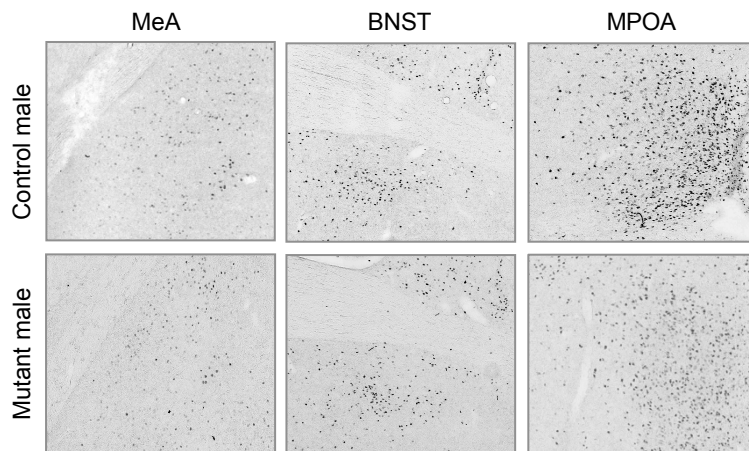
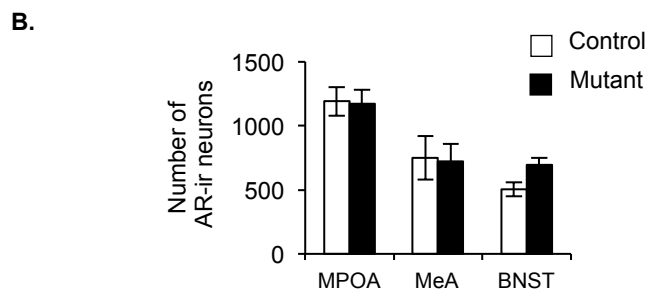
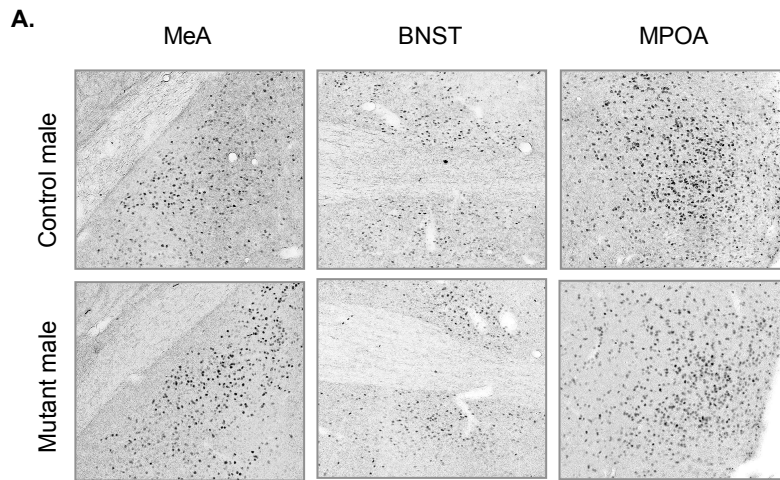


Figure 4

**Discussion
et
Perspectives**

L'utilisation de modèles de mutagenèse conditionnelle, au cours de ma thèse, a permis d'étudier l'implication de l'AR et de l'ER β au niveau central, dans la régulation du comportement sexuel par la testostérone. En effet, cette stratégie permet de préserver l'expression de chacun de ces récepteurs dans les tissus périphériques (Raskin, Marie-Luce et al., 2012 ; Marie-Luce et al., article 4 en préparation) et ainsi de ne pas interférer avec leurs fonctions cruciales dans ces tissus, en particulier pour l'AR dans la différenciation sexuelle du tractus urogénital mâle. Les animaux portant la mutation conditionnelle ont, en effet, un tractus urogénital normalement développé et fonctionnel (Raskin, Marie-Luce et al., 2012 ; Marie-Luce et al., article 4 en préparation).

Les principaux résultats obtenus indiquent que, chez le mâle, la régulation du comportement sexuel par la testostérone implique deux voies complémentaires utilisant l'AR et l'ER α .

Selon la structure neurale considérée, l'AR est engagé en période périnatale et/ou à l'âge adulte. En effet, au niveau cérébral l'AR n'est pas nécessaire dans la région préoptique à l'action organisatrice de la testostérone au cours du développement ; mais est essentiel pour initier et maintenir le comportement sexuel à l'âge adulte (Marie-Luce et al., article 1 en préparation). En revanche, au niveau spinal, l'AR joue un rôle important à la fois dans l'organisation et l'activation du NSB par la testostérone (Raskin, Marie-Luce et al., 2012).

L'ER β central ne semble pas jouer un rôle dans l'organisation et l'activation du comportement sexuel mâle par la testostérone (Marie-Luce et al., article 4 en préparation).

D'autre part, la différenciation sexuelle des circuits neuronaux par la testostérone n'est pas affectée par l'exposition périnatale à de faibles doses de BPA. Ce dernier semble perturber l'activation de la voie androgénique par la testostérone à l'âge adulte, voie nécessaire à l'expression du comportement sexuel (Picot et al., article 3 en soumission).

I. L'AR et la régulation du comportement sexuel par la testostérone

I.1. Au niveau cérébral

L'AR et la régulation de l'axe HPG

Les mâles AR^{NesCre} croisés en retour en fond génétique C57BL6J possèdent de forts taux de testostérone (Marie-Luce et al., article 1 en préparation), comme cela avait été précédemment décrit en fond génétique mixte (Raskin et al., 2009). Ces résultats montrent que l'AR est impliqué dans le rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone sur l'axe HPG. Ceci est en accord avec la majorité des études précédemment réalisées sur les mâles ER α KO, présentant des taux de LH équivalents à ceux des mâles contrôles (Wersinger et al., 1999; Smith et al., 2005a). Les résultats obtenus sur l'ER β finissent de confirmer le rôle majeur de l'AR dans le rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone sur l'axe HPG.

Les forts taux de testostérone chez les mâles AR^{NesCre} proviennent d'une absence de rétrocontrôle au niveau de l'axe HPG exercé par la testostérone. En outre, il a été montré que les taux de LH sont élevés mais le contenu hypothalamique en GnRH est maintenu chez les mâles invalidés pour l'AR central (Raskin et al., 2009). La levée de rétrocontrôle de l'axe HPG pourrait donc provenir d'un défaut de libération de GnRH. Cependant, l'expression des récepteurs des hormones stéroïdes par les neurones GnRH dans la région préoptique reste controversée. En effet, il semble que ces neurones n'expriment ni l'ER α , ni l'AR chez les rongeurs (Oakley et al., 2009) mais expriment l'ER β (Hrabovszky et al., 2000 ; 2001). Toutefois il semble que l'ER β ne joue pas de rôle fondamental dans le contrôle de la sécrétion de GnRH (Temple et al., 2003). Nos résultats d'inactivation de l'ER β dans le système nerveux central ne montrent aucune différence dans les niveaux circulants de testostérone (Marie-Luce et al., article 4 en préparation). Néanmoins, des mesures des niveaux de LH seront effectuées afin de confirmer ce résultat.

Les neurones à kisspeptines présents dans le noyau arqué ont été décrits comme des intermédiaires potentiels du rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone sur la libération de GnRH. Après castration, les niveaux d'ARNm de *Kiss1* augmentent significativement dans le noyau arqué chez la souris et le rat. Cet effet peut être reversé complètement par l'ajout de testostérone, et partiellement par l'œstradiol et la dihydro-

testostérone (Irwig et al., 2004; Navarro et al., 2004; Smith et al., 2009). Cette augmentation des niveaux de *Kiss1* est associée à une augmentation de la sécrétion de GnRH (Smith et al., 2005b). Chez la souris, les neurones à kisspeptine du noyau arqué peuvent être des cibles directes des stéroïdes sexuels, car ils expriment l'AR et l'ER α (Smith et al., 2005). Nous envisageons de quantifier le niveau d'expression de kisspeptine dans le NArc afin de vérifier si la levée du rétrocontrôle négatif de l'axe HPG observée chez les mâles AR^{NesCre} provient d'une altération de l'expression de kisspeptine dans le noyau arqué. Une étude immunohistochimique préliminaire, réalisée sur des mâles mutants et contrôles castrés et supplémentés en testostérone, semble révéler une augmentation du niveau d'expression de kiss-1 chez les mutants (Résultats non montrés). Ceci suggère que la levée du rétrocontrôle négatif de l'axe HPG observée chez les mâles mutants résulte, au moins en partie, d'une altération de l'expression de kisspeptine dans le NArc.

L'AR et le comportement sexuel mâle

Nous avons montré que l'invalidation de l'AR dans le système nerveux interfère avec le comportement sexuel des mâles. En effet, les mâles AR^{NesCre}, en fond génétique C57BL6J, montrent une altération de la motivation et de la performance sexuelles, lorsqu'ils sont intacts (Picot et al., article 3 en soumission) ou supplémentés à des taux équivalents de testostérone (Marie-Luce et al., article 1 en préparation, Raskin, Marie-Luce et al., 2012). Cependant ces altérations sont moins hétérogène que celles précédemment décrites en fond génétique mixte (Raskin et al., 2009). En effet, en fond mixte, on retrouvait trois groupes en terme de nombre d'animaux qui s'accouplent : le premier groupe montrant un comportement sexuel complet mais avec un déficit de la motivation et de la performance, le deuxième avec un comportement sexuel incomplet et un troisième groupe qui ne s'accouple pas. En fond génétique C57BL6J, la majorité des mutants correspondent aux premiers et troisième groupes des mutants en fond mixte avec un pourcentage de l'ordre de 71% pour le premier groupe. Ces résultats sont en accord avec les variations relatives au fond génétique observées dans l'expression du comportement sexuel et sa modulation par les stéroïdes sexuels (Burns-Cusato et al., 2004). Par exemple, des différences existent dans le degré d'altération du comportement sexuel mâle des mutants ER α KO selon le fond génétique utilisé. Une profonde altération est observée chez les mâles en fond C57BL6J, et le croisement en retour en fond BALB/c ou DBA/2J

permet de restaurer le comportement pour un tiers des animaux (Dominguez-Salazar et al., 2004).

Nos animaux mutants ne montrent pas d'abolition complète du comportement sexuel, contrairement aux animaux ubiquitaires ARKO (Sato et al., 2004), suggérant que la voie des œstrogènes est fonctionnelle et compense partiellement l'absence de l'AR. Ceci est confirmé par l'ajout d'œstradiol qui induit un comportement reproducteur sensiblement similaire entre les mâles contrôles et mutants castrés (Marie-Luce et al., article 1 en préparation), en plus d'une expression ER α normale dans les régions cérébrales impliquées dans l'expression du comportement sexuel (Raskin et al., 2009). Cependant, la voie ER n'est pas suffisante pour compenser l'absence de l'AR (Marie-Luce et al., article 1 ; Picot et al., article 3), car les altérations sexuelles ont lieu même en présence de taux circulants élevés d'œstradiol. Ceci est en lien avec les études montrant que la restauration du comportement complet nécessite la stimulation simultanée de l'AR et l'ER chez le rat (Cooke et al., 2003) et les souris BALB/c AnN (Arteaga-Silva et al., 2007). L'administration d'œstradiol restaure les montées et les thrusts chez les animaux Tfm comme chez les animaux contrôles. Il en avait été conclu que l'AR n'était pas important pour le comportement sexuel (Bodo et Rissman, 2007). Or, aucune comparaison n'avait été effectuée, dans cette étude, entre l'administration d'œstradiol et de testostérone. Nos résultats permettent aujourd'hui de faire une nouvelle interprétation, qui est que l'AR dans le système nerveux est également nécessaire à l'initiation du comportement sexuel et joue un rôle exclusif dans l'activité érectile et l'éjaculation.

Les mâles mutants ont une préférence olfactive normale après une exposition à des stimuli olfactifs mâle et femelle (Marie-Luce et al., article 1 en préparation) alors que les souris Tfm montrent, avec les même types de tests, une préférence olfactive profondément altérée (Bodo et Rissman, 2007). On notera que l'évaluation de la préférence olfactive a été réalisée en présence de litière souillée ou d'animaux anesthésiés. Ainsi l'ensemble des stimuli olfactifs (volatiles et non volatiles) auxquels les animaux sont soumis en condition d'accouplement ont été testés (Baum, 2009; Keller et al., 2009). Nous supposons que les différences entre le modèle conditionnel et ubiquitaire sont dues à une différence de statut neuroendocrinien pendant la période périnatale. Une diminution des niveaux de testostérone pendant la période périnatale pourrait interférer avec l'activation de la voie de signalisation ER α et donc la différenciation sexuelle du

circuit neural impliqué dans l'expression du comportement sexuel. D'une part, nos résultats s'accordent avec ceux obtenus chez le rat Tfm. D'autre part, l'invalidation de l'ER α seul et non de l'ER β ou de l'AR perturbe la préférence olfactive des souris. Une étude effectuée chez les nouveaux-nés ARKO rapporte des niveaux comparables de testostérone à ceux des mâles contrôles (Sato et al., 2004). Cependant, la moyenne des erreurs standards étant très élevée, les auteurs n'excluent pas la possibilité d'une altération de la production de testostérone par les testicules fœtaux (Sato et al., 2004). Ces résultats indiquent que l'AR est requis dans les régions neuronales en aval du bulbe olfactif (AMe, BNST, POA), pour initier le comportement sexuel.

Il est décrit que l'expérience sexuelle améliore le comportement sexuel et la préférence olfactive chez les rongeurs (Swaney et al., 2007 ; 2012). Ce qui n'est pas le cas chez les mâles AR^{NesCre}, pour qui l'expérience sexuelle ne restaure pas le comportement reproducteur (Marie-Luce et al., article 1 en préparation). L'absence d'amélioration du comportement sexuel suggère que l'AR est non seulement nécessaire à l'expression du comportement mais également dans les processus adaptatifs permettant à la souris mâle de s'améliorer entre deux expériences. Cependant les mécanismes qui sous-tendent les changements comportementaux avec l'expérience restent inconnus. De récentes études chez le rat indiquent que l'expression de l'AR change après l'éjaculation de rats mâles (Fernández-Guasti et Rodríguez-Manzo, 2003; Romano-Torres et al., 2007). Ainsi, chez les rats sexuellement rassasiés, l'expression de l'AR diminue significativement dans deux régions fortement impliquées dans l'expression du comportement sexuel ; l'AMe et le VMH (Fernández-Guasti et Rodríguez-Manzo, 2003). À l'inverse, l'expression de l'ER α se trouve être augmenté après accouplement dans les régions citées ci-dessus (Phillips-Farfán et Fernández-Guasti, 2009). Il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression de l'ER α avant et après un premier accouplement chez les mâles AR^{NesCre}.

Par ailleurs, nos études montrent de manière intéressante que les mâles AR^{NesCre} sont incapables d'adopter un comportement de lordose sous imprégnation d'hormones femelle (Picot et al., article 3 en soumission), tout comme les mâles ARKO et Tfm (Ohno et al., 1974 ; Sato et al., 2004). Ceci est associé à une organisation neuroanatomique de la région POA identique à celle des mâles contrôles (Marie-Luce et al., article 1 et Picot et

al., article 3). Dans cette région, fortement impliquée dans plusieurs fonctions et comportements liés à la reproduction, sont localisées des populations de neurones TH, kisspeptine et calbindine dont le nombre est défini de manière irréversible en période périnatale. L'étude neuroanatomique indique que la déféminisation du comportement sexuel n'est pas altérée chez les mâles invalidés pour l'AR dans le système nerveux.

I.2. Au niveau spinal

L'altération de la performance sexuelle observée chez les mâles AR^{NesCre} (Marie-Luce et al., article 1 ; Raskin, Marie-Luce et al., 2012) et l'absence d'éjaculation chez les mâles supplémentés en œstradiol sont probablement dus, au moins en partie, à la nécessité préalable de la stimulation de l'AR dans les régions spinales et périphériques impliquées dans l'érection et l'éjaculation. En effet, les animaux mutants montrent une altération de l'activité érectile comportementale (toiletage des parties génitales) conduisant à une diminution de la fréquence des intromissions (Marie-Luce et al., article 1 ; Raskin, Marie-Luce et al., 2012). L'utilisation de la lignée conditionnelle pour l'AR a permis pour la première fois d'évaluer l'implication de l'AR central dans la différenciation par la testostérone du système neuromusculaire NSB chez la souris. Ce système est connu pour sa participation cruciale dans le contrôle de l'érection et l'émission de sperme (Sachs, 1982; Holmes et Sachs, 1994; Steers, 2000).

La castration de mâles contrôlés à l'âge adulte a pour conséquence de réduire le poids des muscles BC/LA et la taille de la jonction post-synaptique chez les mâles des deux phénotypes (Raskin, Marie-Luce et al., 2012), en accord avec les précédentes études chez le rat (Zuloaga et al., 2007) et une étude récente chez la souris (Park et al., 2002). Ainsi, la sensibilité des souris C57BL6J à la testostérone à l'âge adulte et l'invalidation conditionnelle de l'AR font de notre modèle un excellent outil pour l'étude de la plasticité du système neuromusculaire NSB dépendante de l'action centrale de la testostérone. Notre étude est la première à étudier les mécanismes de cette plasticité chez la souris.

L'absence de l'AR central n'a aucune influence sur le développement du muscle BC, ni sur la survie des motoneurons. L'hypothèse communément admise dans la littérature suppose que la différenciation sexuelle en nombre de cette population neuronale ne dépend pas de l'AR spinal. En effet, les motoneurons du NSB ne possèdent pas l'AR

pendant la période périnatale où la mort cellulaire survient chez le rat (Fishman et al., 1990; Jordan et al., 1990) et chez la souris (Smith et al., 2012). De plus, l'application locale d'un antagoniste de l'AR sur les muscles BC/LA ou leur axotomie, empêchent la masculinisation du NSB chez le mâle (Fishman et Breedlove, 1992; Sengelaub et Forger, 2008). Cependant, l'étude de Niel suggère que l'AR dans les fibres musculaires ne suffit pas à préserver les motoneurones du NSB (Niel et al., 2009). Il est donc possible que d'autres types cellulaires au sein des muscles périnéaux, comme les fibroblastes qui expriment l'AR (Monks et al., 2004), participent à l'acquisition de ce dimorphisme ou que d'autres sites d'action autres que le BC/LA soient impliqués.

En utilisant deux techniques, nous avons pu comparer le nombre, la taille et l'arborisation dendritique entre les mâles contrôles et invalidés pour l'AR central, selon qu'ils aient été supplémentés ou non en testostérone. Les mâles AR^{NesCre} présentent une altération partielle du dimorphisme de la taille des motoneurones, qui se trouve être intermédiaire entre celle des femelles et des mâles contrôles (Raskin, Marie-Luce et al., 2012). L'acquisition de ce dimorphisme se fait à la fois suite aux effets organisationnels et activationnels de la testostérone (Park et al., 2002 ; Zuloaga et al., 2007). Jusqu'à maintenant il était supposé que la testostérone périnatale agisse indirectement pour influencer la taille cellulaire (Araki et al., 1991; Zuloaga et al., 2007) et directement à l'âge adulte sur l'AR présents dans les motoneurones chez le rat (Sengelaub et Forger, 2008). Nos résultats permettent aujourd'hui d'apporter de nouveaux éléments de réponses.

Enfin, les mâles AR^{NesCre} ont une réduction significative de la longueur des dendrites des motoneurones du NSB (Raskin, Marie-Luce et al., 2012). De la même façon que pour la taille, nous avons pu montrer que l'AR spinal était nécessaire au cours du développement dans l'organisation de l'arborisation. Sans exclure la possibilité que le muscle BC soit également impliqué, nos données vont à l'encontre des résultats décrits précédemment chez le rat, accordant un rôle exclusif aux œstrogènes au niveau des muscles BC/LA chez le rat (Nowacek et Sengelaub, 2006; Sengelaub et Forger, 2008) pour influencer le développement de la morphologie dendritique. À l'âge adulte, le maintien de l'arborisation ne semble pas impliquer l'AR spinal, mais serait vraisemblablement par l'action indirecte de la testostérone par les muscles BC/LA. Ceci est en

accord avec les travaux réalisés chez le rat, montrant que la testostérone agit principalement via le muscle (Rand et Breedlove, 1995).

La diminution de la taille et de la longueur des dendrites des motoneurones du NSB pourrait résulter en une diminution de l'activité neuronale chez les mâles mutants. L'une des cibles potentielles de l'AR dans les motoneurones est le facteur neurotrophique BDNF. Il est actuellement proposé que les motoneurones, sous l'action de la testostérone, libèrent des facteurs trophiques comme BDNF qui agit en retour sur la morphologie des motoneurones à l'âge adulte (Yang et al., 2004 ; Verhovshek et al., 2010). BDNF est également exprimé dans les muscles BC/LA (Ottem et al., 2007 ; Verhovshek et al., 2010). Une première tentative de caractérisation immunohistochimique du BDNF dans des coupes de moelle s'est pour le moment avérée sans succès, faute d'anticorps spécifique. Nous envisageons de tester de nouveaux anticorps et d'étudier également l'expression de son récepteur trkB.

Au vu de tous ces résultats, nous montrons pour la première fois, que chez la souris, l'AR dans le système nerveux participe à la régulation morphologique des motoneurones du NSB par la testostérone, mais n'est pas nécessaire à leur survie périnatale. Les défauts observés pour la taille et l'arborisation des motoneurones du NSB pourraient contribuer à la réduction de la performance sexuelle et à la baisse de la fertilité observées chez les mâles AR^{NesCre}. D'autant plus que l'ablation du muscle BC chez la souris réduit la fertilité et l'érection nécessaire au maintien des intromissions pendant les thrusts (Elmore et Sachs, 1988). Néanmoins, l'érection du pénis est un processus complexe faisant intervenir plusieurs régions spinales et supra-spinales (Steers, 2000) où l'AR est exprimé (Giuliano et Rampin, 2004). Les dysfonctions érectiles observées chez les mâles AR^{NesCre} peuvent donc être la conséquence d'altérations à plusieurs niveaux. Un « centre éjaculateur » situé dans le segment L3-L4 a été récemment décrit (Truitt et Coolen, 2002), constitué d'un nombre plus important de neurones exprimant la galanine/cholecystokinine ou le peptide de libération de la gastrine (GRP) chez les mâles que les femelles (Newton et Phan, 2006 ; Sakamoto et al., 2008 et 2009a). Ces neurones envoient des projections notamment vers le NSB et le blocage des récep-

teurs de la gastrine (GRP-R) par un antagoniste diminue les réflexes érectiles et l'éjaculation chez le rat (Sakamoto et al., 2008). La même équipe a récemment montré que les rats Tfm possèdent un nombre de neurones GRP hyperféminisé (Sakamoto et al., 2009), indiquant l'implication des androgènes dans l'organisation des neurones GRP et la régulation de l'expression de GRP chez le rat (Sakamoto et al., 2009). Un défaut d'organisation du système GRP pourrait donc expliquer les problèmes érectiles observés chez nos mâles AR^{NesCre}. Une collaboration avec l'équipe de H. Sakamoto (laboratoire Ushimado Marine, Université Okayama, Japon) est d'ores et déjà en cours, afin d'évaluer l'impact de l'absence de l'AR dans le système nerveux sur l'organisation des neurones GRP chez la souris.

II. L'ERβ et la régulation de l'expression du comportement sexuel mâle

L'invalidation de l'ERβ dans le système nerveux n'affecte pas la régulation neuroendocrine au niveau de l'axe HPG, contrairement à la lignée AR^{NesCre}. En effet, les mâles ERβ^{NesCre} ont des taux circulants de testostérone équivalents à ceux des mâles contrôles (Marie-Luce et al., article 4 en préparation). Ce qui est en adéquation avec le rôle mineur attribué à l'ERβ dans la régulation de l'axe HPG (Temple et al., 2003). Néanmoins, les taux circulants de LH seront bientôt mesurés afin de confirmer nos résultats.

Les mâles invalidés pour l'ERβ dans le système nerveux ont un tractus urogénital normal et fonctionnel. En effet, nous n'avons constaté aucune perturbation significative de l'expression du comportement sexuel mâle (Marie-Luce et al., article 4 en préparation). Les mâles dépourvus d'ERβ central sont capables de réaliser un comportement sexuel complet, puisqu'ils sont capables de se reproduire. Ceci a pu être confirmé par l'analyse détaillée du comportement sexuel qui ne révèle que des différences mineures entre les mâles ERβ^{NesCre} et contrôles et seulement au 1^{er} test (Marie-Luce et al., article 4 en préparation). De plus, l'amélioration avec l'expérience sexuelle est visible pour les deux génotypes. Ce phénotype comportemental est associé à une préférence olfactive normale vis à vis des stimuli femelles (Marie-Luce et al., article 4 en préparation).

Par ailleurs, le faible quotient de lordose observé chez les mâles ERβ^{NesCre} (Marie-Luce et al., article 4 en préparation) suggère que chez le mâle, l'ERβ central n'est pas indispensable au processus de déféminisation du comportement sexuel. Pour vérifier cette interprétation, des études neuroanatomiques dans les régions sexuellement

dimorphiques ont été entreprises. Les résultats préliminaires indiquent que l'ER β n'est pas impliqué dans la différenciation du nombre de neurones à kisspeptines et TH dans l'AVPV. Des quantifications sont en cours pour d'autres populations neuronales comme celle exprimant la calbindine.

La comparaison de notre lignée conditionnelle avec la lignée ubiquitaire précédemment décrite (Ogawa et al., 1999 ; Kudwa et al., 2005) montre des convergences et des divergences. Les mâles ER β KO ont un phénotype externe de type mâle, et le comportement sexuel est normal (Ogawa et al., 1999 ; Temple et al., 2003). Cela est en accord avec nos données indiquant que l'ER β n'est pas nécessaire à l'expression du comportement sexuel à l'âge adulte.

En revanche, l'invalidation conditionnelle de l'ER β n'augmente pas la capacité des mâles à montrer un comportement de lordose, contrairement à ce qui a été rapporté pour l'invalidation ubiquitaire de l'ER β (Kudwa et al., 2005). On notera qu'à ce jour aucune autre étude n'a confirmé cet effet féminisant de l'absence de l'ER β au niveau comportemental et même neuroanatomique. La quantification des neurones TH dans l'AVPV chez les mâles ER β ^{NesCre} confirme nos observations.

Notre hypothèse est que l'AR et l'ER α , et non l'ER β , jouent des rôles complémentaires dans le contrôle du comportement sexuel par la testostérone chez le mâle. Une étude décrit des effets transitoires de la mutation à la puberté (Temple et al., 2003). Cela est en lien avec les études qui suggèrent que les modifications endocrines qui surviennent à la puberté constitueraient une seconde vague d'organisation neuronale dépendante de la testostérone pour compléter l'organisation périnatale et joueraient un rôle important dans la maturation des comportements reproducteurs (Clarkson et al., 2009, Ojeda et Skinner, 2006 ; Schultz et al., 2004). Il serait donc intéressant d'effectuer des mesures des niveaux de testostérone et des tests de comportement sexuel mâle en période pré-pubertaire et pendant la puberté afin d'évaluer le rôle de l'ER β dans la maturation de l'axe HPG d'une part et du comportement sexuel mâle d'autre part. Par ailleurs, l'ER β est moins exprimé dans les régions impliquées dans l'expression des comportements de reproduction et plutôt présent dans des régions liées aux fonctions cognitives (Handa et al., 2012). Il serait impliqué dans la modulation de comportements émotionnels. En effet, il est décrit que les effets anxiolytiques de l'œstradiol impliquent l'ER β (Lund et al., 2005 ; Krezel et al., 2001). En outre, les animaux ER β KO montrent un

comportement anxieux augmenté, mesuré lors de différents tests d'anxiété (Krezel et al., 2001 ; Frye et al., 2008 ; Oyola et al., 2012). Une analyse de l'état d'anxiété des animaux $ER\beta^{NesCre}$ sera bientôt entreprise grâce à l'utilisation de paradigmes du labyrinthe en croix surélevée ou de la boîte claire/obscur.

III. Le BPA et perturbation des effets de la testostérone

L'ensemble de nos études réalisées sur 3 cohortes d'animaux indique que :

- L'exposition périnatale ou adulte chez la souris à de faibles doses de BPA n'interfère pas avec les niveaux circulants de testostérone. Cette absence d'effets sur les niveaux de testostérone et le poids des vésicules séminales a également rapportée pour différentes souches de souris (Cagen et al., 1999; Nagao et al., 2002; Kawai et al., 2003) et de rat (Kubo et al., 2003; Cagen et al., 1999; Bai et al., 2011). La seule étude révélant des effets délétères sur les taux de testostérone a été observée pour les souris CD1 (Xi et al., 2011). Mais pour cette même étude, le poids des vésicules séminales n'était pas modifié, bien que ce soit des glandes androgéno-dépendantes. De plus, les doses de BPA administrées étaient jusqu'à 10 fois supérieures à la NOAEL. À l'âge adulte, de la même façon, nous n'avons observé aucune altération pour les niveaux circulants de testostérone et le poids des vésicules séminales (Picot et al., article 3 en soumission). Certaines études rapportent effectivement l'absence d'effets sur le tractus urogénital pour de faibles ou fortes doses de BPA (Nagao et al., 2002; Takahashi et Oishi, 2003). Alors que d'autres décrivent chez le rat des effets qui varient selon la durée et le mode d'exposition (Takahashi et Oishi, 2003; Tohei et al., 2001; Takahashi et Oishi, 2001).

- L'exposition au BPA n'interfère pas avec l'organisation du comportement sexuel mâle chez les souris C57BL6J. En effet, nous avons observé que les mâles exposés en période périnatale, à la dose TDI ou NOAEL de BPA, exhibent un comportement sexuel mâle identique aux mâles contrôles d'une part et d'autre part présentent un faible quotient de lordose (Picot et al., article 3 en soumission), témoignant d'une déféminisation correcte du comportement sexuel. De manière surprenante, un quotient de lordose particulièrement faible a été observé pour les mâles exposés à la dose NOAEL de BPA, la dose la plus forte, suggérant que la déféminisation du comportement mâle est accentuée à cette dose. À l'inverse, une étude récente menée chez le rat, rapporte que le comportement

sexuel est altéré après une exposition en période périnatale à la dose TDI de BPA. Mais cela concerne uniquement les mâles expérimentés (Jones et al., 2011). Cette divergence peut être due à la différence du modèle animal utilisé.

De plus, au niveau neuroanatomique, nous n'avons trouvé aucune différence entre les animaux traités au véhicule et au BPA, dans le niveau d'expression des neurones kisspeptine et calbindine (Picot et al., article 3 en soumission). Ainsi nous montrons que l'organisation sexuellement dimorphique dans la MPOA est maintenue chez les mâles traités au BPA. Par ailleurs, aucune altération n'a été observée dans les noyaux sexuellement dimorphiques aux doses de BPA similaires à celles appliquées dans notre étude (Kubo et al., 2001; Kubo et al., 2003; Farabollini et al., 2002). De même qu'à la dose la plus faible de BPA, le nombre de neurones TH dans l'AVPV n'est pas perturbé chez les souris CD1 mâle (Rubin et al., 2006).

Ainsi nous montrons que le BPA ne modifie pas les processus de masculinisation et de déféminisation du comportement sexuel, chez les mâles.

- L'exposition au BPA à l'âge adulte interfère avec l'activation du comportement sexuel à la dose TDI seulement. Les faibles doses de BPA seraient donc plus dommageables que les fortes doses sur le comportement sexuel. L'idée émergente est que les perturbateurs endocriniens ont des effets à de faibles doses et non à fortes doses (vom Saal et al. 1998; vom Saal et al., 1997; Jenkins et al., 2011; Welshons et al., 2003). Ainsi, en fonction de la dose, les interactions avec les voies de signalisations de la testostérone seraient différentes. Ceci pourrait expliquer les effets dose dépendantes et par conséquent les différences comportementales.

Ces déficits sexuels sont associés à une préférence olfactive normale pour les stimuli olfactifs femelle (Picot et al., article 3 en soumission), indiquant une fonction neuronale altérée en réponse aux phéromones, dans les régions sous-jacentes au bulbe olfactif. De plus, l'expérience sexuelle ne restaure pas les déficits observés (Picot et al., article 3 en soumission). Ceci suggère que l'exposition au BPA interfère avec l'expression pour la première fois ainsi qu'avec les processus adaptatifs nécessaires à l'amélioration du comportement sexuel mâle.

- L'existence de plusieurs similitudes dans les altérations sexuelles observées entre l'exposition adulte au BPA et l'inactivation de l'AR dans le système nerveux. Alors que

nous démontrons que l'ER β ne joue pas de rôle crucial dans la régulation du comportement sexuel, une altération de la voie de signalisation de l'ER α n'est pas plausible. La perturbation précoce de l'ER α induit un déficit de l'organisation de la préférence olfactive, du comportement sexuel et du dimorphisme sexuel des populations neuronales dans la POA (Ogawa et al., 1997; Wersinger et al., 1997; Bakker et al., 2002; Bodo et al., 2006; Simerly et al., 1997). Or, nous n'avons trouvé aucune de ces altération chez les mâles exposés au BPA en période périnatale. Par ailleurs, nous avons précédemment montré que la voie œstrogénique était moins efficace que celle de l'AR pour l'expression d'un comportement sexuel complet. Au vu de l'ensemble de nos résultats, notre hypothèse est que le BPA à la dose TDI agit, au moins en partie, comme un composé anti-androgénique dans les circuits neuronaux impliqués dans l'expression du comportement sexuel. L'ensemble des effets de l'invalidation de l'AR dans le système nerveux que nous avons rapporté pour les mâles AR^{NesCre} (Marie-Luce et al., article 1 ; Raskin, Marie-Luce et al., 2012) est très similaire aux effets de l'exposition à la dose TDI de BPA qui ne perturbe pas l'organisation de la préférence olfactive et le nombre de neurones à kisspeptine et calbindine dans la POA, ni la déféminisation du comportement. De même pour la restauration du comportement avec l'expérience. En outre, plusieurs études rapportent une activité anti-androgénique pour le BPA *in vitro* (Sohoni et Sumpter, 1998; Paris et al., 2002; Lee et al., 2003; Satoh et al., 2004; Xu et al., 2005; Sun et al., 2006). Les résultats similaires obtenus pour le nombre de neurones ER α suggèrent étrangement que la surexpression observée dans la POA dépendrait d'un mécanisme d'action commun entre le BPA et la mutation AR^{NesCre}. Cependant, la manière exacte dont le BPA exerce cette activité anti-androgénique potentiel *in vivo* reste à définir. Le BPA pourrait interférer avec la liaison de la testostérone sur l'AR et bloquer son activation ou affecter d'autres étapes de l'activation de l'AR et donc sa fonction comme rapportée *in vitro* (Lee et al., 2003).

Ainsi nos données mettent en lumière, pour la première fois, que la période d'exposition adulte n'est pas à sous-estimer pour le système nerveux central. La souris constitue un bon modèle pour évaluer les effets d'une contamination au BPA et les effets observés pourraient donc ne pas être très différents chez d'autres espèces de mammifères, dont l'Homme. En effet, le métabolisme entre les rongeurs et les primates est assez similaire (Taylor et al., 2011) et la dose TDI serait proche de la contamination environ-

nementale au BPA (vom Saal et al., 1998 ; 1997).

IV. Perspectives

Concernant la lignée *AR^{NesCre}*, nous prévoyons d'approfondir l'étude de l'altération motivationnelle des mâles mutants. Pour cela, nous envisageons de réaliser un test de préférence de place conditionné à l'accouplement. Ce test permet d'évaluer la préférence pour un environnement qui est associé à un stimulus (drogues, nourritures ou interactions sociales). Dans notre cas, l'accouplement est le stimulus positif. Ce test a démontré la valeur récompensante du comportement sexuel chez le mâle et la femelle rat et souris (Paredes, 2009 ; 2010). Cela consiste, dans un dispositif constitué de deux compartiments séparés par un couloir neutre, à associer dans un premier temps l'un des compartiment à l'état de motivation et de récompense procurées par l'éjaculation. Puis, le jours test, l'animal circule librement entre les compartiments. Le temps passé à circuler dans le compartiment conditionné permet d'évaluer la motivation sexuelle du mâle.

Les vocalisations ultrasonores émises lors de la phase pré-copulatoire peuvent également être mesurées lors du test de comportement sexuel. Une récente étude montre que les souris mâles changent les caractéristiques des vocalisations ultrasonores qu'ils émettent en réponse aux changements pertinents des informations sociales, notamment en présence d'une femelle en œstrus (Hanson et Hurley, 2012). Nous disposons depuis peu du dispositif au sein du laboratoire, qui pourra être mis en place très prochainement.

En relation avec l'altération de la motivation des mutants, nous envisageons d'identifier les protéines qui agissent en aval de l'AR, qui pourraient être sur- ou sous-exprimés dans la région préoptique des mâles mutants. La comparaison de l'expression des gènes cibles de l'AR dans la région préoptique entre les mâles mutants et mâles contrôles pourrait être analysé grâce à une étude du protéome. On sait notamment qu'il y a une augmentation de la libération de la dopamine dans l'aire préoptique médiane chez le mâle lors d'une exposition à une femelle réceptive et pendant l'accouplement. Cette libération est sous le contrôle de la testostérone et jouerait un rôle facilitateur dans l'expression du comportement sexuel (Hull et Dominguez, 2006 ; Hull et Rodriguez-Manzo, 2009).

Concernant la lignée $ER\beta^{NesCre}$, suite à nos précédentes observations, nous souhaitons évaluer le rôle de l' $ER\beta$ dans la mise en place de la puberté. Les perturbations transitoires observées à la puberté chez les mâles $ER\beta KO$ (Temple et al., 2003) suggèrent que l' $ER\beta$ jouerait un rôle dans les effets de la testostérone pendant la puberté. Pour cela, nous envisageons de suivre l'évolution des taux circulants de testostérone et la mise en place du comportement sexuel au cours de la puberté.

Par ailleurs, nous évaluerons l'implication de l' $ER\beta$ dans l'état d'anxiété. Pour cela, nous prévoyons de réaliser très prochainement des tests d'anxiété (labyrinthe de la croix surélevée, la boîte claire-obscur ou encore open-field). Les tests d'anxiété reposent sur l'aversion naturelle qu'ont les rongeurs pour les milieux ouverts, lumineux et surélevés. L'état d'anxiété est évalué en laissant le choix à l'animal de circuler librement entre une zone sombre et fermée, et une zone ouverte et éclairée. Un animal est jugé anxieux lorsqu'il passe très peu de temps dans la partie ouverte (Dawson et Tricklebank, 1995).

Concernant le BPA, le phénotype comportemental étant très similaire à celui observé chez les mâles AR^{NesCre} , nous envisageons d'étudier l'activité érectile comportementale des mâles exposés au BPA à l'âge adulte. Selon les résultats obtenus, nous pourrions également entreprendre l'étude du système NSB.

Par ailleurs, afin de poursuivre l'étude des mécanismes d'action du BPA au niveau cérébral, nous prévoyons de comparer les résultats obtenus à l'issue de l'étude protéomique chez les mâles AR^{NesCre} avec ceux des animaux traités au BPA.

En conclusion, l'ensemble des études menées au cours de ma thèse a permis de mieux comprendre l'implication relative des récepteurs AR et ER β dans la régulation par la testostérone du comportement sexuel mâle. L'utilisation du modèle conditionnel a, entre autres, permis de définir le rôle de l'AR au niveau cérébral *versus* spinal. D'autre part, cette technique aidera sûrement dans un futur proche à déterminer *in vivo* les mécanismes d'actions mis en jeu par le BPA au niveau central (et probablement pour d'autres perturbateurs endocriniens).

Néanmoins il reste encore des voies à explorer dans les mécanismes d'action de la testostérone, notamment les neurotransmetteurs ou neuropeptides mis en cause dans l'expression du comportement sexuel. Il est donc important d'identifier la nature des voies de signalisation activées par les récepteurs AR et/ou ERs et par conséquent les gènes cibles, dans l'organisation et l'activation des circuits neuronaux impliqués dans l'expression du comportement sexuel.

Références

Bibliographiques

A

- Agate, R.J., Grisham, W., Wade, J., Mann, S., Wingfield, J., Schanen, C., Palotie, A., and Arnold, A.P. (2003).** Neural, not gonadal, origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4873–4878.
- Ahmed, E.I., Zehr, J.L., Schulz, K.M., Lorenz, B.H., DonCarlos, L.L., and Sisk, C.L. (2008).** Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat. Neurosci.* *11*, 995–997.
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., and Hardy, M.P. (2004).** Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* *145*, 592–603.
- Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H., and Elbetieha, A.M. (2002).** Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur. J. Oral Sci.* *110*, 163–167.
- Amateau, S.K., Alt, J.J., Stamps, C.L., and McCarthy, M.M. (2004).** Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology* *145*, 2906–2917.
- Amateau, S.K., and McCarthy, M.M. (2002).** Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *J. Neuroendocrinol.* *14*, 904–910.
- Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., and Mark, M. (2008).** Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER β -null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2433–2438.
- Antonson, P., Omoto, Y., Humire, P., and Gustafsson, J.-Å. (2012).** Generation of ER α -floxed and knockout mice using the Cre/LoxP system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *424*, 710–716.
- Apostolakis, E.M., Ramamurphy, M., Zhou, D., Oñate, S., and O'Malley, B.W. (2002).** Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and un-masks genetic adaptation in knockout mice. *Mol. Endocrinol.* *16*, 1511–1523.
- Arai, Y., Murakami, S., and Nishizuka, M. (1994).** Androgen enhances neuronal degeneration in the developing preoptic area: apoptosis in the anteroventral periventricular nucleus (AVPvN-POA). *Horm Behav* *28*, 313–319.
- Araki, I., Harada, Y., and Kuno, M. (1991).** Target-dependent hormonal control of neuron size in the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J. Neurosci.* *11*, 3025–3033.
- Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V., and Haydon, P.G. (1999).** Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *77*, 699–706.
- Argiolas, A., and Melis, M.R. (2004).** The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol. Behav.* *83*, 309–317.
- Argiolas, A., and Melis, M.R. (2005).** Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog. Neurobiol.* *76*, 1–21.
- Arnold, A.P. (2009).** The organizational–activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Hormones and Behavior* *55*, 570–578.
- Arnold, A.P., and Breedlove, S.M. (1985).** Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm Behav* *19*, 469–498.
- Arteaga-Silva, M., Rodriguez-Dorantes, M., Baig, S., and Morales-Montor, J. (2007).** Effects of castration and hormone replacement on male sexual behavior and pattern of expression in the brain of sex-steroid receptors in BALB/c AnN mice. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *147*, 607–615.
- Auger, A.P. (2001).** Ligand-independent activation of progestin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reproduction* *122*, 847–855.
- Auger, A.P., Tetel, M.J., and McCarthy, M.M. (2000).** Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 7551–7555.

B

- Bai, Y., Chang, F., Zhou, R., Jin, P.-P., Matsumoto, H., Sokabe, M., and Chen, L. (2011).** Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge system in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology* 152, 1562–1571.
- Baillet, A., and Mandon-Pépin, B. (2012).** Mammalian ovary differentiation - a focus on female meiosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356, 13–23.
- Baillet, A., Mandon-Pépin, B., Veitia, R., and Cotinot, C. (2011).** [Genetics of early ovarian differentiation: recent data]. *Biol Aujourd'hui* 205, 201–221.
- Bakker, J. (2006).** [Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens]. *Med Sci (Paris)* 22, 459–461.
- Bakker, J., and Baum, M.J. (2008).** Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29, 1–16.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2002).** Sexual partner preference requires a functional aromatase (*cyp19*) gene in male mice. *Horm Behav* 42, 158–171.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2003).** The aromatase knockout (ArKO) mouse provides new evidence that estrogens are required for the development of the female brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 251–262.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2004).** Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behav* 46, 1–10.
- Bardin, C.W., Bullock, L., Schneider, G., Allison, J.E., and Stanley, A.J. (1970).** Pseudohermaphrodite rat: end organ insensitivity to testosterone. *Science* 167, 1136–1137.
- Baskerville, T.A., and Douglas, A.J. (2008).** Interactions between dopamine and oxytocin in the control of sexual behaviour. *Prog. Brain Res.* 170, 277–290.
- Baum, M.J. (2009).** Sexual differentiation of pheromone processing: links to male-typical mating behavior and partner preference. *Horm Behav* 55, 579–588.
- Baum, M.J., Erskine, M.S., Kornberg, E., and Weaver, C.E. (1990).** Prenatal and neonatal testosterone exposure interact to affect differentiation of sexual behavior and partner preference in female ferrets. *Behav. Neurosci.* 104, 183–198.
- Beach, F.A., and Buehler, M.G. (1977).** Male rats with inherited insensitivity to androgen show reduced sexual behavior. *Endocrinology* 100, 197–200.
- Beach, F.A. (1942).** Sexual behavior of prepubertal male and female rats treated with gonadal hormones. *J. comp. Psychol* 34, 285–292.
- Beatty, W.W. (1979).** Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: organizational and activational influences. *Horm Behav* 12, 112–163.
- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., and Fellous, M. (1990).** Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450.
- Berthold AA. (1849).** Transplantation der hoden. *Arch Anat Physiol Wiss Med* 16, 42–60.
- Biedermann, S., Tschudin, P., and Grob, K. (2010).** Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Anal Bioanal Chem* 398, 571–576.
- Bingham, B., Williamson, M., and Viau, V. (2006).** Androgen and estrogen receptor-beta distribution within spinal-projecting and neurosecretory neurons in the paraventricular nucleus of the male rat. *J Comp Neurol.* 499, 911–23.
- Birkett, J.W., and Lester, J.N. (2003).** Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes.
- Blaustein, J.D., and Erskine, M.S. (2002).** 2 - Feminine Sexual Behavior: Cellular Integration of Hormonal and Afferent Information in the Rodent Forebrain. In *Hormones, Brain and Behavior*, (San Diego: Academic Press), pp. 139–214.
- Bodo, C., Kudwa, A.E., and Rissman, E.F. (2006).** Both estrogen receptor-alpha and -beta are required for sexual differentiation of the anteroventral periventricular area in mice. *Endocrinology* 147, 415–420.
- Bodo, C., and Rissman, E.F. (2007).** Androgen receptor is essential for sexual differentiation of responses to olfactory cues in mice. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2182–2190.

- Bodo, C., and Rissman, E.F. (2008).** The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinology* *149*, 4142–4150.
- Bonthuis, P.J., Cox, K.H., and Rissman, E.F. (2012).** X-chromosome dosage affects male sexual behavior. *Horm Behav* *61*, 565–572.
- Brailoiu, E., Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Mizuo, K., Sklar, L.A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., and Dun, N.J. (2007).** Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J. Endocrinol.* *193*, 311–321.
- Brand, T., Kroonen, J., Mos, J., and Slob, A.K. (1991).** Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm Behav* *25*, 323–341.
- Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., Martin, P.G., Theodorou, V., Fioramonti, J., and Houdeau, E. (2010).** Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 448–453.
- Breedlove, S.M. (1992).** Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. *J. Neurosci.* *12*, 4133–4142.
- Breedlove, S.M. (1997).** Neonatal androgen and estrogen treatments masculinize the size of motoneurons in the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Cell. Mol. Neurobiol.* *17*, 687–697.
- Breedlove, S.M., and Arnold, A.P. (1980).** Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. *Science* *210*, 564–566.
- Breedlove, S.M., and Arnold, A.P. (1981).** Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. *Brain Res.* *225*, 297–307.
- Breedlove, S.M., and Arnold, A.P. (1983a).** Hormonal control of a developing neuromuscular system. I. Complete Demasculinization of the male rat spinal nucleus of the bulbocavernosus using the anti-androgen flutamide. *J. Neurosci.* *3*, 417–423.
- Breedlove, S.M., and Arnold, A.P. (1983b).** Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J. Neurosci.* *3*, 424–432.
- Breedlove, S.M., Jacobson, C.D., Gorski, R.A., and Arnold, A.P. (1982).** Masculinization of the female rat spinal cord following a single neonatal injection of testosterone propionate but not estradiol benzoate. *Brain Res.* *237*, 173–181.
- Bremer, A.A. (2010).** Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord* *8*, 375–394.
- Brennan, P.A., and Keverne, E.B. (2004).** Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr. Biol.* *14*, R81–89.
- Brennan, P.A., and Zufall, F. (2006).** Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* *444*, 308–315.
- Büdefeld, T., Grgurevic, N., Tobet, S.A., and Majdic, G. (2008).** Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev Neurobiol* *68*, 981–995.
- Burke, K.A., Widows, M.R., and Sengelaub, D.R. (1997).** Synergistic effects of testosterone metabolites on the development of motoneuron morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J. Neurobiol.* *33*, 1–10.
- Burns-Cusato, M., Scordalakes, E.M., and Rissman, E.F. (2004).** Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol. Behav.* *83*, 217–232.
- Burridge, E. 2003.** Bisphenol A: product profile. *Eur Chem News* *17*.

C

- Cagen, S.Z., Waechter, J.M., Jr, Dimond, S.S., Breslin, W.J., Butala, J.H., Jekat, F.W., Joiner, R.L., Shiotsuka, R.N., Veenstra, G.E., and Harris, L.R. (1999).** Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol. Sci.* *50*, 36–44.
- Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., and Needham, L.L. (2005).** Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* *113*, 391–395.
- Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., and Hauser, R.**

- (2009). Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ. Health Perspect.* *117*, 639–644.
- Campbell, A.B., and McGill, T.E. (1970).** Neonatal hormone treatment and sexual behavior in male mice. *Hormones and Behavior* *1*, 145–150.
- Cao, J., Mickens, J.A., McCaffrey, K.A., Leyrer, S.M., and Patisaul, H.B. (2012).** Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology* *33*, 23–36.
- Cao, J., and Patisaul, H.B. (2011).** Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J. Comp. Neurol.* *519*, 2954–2977.
- Ceccarelli, I., Della Seta, D., Fiorenzani, P., Farabollini, F., and Aloisi, A.M. (2007).** Estrogenic chemicals at puberty change ER α in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicol Teratol* *29*, 108–115.
- Chang, C.S., Kokontis, J., and Liao, S.T. (1988).** Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* *240*, 324–326.
- Charest, N.J., Zhou, Z.X., Lubahn, D.B., Olsen, K.L., Wilson, E.M., and French, F.S. (1991).** A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol. Endocrinol.* *5*, 573–581.
- Charlier, T.D., and Balthazart, J. (2005).** Modulation of hormonal signaling in the brain by steroid receptor coactivators. *Rev Neurosci* *16*, 339–357.
- Chung, W.C., Swaab, D.F., and De Vries, G.J. (2000).** Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat brain. *J. Neurobiol.* *43*, 234–243.
- Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R., and Herbison, A.E. (2009).** Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* *150*, 3214–3220.
- Clarkson, J., and Herbison, A.E. (2006).** Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* *147*, 5817–5825.
- Clarkson, J., and Herbison, A.E. (2011).** Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 293–301.
- Clarkson, J., Shamas, S., Mallinson, S., and Herbison, A.E. (2012).** Gonadal steroid induction of kisspeptin peptide expression in the rostral periventricular area of the third ventricle during postnatal development in the male mouse. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 907–915.
- Collado, P., Valencia, A., Del Abril, A., Rodríguez-Zafra, M., Pérez-Laso, C., Segovia, S., and Guillamón, A. (1993).** Effects of estradiol on the development of sexual dimorphism in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *75*, 285–287.
- Collier, A.C., Ganley, N.A., Tingle, M.D., Blumenstein, M., Marvin, K.W., Paxton, J.W., Mitchell, M.D., and Keelan, J.A. (2002).** UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem. Pharmacol.* *63*, 409–419.
- Cooke, B.M., Tabibnia, G., and Breedlove, S.M. (1999).** A brain sexual dimorphism controlled by adult circulating androgens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 7538–7540.
- Cooke, B.M., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2003).** Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm Behav* *43*, 336–346.
- Coquelin, A., and Bronson, F.H. (1979).** Release of luteinizing hormone in male mice during exposure to females: habituation of the response. *Science* *206*, 1099–1101.
- Coquelin, A., and Bronson, F.H. (1980).** Secretion of luteinizing hormone in male mice: factors that influence release during sexual encounters. *Endocrinology* *106*, 1224–1229.
- Coquelin, A., and Desjardins, C. (1982).** Luteinizing hormone and testosterone secretion in young and old male mice. *Am. J. Physiol.* *243*, E257–263.
- Corbier, P., Edwards, D.A., and Roffi, J. (1992).** The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* *100*, 127–131.
- Cornil, C.A., Ball, G.F., and Balthazart, J. (2006).** Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res.* *1126*, 2–26

- Cornil, C. A., and Charlier, T.D. (2010).** Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *J Neuroendocrinol.* 22, 664-673.
- Cox, K.H., Gatewood, J.D., Howeth, C., and Rissman, E.F. (2010).** Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav* 58, 754-761.
- Cross, E., and Roselli, C.E. (1999).** 17beta-estradiol rapidly facilitates chemoinvestigation and mounting in castrated male rats. *Am. J. Physiol.* 276, R1346-1350.

D

- Dalterio, S., Bartke, A., and Butler, K. (1979).** A single injection of 17 beta-estradiol facilitates sexual behavior in castrated male mice. *Horm Behav* 13, 314-327.
- David, K.G., Dingemans, E., Freud, J., and Laqueur, E. (1935).** On crystalline male hormone from testicles (testosterone). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 233, 281.
- Davis, E.C., Popper, P., and Gorski, R.A. (1996).** The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res.* 734, 10-18.
- Dawson, G.R., and Tricklebank, M.D. (1995).** Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci.* 16, 33-36.
- Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A.M., Dessì-Fulgheri, F., and Farabollini, F. (2006).** Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 50, 301-307.
- Demierre, A.-L., Peter, R., Oberli, A., and Bourqui-Pittet, M. (2012).** Dermal penetration of bisphenol A in human skin contributes marginally to total exposure. *Toxicol. Lett.* 213, 305-308.
- Denner, L.A., Weigel, N.L., Maxwell, B.L., Schrader, W.T., and O'Malley, B.W. (1990).** Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740-1743.
- Dewing, P., Boulware, M.I., Sinchak, K., Christensen, A., Mermelstein, P.G., and Micevych, P. (2007).** Membrane estrogen receptor-alpha interactions with metabotropic glutamate receptor 1a modulate female sexual receptivity in rats. *J. Neurosci.* 27, 9294-9300.
- Dodds, E.C., and Lawson, W. (1936).** Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* 137, 996-996.
- Dominguez, J., Riolo, J.V., Xu, Z., and Hull, E.M. (2001).** Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. *J. Neurosci.* 21, 349-355.
- Dominguez-Salazar, E., Bateman, H.L., and Rissman, E.F. (2004).** Background matters: the effects of estrogen receptor alpha gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. *Horm Behav* 46, 482-490.
- Dorries, K.M., Adkins-Regan, E., and Halpern, B.P. (1997).** Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav. Evol.* 49, 53-62.
- Drews, U. (1998).** Direct and mediated effects of testosterone: analysis of sex reversed mosaic mice heterozygous for testicular feminization. *Cytogenet. Cell Genet.* 80, 68-74.
- Dugger, B.N., Morris, J.A., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2007).** Androgen receptors are required for full masculinization of the ventromedial hypothalamus (VMH) in rats. *Horm Behav* 51, 195-201.
- Dulac, C., and Torello, A.T. (2003).** Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 551-562.
- Dungan, H.M., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2006).** Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 147, 1154-1158.
- Dunlap, J.L., Gerall, A.A., and McLean, L.D. (1973).** Enhancement of female receptivity in neonatally castrated males by prepuberal ovarian transplants. *Physiol. Behav.* 10, 701-705.
- Durazzo, A., Morris, J.A., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2007).** Effects of the testicular feminization mutation (tfm) of the androgen receptor gene on BSTMPM volume and morphology in rats. *Neurosci. Lett.* 419, 168-171.

E

- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1996).** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–4805.
- Edelmann, M., Wolfe, C., Scordalakes, E.M., Rissman, E.F., and Tobet, S. (2007).** Neuronal nitric oxide synthase and calbindin delineate sex differences in the developing hypothalamus and preoptic area. *Dev Neurobiol* 67, 1371–1381.
- Edwards, D.A. (1971).** Neonatal administration of androstenedione, testosterone or testosterone propionate: effects on ovulation, sexual receptivity and aggressive behavior in female mice. *Physiol. Behav.* 6, 223–228.
- Edwards, D.A., and Burge, K.G. (1971).** Estrogenic arousal of aggressive behavior and masculine sexual behavior in male and female mice. *Hormones and Behavior* 2, 239–245.
- EFSA. (2006).** Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROP ANE (Bisphenol A) Question number EFSA-Q-2005-100. Adopted on 29 November 2006. *The EFSA Journal* 2006; 428, 1-75.
- EFSA. (2008).** Toxicokinetics of Bisphenol A. Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) (Question No EFSA-Q-2008-382). Adopted on 9 July 2008. *The EFSA Journal* 2008; 759, 1- 10.
- Elmore, L.A., and Sachs, B.D. (1988).** Role of the bulbospongiosus muscles in sexual behavior and fertility in the house mouse. *Physiol. Behav* 44, 125-129
- Esumi, H., Takahashi, Y., Seki, M., Sato, S., Nagase, S., and Sugimura, T. (1982).** Perinatal changes of alpha-fetoprotein concentration in the serum and its synthesis in the liver of analbuminemic rats. *Cancer Res.* 42, 306–308.

F

- Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F., and Dessì-Fulgheri, F. (2002).** Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 3, 409–414.
- Farabollini, F., Porrini, S., and Dessì-Fulgherit, F. (1999).** Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 687–694.
- Fechner, P.Y. (2002).** Gender differences in puberty. *J Adolesc Health* 30, 44–48.
- Fernández-Guasti, A., and Rodríguez-Manzo, G. (2003).** Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand J Psychol* 44, 257–263.
- Finn, P.D., and Yahr, P. (2005).** Projection from the ventral bed nucleus of the stria terminalis to the retrorubral field in rats and the effects of cells in these areas on mating in male rats versus gerbils. *Horm Behav* 47, 123–138.
- Fisher, C.R., Graves, K.H., Parlow, A.F., and Simpson, E.R. (1998).** Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6965–6970.
- Fishman, R.B., and Breedlove, S.M. (1992).** Local perineal implants of anti-androgen block masculinization of the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 70, 283–286.
- Fishman, R.B., Chism, L., Firestone, G.L., and Breedlove, S.M. (1990).** Evidence for androgen receptors in sexually dimorphic perineal muscles of neonatal male rats. Absence of androgen accumulation by the perineal motoneurons. *J. Neurobiol.* 21, 694–704.
- Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., and Breer, H. (2007).** Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. *Chem. Senses* 32, 623–631.
- Forger, N.G. (2006).** Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience* 138, 929–938.
- Forger, N.G. (2009).** Control of Cell Number in the Sexually Dimorphic Brain and Spinal Cord. *J Neuroendocrinol* 21, 393–399.

- Forger, N.G., and Breedlove, S.M. (1987).** Seasonal variation in mammalian striated muscle mass and motoneuron morphology. *J. Neurobiol.* *18*, 155–165.
- Forger, N.G., Fishman, R.B., and Breedlove, S.M. (1992).** Differential effects of testosterone metabolites upon the size of sexually dimorphic motoneurons in adulthood. *Horm Behav* *26*, 204–213.
- Forger, N.G., Rosen, G.J., Waters, E.M., Jacob, D., Simerly, R.B., and de Vries, G.J. (2004).** Deletion of Bax eliminates sex differences in the mouse forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 13666–13671.
- Foster, D.L., Jackson, L.M., and Padmanabhan, V. (2006).** Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* *254-255*, 109–119.
- Frye, C.A., Koonce, C.J., Edinger, K.L., Osborne, D.M., and Walf, A.A. (2008)** Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. *Hormones and Behavior.* *54*, 726-734.
- Fu, P., and Kawamura, K. (2010).** Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ. Pollut.* *158*, 3138–3143.
- Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., and Gustafson, E.L. (2003).** The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1357–1363.

G

- Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Van Reeth, T., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smitz, J., Alexandre, H., Szpirer, C., et al. (2002).** Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 12865–12870.
- Garcia-Falgueras, A., Pinos, H., Collado, P., Pasaro, E., Fernandez, R., Jordan, C.L., Segovia, S., and Guillamon, A. (2005).** The role of the androgen receptor in CNS masculinization. *Brain Res.* *1035*, 13–23.
- García-Segura, L.M., Chowen, J.A., Párducz, A., and Naftolin, F. (1994).** Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog. Neurobiol.* *44*, 279–307.
- Gaspar, M.L., Meo, T., Bourgarel, P., Guenet, J.L., and Tosi, M. (1991).** A single base deletion in the Tfm androgen receptor gene creates a short-lived messenger RNA that directs internal translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 8606–8610.
- Gatewood, J.D., Wills, A., Shetty, S., Xu, J., Arnold, A.P., Burgoyne, P.S., and Rissman, E.F. (2006).** Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *J. Neurosci.* *26*, 2335–2342.
- De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Léclureuil, C., et al. (2004).** A Sertoli cell-selective knock-out of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 1327–1332.
- George, F.W., and Wilson, J.D. (1978).** Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *47*, 550–555.
- Gerall, A.A., Dunlap, J.L., and Hendricks, S.E. (1973).** Effect of ovarian secretions on female behavioral potentiality in the rat. *J Comp Physiol Psychol* *82*, 449–465.
- Gilmore, R.F., Varnum, M.M., and Forger, N.G. (2012).** Effects of blocking developmental cell death on sexually dimorphic calbindin cell groups in the preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis. *Biol Sex Differ* *3*, 5.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001).** The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* *81*, 629–683.
- Ginsberg, G., and Rice, D.C. (2009).** Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ. Health Perspect.* *117*, 1639–1643.
- Giuliano, F., and Rampin, O. (2004).** Neural control of erection. *Physiol Behav* *83*, 189–201.
- Giusti, R.M., Iwamoto, K., and Hatch, E.E. (1995).** Diethylstilbestrol revisited: a review of the

- long-term health effects. *Ann. Intern. Med.* *122*, 778–788.
- Gleason, E.D., Fuxjager, M.J., Oyegbile, T.O., et Marler, C.A. (2009).** Testosterone release and social context: When it occurs and why. *Frontiers in Neuroendocrinology* *30*, 460–469.
- Gnessi, L., Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Spera, G., Wang, C., Bondjers, C., Karlsson, L., and Betsholtz, C. (2000).** Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J. Cell Biol.* *149*, 1019–1026.
- Goldstein, L.A., Kurz, E.M., and Sengelaub, D.R. (1990).** Androgen regulation of dendritic growth and retraction in the development of a sexually dimorphic spinal nucleus. *J. Neurosci.* *10*, 935–946.
- Goldstein, L.A., and Sengelaub, D.R. (1994).** Differential effects of dihydrotestosterone and estrogen on the development of motoneuron morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J. Neurobiol.* *25*, 878–892.
- Gore, A.C., Wersinger, S.R., and Rissman, E.F. (2000).** Effects of female pheromones on gonadotropin-releasing hormone gene expression and luteinizing hormone release in male wild-type and oestrogen receptor-alpha knockout mice. *J. Neuroendocrinol.* *12*, 1200–1204.
- Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E., and Southam, A.M. (1978).** Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* *148*, 333–346.
- Gorski, R.A., Harlan, R.E., Jacobson, C.D., Shryne, J.E., and Southam, A.M. (1980).** Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J. Comp. Neurol.* *193*, 529–539.
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P., and Gaido, K.W. (1998).** Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* *142*, 203–214.
- Goy, R.W. (1966).** Role of androgens in the establishment and regulation of behavioral sex differences in mammals. *J. Anim. Sci.* *25 Suppl*, 21–35.
- Greco, T.L., and Payne, A.H. (1994).** Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* *135*, 262–268.
- Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., and Chambon, P. (1986).** Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J. Steroid Biochem.* *24*, 77–83.
- Grignard, E., Lapenna, S., and Bremer, S. (2012).** Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol In Vitro* *26*, 727–731.
- Grumbach, M.M. (2002).** The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm. Res.* *57 Suppl* *2*, 2–14.
- Gu, G.B., and Simerly, R.B. (1997).** Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J. Comp. Neurol.* *384*, 142–164.

H

- Habert, R., and Picon, R. (1984).** Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J. Steroid Biochem.* *21*, 193–198.
- Hamada, T., and Sakuma, Y. (2010).** Estrogen receptor {alpha} gene promoter 0/B usage in the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Endocrinology* *151*, 1923–1928.
- Hamson, D.K., Jones, B.A., and Watson, N.V. (2004).** Distribution of androgen receptor immunoreactivity in the brainstem of male rats. *Neuroscience.* *127*, 797–803.
- Hamson, D.K., Morris, J.A., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2009).** Time course of adult castration-induced changes in soma size of motoneurons in the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Neurosci. Lett.* *454*, 148–151.
- Handa, R. J., Ogawa, S., Wang, J. M., and Herbison, A. E. (2012).** Roles for oestrogen receptor β in adult brain function. *J Neuroendocrinol.* *24*, 160–173.
- Hanson, J.L., and Hurley, L.M. (2012).** Female presence and estrous state influence mouse ultrasonic courtship vocalizations. *PLoS One.* *7*, e40782.
- Harding, S.M., and McGinnis, M.Y. (2004).** Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN:

- effects on male sociosexual behaviors. *Physiol. Behav.* *81*, 671–680.
- Hart, B.L. (1972).** Manipulation of neonatal androgen: effects on sexual responses and penile development in male rats. *Physiol. Behav.* *8*, 841–845.
- Hazell, G.G.J., Yao, S.T., Roper, J.A., Prossnitz, E.R., O'Carroll, A.-M., and Lolait, S.J. (2009).** Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J. Endocrinol.* *202*, 223–236.
- He, W.W., Kumar, M.V., and Tindall, D.J. (1991).** A frame-shift mutation in the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in the testicular-feminized mouse. *Nucleic Acids Res.* *19*, 2373–2378.
- He, Z., Paule, M.G., and Ferguson, S.A. (2012).** Low oral doses of bisphenol A increase volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male, but not female, rats at postnatal day 21. *Neurotoxicol Teratol* *34*, 331–337.
- Hegstrom, C.D., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2002).** Photoperiod and androgens act independently to induce spinal nucleus of the bulbocavernosus neuromuscular plasticity in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*. *J. Neuroendocrinol.* *14*, 368–374.
- Hellstrom, W.J.G. (2008).** Clinical applications of centrally acting agents in male sexual dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* *20 Suppl 1*, S17–23.
- Hellwinkel, O.J., Bull, K., Holterhus, P.M., Homburg, N., Struve, D., and Hiort, O. (1999).** Complete androgen insensitivity caused by a splice donor site mutation in intron 2 of the human androgen receptor gene resulting in an exon 2-lacking transcript with premature stop-codon and reduced expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *68*, 1–9.
- Hess, R.A. (2000).** Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev. Reprod.* *5*, 84–92.
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., and Lubahn, D.B. (1997).** A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* *390*, 509–512.
- Hojo, Y., Hattori, T.-A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H.-T., Mukai, H., Morrison, J.H., Janssen, W.G.M., Kominami, S., et al. (2004).** Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 865–870.
- Holmes, G.M., and Sachs, B.D. (1994).** Physiology and mechanics of rat levator ani muscle: evidence for a sexual function. *Physiol. Behav.* *55*, 255–266.
- Homma, T., Sakakibara, M., Yamada, S., Kinoshita, M., Iwata, K., Tomikawa, J., Kanazawa, T., Matsui, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., et al. (2009).** Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol. Reprod.* *81*, 1216–1225.
- Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., and Maeda, S. (1998).** Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *252*, 445–449.
- Houtsmuller, E.J., Brand, T., de Jonge, F.H., Joosten, R.N., van de Poll, N.E., and Slob, A.K. (1994).** SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol. Behav.* *56*, 535–541.
- Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Ryan, B.C., and Gray, L.E., Jr (2008).** Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol. Sci.* *102*, 371–382.
- Hrabovszky, E., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Hajszán, T., Carpenter, C.D., Liposits, Z., and Petersen, S.L. (2000).** Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology.* *141*, 3506–3509.
- Hrabovszky, E., Steinhäuser, A., Barabás, K., Shughrue, P.J., Petersen, S.L., Merchenthaler, I., and Liposits, Z. (2001).** Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology.* *142*, 3261–3264.
- Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B., Horvath, M.C., Keller, E., Caraty, A., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z., et al. (2010).** The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin

- B neurons. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 1984–1998.
- Hull, E.M., and Dominguez, J.M. (2006).** Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res.* *1126*, 66–75.
- Hull, E.M., and Dominguez, J.M. (2007).** Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav* *52*, 45–55.
- Hull, E.M., Du, J., Lorrain, D.S., and Matuszewich, L. (1997).** Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res. Bull.* *44*, 327–333.
- Hull, E.M., Meisel, R.L., and Sachs, B.D. (2002).** 1 - Male Sexual Behavior. In *Hormones, Brain and Behavior*, (San Diego: Academic Press), pp. 3–137.
- Hull, E.M., Muschamp, J.W., and Sato, S. (2004).** Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol. Behav.* *83*, 291–307.
- Hull, E.M., and Rodríguez-Manzo, G. (2009).** 1 - Male Sexual Behavior. In *Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)*, (San Diego: Academic Press), pp. 5–66.

I

- Imwalle, D.B., Scordalakes, E.M., and Rissman, E.F. (2002).** Estrogen receptor alpha influences socially motivated behaviors. *Horm Behav* *42*, 484–491.
- Ingraham, H.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W.H., Nachtigal, M.W., Abbud, R., Nilson, J.H., and Parker, K.L. (1994).** The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* *8*, 2302–2312.
- Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H., and Kato, S. (2003).** Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 140–144.
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004).** Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* *80*, 264–272.
- Isensee, J., Meoli, L., Zazzu, V., Nabzyk, C., Witt, H., Soewarto, D., Effertz, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Busch, D., et al. (2009).** Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology* *150*, 1722–1730.
- Ishido, M., Masuo, Y., Kunimoto, M., Oka, S., and Morita, M. (2004).** Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J. Neurosci. Res.* *76*, 423–433.
- Ito, S., Murakami, S., Yamanouchi, K., and Arai, Y. (1986).** Prenatal androgen exposure, preoptic area and reproductive functions in the female rat. *Brain Dev.* *8*, 463–468.

J

- Jacob, D.A., Bengston, C.L., and Forger, N.G. (2005).** Effects of Bax gene deletion on muscle and motoneuron degeneration in a sexually dimorphic neuromuscular system. *J. Neurosci.* *25*, 5638–5644.
- James, P.J., and Nyby, J.G. (2002).** Testosterone rapidly affects the expression of copulatory behavior in house mice (*Mus musculus*). *Physiol. Behav.* *75*, 287–294.
- James, P.J., Nyby, J.G., and Saviolakis, G.A. (2006).** Sexually stimulated testosterone release in male mice (*Mus musculus*): roles of genotype and sexual arousal. *Horm Behav* *50*, 424–431.
- Jašarević, E., Sieli, P.T., Twellman, E.E., Welsh, T.H., Jr, Schachtman, T.R., Roberts, R.M., Geary, D.C., and Rosenfeld, C.S. (2011).** Disruption of adult expression of sexually selected traits by developmental exposure to bisphenol A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 11715–11720.
- Jean-Faucher, C., Berger, M., de Turckheim, M., Veysièrè, G., and Jean, C. (1978).** Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in mice from birth to adulthood. *Acta Endocrinol.* *89*, 780–788.
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R., and Lamartinière, C.A. (2011).** Chronic Oral Exposure to Bisphenol A Results in a Nonmonotonic Dose Response in Mammary Carcinogenesis and Metastasis in MMTV-erbB2 Mice. *Environmental Health Perspectives* *119*, 1604–1609.

- Jones, B.A., Shimell, J.J., and Watson, N.V. (2011).** Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Horm Behav* 59, 246–251.
- Jordan, C.L., Letinsky, M.S., and Arnold, A.P. (1990).** Critical period for the androgenic block of neuromuscular synapse elimination. *J. Neurobiol.* 21, 760–767.
- Jordan, C.L., Padgett, B., Hershey, J., Prins, G., and Arnold, A. (1997).** Ontogeny of androgen receptor immunoreactivity in lumbar motoneurons and in the sexually dimorphic levator ani muscle of male rats. *J. Comp. Neurol.* 379, 88–98.
- Joskow, R., Barr, D.B., Barr, J.R., Calafat, A.M., Needham, L.L., and Rubin, C. (2006).** Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc* 137, 353–362.
- Jost, A. (1947).** The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 66, 302.
- Juntti, S.A., Tollkuhn, J., Wu, M.V., Fraser, E.J., Soderborg, T., Tan, S., Honda, S.-I., Harada, N., and Shah, N.M. (2010).** The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron* 66, 260–272.

K

- Kauffman, A.S. (2009).** Sexual differentiation and the Kiss1 system: hormonal and developmental considerations. *Peptides* 30, 83–93.
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., and Tena-Sempere, M. (2007).** Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148, 1774–1783.
- Kawai, K., Nozaki, T., Nishikata, H., Aou, S., Takii, M., and Kubo, C. (2003).** Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 111, 175–178.
- Keller, M., Baum, M.J., Brock, O., Brennan, P.A., and Bakker, J. (2009).** The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 200, 268–276.
- Kelly, M.J., Moss, R.L., and Dudley, C.A. (1976).** Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. *Brain Res.* 114, 152–157.
- Kerkhofs, S., Denayer, S., Haelens, A., and Claessens, F. (2009).** Androgen receptor knockout and knock-in mouse models. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 11–17.
- Keverne, E.B. (2005).** Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. *Nat. Neurosci.* 8, 1637–1638.
- Kim, J., Semaan, S.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Dhamija, S., and Kauffman, A.S. (2011).** Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology* 152, 2020–2030.
- Kim, K.W., Zhao, L., and Parker, K.L. (2009).** Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 132–136.
- Kimchi, T., Xu, J., and Dulac, C. (2007).** A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* 448, 1009–1014.
- Kimelberg, H.K. (1983).** Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell. Mol. Neurobiol.* 3, 1–16.
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., and Fujimoto, N. (2002).** Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 554–559.
- Kondo, Y., and Sachs, B.D. (2002).** Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol. Behav.* 76, 443–447.
- Kondo, Y., Sachs, B.D., and Sakuma, Y. (1998).** Importance of the medial amygdala in rat penile erection evoked by remote stimuli from estrous females. *Behav. Brain Res.* 91, 215–222.
- Konkle, A.T.M., and McCarthy, M.M. (2011).** Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology* 152, 223–235.

- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991).** Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* *351*, 117–121.
- Kow, L.-M., and Pfaff, D.W. (2004).** The membrane actions of estrogens can potentiate their lordosis behavior-facilitating genomic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 12354–12357.
- Krege, J.H., Hodgkin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998).** Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15677–15682.
- Krezel, W., Dupont, S., Krust, A., Chambon, P., and Chapman, P.F. (2001).** Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *98*, 12278-12282.
- Kubo, K., Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T., and Aou, S. (2001).** Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* *304*, 73–76.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., and Aou, S. (2003).** Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* *45*, 345–356.
- Kudwa, A.E., Bodo, C., Gustafsson, J.-A., and Rissman, E.F. (2005).** A previously uncharacterized role for estrogen receptor beta: defeminization of male brain and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 4608–4612.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997a).** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* *138*, 863–870.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996).** Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 5925–5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.A. (1998).** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* *139*, 4252–4263.
- Kumar, R., Johnson, B.H., and Thompson, E.B. (2004).** Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem.* *40*, 27–39.
- Kumar, R., and Thompson, E.B. (2003).** Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* *17*, 1–10.
- Kurebayashi, H., Betsui, H., and Ohno, Y. (2003).** Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol. Sci.* *73*, 17–25.
- Kurz, E.M., Brewer, R.G., and Sengelaub, D.R. (1991).** Hormonally mediated plasticity of motoneuron morphology in the adult rat spinal cord: a cholera toxin-HRP study. *J. Neurobiol.* *22*, 976–988.

L

- Lamprecht, S.A., Kohen, F., Ausher, J., Zor, U., and Lindner, H.R. (1976).** Hormonal stimulation of oestradiol-17 beta release from the rat ovary during early postnatal development. *J. Endocrinol.* *68*, 343–344.
- Lauber, M.E., and Lichtensteiger, W. (1994).** Pre- and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in the male rat brain studied by in situ hybridization. *Endocrinology* *135*, 1661–1668.
- Lee, A.W., and Pfaff, D.W. (2008).** Hormone effects on specific and global brain functions. *J Physiol Sci* *58*, 213–220.
- Lee, H.-J., and Chang, C. (2003).** Recent advances in androgen receptor action. *Cell. Mol. Life Sci.* *60*, 1613–1622.
- Lee, H.-J., Macbeth, A.H., Pagani, J.H., and Young, W.S., 3rd (2009).** Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog. Neurobiol.* *88*, 127–151.
- Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.-Y., Ahn, R.S., and Lee, K. (2003).** Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci.* *75*, 40–46.

- Lenz, K.M., Nugent, B.M., and McCarthy, M.M. (2012).** Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Front Neurosci* 6, 26.
- Lenz, K.M., and Sengelaub, D.R. (2009).** Maternal care effects on SNB motoneuron development: the mediating role of sensory afferent distribution and activity. *Dev Neurobiol* 69, 603–615.
- Levine, J.E. (2003).** Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). In *Encyclopedia of Hormones*, (New York: Academic Press), pp. 157–165.
- Lévy, F., and Keller, M. (2009).** Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behav. Brain Res.* 200, 336–345.
- Li, A.A., Baum, M.J., McIntosh, L.J., Day, M., Liu, F., and Gray, L.E., Jr (2008).** Building a scientific framework for studying hormonal effects on behavior and on the development of the sexually dimorphic nervous system. *Neurotoxicology* 29, 504–519.
- Li, C., Chen, P., and Smith, M.S. (1999).** Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140, 5382–5390.
- Li, J., Ma, M., and Wang, Z. (2010).** In vitro profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicol In Vitro* 24, 201–207.
- Liberles, S.D., and Buck, L.B. (2006).** A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* 442, 645–650.
- Lim, D.S., Kwack, S.J., Kim, K.B., Kim, H.S., and Lee, B.M. (2009).** Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *J Toxicol Environ Health A.* 72, 1285–1291.
- Lisk, R.D. (1969).** Progesterone: biphasic effects on the lordosis response in adult or neonatally gonadectomized rats. *Neuroendocrinology* 5, 149–160.
- López, H.H., and Ettenberg, A. (2002).** Sexually conditioned incentives: attenuation of motivational impact during dopamine receptor antagonism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 65–72.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sullivan, P.M., Willard, H.F., French, F.S., and Wilson, E.M. (1988).** Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240, 327–330.
- Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993).** Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11162–11166.
- Lund, T.D., Rovis, T., Chung, W.C., and Handa, R.J. (2005).** Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology.* 146, 797–807.
- Luttge, W.G., and Hall, N.R. (1973).** Androgen-induced agonistic behavior in castrate male Swiss-Webster mice: comparison of four naturally occurring androgens. *Behav Biol* 8, 725–732.
- Lyon, M.F., and Hawkes, S.G. (1970).** X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227, 1217–1219.

M

- Majdic, G., and Tobet, S. (2011).** Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 32, 137–145.
- Malmnäs, C.O. (1976).** The significance of dopamine, versus other catecholamines, for L-dopa induced facilitation of sexual behavior in the castrated male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4, 521–526.
- Martel, K.L., and Baum, M.J. (2009).** Adult testosterone treatment but not surgical disruption of vomeronasal function augments male-typical sexual behavior in female mice. *J. Neurosci.* 29, 7658–7666.
- Masuo, Y., Ishido, M., Morita, M., and Oka, S. (2004).** Effects of neonatal treatment with 6-hydroxydopamine and endocrine disruptors on motor activity and gene expression in rats. *Neural Plast.* 11, 59–76.
- Matsuda, K.I., Mori, H., and Kawata, M. (2012).** Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.* 13, 163–171
- Matsumoto, A. (1997).** Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons. *Brain Res. Bull.* 44, 539–547.

- Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., and Kato, S. (2003).** Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 95–99.
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., and Zacharewski, T. (2000).** Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 223–234.
- Matthews, J.B., Twomey, K., and Zacharewski, T.R. (2001).** In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 149–157.
- McCarthy, M.M., and Arnold, A.P. (2011).** Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat. Neurosci.* 14, 677–683.
- McCarthy, M.M., de Vries, G.J., and Forger, N.G. (2009).** 54 - Sexual Differentiation of the Brain: Mode, Mechanisms, and Meaning. In *Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)*, (San Diego: Academic Press), pp. 1707–1746.
- McClintock, M.K. (2002).** 15 - Pheromones, Odors, and Vasanas: The Neuroendocrinology of Social Chemosignals in Humans and Animals. In *Hormones, Brain and Behavior*, (San Diego: Academic Press), pp. 797–870.
- McGill, T.E. (1962).** Sexual behavior in three inbred strains of mice. *Behaviour*, 19, 341–350.
- McGregor, A., and Herbert, J. (1992).** Differential effects of excitotoxic basolateral and corticomedial lesions of the amygdala on the behavioural and endocrine responses to either sexual or aggression-promoting stimuli in the male rat. *Brain Res.* 574, 9–20.
- McKenna, K.E., and Nadelhaft, I. (1986).** The organization of the pudendal nerve in the male and female rat. *J. Comp. Neurol.* 248, 532–549.
- Melcangi, R.C., Poletti, A., Cavarretta, I., Celotti, F., Colciago, A., Magnaghi, V., Motta, M., Negri-Cesi, P., and Martini, L. (1998).** The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 295–299.
- Meisel, R. L., and Sachs, B. D. (1994).** In *Physiology of Reproduction*, eds Knobil E, Neill J D (Raven, New York), 2nd Ed. pp 3–105.
- Melis, M.R., Mauri, A., and Argiolas, A. (1994).** Apomorphine- and oxytocin-induced penile erection and yawning in intact and castrated male rats: effect of sexual steroids. *Neuroendocrinology* 59, 349–354.
- Melis, M.R., Succu, S., Mauri, A., and Argiolas, A. (1998).** Nitric oxide production is increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats during non-contact penile erections and copulation. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1968–1974.
- Merchenthaler, I. Lane, M. V. Numan, S. and Dellovade, T. L. (2004).** Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol.* 473, 270–91.
- Meredith, M., and O'Connell, R.J. (1979).** Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J. Physiol. (Lond.)* 286, 301–316.
- Merry, D.E., and Korsmeyer, S.J. (1997).** Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 245–267.
- Mesulam, M.M. (1978).** Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.* 26, 106–117.
- Micevych, P., and Dominguez, R. (2009).** Membrane estradiol signaling in the brain. *Front Neuroendocrinol* 30, 315–327.
- Micevych, P.E., and Mermelstein, P.G. (2008).** Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Mol. Neurobiol.* 38, 66–77.
- Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M. (2003).** Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144, 2055–2067.
- Mizukami, S., Nishizuka, M., and Arai, Y. (1983).** Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp. Neurol.* 79, 569–575.
- Moggs, J.G., and Orphanides, G. (2001).** Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular

- responses. *EMBO Rep.* 2, 775–781.
- Molenda, H.A., Griffin, A.L., Auger, A.P., McCarthy, M.M., and Tetel, M.J. (2002).** Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology* 143, 436–444.
- Mong, J.A., Kurzweil, R.L., Davis, A.M., Rocca, M.S., and McCarthy, M.M. (1996).** Evidence for sexual differentiation of glia in rat brain. *Horm Behav* 30, 553–562.
- Monks, D.A., O’Bryant, E.L., and Jordan, C.L. (2004).** Androgen receptor immunoreactivity in skeletal muscle: enrichment at the neuromuscular junction. *J. Comp. Neurol.* 473, 59–72.
- Moore, C.L. (1984).** Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Dev Psychobiol* 17, 347–356.
- Moore, C.L., and Power, K.L. (1992).** Variation in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. *Developmental Psychobiology* 25, 165–182.
- Morozov, A., Kellendonk, C., Simpson, E., and Tronche, F. (2003).** Using conditional mutagenesis to study the brain. *Biol. Psychiatry* 54, 1125–1133.
- Morris, J.A., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2004).** Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat. Neurosci.* 7, 1034–1039.
- Morris, J.A., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2008).** Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J. Comp. Neurol.* 506, 851–859.
- Morris, J.A., Jordan, C.L., Dugger, B.N., and Breedlove, S.M. (2005).** Partial demasculinization of several brain regions in adult male (XY) rats with a dysfunctional androgen receptor gene. *J. Comp. Neurol.* 487, 217–226.
- Morris, J.M. (1953).** The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 65, 1192–1211.
- Motelica-Heino, I., Castanier, M., Corbier, P., Edwards, D.A., and Roffi, J. (1988).** Testosterone levels in plasma and testes of neonatal mice. *J. Steroid Biochem.* 31, 283–286.
- Murphy, L., and O’Shaughnessy, P.J. (1991).** Testicular steroidogenesis in the testicular feminized (Tfm) mouse: loss of 17 alpha-hydroxylase activity. *J. Endocrinol.* 131, 443–449.

N

- Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Yoshimura, S., and Ono, H. (2002).** Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. *Reprod. Toxicol.* 16, 123–130.
- Nakamura, K., Itoh, K., Dai, H., Han, L., Wang, X., Kato, S., Sugimoto, T., and Fushiki, S. (2012).** Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior. *Brain Dev.* 34, 57–63.
- Nakamura, S., Tezuka, Y., Ushiyama, A., Kawashima, C., Kitagawara, Y., Takahashi, K., Ohta, S., and Mashino, T. (2011).** Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicol. Lett.* 203, 92–95.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2004).** Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145, 4565–4574.
- Nayak, N.C., and Mital, I. (1977).** The dynamics of alpha-fetoprotein and albumin synthesis in human and rat liver during normal ontogeny. *Am. J. Pathol.* 86, 359–374.
- Newton, B.W., and Phan, D.C. (2006).** Androgens regulate the sexually dimorphic production of co-contained galanin and cholecystokinin in lumbar laminae VII and X neurons. *Brain Res.* 1099, 88–96.
- Niel, L., Shah, A.H., Lewis, G.A., Mo, K., Chatterjee, D., Fernando, S.M., Hong, M.H., Chang, W.Y., Vollmayr, P., Rosen, J., et al. (2009).** Sexual differentiation of the spinal nucleus of the bulbocavernosus is not mediated solely by androgen receptors in muscle fibers. *Endocrinology* 150, 3207–3213.

- Niimura, Y., and Nei, M. (2007).** Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution. *PLoS ONE* 2, e708.
- Nishizuka, M., and Arai, Y. (1981).** Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Res.* 212, 31–38.
- Nissen, H.W. (1929).** The effects of gonadectomy, vasotomy, and injections of placental and orchic extracts on the sex behavior of the white rat. *Genetic Psychology Monographs* 5, 455–550.
- Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F., and Katagiri, M. (2001).** Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1064–1067.
- Nordeen, E.J., Nordeen, K.W., Sengelaub, D.R., and Arnold, A.P. (1985).** Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229, 671–673.
- Normandin, J.J., and Murphy, A.Z. (2008).** Nucleus paragigantocellularis afferents in male and female rats: organization, gonadal steroid receptor expression, and activation during sexual behavior. *J Comp Neurol.* 508, 771-794.
- Nowacek, A.S., and Sengelaub, D.R. (2006).** Estrogenic support of motoneuron dendritic growth via the neuromuscular periphery in a sexually dimorphic motor system. *J. Neurobiol.* 66, 962–976.
- NTP. NTP-CERHR Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Bisphenol A.** NIH Publication No. 08–5994. 2008.

O

- O’Shaughnessy, P.J., Morris, I.D., Huhtaniemi, I., Baker, P.J., and Abel, M.H. (2009).** Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: Data from mutant and genetically modified mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 306, 2–8.
- Oakley, A.E., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2009).** Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr. Rev.* 30, 713–743.
- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1999).** Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12887–12892.
- Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (2000).** Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14737–14741.
- Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1997).** Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1476–1481.
- Ogawa, S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1996).** Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology* 64, 467–470.
- Ogawa, S., Washburn, T.F., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1998).** Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology* 139, 5058–5069.
- Ohno, S., Geller, L.N., and Young Lai, E.V. (1974).** Tfm mutation and masculinization versus feminization of the mouse central nervous system. *Cell* 3, 235–242.
- Ojeda, S.R., Prevot, V., Heger, S., Lomniczi, A., Dziedzic, B., and Mungenast, A. (2003).** Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Annals of Medicine* 35, 244–255.
- Ojeda, S.R., and Skinner, M.K. (2006).** Chapter 38 - Puberty in the Rat. In Knobil and Neill’s *Physiology of Reproduction* (Third Edition), (St Louis: Academic Press), pp. 2061–2126.
- Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (1996).** Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 104, 298–305.
- Olsen, K.L. (1979).** Induction of male mating behavior in androgen-insensitive (tfm) and Normal (King-Holtzman) male rats: effect of testosterone propionate, estradiol benzoate, and dihydrotestosterone. *Horm Behav* 13, 66–84.
- Oppenheim, R.W. (1991).** Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev.*

Neurosci. *14*, 453–501.

- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B.S., and Sakuma, Y. (2002).** Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 3306–3311.
- Orikasa, C., Kondo, Y., Usui, S., and Sakuma, Y. (2010).** Similar numbers of neurons are generated in the male and female rat preoptic area in utero. *Neurosci. Res.* *68*, 9–14.
- Orikasa, C., and Sakuma, Y. (2010).** Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J. Comp. Neurol.* *518*, 3618–3629.
- Ottm, E.N., Beck, L.A., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2007).** Androgen-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B in the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Endocrinology* *148*, 3655–3665.
- Oyola, M.G., Portillo, W., Reyna, A., Foradori, C.D., Kudwa, A., Hinds, L., Handa, R.J., and Mani, S.K. (2012).** Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor- β (ER β) activation by a selective ER β agonist in female mice. *Endocrinology* *153*, 837–846.

P

- Pang, S.F., and Tang, F. (1984).** Sex differences in the serum concentrations of testosterone in mice and hamsters during their critical periods of neural sexual differentiation. *J. Endocrinol.* *100*, 7–11.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Sica, M., Gotti, S., Martini, M., Pinos, H., Carrillo, B., and Collado, P. (2006).** Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience* *138*, 987–995.
- Paredes, R.G. (2009).** Evaluating the neurobiology of sexual reward. *ILAR J.* *50*, 15–27.
- Paredes, R.G. (2010).** Hormones and sexual reward. *Vitam Horm.* *82*, 241–262.
- Paris, F., Balaguer, P., Térouanne, B., Servant, N., Lacoste, C., Cravedi, J.-P., Nicolas, J.-C., and Sultan, C. (2002).** Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* *193*, 43–49.
- Park, J.-J., Zup, S.L., Verhovshek, T., Sengelaub, D.R., and Forger, N.G. (2002).** Castration reduces motoneuron soma size but not dendritic length in the spinal nucleus of the bulbocavernosus of wild-type and BCL-2 overexpressing mice. *J. Neurobiol.* *53*, 403–412.
- Park, J.J., Howell, M., Winseck, A., and Forger, N.G. (1999).** Effects of testosterone on the development of a sexually dimorphic neuromuscular system in ciliary neurotrophic factor receptor knockout mice. *J. Neurobiol.* *41*, 317–325.
- Patchev, A.V., Götz, F., and Rohde, W. (2004).** Differential role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *FASEB J.* *18*, 1568–1570.
- Patisaul, H.B., and Bateman, H.L. (2008).** Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ERbeta agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Horm Behav* *53*, 580–588.
- Patisaul, H.B., Todd, K.L., Mickens, J.A., and Adewale, H.B. (2009).** Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology* *30*, 350–357.
- Pérez-Laso, C., Segovia, S., Collado, P., Rodríguez-Zafra, M., Del Abril, A., and Guillamón, A. (1997).** Estradiol masculinizes the number of accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Brain Res. Bull.* *42*, 227–230.
- Pfaff, D.W. (1973).** Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* *182*, 1148–1149.
- Phillips-Farfán, B.V., and Fernández-Guasti, A. (2009).** Endocrine, neural and pharmacological aspects of sexual satiety in male rats. *Neurosci Biobehav Rev* *33*, 442–455.
- Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A., and Young, W.C. (1959).** Organizing Action of Prenatally Administered Testosterone Propionate on the Tissues Mediating Mating Behavior in the Female Guinea Pig. *Endocrinology* *65*, 369–382.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., and Waechter,**

- J.M., Jr (2000).** The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* 54, 3–18.
- Power, R.F., Mani, S.K., Codina, J., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1991).** Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254, 1636–1639.
- Prasanth, G.K., Divya, L.M., and Sadasivan, C. (2010).** Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *J Appl Toxicol* 30, 769–774.
- Pritchett, J.J., Kuester, R.K., and Sipes, I.G. (2002).** Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab. Dispos.* 30, 1180–1185.
- Puts, D.A., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2006).** Defending the brain from estrogen. *Nat. Neurosci.* 9, 155–156.

Q

- Quadagno, D.M., Wolfe, H.G., Kan Wha Ho, G., and Goldman, B.D. (1975).** Influence of neonatal castration or neonatal anti-gonadotropin treatment on fertility, phallus development, and male sexual behavior in the mouse. *Fertil. Steril.* 26, 939–944.

R

- Radomska-Pandya, A., Little, J.M., Pandya, J.T., Tephly, T.R., King, C.D., Barone, G.W., and Raufman, J.P. (1998).** UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 1394, 199–208.
- Raisman, G., and Field, P.M. (1973).** Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res.* 54, 1–29.
- Ramos, J.G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Costabel, L., Muñoz-De-Toro, M., and Luque, E.H. (2003).** Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144, 3206–3215.
- Rampin, O., Jérôme, N., and Suaudeau, C. (2003).** Proerectile effects of apomorphine in mice. *Life Sci.* 72, 2329–2336.
- Rand, M.N., and Breedlove, S.M. (1995).** Androgen alters the dendritic arbors of SNB motoneurons by acting upon their target muscles. *J. Neurosci.* 15, 4408–4416.
- Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., and Mhaouty-Kodja, S. (2009).** Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J. Neurosci.* 29, 4461–4470.
- Raskin, K., and Mhaouty-Kodja, S. (2011).** Testostérone et contrôle central de l'érection. *Andrologie* 21, 175–185.
- Raynaud, J.P. (1973).** Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids* 21, 249–258.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005).** A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625–1630.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., and vom Saal, F.S. (2007).** In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol.* 24, 199–224.
- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Fugger, H.N., and Foster, T.C. (1999).** Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor alpha. *Brain Res.* 835, 80–90.
- Rissman, E.F., Wersinger, S.R., Taylor, J.A., and Lubahn, D.B. (1997).** Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Behav* 31, 232–243.
- Roa, J., Vigo, E., García-Galiano, D., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Pineda, R., Diéguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2008).** Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E1088–1096.
- Robertson, K.M., Simpson, E.R., Lacham-Kaplan, O., and Jones, M.E. (2001).** Characterization

- of the fertility of male aromatase knockout mice. *J. Androl.* *22*, 825–830.
- Romano-Torres, M., Phillips-Farfán, B.V., Chavira, R., Rodríguez-Manzo, G., and Fernández-Guasti, A. (2007).** Relationship between sexual satiety and brain androgen receptors. *Neuroendocrinology* *85*, 16–26.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., and Milgrom, E. (2003).** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10972–10976.
- Rubin, B.S., Lenkowski, J.R., Schaeberle, C.M., Vandenberg, L.N., Ronsheim, P.M., and Soto, A.M. (2006).** Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* *147*, 3681–3691.
- Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C., and Soto, A.M. (2001).** Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* *109*, 675–680.
- Rubinow, D.R., and Schmidt, P.J. (1996).** Androgens, brain, and behavior. *Am J Psychiatry* *153*, 974–984.
- Ryan, B.C., and Vandenberg, J.G. (2006).** Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav* *50*, 85–93.
- Ryan, K.J., Naftolin, F., Reddy, V., Flores, F., and Petro, Z. (1972).** Estrogen formation in the brain. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *114*, 454–460.

S

- vom Saal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S., and Welshons, W.V. (1997).** Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 2056–2061.
- vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., and Welshons, W.V. (1998).** A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* *14*, 239–260.
- Sachs, B.D. (1982).** Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation, and induction of pregnancy in the rat. *J. Reprod. Fertil.* *66*, 433–443.
- Safe, S., and Kim, K. (2004).** Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *77*, 1–36.
- Sakamoto, H., Matsuda, K.-I., Zuloaga, D.G., Hongu, H., Wada, E., Wada, K., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., and Kawata, M. (2008).** Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. *Nat. Neurosci.* *11*, 634–636.
- Sakamoto, H., Matsuda, K.-I., Zuloaga, D.G., Nishiura, N., Takanami, K., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., and Kawata, M. (2009a).** Stress affects a gastrin-releasing peptide system in the spinal cord that mediates sexual function: implications for psychogenic erectile dysfunction. *PLoS ONE* *4*, e4276.
- Sakamoto, H., Takanami, K., Zuloaga, D.G., Matsuda, K., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., and Kawata, M. (2009b).** Androgen regulates the sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord that mediates male sexual function. *Endocrinology* *150*, 3672–3679.
- Sakamoto, H., Yokota, H., Kibe, R., Sayama, Y., and Yuasa, A. (2002).** Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* *1573*, 171–176.
- Sakuma, Y. (2009).** Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 410–414.
- Salgueiro, E., et Reyss, A. (2002).** *Biologie de la reproduction sexuée* (Belin).
- Sarkey, S., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., Garcia-Ovejero, D., and DonCarlos, L.L. (2008).** Classical androgen receptors in non-classical sites in the brain. *Horm Behav* *53*, 753–764.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T.,**

- Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., et al. (2004).** Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 1673–1678.
- Satoh, K., Ohyama, K., Aoki, N., Iida, M., and Nagai, F. (2004).** Study on anti-androgenic effects of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE), bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen. *Food Chem. Toxicol.* *42*, 983–993.
- Savu, L., Benassayag, C., Vallette, G., Christeff, N., and Nunez, E. (1981).** Mouse alpha 1-fetoprotein and albumin. A comparison of their binding properties with estrogen and fatty acid ligands. *J. Biol. Chem.* *256*, 9414–9418.
- Scaletta, L.L., and Hull, E.M. (1990).** Systemic or intracranial apomorphine increases copulation in long-term castrated male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *37*, 471–475.
- Schimmer, B.P., and White, P.C. (2010).** Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1322–1337.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., and Chahoud, I. (2002).** Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* *110*, A703–707.
- Schröder, H.D. (1980).** Organization of the motoneurons innervating the pelvic muscles of the male rat. *J. Comp. Neurol.* *192*, 567–587.
- Schulz, K.M., Molenda-Figueira, H.A., and Sisk, C.L. (2009).** Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* *55*, 597–604.
- Schulz, K.M., Richardson, H.N., Zehr, J.L., Osetek, A.J., Menard, T.A., and Sisk, C.L. (2004).** Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Horm Behav* *45*, 242–249.
- Scordalakes, E.M., Imwalle, D.B., and Rissman, E.F. (2002).** Oestrogen's masculine side: mediation of mating in male mice. *Reproduction* *124*, 331–338.
- Segovia, S., and Guillamón, A. (1982).** Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res.* *281*, 209–212.
- Segovia, S., and Guillamón, A. (1993).** Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *18*, 51–74.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr, Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., et al. (2003).** The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.* *349*, 1614–1627.
- Sengelaub, D.R., and Arnold, A.P. (1986).** Development and loss of early projections in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *J. Neurosci.* *6*, 1613–1620.
- Sengelaub, D.R., and Forger, N.G. (2008).** The spinal nucleus of the bulbocavernosus: firsts in androgen-dependent neural sex differences. *Horm Behav* *53*, 596–612.
- Sengelaub, D.R., Nordeen, E.J., Nordeen, K.W., and Arnold, A.P. (1989).** Hormonal control of neuron number in sexually dimorphic spinal nuclei of the rat: III. Differential effects of the androgen dihydrotestosterone. *J. Comp. Neurol.* *280*, 637–644.
- Shah, N.M., Pisapia, D.J., Maniatis, S., Mendelsohn, M.M., Nemes, A., and Axel, R. (2004).** Visualizing sexual dimorphism in the brain. *Neuron* *43*, 313–319.
- Shapiro, B.H., Goldman, A.S., Steinbeck, H.F., and Neumann, F. (1976).** Is feminine differentiation of the brain hormonally determined? *Experientia* *32*, 650–651.
- Shimazaki, J., Kurihara, H., Ito, Y., and Shida, K. (1965).** Metabolism of testosterone in prostate. 2. Separation of prostatic 17-beta-ol-dehydrogenase and 5-alpha-reductase. *Gunma J Med Sci* *14*, 326–333.
- Sickel, M.J., and McCarthy, M.M. (2000).** Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation. *J. Neuroendocrinol.* *12*, 397–402.
- Simerly, R.B. (2002).** Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* *25*, 507–536.
- Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., and Swanson, L.W. (1990).** Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* *294*, 76–95.
- Simerly, R.B., and Swanson, L.W. (1986).** The organization of neural inputs to the medial preoptic

- nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* *246*, 312–342.
- Simerly, R.B., Zee, M.C., Pendleton, J.W., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1997).** Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 14077–14082.
- Simon, N.G. (2002).** 5 - Hormonal Processes in the Development and Expression of Aggressive Behavior. In *Hormones, Brain and Behavior*, (San Diego: Academic Press), p. 339–392.
- Simon, N.G., and Gandelman, R. (1978).** The estrogenic arousal of aggressive behavior in female mice. *Hormones and Behavior* *10*, 118–127.
- Simoneau, C., Valzacchi, S., Morkunas, V., and Van den Eede, L. (2011).** Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* *28*, 1763–1768.
- Simpson, E.R. (2000).** Role of aromatase in sex steroid action. *J. Mol. Endocrinol.* *25*, 149–156.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., and Michael, M.D. (1994).** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* *15*, 342–355.
- Sluysers, M., Rijkers, A.W., de Goeij, C.C., Parker, M., and Hilkens, J. (1988).** Assignment of estradiol receptor gene to mouse chromosome 10. *J. Steroid Biochem.* *31*, 757–761.
- Smith, J.T., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2006).** Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* *131*, 623–630.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2005a).** Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* *146*, 3686–3692.
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2005b).** Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* *146*, 2976–2984.
- Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A., and Clarke, I.J. (2009).** Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* *150*, 5530–5538.
- Smith, M.R., Hamson, D.K., Poort, J.E., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2012).** Ontogeny of androgen receptor expression in spinal nucleus of the bulbocavernosus motoneurons and their target muscles in male mice. *Neuroscience Letters.* *513*, 119–123
- Sohoni, P., and Sumpter, J.P. (1998).** Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* *158*, 327–339.
- Staudt, J., and Dörner, G. (1976).** Structural changes in the medial and central amygdala of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Endokrinologie* *67*, 296–300.
- Steers, W.D. (2000).** Neural pathways and central sites involved in penile erection: neuroanatomy and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* *24*, 507–516.
- Stoeklin, E., Wissler, M., Schaetzle, D., Pfitzner, E., and Groner, B. (1999).** Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *69*, 195–204.
- Sun, H., Xu, L.-C., Chen, J.-F., Song, L., and Wang, X.-R. (2006).** Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food Chem. Toxicol.* *44*, 1916–1921.
- Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., and Nakashima, K. (2004).** Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* *18*, 501–507.
- Swaney, W.T., Curley, J.P., Champagne, F.A., and Keverne, E.B. (2007).** Genomic imprinting mediates sexual experience-dependent olfactory learning in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *104*, 6084–6089.
- Swaney, W.T., Dubose, B.N., Curley, J.P., and Champagne, F.A. (2012).** Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Horm Behav* *61*, 472–478.

T

- Takahashi, O., and Oishi, S. (2001).** Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch. Toxicol.* *75*, 42–51.

- Takahashi, O., and Oishi, S. (2003).** Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* *41*, 1035–1044.
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y. (2006).** Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol. Lett.* *167*, 95–105.
- Takeda, Y., Liu, X., Sumiyoshi, M., Matsushima, A., Shimohigashi, M., and Shimohigashi, Y. (2009).** Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERRgamma isoform. *J. Biochem.* *146*, 113–122.
- Tan, S.-H., Dagvadorj, A., Shen, F., Gu, L., Liao, Z., Abdulghani, J., Zhang, Y., Gelmann, E.P., Zellweger, T., Culig, Z., et al. (2008).** Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* *68*, 236–248.
- Tang, P., Park, D.J., Marshall Graves, J.A., and Harley, V.R. (2004).** ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol. Metab.* *15*, 339–344.
- Taylor, J.A., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Vandervoort, C.A. (2010).** Similarity of Bisphenol A Pharmacokinetics in Rhesus Monkeys and Mice: Relevance for Human Exposure. *Environ Health Perspect.*
- Taylor, J.A., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Toutain, P.-L., Laffont, C.M., and VandeVoort, C.A. (2011).** Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ. Health Perspect.* *119*, 422–430.
- Taziaux, M., Keller, M., Bakker, J., and Balthazart, J. (2007).** Sexual behavior activity tracks rapid changes in brain estrogen concentrations. *J. Neurosci.* *27*, 6563–6572.
- Temple, J.L., Scordalakes, E.M., Bodo, C., Gustafsson, J.A., and Rissman, E.F. (2003).** Lack of functional estrogen receptor beta gene disrupts pubertal male sexual behavior. *Horm Behav* *44*, 427–434.
- Tetel, M.J. (2009).** Modulation of steroid action in the central and peripheral nervous systems by nuclear receptor coactivators. *Psychoneuroendocrinology* *34 Suppl 1*, S9–19.
- Thomas, P., and Dong, J. (2006).** Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *102*, 175–179.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005).** Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* *146*, 624–632.
- Tilbrook, A.J., and Clarke, I.J. (2001).** Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol. Reprod.* *64*, 735–742.
- Tilghman, S.M., and Belayew, A. (1982).** Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 5254–5257.
- Toda, K., Okada, T., Takeda, K., Akira, S., Saibara, T., Shiraishi, M., Onishi, S., and Shizuta, Y. (2001).** Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17beta-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J. Endocrinol.* *168*, 455–463.
- Toda, N., Ayajiki, K., and Okamura, T. (2005).** Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol. Ther.* *106*, 233–266.
- Tohei, A., Suda, S., Taya, K., Hashimoto, T., and Kogo, H. (2001).** Bisphenol A inhibits testicular functions and increases luteinizing hormone secretion in adult male rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* *226*, 216–221.
- Torres-Aleman, I., Rejas, M.T., Pons, S., and Garcia-Segura, L.M. (1992).** Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes in vitro: a neuronal-mediated effect. *Glia* *6*, 180–187.
- Touhara, K., and Vosshall, L.B. (2009).** Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 307–332.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., and Giguère, V. (1997).** Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* *11*, 353–365.
- Trinh, K., and Storm, D.R. (2003).** Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling

- through main olfactory epithelium. *Nat. Neurosci.* 6, 519–525.
- Tronche, F., Casanova, E., Turiault, M., Sahly, I., and Kellendonk, C. (2002).** When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett.* 529, 116–121.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schütz, G. (1999).** Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99–103.
- Truitt, W. A., and Coolen, L. M. (2002).** Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 297, 1566–1569.
- Truitt, W. A., Shipley, M. T., Veening, J.G., and Coolen, L.M. (2003).** Activation of a subset of lumbar spinothalamic neurons after copulatory behavior in male but not female rats. *J. Neurosci* 23, 325–331.
- Tsukahara, S. (2009).** Sex differences and the roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. *J. Neuroendocrinol.* 21, 370–376.
- Tsukahara, S., Tsuda, M.C., Kurihara, R., Kato, Y., Kuroda, Y., Nakata, M., Xiao, K., Nagata, K., Toda, K., and Ogawa, S. (2011).** Effects of aromatase or estrogen receptor gene deletion on masculinization of the principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis of mice. *Neuroendocrinology* 94, 137–147.

U

- Upmeier, A., Degen, G.H., Diel, P., Michna, H., and Bolt, H.M. (2000).** Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch. Toxicol.* 74, 431–436.

V

- Vale, J.R., Ray, D., and Vale, C.A. (1974).** Neonatal androgen treatment and sexual behavior in males of three inbred strains of mice. *Dev Psychobiol* 7, 483–488.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., and Welshons, W.V. (2007).** Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177.
- Vanderhorst, V.G., Gustafsson, J.A., and Ulfhake, B. (2005).** Estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J Comp Neurol.* 488, 152–179.
- Vanderhorst, V.G., Terasawa, E., and Ralston, H.J. 3rd. (2009).** Estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of the female rhesus monkey: species-specific characteristics. *Neuroscience.* 158, 798–810.
- Vasudevan, N., and Pfaff, D.W. (2008).** Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front Neuroendocrinol* 29, 238–257.
- Verhovshek, T., Buckley, K.E., Sargent, M.A., and Sengelaub, D.R. (2010a).** Testosterone metabolites differentially maintain adult morphology in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Dev Neurobiol* 70, 206–221.
- Verhovshek, T., Cai, Y., Osborne, M.C., and Sengelaub, D.R. (2010b).** Androgen regulates brain-derived neurotrophic factor in spinal motoneurons and their target musculature. *Endocrinology* 151, 253–261.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G., and Dekant, W. (2002).** Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1281–1287.
- De Vries, G.J., Rissman, E.F., Simerly, R.B., Yang, L.-Y., Scordalakes, E.M., Auger, C.J., Swain, A., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P.S., and Arnold, A.P. (2002).** A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J. Neurosci.* 22, 9005–9014.
- De Vries, G.J., and Simerly, R.B. (2002).** 64 - Anatomy, Development, and Function of Sexually Dimorphic Neural Circuits in the Mammalian Brain. In *Hormones, Brain and Behavior*, (San

Diego: Academic Press), p. 137–191

W

- Wagner, C.K., and Clemens, L.G. (1989).** Anatomical organization of the sexually dimorphic perineal neuromuscular system in the house mouse. *Brain Res.* 499, 93–100.
- Wagner, C.K., and Morrell, J.I. (1996).** Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: a cellular-level analysis using in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* 370, 71–84.
- Wallis, C.J., and Luttge, W.G. (1975).** Maintenance of male sexual behavior by combined treatment with oestrogen and dihydrotestosterone in CD-1 mice. *J. Endocrinol.* 66, 257–262.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., and Waterfield, M. (1985).** Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7889–7893.
- Ward, O.B., Wexler, A.M., Carlucci, J.R., Eckert, M.A., and Ward, I.L. (1996).** Critical periods of sensitivity of sexually dimorphic spinal nuclei to prenatal testosterone exposure in female rats. *Horm Behav* 30, 407–415.
- Wee, B.E., and Clemens, L.G. (1987).** Characteristics of the spinal nucleus of the bulbocavernosus are influenced by genotype in the house mouse. *Brain Res.* 424, 305–310.
- Weigel, N.L., and Moore, N.L. (2007).** Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol. Endocrinol.* 21, 2311–2319.
- Welshons, V.W., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., and vom Saal, F.S. (2003).** Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental health perspectives* 111, 994-1006.
- Wersinger, S.R., Haisenleder, D.J., Lubahn, D.B., and Rissman, E.F. (1999).** Steroid feedback on gonadotropin release and pituitary gonadotropin subunit mRNA in mice lacking a functional estrogen receptor alpha. *Endocrine* 11, 137–143.
- Wersinger, S.R., and Rissman, E.F. (2000).** Dopamine activates masculine sexual behavior independent of the estrogen receptor alpha. *J. Neurosci.* 20, 4248–4254.
- Wersinger, S.R., Sannen, K., Villalba, C., Lubahn, D.B., Rissman, E.F., and De Vries, G.J. (1997).** Masculine sexual behavior is disrupted in male and female mice lacking a functional estrogen receptor alpha gene. *Horm Behav* 32, 176–183.
- Wolstenholme, J.T., Edwards, M., Shetty, S.R.J., Gatewood, J.D., Taylor, J.A., Rissman, E.F., and Connelly, J.J. (2012).** Gestational Exposure to Bisphenol A Produces Transgenerational Changes in Behaviors and Gene Expression. *Endocrinology.* 153, 3828-3838
- Woolley, C.S. (2007).** Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 657–680.
- Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N., and Watson, C.S. (2005).** Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 431–439.
- Wright, C.L., Burks, S.R., and McCarthy, M.M. (2008).** Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. *Dev Neurobiol* 68, 1406–1419.

X

- Xi, W., Lee, C.K.F., Yeung, W.S.B., Giesy, J.P., Wong, M.H., Zhang, X., Hecker, M., and Wong, C.K.C. (2011).** Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod. Toxicol.* 31, 409–417.
- Xu, L.-C., Sun, H., Chen, J.-F., Bian, Q., Qian, J., Song, L., and Wang, X.-R. (2005).** Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216, 197–203.
- Xu, X., Coats, J.K., Yang, C.F., Wang, A., Ahmed, O.M., Alvarado, M., Izumi, T., and Shah, N.M. (2012).** Modular genetic control of sexually dimorphic behaviors. *Cell* 148, 596–607.
- Xu, X., Zhang, J., Wang, Y., Ye, Y., and Luo, Q. (2010).** Perinatal exposure to bisphenol-A impairs

learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm Behav* 58, 326–333.

Y

- Yang, J.H., Menshenina, J., Cunha, G.R., Place, N., and Baskin, L.S. (2010).** Morphology of mouse external genitalia: implications for a role of estrogen in sexual dimorphism of the mouse genital tubercle. *J. Urol.* 184, 1604–1609.
- Yang, L.Y., Verhovshek, T., and Sengelaub, D.R. (2004).** Brain-derived neurotrophic factor and androgen interact in the maintenance of dendritic morphology in a sexually dimorphic rat spinal nucleus. *Endocrinology* 145, 161–168.
- Yeh, S., Tsai, M.-Y., Xu, Q., Mu, X.-M., Lardy, H., Huang, K.-E., Lin, H., Yeh, S.-D., Altuwaijri, S., Zhou, X., et al. (2002).** Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13498–13503.
- Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S., and Yuasa, A. (1999).** Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* 340 (Pt 2), 405–409.
- Young, J.M., and McNeilly, A.S. (2010).** Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140, 489–504.

Z

- Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., and Perdu, E. (2011).** Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82, 424–430.
- Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., and Cravedi, J.-P. (2003).** Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 309–319.
- Zhao, L., Kim, K.W., Ikeda, Y., Anderson, K.K., Beck, L., Chase, S., Tobet, S.A., and Parker, K.L. (2008).** Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Mol. Endocrinol.* 22, 1403–1415.
- Zhou, L., Blaustein, J.D., and De Vries, G.J. (1994).** Distribution of androgen receptor immunoreactivity in vasopressin- and oxytocin-immunoreactive neurons in the male rat brain. *Endocrinology* 134, 2622–2627.
- Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2007).** Mammalian pheromone sensing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 483–489.
- Zuloaga, D.G., Morris, J.A., Monks, D.A., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2007).** Androgen-sensitivity of somata and dendrites of spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) motoneurons in male C57BL6J mice. *Horm Behav* 51, 207–212.
- Zuloaga, D.G., Puts, D.A., Jordan, C.L., and Breedlove, S.M. (2008).** The role of androgen receptors in the masculinization of brain and behavior: what we've learned from the testicular feminization mutation. *Horm Behav* 53, 613–626.
- Zup, S.L., Carrier, H., Waters, E.M., Tabor, A., Bengston, L., Rosen, G.J., Simerly, R.B., and Forger, N.G. (2003).** Overexpression of bcl-2 reduces sex differences in neuron number in the brain and spinal cord. *J. Neurosci.* 23, 2357–2362.

