HAL
open science

Evolution du contrôle neuroendocrinien de la reproduction : origine et rôle du système kisspeptine ?

Jérémy Pasquier

To cite this version:

Jérémy Pasquier. Evolution du contrôle neuroendocrinien de la reproduction : origine et rôle du système kisspeptine ?. Biologie animale. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66533 . tel-00834247

HAL Id: tel-00834247

https://theses.hal.science/tel-00834247v1

Submitted on 14 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 -PARIS IV

ÉCOLE DOCTORALE DIVERSITÉ DU VIVANT-ED392

Spécialité : Biologie

Présentée par

Jérémy PASQUIER

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Evolution du contrôle neuroendocrinien de la reproduction : origine et rôle du système kisspeptine ?

Direction de thèse : **Dr. Sylvie DUFOUR**
Co-encadrement : **Dr. Karine ROUSSEAU** et **Dr. Anne-Gaëlle LAFONT**

Soutenue le : 14 décembre 2012

Devant le jury composé de :

Mme. Florence Le GAC	DR INRA, Rennes	Rapporteur
M. Bruno QUERAT	CR CNRS, Paris	Rapporteur
M. Yonathan ZOHAR	PR UMBC, Baltimore, USA	Examinateur
M. Pascal FAVREL	PR UCBN, Caen	Examinateur
M. Gilles BŒUF	PR UPMC, Paris	Examinateur
Mme. Karine ROUSSEAU	MC MNHN, Paris	Examinateur
Mme. Sylvie DUFOUR	DR CNRS, Paris	Examinateur

Résumé : Cette thèse a eu pour objectif l'étude, d'un point de vue à la fois évolutif et physiologique, du système kisspeptine, composé des peptides Kiss et de leurs récepteurs Kissr.

Nos analyses de génomes provenant d'espèces occupant des positions clés dans la classification des vertébrés a permis des avancées sur la compréhension de l'évolution du système kisspeptine. Nous avons montré, pour la première fois, l'existence de trois *Kissr* chez un téléostéen basal, l'anguille européenne, et de quatre *Kissr* chez un sarcoptérygien basal, le cœlacanthe, et un actinoptérygien non-téléostéen, le lépisostée. Ceci a porté à quatre le nombre de *Kissr* présents chez une même espèce de vertébrés. Le maximum était jusqu'alors de trois chez un amphibien, le xénope. Ces analyses ont aussi révélé la présence de deux *Kiss,* chez l'anguille et le lépisostée, et de trois *Kiss* chez le cœlacanthe. Ces résultats n'ont pas modifié le nombre maximal de *Kiss,* chez les vertébrés, qui était alors de trois chez le xénope. Nous avons aussi identifié de nouvelles séquences chez d'autres vertébrés. A partir de l'ensemble de ces séquences, nous avons proposé une nouvelle classification des familles de *Kiss* et de *Kissr,* basée sur des critères phylogénétiques et synténiques. De plus, les analyses synténiques ont montré que les quatre *Kissr* de vertébrés se répartissent sur un tétra-paralogon. Il en est de même pour les trois *Kiss*. Ces tétra-parlogons suggèrent que la diversité des *Kiss* et des *Kissr* résulte des deux événements de duplication du génome (1R et 2R) survenus à la base des vertébrés. Des pertes de gènes ont ensuite diminué le nombre de *Kiss* et de *Kissr* dans les lignées de sarcoptérygiens et d'actinoptérygiens. Ces pertes ont, en particulier, annulé l'impact de la 3R, propre aux téléostéens, sur le nombre de ces gènes. Les résultats de cette thèse ont révélé des histoires évolutives complexes ayant conduit à la perte ou à la conservation de *Kiss* et de *Kissr* différents selon les lignées de vertébrés.

Afin d'aborder les mécanismes évolutifs qui ont pu mener à la conservation de plusieurs *Kiss* et *Kissr* chez un même organisme, nous nous sommes intéressés à un modèle d'intérêt à la fois phylogénétique et physiologique, l'anguille européenne, dont le système kisspeptine est composé de deux *Kiss* et trois *Kissr*. Les analyses par PCR quantitative ont révélé des différences, entre les paralogues, dans leurs distributions tissulaires et leurs régulations pendant la maturation sexuelle. Ces variations d'expression suggèrent un rôle stimulateur classique de certains composants du système kisspeptine sur GnRH, et pouvant relayer le rétrocontrôle positif des stéroïdes sexuels lors de la maturation. L'étude de ce modèle a aussi apporté un éclairage nouveau sur la fonctionnalité du système kisspeptine chez les vertébrés, avec la découverte d'un effet inhibiteur sur l'expression de la *LHβ* par les cellules hypophysaires *in vitro*. Cette inhibition au niveau hypophysaire pourrait être levée lors de la maturation.

En conclusion cette étude a contribué à montrer la complexité du système kisspeptine chez les vertébrés, tout en clarifiant la classification et l'histoire évolutive de ses composants.

Mots clés : kisspeptine, évolution, phylogénie, synténie, reproduction, vertébrés, *Anguilla*, *Latimeria*, *Lepisosteus*

Laboratoire d'accueil

UMR BOREA (Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques),
7 rue Cuvier CP32,
75231 Paris Cedex 05.

Evolution of the neuroendocrine control of the reproduction: origin and role of the kisspeptin system?

Abstract: The aim of this thesis is the study, from both evolutionary and physiological approaches, of the kisspeptin system, composed of Kiss peptides and their receptors, Kissr.

Our analysis of genomes from vertebrate species of key phylogenetical positions, let to significant advances in the evolution of kisspeptin system. We showed for the first time the presence of three *Kissr* in a basal teleost, the European eel, and of four *Kissr* in a basal sarcopterygien the coelacanth, and in a non-teleost actinopterygian, the spotted gar. This led to up to four the number of *Kissr* in a given vertebrate species. Up to now, the maximum was three in an amphibian, the xenopus. These analyses also revealed the presence of two *Kiss* in the eel and spotted gar, and of three *Kiss* in the coelacanth. These results did not modify the maximal number of *Kiss* in vertebrates, which were already three in the xenopus. We also identified new sequences in other vertebrates. From all these sequences, we could propose a new classification of *Kiss* and *Kissr* families, based on phylogenetic and syntenic criteria. In addition syntenic analyses revealed that the four vertebrate *Kissr* are distributed on a tetra paralogon. The same situation was shown for the three *Kiss*. These tetra-paralogons suggest that the diversity of *Kiss* and *Kissr* results from the two whole genome duplication events (1R & 2R) that occurred in the vertebrate ancestors. Gene losses led, then, to the reduction of the numbers of Kiss and Kissr in the sarcopterygian and actinopterygians lineages. In particular, these losses suppressed the impact of the teleost-specific 3R on the current gene number. The results of this thesis revealed complex evolutionary histories that have resulted in the loss or the conservation of different *Kiss* and *Kissr*, according to vertebrate lineages.

In order to address the evolutionary mechanisms that may have driven the conservation of multiple *Kiss* and *Kissr* in a given organism, we investigated the European eel. This biological model is of high phylogenetic and physiological interest, and presents two *Kiss* and three *Kissr*. Quantitative PCR analyses revealed differences among paralogs in their tissue distributions and in their regulations during sexual maturation. These expression variations suggested a classical stimulatory role on GnRH of some kisspeptin system components, which could mediate the sex steroid feedback during sexual maturation. The study of this model also highlighted a new function of kisspeptin system in vertebrates, with the discovery of an inhibition of *LHβ* expression by pituitary cells *in vitro*. This inhibition at the pituitary level may be removed during sexual maturation.

In conclusion, this study contributed to illustrate the complexity of the kisspeptin system in vertebrates, and to clarify the classifications and the evolutionary histories of its components.

Key words: kisspeptin, phylogeny, synteny, evolution, reproduction, vertebrate, *Anguilla*, *Latimeria*, *Lepisosteus*.

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu les membres du jury, le Docteur Florence Le Gac et le Docteur Bruno Quérat pour avoir bien voulu sacrifier de leur temps et de leur énergie à la correction de ce manuscrit, ainsi que le Professeur Gilles Bœuf, le Professeur Pascal Favrel et le Professeur Yonathan Zohar qui m'ont tous fait l'honneur d'accepter de participer à l'évaluation de mon travail le jour de ma soutenance de thèse.

J'aimerais exprimer ma plus profonde gratitude à ma directrice de thèse, le docteur Sylvie Dufour, qui a, en toutes circonstances, su me consacrer une part de son précieux temps et me prodiguer ses judicieux conseils. Milles mercis à ma co-directrice de thèse, le docteur Karine Rousseau, pour son extrême gentillesse, ses encouragements et son aide indispensable dans les sombres moments rédactionnels. Je ne saurais clore ce paragraphe sans mentionner, la totalité de mes encadrantes, c'est pourquoi je tiens à remercier, du fond du cœur, mon encadrante « non-officielle », le docteur Anne-Gaëlle Lafont, qui a toujours La bonne idée au bon moment et qui ne recule devant aucun test.

Toutes les trois ont su faire preuve d'une patience sans faille (ou presque). Les mots me manquent pour exprimer à quel point elles ont compté durant ces années de doctorat. J'espère seulement être capable, un jour, de leur rendre un peu de cette lumière qui m'a guidé et dont elles ont été la source.

Un grand merci à tous les collègues du 7 rue Cuvier sans qui la thèse aurait sûrement été un peu pâlotte. Merci à Sylvie Balloche pour la gentillesse avec laquelle elle m'a remplacé à la paillasse lorsque j'étais malade et pour ses expériences culinaires qu'elle nous fait partager en toute simplicité. Merci à Françoise Gonnet pour les approvisionnements en caféine (et dieu sait s'ils sont indispensables dans ce monde de fou !). Merci au docteur Cécile Jolly pour sa bonne humeur et sa gentillesse en toutes circonstances, ainsi que pour ses critiques objectives des Goonies et de la trilogie Indiana Jones (qui, à mon sens, sont proche du chef d'œuvre, mais enfin bon on ne va pas y revenir maintenant). Merci à Charlotte, Christian et Florian pour leur aide et leur efficacité, j'espère que les prochains seront comme eux.

L'équipe ne serait pas complète sans les collègues Céphalos du 55 rue Buffon. Merci à eux de m'avoir ouvert en grand la porte de leur labo. Merci également d'avoir été mon premier public même lorsque les présentations s'enchainent et se ressemblent toutes. Une mention spéciale pour Madame Andouche et Monsieur Baratte toujours partant pour le rapprochement de nos deux moitiés d'équipe autour d'un verre, un bon repas ou simplement une bonne blague.

Au cours de cette thèse il m'a été donné la chance de travailler avec un grand nombre de collaborateurs aussi intéressants d'un point de vue scientifique qu'humain.

Merci au professeur Ching-Fong Chang et au docteur Chan-Ru Jeng, ainsi qu'à leurs équipes respectives, pour leur chaleureux accueil à Taïwan et toutes les choses que j'ai eu la chance d'apprendre à leur contact.

Merci au professeur Hervé Tostivint pour les bons moments passés à discuter d'évolution et tous les précieux enseignements dispensés concernant les synténies.

Merci aux docteurs Guido van den Thillart et Ron Dirk pour tout le travail réalisé sur le génome d'anguille et la formation à la manipulation de données génomiques. Merci également pour leur accueil à Leiden.

Merci au docteur Jonna Tomkiewicz et à son équipe pour toute l'aide et le travail fournis lors des maturations expérimentales, ainsi que pour leur accueil dans leurs installations danoises.

Merci au docteur Antoni Acou pour son expertise et son accueil à la station de Dinard.

Pour finir ce paragraphe, j'aimerais adresser un merci tout particulier à Eric Ryckelynck et toute son équipe de chefs qui, depuis des années, fournissent un effort exceptionnel afin que nous puissions travailler dans de meilleures conditions. Ils nous accueillent toujours avec le sourire et ils ont conscience que seule l'entraide pourra peut-être sauver l'anguille de l'extinction.

Merci à tous les maîtres de conf, les profs, et les préparateurs du LV201 et LV102 pour m'avoir accueilli dans vos équipes et formé à l'un des plus beaux métiers du monde. La confiance que vous m'avez insufflée face à un auditoire n'est pas prête de s'estomper.

J'aimerais remercier tous ceux dont le nom n'apparaît dans aucun des documents relatifs à ce travail et pourtant sans qui rien n'aurait été possible. Je veux bien évidemment parler des amis : Patrick, Mathieu, Matthieu, Justine, Sankar, Mahdi, Victor, Marina, Céline, Daphné… Merci d'avoir été là pour me rappeler qu'il y a une vie en dehors des manips.

Des paragraphes entiers ne suffiraient pas à rendre hommage aux membres de ma famille, et en particulier à Angélique (ma moitié), Emilie (ma petite sœur), Angela (ma maman), Bernard (mon papa) et Sara (ma belle-mère), qui m'ont soutenu et apporté toute l'affection qu'on puisse rêver. Vous habitez mon cœur et mon esprit à chaque instant.

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été financée par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. L'ensemble des travaux et des missions a été soutenu par l'UMR 7208 BOREA, l'ANR franco-taïwanaise PUBERTEEL, le projet européen PRO-EEL, ainsi que par le programme « Summer 2011 training and practicing internship in Taiwan ».

Ces travaux ont été valorisés par la soumission et la publication d'articles scientifiques ainsi que par de nombreuses communications orales à l'occasion de congrès nationaux et internationaux.

Dans le cadre de mon contrat doctoral, j'ai également eu l'opportunité d'effectuer des heures d'enseignement dans l'UFR de biologie de l'Université Pierre et Marie Curie en tant que « chargé de mission enseignement ». Cela correspond, au bout de trois ans, à une année d'enseignement à temps plein en temps qu'enseignant chercheur.

Publications :

J. Pasquier, A.-G. Lafont, S.-R. Jeng, M. Morini, R. Dirks, G. Thillart, J. Tomkiewicz, H. Tostivint, C.-F. Chang, H. Vaudry, K. Rousseau, S. Dufour, **2012**. Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. Plos One.

S.-R. Jeng, Y.-T. Pen, M.-M. Gueguen, W.-S. Yueh, J. Pasquier, S. Dufour, C.-F. Chang and O. Kah, **2012**. Evolution of the *cyp19a1* gene (aromatase) in ray-finned fish: Insights from the Japanese eel. Plos One.

S.-R. Jeng, J. Pasquier, W.-S. Yueh, G.-R. Chen, Y.-H. Lee, S. Dufour, and C.-F. Chang, **2012**. Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroids dependent and independent mechanisms. General and Comparative Endocrinology, 175 : 163-172.

J. Pasquier, A.-G. Lafont, J. Leprince, H. Vaudry, K. Rousseau, S. Dufour, **2011**. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. General and Comparative Endocrinology, 173 : 216-225.

Publication en révision :

J. Pasquier, A.-G. Lafont, H. Tostivint, H. Vaudry, K. Rousseau, S. Dufour. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. Frontiers in Neureuendocrine Science, révisions mineures.

Publication en préparation :

J. Pasquier, A.-G. Lafont, F. Denis, J. Tomkiewicz, H. Vaudry, K. Rousseau, S. Dufour. The two Kisspeptin genes of the European eel are expressed in the brain-pituitary axis and differentially regulated during experimental maturation.

Participation à des programmes internationaux :

ANR Franco-Taïwanaise PUBERTEEL (2009-2011)

Programme: « Summer 2011 training and practicing internship in Taiwan »

Projet européen PRO-EEL (2010-2014)

Eel Genome Project

Programme européen EELIAD

Participations à des conférences nationales :

Journées scientifiques de l'UMR BOREA 2012, Caen (oral)

- Le système kisspeptin chez l'anguille européenne: évolution et fonctionnalité.
  Pasquier *et al.*

Journées des doctorants du centre des sciences de la Mer de l'UPMC 2011, Paris (oral)

- Investigation of the kisspeptin system in the European eel.
  Pasquier *et al*.

Journées scientifiques de l'UMR BOREA 2010, Paris (oral)

- Le système Kisspeptin chez l'anguille européenne.
  Pasquier *et al.*

Journée de l'école Doctorale Diversité du Vivant 2010, Roscoff (oral)

- Kiss un premier pas dans la puberté.
  Pasquier *et al*.

Journées scientifiques de l'UMR BOREA 2009, Paris (oral)

- Evolution du contrôle neuroendocrinien de la reproduction : origine et rôle du système kisspeptine/GPR54?
  Pasquier *et al.*

Participations à des conférences internationales :

38ème Colloque de la société de neuroendocrinologie, Banyuls, France, septembre 2012 (oral)

- Origin and evolution of the vertebrate Kisspeptin system: whole genome duplication rounds as diversity drivers.
  Pasquier *et al.*

7th International Symposium on Fish Endocrinology, Buenos Aires, Argentine, septembre 2012 (oral)

- Diversity and evolutionary history of the Kiss/Kissr system in vertebrates: new data from fish genomes.
  Pasquier *et al.*

3rd PRO-EEL Project Meeting, Valencia, Espagne, 2012 (oral)

- Kisspeptin system in european eel : functional aspects.
  Pasquier *et al.*

Eel Genomics Meeting, Leiden, Pays-Bas, 2011 (oral)

- Rfamide Peptide Systems in the Euroean Eel.
  Pasquier *et al.*

Meeting of the Summer 2011 training and practicing internship, National scientific council, Taipei, Taiwan 2011 (oral)

- Kiss from Taiwan.
  Pasquier *et al.*

7th International congress of Neuroendocrinology 2010, Rouen, France (poster)

- Existence and direct pituitary effect of kisspeptin/GPR54 in the European eel, Anguilla anguilla.
  Pasquier J., Lafont AG., Rousseau K. et Dufour S.

Encadrements :

2012- Christian Atkinson, étudiant Erasmus en Master à l'université de Keele, UK. Stage de 6 mois avec mémoire en anglais.
Sujet: « Characterisation of the GnIH system in European eel, *Anguilla anguilla* ».

2012- Florian Dennis, étudiant en 3ème année de l'Ecole d'Ingénieur Sup'Biotech Paris, France. Stage de 3 mois avec soutenance et rapport en anglais.
Sujet: « Etude de la régulation de Kisspeptin chez l'anguille Européenne, *Anguilla anguilla* ».

2011- Charlotte Colle, étudiante en 3ème année de licence à l'UPMC, Paris, France. Stage volontaire de 4 mois.
Sujet: «Recherche de séquences et clonage des récepteurs à GnIH chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla* ».

Enseignements :

Chargé de mission d'enseignement de l'UPMC :

Disciplines enseignées:

LV102 « Diversité du vivant »: bases de la biologie animale et végétale.
Niveau: Travaux pratiques et dirigés de 1ère année de licence de biologie.

LV201 « Biologie fonctionnelle des organismes animaux »: biologie animale.
Niveau: Travaux pratiques et dirigés de 2ème année de licence de biologie.

Volume horaire: 64 h/an

Principales abréviations

1R : première duplication globale génomique survenue chez les vertébrés

11-KT : 11-kétotestostérone

2R : deuxième duplication globale génomique survenue chez les vertébrés

26RFa : peptide de la famille des RFamide faisant 26 acides aminés de long.

3R : troisième duplication globale génomique spécifique des téléostéens

a.a. : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARC : noyau arqué

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

AVPV : noyau antéroventral periventriculaire

AXOR12 : code arbitraire pour le GPR54 ou récepteur aux kisspeptine humain

C-terminale : carboxy-terminale

CDS : coding sequence

CG : chorionic gonadotropin

cGnRH : chicken gonadotropin releasing hormone

DHT : 5α-dihydrotestostérone

E: acide glutamique

E2 : œstradiol

ERα : œstrogene receptor α

ERβ : œstrogene receptor β

F : phénylalanine

fGRP : frog growth hormone releasing peptide

FSH : follicle stimulating hormone

G : glycine

gfGPR54a : GPR54 de type a de poisson rouge

GnIH : gonadotropin inhibitory hormone

GnRH : gonadotropin releasing hormone

GPCR : G protein coupled receptor

GPR54 : G protein coupled receptor 54

GPR54-/- : mutation homozygote perte de fonction de GPR54

HH : hypogonadisme hypogonadotrope

hOT7T175 : code arbitraire pour le GPR54 ou récepteur aux kisspeptine humain

HPG : hypothalamo-pituitary-gonade

HPLC : high-pressure liquid chromatography

K : lysine

KISS : kisspeptine

Kiss : kisspeptine

KiSS : kisspeptine

Kiss(10) : kisspeptine composé des 10 acides aminés conservés

Kiss1 : kisspeptine de type 1

Kiss1a : kisspeptine de type 1a chez le xénope

Kiss1b : kisspeptine de type 1b chez le xénope

Kiss1r : récepteur au Kiss1

Kiss2 : kisspeptine de type 2

Kissr : récepteur au kispeptine

KO : knock out

Kp : pepide maturé à partire du prépro-kisspeptine

Kp1(X) : peptide maturé à partire du prépro-kisspeptine de type 1 et composé de X acides aminés

Kp2(X) : peptide maturé à partire du prépro-kisspeptine de type 2 et composé de X acides aminés

KRBDPx : variant X du Kiss1rb de poisson zèbre

L : leucine

LH : luteinizing hormone

LPXRF : motif leucine-proline-leucine/Q-arginine-phénylalanine

mGnRH : mammalian gonadotropin releasing hormone

mPOA : aire pré-optique médiane

N-terminale : amino-terminale

NPFF : neur-peptide FF

NPPv: noyau *posterioris periventricularis*

NPVF : neuro-peptide VF

NRL : noyau récessus latéral

NVT: noyau *ventralis tuberis*

P : proline

pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction

POA : aire pré-optique

PPD : *proximal pars distalis*

PrRP : prolactine releasing peptide

Q : glutamine

QFRP : peptide homologue des 26RFa

R : arginine

RACE : Rapid Amplification of cDNA-ends

RFRP : Rfamide related peptide

TSH : thyroid stimulating hormone

Vtg : vitellogénine

xtGPR54 : GPR54 de xénope

Sommaire

Résumés de la thèse II
Remerciements IV
Avant-propos VI
Principales abréviations X
Sommaire XIII

Chapitre 1 : Introduction générale 1
1. La famille des peptides RFamide 2
2. Le système kisspeptine 4
2.1. Les kisspeptines 4
2.1.1 Découverte et diversité des kisspeptines 4
2.1.2. Structure des kisspeptines 5
a. Les gènes codant les kisspeptines 5
b. Structure primaire des peptides 6
c. Structure tertiaire du decapeptide Kp(10) 7
2.1.3. Localisation des kisspeptines 7
2.2. Récepteurs aux kisspeptines 9
2.2.1. Découverte et diversité des récepteurs à la kisspeptine 9
2.2.2. Structure des récepteurs à la kisspeptine 10
a. Les gènes codant pour les Kissr 10
b. Les récepteurs 11
2.2.3. Localisation des récepteurs à la kisspeptine 12
3. Rôles du système kisspeptine 13
3.1. Rôles divers du système kisspeptine 13
3.1.1. Suppression des métastases 13
3.1.2. Répression de l'invasion du trophoblaste chez les mammifères 14
3.1.3. Autres rôles 15
a. Rôle dans le pancréas 15
b. Rôle cardiovasculaire 15
3.2. Rôle dans le contrôle neuroendocrinien de la reproduction 16
3.2.1. L'axe cerveau-hypophyse-gonade 16
a. Les GnRH 17
b. La dopamine 19
c. Les gonadotropines hypophysaires 19
d. Les stéroïdes sexuels 20
3.2.2. Découverte du rôle du système kisspeptine dans la reproduction 21
3.2.3. Régulations des Kiss et Kissr au cours de la maturation sexuelle 23
a. Chez les mammifères 23
b. Chez les téléostéens 23
3.2.4. Rétrocontrôles des stéroïdes sexuels 25
a. Chez les mammifères 25
b. Chez les téléostéens 27
3.2.5. Effets in vivo de traitements aux kisspeptines 27
a. Chez les mammifères 28
a. Chez les téléostéens 29
3.2.6. Effets in vitro de traitements aux kisspeptines 30
4. Problématique 31
4.1. Modèle de l'anguille 32
4.1.1. Intérêt biologique de l'anguille 32
a. Le cycle de vie de l'anguille européenne 32
b. Maturation expérimentale de l'anguille 34
4.1.2. Intérêt phylogénétique des élopomorphes 37
4.2. Génomes d'intérêt phylogénétique 37
4.3. Objectifs de la thèse 38

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes 40
1. Expérimentations *in vivo* 41
1.1. Provenance des animaux 41

1.2. Traitements gonadotropes 41
1.3. Prélèvement des organes 41
2. Expérimentations *in vitro* 41
2.1. Provenance des animaux 41
2.2. Cultures primaires de cellules hypophysaires 42
2.3. Traitement des cellules 42
3. Distributions tissulaires 42
3.1. Provenance des animaux 42
3.2. Prélèvement des organes 42
4. Clonages 43
4.1. Séquençage des ARNm codant *Kissr-2*, *Kiss2* et *Kiss1* 43
4.2. Séquençage des ARNm codant *Kissr-1* et *Kissr-3* 44
5. Dosage par PCR quantitative en temps réel 44
6. Analyses statistiques 45
7. Analyse de bases de données moléculaires 45
8. Analyses phylogénétiques 45
9. Analyses synténiques 45

Chapitre 3 : Mise en évidence du système kisspeptine chez l'anguille européenne : caractérisation d'un récepteur aux kisspeptines et étude *in vitro* de l'effet direct hypophysaire de différents kisspeptines sur l'expression des hormones gonadotropes d'anguille. 47
1. Introduction de l'article 1 48
2. Article 1: First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla Anguilla.* 48

Chapitre 4 : Origine et histoire évolutive des récepteurs aux kisspeptines chez les vertébrés : apports des nouveaux génomes et étude de la conservation des *Kissr* chez l'anguille par détermination de leur distribution tissulaire et de leur régulation au cours d'une maturation expérimentale. 59
1. Introduction de l'article 2 60
2. Article 2: Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. 60

Chapitre 5 : Caractérisation de deux *Kiss* chez l'anguille, étude de leur conservation par détermination de leur distribution tissulaire et de leur régulation au cours d'une maturation expérimentale. 73
1. Introduction de l'article 3 74
2. Article 3: The two Kisspeptin genes of the European eel are expressed in the brain-pituitary axis and differentially regulated during experimental maturation. 74

Chapitre 6 : Origine et histoire évolutive des kisspeptines chez les vertébrés : apports des nouveaux génomes et comparaison des histoires évolutives des *Kiss* et des *Kissr* chez les vertébrés. 100
1. Introduction de l'article 4 101
2. Article 4: Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. 101

Chapitre 7 : Discussion générale et perspectives 130
1. Histoires évolutives des Kiss et des Kissr 131
1.1. Réévaluation de la diversité spécifique des *Kiss* et des *Kissr* chez les vertébrés 131
1.2. Réévaluation de la diversité globale des Kiss et des Kissr au sein des vertébrés 132
1.3. Tétra-paralogons et origine unique pour chacune des deux familles de gènes 133
1.4 Identification des chromosomes ayant hébergé les Kiss et Kissr ancestraux 135
1.5. Evénements indépendants de perte des Kiss et des Kissr selon les lignées de vertébrés 135
1.6. La 3R et le cas particulier des téléostéens 137
1.7. Indépendance des histoires évolutives des Kiss et des Kissr 137
2. Exemple de conservation et de sub-fonctionnalisation des multiples *Kiss* et *Kissr* dans le contrôle de la reproduction : le cas de l'anguille 139
2.1. Distribution des *Kiss* et *Kissr* majoritairement dans l'axe gonadotrope 139
2.2. Régulations différentielles des Kiss et des Kissr au cours d'une maturation expérimentale d'anguilles femelles 141

2.3. Effet inhibiteur *in vitro* des kisspeptines sur l'expression de LHβ 143
2.4. Dualité du rôle du système kisspeptine chez l'anguille 144
2.5. Rôle ancestral du système kisspeptine 145
3. Conclusion 146
4. Perspectives 146

Bibliographie 149

Chapitre 1

Introduction générale

La nomenclature adoptée dans l'introduction générale pour les kisspeptines et leurs récepteurs reflète celle des auteurs originaux. En revanche, dans le chapitre 7 : Discussion générale et perspectives, nous utilisons les nomenclatures mises en place au cours de cette étude.

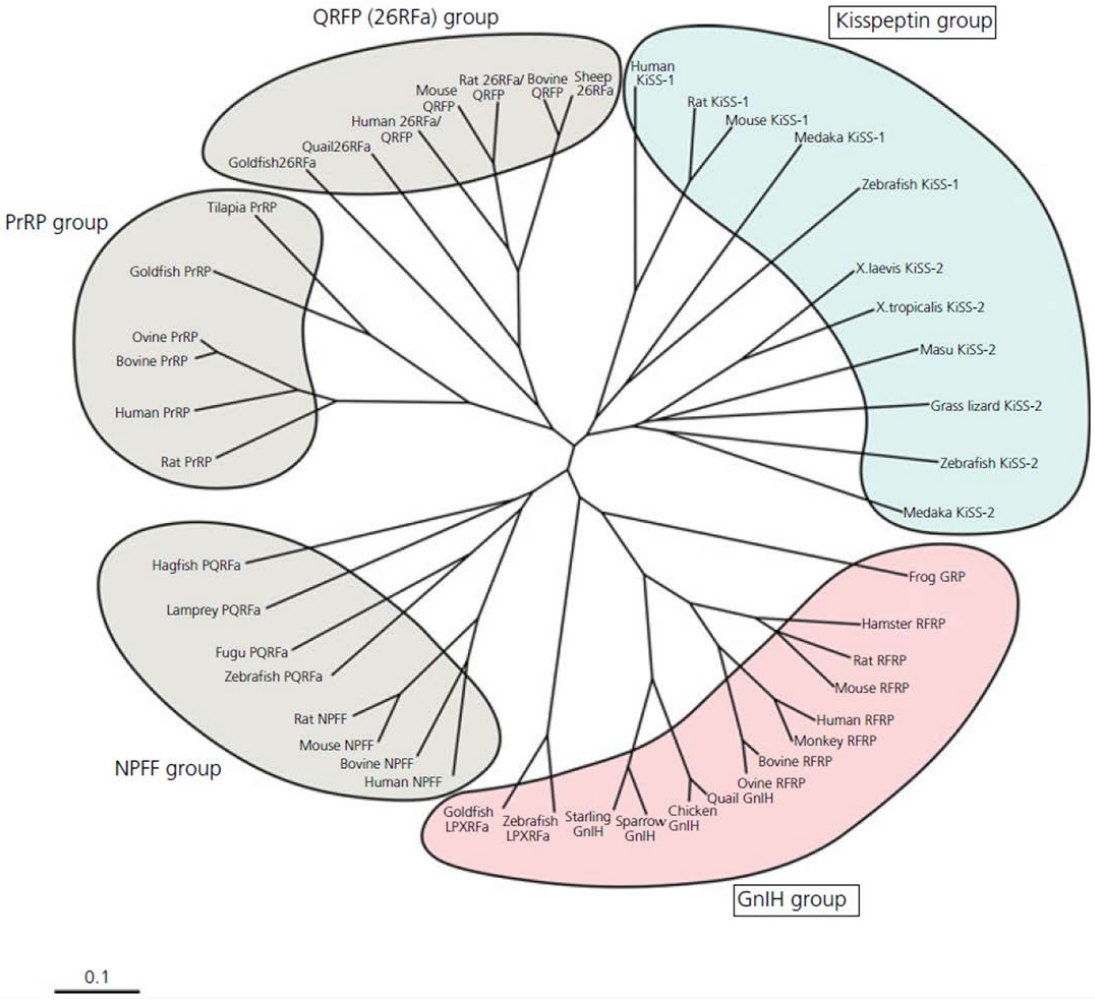
1. La famille des peptides RFamide

Cette famille regroupe un grand nombre de peptides dont la caractéristique commune est de présenter à leur extrémité carboxy-terminale (C-terminale) une arginine (R) suivie d'une phénylalanine (F) qui présente une fonction amide. Le premier représentant de cette famille, dont la séquence est FMRFamide, a été isolé par Price et Greenberg en 1979 dans un ganglion du mollusque *Macrocallista nimbosa* (Price and Greenberg, 1977). Ce très court peptide a été identifié comme un excitateur cardiaque chez cette espèce. Depuis, des peptides présentant ce même motif RFamide carboxy-terminal ont été identifiés dans d'autres groupes de métazoaires (pour revue : Walker et al., 2009).

Chez les vertébrés, les RFamides sont communément classés en cinq groupes distincts (pour revue : Fukusumi et al., 2006; Tsutsui et al., 2010) (Figure 1) :

- Les GnIH (Gonadotropin Inhibitory Hormone) ont été découverts pour leur rôle inhibiteur de la libération des gonadotropines chez la caille (*Coturnix japonica*) (Tsutsui et al., 2000). Ils ont été décrits par la suite chez d'autres vertébrés (pour revue : Tsutsui et al., 2010). Bien qu'ils n'aient pas un effet inhibiteur chez toutes les espèces, c'est le nom le plus couramment employé. Toutefois, la nomenclature de ces peptides n'est pas encore homogène et ils peuvent se cacher sous les appellations suivantes : RFRP (RFamide Related Peptide), NPVF (Neuro Peptide VF), fGRP (frog Growth hormone Releasing Peptide). Néanmoins, quelle que soit leur appellation, ils partagent tous le même motif carboxy-terminal LPXRFamide avec X= L ou Q.
- Les NPFF ont été découverts pour leur rôle dans la nociception chez l'humain (Perry et al., 1997). Ils ont par la suite été identifiés chez de nombreux vertébrés (pour revue : Osugi et al., 2006). Ils sont souvent confondus avec les peptides GnIH car très proches structuralement et phylogénétiquement. Tous les peptides NPFF partagent le motif C-terminal PQRFamide (pour revue : Osugi et al., 2006).
- Les 26RFa (peptide RFamide de 26 acides aminés), ont été découverts chez un amphibien, *Rana esculenta*, pour leur rôle orexigénique (Chartrel et al., 2003). Ces péptides ont également été identifiés chez d'autres vertébrés (pour revue : (Ukena et al., 2011)).

- Les PrRP (Prolactin Releasing Peptide) ont été découverts dans le cerveau humain pour leurs propriétés stimulatrices sur la libération de la prolactine (Hinuma et al., 1998). Ces peptides ont été découverts chez d'autres vertébrés chez lesquels ils pourraient avoir de nombreux rôles (pour revue : Fukusumi et al., 2006).
- Les KISS ou Kisspeptines qui ont fait l'objet de cette thèse seront présentés plus en détail.



<u>Figure 1</u> : Arbre phylogénétique non-enraciné des peptides de la famille des Rfamide. (Tsutsui et al., 2010)

Tous ces peptides partagent également la propriété d'être considérés, du moins chez les vertébrés, comme des neuropeptides pouvant agir comme des neuro-hormones. En tant que tels, les membres de cette famille peuvent être impliqués dans toutes les fonctions du vivant, de la perception de stimuli internes ou environnementaux (pour revue : (Greives et al., 2008) à la reproduction (pour revue : (Tsutsui et al., 2010) en passant par l'homéostasie

générale de l'organisme comme par exemple le contrôle de la prise alimentaire (pour revue : (Bechtold and Luckman, 2007).

2. Le système kisspeptine

2.1. Les kisspeptines

2.1.1 Découverte et diversité des kisspeptines

En 1996, le groupe de D.R. Welch, implanté à Hershey en Pennsylvanie, rapporte la découverte d'un ARNm surexprimé dans des cellules d'une lignée de mélanome humain présentant une faible capacité métastasique (Lee et al., 1996). Cet ARNm, codant pour un peptide précurseur de 145 acides aminés, a été nommé *Kiss* en l'honneur de la spécialité de Hershey, les fameux « Hershey Chocolate Kiss ». En 1998, West et collaborateurs identifient et localisent sur le chromosome 1 humain, le gène *Kiss1* codant pour l'ARNm *Kiss* (West et al., 1998). En 2001, trois peptides matures sont identifiés et isolés par HPLC à partir d'extrait de placenta humain: Kp(54) (kisspeptine de 54 a.a.), Kp(14) (kisspeptine de 14 a.a.) et Kp(13) (kisspeptine de 13 a.a.) (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). Ces peptides matures sont issus du clivage enzymatique du prépro-kisspeptine de 145 a.a. Le plus long des trois peptides (Kp(54)) correspond à la métastine, peptide impliqué dans l'effet anti-métastasique sur les cellules de certains cancers (Ohtaki et al., 2001). De plus, il a été montré, en système hétérologue, que le Kp(10) (kisspeptine de 10 a.a. commun aux Kp(54), Kp(14) et Kp(13)) se lie de manière plus spécifique au récepteur des kisspeptines et entraine une plus forte réponse que les kisspeptines plus longs (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). Depuis 1996, le gène *Kiss1* ou ses produits ont été identifiés chez un grand nombre d'espèces appartenant à différents *phyla* de mammifères (pour revues : Lee et al., 2009; Tsutsui et al., 2010; Um et al., 2010). Il a fallu attendre 2008 pour que le premier *Kiss1* soit identifié chez un vertébré non-mammifère, le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Kanda et al., 2008; van Aerle et al., 2008), marquant ainsi le début de l'étude de ce gène chez des espèces non-mammaliennes (pour revues : Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012; Tsutsui et al., 2010; Um et al., 2010).

En 2009, Felip et collaborateurs clonent deux ARNm codant pour deux *Kiss* différents chez un téléostéen, le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*). L'un des deux ARNm a gardé la dénomination *Kiss1* en raison du degré de similarité élevé qui existe entre sa séquence de Kp(10) et celles des séquences de mammifères déjà décrites. Le second ARNm a pris l'appellation de *Kiss2*. La même année, trois ARNm codant pour trois prépro-kisspeptines différents sont clonés chez le xénope (*Xenopus tropicalis* : *Kiss1a*, *Kiss1b* et *Kiss2*) (Lee et

al., 2009). Jusqu'à maintenant, le xénope était l'espèce présentant la plus grande diversité de *Kiss*. Toutefois, l'existence de deux gènes codant pour différents kisspeptines a été mise en évidence chez le poisson zèbre (Kitahashi et al., 2009), le médaka (*Oryzias latipes*) (Kitahashi et al., 2009), le poisson rouge (*Carasius auratus*) (Li et al., 2009), la chimère (*Callorhinchus milii*) (Lee et al., 2009), la lamproie marine (*Petromyson marinus*) (Lee et al., 2009) et l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) (Lee et al., 2009). Ce dernier est le seul mammifère chez qui deux gènes ont été identifiés. Certaines espèces comme le lézard (*Anolis carolinensis*), le fugu (*Takifugu rubripes*), le poisson globe (*Tetraodon nigroviridis*) ou l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) ne présentent dans leur génome que le *Kiss2* (pour revue : Tena-Sempere et al., 2012). A ce jour, aucun *Kiss* n'a été trouvé dans la lignée des oiseaux (pour revues : Akazome et al., 2010; Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012; Um et al., 2010).

2.1.2. Structure des kisspeptines

a. Les gènes codant les kisspeptines

Les gènes *Kiss* partagent la même structure. En effet, leur region codante (CDS) est répartie sur deux exons (Figure 2). Le premier exon code principalement pour le peptide signal alors que le second exon code pour le reste du prépro-kisspeptine incluant la séquence codant pour les différents peptides matures (pour revue : Tena-Sempere et al., 2012). Les tailles respectives des deux exons dépendent du type de *Kiss* et de l'espèce dont ils proviennent, mais généralement le CDS fait entre 300 et 480 nucléotides. Le CDS code donc pour une protéine comprise entre 100 et 160 a.a..

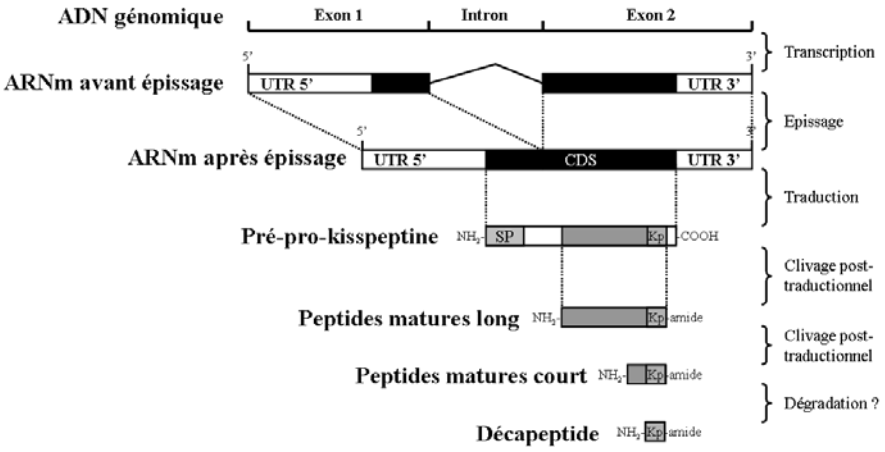


Figure 2 : Schéma général des principales étapes menant du gène *Kiss* jusqu'au décapeptide actif. SP : signal peptide ; UTR : un-translated region ; CDS : coding sequence ; Kp : peptide kisspeptine.

b. Structure primaire des peptides

Les prépro-kisspeptine-1 partagent, entre les espèces, de 12 à 81% d'identité. Ces pourcentages varient de 9 à 82% d'identité pour les prépro-kisspeptine-2. Quant aux pourcentages d'identité d'un type de prépro-kisspeptine par rapport à l'autre, leurs valeurs s'échelonnent de 7% à 16% (pour revue : Tena-Sempere et al., 2012). Ces faibles pourcentages reflètent l'hypervariabilité interspécifique et intergénique des précurseurs des kisspeptines, à l'exception des séquences codant pour les décapeptides matures, Kp(10). En effet, les Kp1(10) partagent entre eux de 70 à 100% d'identité. Les mêmes pourcentages sont retrouvés entre les Kp2(10). Lorsqu'on compare les Kp1(10) aux Kp2(10), on observe de 60 à 90% d'identité.

Les précurseurs des kisspeptines sont maturés par clivages enzymatiques successifs (Figure 2), vraisemblablement réalisés par des prohormones convertases comme par exemple des furines (Kotani et al., 2001) ou les prohormones convertases 1/3 ou 2 (pour revue : Seidah, 2011). En C-terminal juste après le motif RF, ils présentent un site de clivage très conservé chez les neuropeptides de vertébrés, qui est constitué d'une glycine (G) et d'un ou deux acides aminés alcalin, une lysine (K) et/ou bien une arginine (R) (pour revue : Seidah, 2011). Les différents sites de clivage en N-terminal sont constitués d'un ou plusieurs acides aminés alcalins (R ou K) (pour revue : Seidah, 2011). Tous les précurseurs de *Kiss2* de téléostéens présentent une arginine en position 13 à partir du motif RF-amide, ce qui semble indiquer l'existence d'un peptide mature de 12 a.a., Kp2(12) (Zmora et al., 2012). Chez le xénope, dont le prépro-kisspeptine-2 présente une arginine 13 a.a. en amont de son motif RF-amide, un Kp2(12) a été isolé par HPLC (Lee et al., 2009). En ce qui concerne les précurseurs des *Kiss1*, il y a conservation d'un acide aminé alcalin en position 16 à partir du motif RF-amide chez la plupart des mammifères et des téléostéens, ce qui semble indiquer l'existence d'un Kp1(15) chez ces espèces (Zmora et al., 2012). De plus, les Kp1(15) potentiels des mammifères présentent en N-terminal un acide glutamique (E) qui subirait une pyroglutamilation qui augmenterait l'affinité de Kp1(15) pour le récepteur Kissr, comme l'a montré Lee et al (2009). Cependant, la séquence des Kp(10) est considérée comme la séquence naturelle minimale permettant la fixation spécifique au récepteur, GPR54/Kissr (Kotani et al., 2001). Ceci permettrait d'expliquer la haute conservation de ces séquences au travers des vertébrés.

c. Structure tertiaire du decapeptide Kp(10)

Les études pharmacologiques des kisspeptines se sont principalement focalisées sur l'étude des propriétés d'interaction entre les Kp(10) et leurs récepteurs. La recherche d'agonistes plus puissants aux kisspeptines a mené certaines équipes à substituer aux acides aminés de Kp(10) d'autres acides aminés, position par position (Curtis et al., 2010; Gutiérrez-Pascual et al., 2009; Niida et al., 2006). De cette manière, plusieurs publications ont mis en évidence des acides aminés-clés dans la reconnaissance du peptide par le récepteur (rat, *Ratus norvegicus* : Gutiérrez-Pascual et al., 2009 ; humain, *Homo sapiens* : Curtis et al., 2010). Ainsi, chez l'humain et le rat, les positions 4, 6 et 10 du Kp(10) semblent jouer un rôle critique dans ce processus. En effet, le Kp(10) présente, du moins chez le rat, une conformation hélicoïdale, mélange entre une hélice-α et une hélice-3_{10} (Gutiérrez-Pascual et al., 2009). La substitution des acides aminés aux positions 4, 6 ou 10 entraine une perturbation de cette conformation et le Kp(10) n'est plus reconnu correctement par son récepteur (Gutiérrez-Pascual et al., 2009).

2.1.3. Localisation des kisspeptines

La localisation des produits des gènes codant pour les kisspeptines a été étudiée chez les mammifères, certains téléostéens et le xénope. A l'origine, les produits du gène *Kiss1* ont été purifiés par HPLC, à partir d'extraits de placenta humain (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). De plus, des approches par PCR quantitative ont permis de mesurer l'expression de *Kiss1* au niveau du placenta, du petit intestin, des testicules, du pancréas, de la rate, des reins et du foie chez l'humain (Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). L'expression du transcrit de *Kiss1* au niveau du placenta, des reins et du pancréas a également été confirmée par Western blot (Lee et al., 1996). Chez la souris (*Mus musculus*), l'expression de *Kiss1* à aussi été localisée par hybridation *in situ* dans les cellules α et β des ilôts de Langerhans (Hauge-Evans et al., 2006).

Au niveau cérébral, plusieurs études se sont appliquées à la cartographie précise des noyaux exprimant kisspeptine par des approches d'hybridation *in situ* et d'immuno-histochimie. Chez les mammifères, l'expression de *Kiss1* a été détectée dans plusieurs populations de neurones de l'hypothalamus (pour revue : Mikkelsen and Simonneaux, 2009). Néanmoins, les répartitions de ces populations diffèrent en fonction des espèces. Toutes les espèces mammaliennes étudiées jusqu'à maintenant présentent des neurones à Kiss1 dans le noyau arqué (ARC) (Franceschini et al., 2006; Gottsch et al., 2004; Kinoshita et al., 2005; Revel et al., 2006; Rometo et al., 2007; Smith et al., 2006). Chez les rongeurs, des neurones

exprimant *Kiss1* ont également été localisés dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) (Gottsch et al., 2004; Kinoshita et al., 2005; Revel et al., 2006; Smith et al., 2006), alors que chez les primates (Rometo et al., 2007) et le mouton (*Ovis aries*) (Franceschini et al., 2006), l'expression de Kiss1 dans ce noyau est beaucoup moins fréquente. De plus, des fibres neuronales immunoréactives à Kiss1 ont été localisées dans l'aire pré-optique (POA) à proximité de neurones à GnRH chez le rat (Kinoshita et al., 2005) et la souris (Clarkson and Herbison, 2006).

Jusqu'à maintenant, le xénope est le seul amphibien chez qui la distribution tissulaire des *Kiss* a été réalisée (Lee et al., 2009). *Kiss1a*, *Kiss1b* et *Kiss2* sont tous les trois exprimés dans le cerveau, les testicules, le cœur, et le foie. *Kiss1a* et *Kiss1b* sont également présents dans les poumons, l'intestin et l'œil. *Kiss1a* et *Kiss2* sont également exprimés dans les reins.

Chez les téléostéens, les distributions des transcrits des gènes *Kiss1* et *Kiss2* ont été principalement étudiées par une approche de PCR classique. Globalement, *Kiss1* et *Kiss2* sont majoritairement exprimés dans le cerveau des différentes espèces étudiées quels que soit le sexe ou le stade des individus considérés (medaka : Felip et al., 2009; Kanda et al., 2008; Kitahashi et al., 2009 ; poisson zèbre : Biran et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; van Aerle et al., 2008 ; loup de mer: Felip et al., 2009). Récemment, plusieurs études ont rapporté la cartographie des neurones exprimant les kisspeptines chez plusieurs espèces des téléostéens (pour revue : Ogawa et Parhar, 2012). Chez le médaka, les neurones exprimant *Kiss1* sont localisés dans le noyau *ventralis tuberis* (NVT), le noyau *posterioris periventricularis* (NPPv) et l'habenula (Kanda et al., 2008; Kitahashi et al., 2009) alors que les neurones exprimant Kiss2 se retrouvent dans l'hypothalamus périventriculaire (Kitahashi et al., 2009). Chez le poisson zèbre, les neurones exprimant *Kiss1* se retrouvent dans l'habenula et le l'hypothalamus périventriculaire alors que les neurones à *Kiss2* sont localisés dans le noyau tubérale postérieur, le noyau periventriculaire et la POA (Servili et al., 2011). Chez le loup de mer, les neurones à *Kiss1* se répartissent dans l'habenula et dans l'hypothalamus rostral médian alors que les neurones exprimant *Kiss2* sont situés dans l'hypothalamus dorsal et la POA (Escobar et al., 2012). Chez le bar rayé (*Morone saxatilis*), *Kiss1* et *Kiss2* sont co-exprimés par des neurones du noyau récessus latéral (NRL) (Zmora et al., 2012). Le poisson globe, qui ne possède que le gène de *Kiss2*, présente des neurones à Kiss2 au niveau de l'hypothalamus périventriculaire et de la POA. L'expression des *Kiss* à l'échelle neuroanatomique semble donc très variable selon les espèces de téléostéens étudiées.

La comparaison des profils d'expression de *Kiss1* et *Kiss2* dans les organes périphériques chez le poisson zèbre, le medaka et le loup de mer a révélé des profils différents

pour les deux *Kiss* selon l'espèce, le stade et le sexe des individus considérés (Felip et al., 2009). Chez le poisson zèbre, *Kiss1* est exprimé au niveau des gonades, de l'intestin, du tissu adipeux et de la peau pour les deux sexes, ainsi qu'au niveau du muscle chez la femelle (Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; van Aerle et al., 2008). Chez cette espèce, *Kiss2* est quant à lui exprimé dans l'hypophyse, l'intestin et les ovaires (Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009). Chez le médaka, *Kiss1* est exprimé au niveau des gonades, de l'estomac et de l'œil pour les deux sexes, ainsi qu'au niveau de la peau chez le mâle (Felip et al., 2009; Kanda et al., 2008). Chez le médaka mâle, *Kiss2* est exprimé dans les intestins, le cœur, l'œil et la peau alors que chez la femelle il est exprimé dans les ovaires et les branchies. Chez le poisson rouge, *Kiss1* et *Kiss2* s'expriment dans l'hypophyse, les gonades, les reins, les branchies, l'intestin et le tissu adipeux (Li et al., 2009; Yang et al., 2010). *Kiss1* s'exprime également dans le foie et la rate (Yang et al., 2010) alors que *Kiss2* s'exprime dans le cœur (Li et al., 2009). Chez le loup de mer, *Kiss1* et *Kiss2* s'expriment au niveau des gonades quel que soit le stade ou le sexe des individus (Felip et al., 2009). Les mâles juvéniles présentent également une forte expression de *Kiss1* au niveau du cœur (Felip et al., 2009). Chez le poisson globe qui ne présente que *Kiss2*, ce gène s'exprime dans l'hypophyse, l'œil, les gonades, le foie, la rate et les reins (Shahjahan et al., 2010).

Bien que les différents kisspeptines semblent tous être exprimés dans le cerveau quelque soit l'espèce de vertébré, leurs répartitions dans les noyaux cérébraux ainsi que leurs répartitions dans les organes périphériques sont dépendantes de l'espèce, du sexe et du stade de développement des individus étudiés.

2.2. Récepteurs aux kisspeptines

2.2.1. Découverte et diversité des récepteurs à la kisspeptine

En 1999, indépendamment de la découverte de *Kiss1*, Lee et collaborateurs ont cloné chez le rat un gène codant pour un nouveau récepteur couplé aux protéines G (GPCR pour G-Protein-Coupled-Receptor), *GPR54*. Par la suite, l'orthologue de *GPR54* a été cloné chez l'humain et nommé arbitrairement AXOR12 (Muir et al., 2001) ou hOT7T175 (pour human OT7T175 ; Ohtaki et al., 2001). Malgré un fort pourcentage de similarité avec les récepteurs à la galanine, il a été montré que *GPR54* (AXOR12, hOT7T175) ne lie pas la galanine. Il a donc été considéré comme récepteur orphelin jusqu'en 2001 lorsque Kotani et collaborateurs identifient les kisspeptines comme ses ligands spécifiques. Par la suite, GPR54 a pris l'appellation de « kisspeptin receptor », Kiss1r/KISS1r (ou Kissr). Depuis sa découverte chez le rat et l'humain, il a été étudié chez de nombreux autres mammifères (pour revue :

(Akazome et al., 2010; Kim et al., 2012; Lee et al., 2009; Um et al., 2010). Il a fallu attendre 2004 pour qu'un premier récepteur aux kisspeptines soit identifié chez un vertébré non mammifère, le tilapia, *Oreochromis niloticus* (Parhar et al., 2004), marquant ainsi le début de l'étude de ce gène chez des espèces non mammaliennes (pour revue : Akazome et al., 2010; Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012; Um et al., 2010).

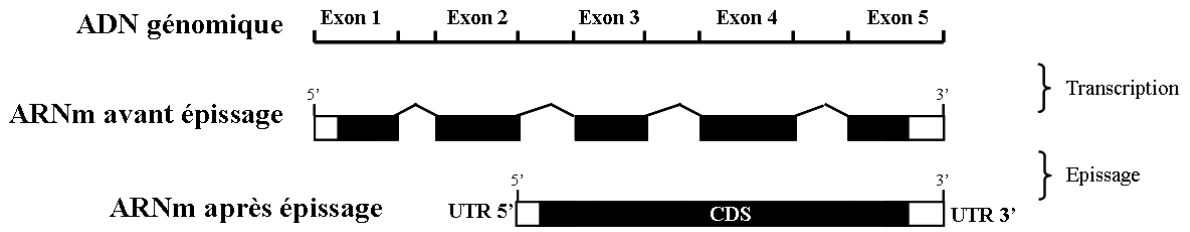
De plus, en 2008, un deuxième *Kissr* est cloné chez le poisson zèbre (Biran et al., 2008). Ce clonage a été suivi par la découverte d'un deuxième *Kissr* chez d'autres espèces de téléostéens comme le médaka (Lee et al., 2009), le poisson rouge (Li et al., 2009) et le bar rayé (Zmora et al., 2012). En 2009, Lee et collaborateurs ont cloné trois *Kissr* chez le xénope, i.e. *xtGPR54-1a*, *xtGPR54-1b* et *xtGPR54-2*. Comme pour les *Kiss*, le xénope était l'espèce présentant la plus grande diversité de *GPR54/Kissr*. Jusque là, aucun *Kissr* n'a été trouvé dans la lignée des oiseaux, ce qui renforce l'hypothèse d'une perte totale du sytème kisspeptine dans cette lignée de vertébrés (pour revues : Akazome et al., 2010; Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012; Um et al., 2010).

A l'heure actuelle, la classification et la dénomination des différents *GPR54/Kissr* restent très complexes, reflétant ainsi l'ambigüité des liens phylogénétiques entre les différents récepteurs.

2.2.2. Structure des récepteurs à la kisspeptine

a. Les gènes codant pour les Kissr

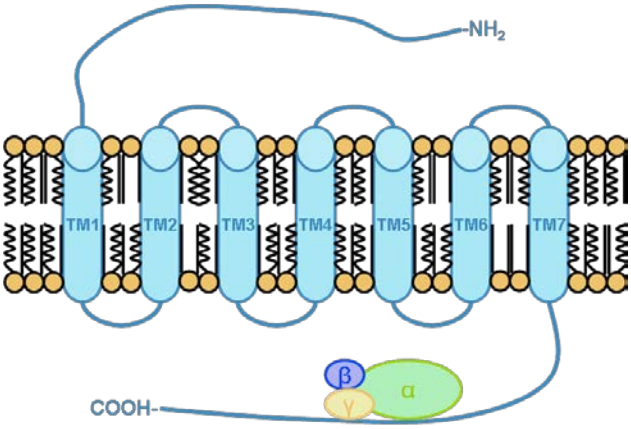
Les gènes codant pour les Kissr présentent une structure conservée de cinq exons et quatre introns (pour revue : Tena-Sempere et al., 2012) (Figure 3). Les tailles des exon-2 (125 pb), exon-3 (136 pb) et exon-4 (239 pb) semblent être conservées chez les vertébrés. Seules les tailles des exons 1 et 5, codant respectivement les extrémités N- et C-terminales du récepteur, semblent varier selon les espèces et les types de récepteurs.



<u>Figure 3</u> : Schéma de la structure nucléotidique générale du gène *Kissr* et de son transcrit.

Plusieurs épissages alternatifs ont été observés chez des téléostéens. Chez la sole sénégalaise (*Solea senegalensis*) qui ne présente qu'un gène codant pour Kissr, deux isoformes du transcrit de *Kissr* ont été clonées (Mechaly et al., 2009). Le premier transcrit présente une organisation classique comprenant les séquences des cinq exons à la suite alors que la séquence du deuxième transcrit correspond à la rétention de l'intron III (entre les exons 3 et 4) en plus des cinq exons. Cet intron de 81 a.a. n'entraine pas de changement de cadre de lecture, mais l'apparition précoce d'un codon stop qui se traduirait par un récepteur tronqué et non fonctionnel. Toutefois, selon les auteurs de l'étude, l'expression de ce récepteur tronqué pourrait permettre de réguler le système kisspeptine. Récemment, une étude a montré l'existence de quatre variants (nommés de KRBDP1 à KRBDP4) du transcrit de Kiss1rb chez le poisson zèbre, en plus de la forme classique (Kiss1rb) (Onuma and Duan, 2012). Ces variants correspondent à des délétions d'un ou plusieurs exons conduisant à des formes tronquées du récepteur. Parmi ces formes, KRBDP3 est localisée au niveau du noyau de la lignée cellulaire COS-7 ainsi que des noyaux de cellules embryonnaires. De plus, KRBDP3 présenterait une activité de transactivation en réponse à une stimulation par les Kp1(10) et Kp2(10) de poisson zèbre (Onuma and Duan, 2012).

b. Les récepteurs



<u>Figure 4</u> : Schéma de la structure tridimensionnelle de Kissr. TM : domaines transmembranaires ; α, β et γ : sous unité de la protéine G associée à Kissr.

En tant que GPCR membres de la famille des récepteurs à la rhodopsine, les Kissr présentent sept domaines transmembranaires (Figure 4) et trois sites de glycosylations à leurs extrémités N-terminales (Kotani et al., 2001; Moon et al., 2009; Muir et al., 2001; Nocillado et al., 2007). La taille des récepteurs s'échelonne entre 270 a.a. et 400 a.a. (pour revue : Lee et

al., 2009). La présence d'une cystéine conservée dans le domaine extracellulaire 2 et d'une autre dans le domaine extracellulaire 3 semble indiquer l'établissement d'un pont disulfure entre ces deux domaines communs aux GPCR (Nikiforovich et al., 2010). En tant que GPCR, Kissr est couplé à une protéine G et il a été montré que chez les mammifères Kiss1r était couplé à une protéine Gq/11 (pour revue : Gottsch et al., 2006). Jusqu'à présent, les protéines G couplées aux récepteurs de téléostéens n'ont pas été identifiées (pour revue : Tena-Sempere et al., 2012).

2.2.3. Localisation des récepteurs à la kisspeptine

Chez le rat, l'expression de *GPR54* a été observée dans différentes régions du cerveau (cerveau moyen, *thalamus*, *hypothalamus*, *hippocampus*, *amygdala*, cortex, cortex frontal et *striatum*), ainsi que dans le foie et l'intestin (Lee et al., 1999). Chez l'homme, *Kiss1r* est très exprimé dans le placenta, le cerveau, l'hypophyse, le pancréas et la moelle épinière (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001).

Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, les trois récepteurs présents sont tous détectés dans le cerveau et différentiellement dans les tissus périphériques (Lee et al., 2009). Les ARNm de *xtGPR54-1a* sont présents dans le cerveau antérieur, l'hypophyse, les testicules et l'intestin. Les ARNm de *xtGPR54-1b* sont trouvés dans le cerveau antérieur, le cerveau médian, les testicules et le foie et ceux de *xtGPR54-2* sont exprimés dans le cerveau antérieur, l'hypophyse et le cœur.

Chez le tilapia, *GPR54* est principalement exprimé dans le cerveau (Martinez-Chavez et al., 2008). Dans l'hypophyse, son expression est plus faible et proche de la limite de détection dans le cœur, le rein, le foie, les gonades et le muscle (Martinez-Chavez et al., 2008). Chez l'espèce *Pimephales promelas*, l'expression de *kiss1r* est observée seulement dans le cerveau et les gonades (Filby et al., 2008). Chez le poisson globe, *kiss1r* est très exprimé dans le télencéphale, le diencéphale, *l'optic tectum*, la rétine, l'hypophyse et les gonades, alors que de faibles niveaux sont détectés dans le *cerebellum* et la *medulla oblongata* (Shahjahan et al., 2010). Chez le poisson zèbre et le poisson rouge, qui possèdent chacun deux *Kissr*, une distribution tissulaire comparée a pu être entreprise. Chez le poisson zèbre, les deux types de récepteurs sont fortement exprimés dans toutes les parties du cerveau (Biran et al., 2008). Cependant, ils différent dans leurs niveaux d'expression en dehors du cerveau : seul *kiss1rb* est très exprimé dans la rate, les branchies, le rein, l'intestin, le pancréas, le tissu adipeux et l'hypophyse, alors que *kiss1ra* est observé dans les gonades (Biran et al., 2008). Chez le poisson rouge, de fortes expressions de *gfGPR54a* et *gfGPR54b* ont pu être détectées

dans les différentes régions cérébrales (télencéphale, *optic tectum*, thalamus, *cerebellum*, *medulla oblongata* et hypothalamus) (Li et al., 2009). Dans les tissus périphériques, *gfGPR54a* est seulement exprimé dans les gonades et le tissu adipeux, alors que *gfGPR54b* est détecté dans tous les tissus périphériques étudiés (foie, intestin, tissu adipeux, branchie, coeur, rein, ovaire, testicule) (Li et al., 2009).

Au niveau cérébral, l'expression du récepteur aux kisspeptines par des neurones à GnRH a été observée pour la première fois chez le tilapia, grâce à une technique de micro-dissection laser (Parhar et al., 2004). Ces neurones provenaient notamment de l'aire préoptique, la partie caudale des bulbes olfactifs et du mésencéphale. Depuis cette découverte historique, peu d'études se sont intéressées à l'étude de la neuroanatomie de l'expression des Kissr de téléostéens. Néanmoins, chez le poisson zèbre, les neurones exprimant *Kiss1r* sont principalement localisés dans la partie ventro-médiane de l'habénula où sont également localisés des neurones à *Kiss1* (Servili et al., 2011). Les neurones exprimant *Kiss2r* sont en revanche présents dans de nombreux noyaux cérébraux concentrés dans la partie antérieur du cerveau de poisson zèbre (Servili et al., 2011). Chez le bar rayé qui possède également deux récepteurs, *gpr54-1* et *gpr54-2*, l'expression de *gpr54-1* a été observée à proximité des neurones à GnRH1 dans la POA et *gpr54-2* a été trouvé exprimé dans ces mêmes neurones. L'expression de *gpr54-2* a également été recensée dans un grand nombre de noyaux de l'hypothalamus de cette espèce (Zmora et al., 2012).

La répartition de l'expression des récepteurs aux kisspeptines semble être dépendante de l'espèce étudiée. De plus, leurs larges répartitions dans le cerveau et les organes périphériques semblent indiquer un grand nombre de cibles pour le système kisspeptine et autant d'implications dans des fonctions variées.

3. Rôles du système kisspeptine

3.1. Rôles divers du système kisspeptine

3.1.1. Suppression des métastases

L'ARNm du kisspeptine a été identifié dans une lignée de cellules cancéreuses humaines aux capacités métastasiques réduites. A partir de cette lignée, Lee et collaborateurs ont pu isoler un nouveau cDNA qu'ils ont nommé *KiSS-1*, avec deux S majuscules qui signifient « Suppressor Sequence ». En effet, la transfection de ce cDNA dans des cellules de mélanomes C8161 supprime la survenue de métastases (Lee et al., 1996; Lee and Welch, 1997a). De même, la transfection du gène *KiSS-1* dans la lignée cellulaire humaine de carcinomes du sein (MDA-MB-435) réduit le potentiel métastasique de 95%, mais ne

supprime pas la tumorigénicité (Lee and Welch, 1997b). En 2001, deux études en parallèle ont montré que les produits de *KiSS-1*, Kp(10) et Kp(54) ou métastine, inhibent *in vitro* l'invasion des métastases en diminuant la mobilité des cellules cancéreuses (Hori et al., 2001; Ohtaki et al., 2001) ou en les empêchant de se fixer dans un nouvel environnement (Ohtaki et al., 2001).

De plus, une diminution de l'expression de kisspeptine a été observée dans les tumeurs primaires et métastasiques parmi une large variété de cancers (cancer de la vessie ; cancer du sein ; carcinome du trophoblaste, carcinome de l'endomètre, carcinome de l'œsophage, carcinome gastrique, mélanome, ostéosarcome, cancer de l'ovaire, cancer du pancréas; pour revue : Mead et al., 2007b). Une corrélation inverse entre le stade d'avancement des tumeurs et le taux d'expression de Kp(54) a été établie. L'expression de *Kissr* est également diminuée dans plusieurs type de cancers dont certains carcinomes (pour revue : Mead et al., 2007b).

3.1.2. Répression de l'invasion du trophoblaste chez les mammifères

Chez les mammifères, le trophoblaste est présent au tout début du développement embryonnaire. Au cours du premier trimestre de gestation, le trophoblaste est un tissue invasif qui permet à l'embryon de se fixer à la muqueuse utérine en réalisant notamment la nidation de l'œuf. Dès la première semaine, le trophoblaste assure un rôle nourricier de l'embryon jusqu'au troisième mois où il prend le nom de placenta.

Les premiers kisspeptines matures (Kp(54), Kp(13) et Kp(14)) ont été isolés à partir d'extraits de placentas humains (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001). Par la suite, grâce à des approches de PCR quantitative et de puce à ADN, les expressions de *Kiss-1* et de son récepteur ont été notamment localisées à l'interface foeto-maternel, au niveau du placenta et plus précocement au niveau du trophoblaste (Bilban et al., 2004; Janneau et al., 2002). Cela semble également indiquer un rôle du système kisspeptine en rapport avec le placenta au cours de la grossesse. De plus, les concentrations circulantes de kisspeptine augmentent au cours de la grossesse : de 940 fois au premier trimestre et jusqu'à 7000 fois au troisième trimestre (Horikoshi et al., 2003). Les concentrations reviennent à leur niveau d'avant grossesse 5 jours après l'accouchement, ce qui désigne le placenta comme source de kisspeptine.

De fortes expressions de *KiSS-1* et *KISS-1R* sont détectées dans les trophoblastes pendant la période d'invasion la plus intense, c'est-à-dire au premier trimestre de la grossesse. *In vitro*, Kp(10), mais pas Kp(13), Kp(14) et Kp(54), inhibe la migration et l'invasion des cellules du trophoblaste (Bilban et al., 2004). Le Kp(10) est également capable de réduire la

croissance et l'invasion d'explants de trophoblaste en culture, mais il n'affecte pas leur prolifération (Hiden et al., 2007). Ainsi de manière comparable à son rôle antimétastasique, kisspeptin permet de limiter l'invasion du trophoblaste ce qui en retour assure une placentation normale lors de la grossesse.

Les kisspeptines pourraient aussi avoir un rôle au moment de l'accouchement, car l'expression de *Kiss1* est plus forte dans des placentas d'accouchement avant terme qu'à terme (Torricelli et al., 2008).

Chez le rat, les transcrits de *KiSS-1* et de *Kissr* sont détectés dans les cellules géantes du trophoblaste au jour 12,5 embryonnaire, quand l'invasion est à son maximum (Terao et al., 2004). Pendant la maturation du placenta, les taux d'expression de ces deux transcrits déclinent graduellement jusqu'au jour 18,5 où ils ne sont plus détectables (Hiden et al., 2007).

3.1.3. Autres rôles

Etant donné la large répartition des expressions des *Kiss* et des *Kissr* chez les différents organismes, on peut attendre une grande variété de rôles dans lesquels pourrait être impliqué le système kisspeptine.

a. Rôle dans le pancréas

Les expressions de *Kiss1* et de son récepteur on été détectées dans le pancréas, chez l'humain (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001), et plus précisément au niveau des cellules α et β des ilôts de Langerhans (Hauge-Evans et al., 2006). Au niveau fonctionnel, des études contradictoires montrent un effet inhibiteur (Hauge-Evans et al., 2006; Silvestre et al., 2008; Vikman and Ahrén, 2009) ou stimulateur (Bowe et al., 2012; Bowe et al., 2009) de kisspeptine sur la sécrétion d'insuline basale ou stimulée par du glucose. Par conséquent, le système kisspeptine pourrait être impliqué dans des pathologies liées au diabète (Panidis et al., 2006).

Aucune étude n'a été menée sur le sujet chez les téléostéens bien que l'expression de *Kiss1rb* ait été détectée dans le pancréas de poisson zèbre (Biran et al., 2008).

b. Rôle cardiovasculaire

Etant donné que le diabète est très souvent associé à des pathologies cardiovasculaires et que les tumeurs métastasiques ou l'invasion du trophoblaste sont deux processus impliquant une angiogénèse, Mead et al (2007) ont émis l'hypothèse que les kisspeptines pourraient être impliqués dans le système cardio-vasculaire. Chez l'homme, *Kiss1* et *Kiss1r*

sont exprimés dans la musculature lisse associée à l'aorte, l'artère coronaire et la veine ombilicale (Mead et al., 2007a). De plus, Kp(10), Kp(13) et Kp(14) ont un effet vasoconstricteur sur des anneaux isolés d'artère coronaire et de veines ombilicales humaines (Mead et al., 2007a). Une distribution cardiovasculaire de la présence de Kiss1r a été faite chez l'homme et les rongeurs. Cette étude a montré une immunoréactivité dans des myocytes, des cellules des muscles lisses et dans des cellules endothéliales de vaisseaux sanguins intramyocardiaques (Maguire et al., 2011). Par ailleurs, deux rôles vasoactifs de Kp(10) ont été observés chez la souris (Sawyer et al., 2011).

Les effets du système kisspeptine n'ont jamais été étudiés chez d'autres groupes que les mammifères bien que *Kiss2* soit exprimé dans le cœur du médaka (Felip et al., 2009), *Kiss2* et *gfGPR54b* soient exprimés dans le cœur du poisson rouge (Li et al., 2009) et que les trois *Kiss* et *xtGPR54-2* soient également exprimés dans le cœur du xénope (Lee et al., 2009).

3.2. Rôle dans le contrôle neuroendocrinien de la reproduction

3.2.1. L'axe cerveau-hypophyse-gonade

Chez les vertébrés, le contrôle de la reproduction est assuré par l'axe cerveau-hypophyse-gonade (pour revues : (Charlton, 2008; Zohar et al., 2010) (figure 5). Dans cet axe, le cerveau intègre et centralise la majorité des stimuli externes et internes qui vont influer sur la fonction de reproduction. L'hypophyse joue un rôle de relai et d'amplificateur des signaux de communication entre le cerveau et les gonades. Les gonades, quant à elles, représentent le lieu de production des gamètes.

La communication entre les différents niveaux se fait par l'intermédiaire d'hormones ou de neurohormones. Parmi les neurohormones qui vont servir de messagers entre le cerveau et l'hypophyse, la « Gonadotropin Releasing Hormone » (GnRH) ou gonadolibérine est considérée comme l'acteur majeur permettant la reproduction (pour revue : (Charlton, 2008; Zohar et al., 2010). En effet, la GnRH stimule la production et la sécrétion des deux hormones gonadotropes, la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicle Stimulating Hormone). Chez les mammifères, les neurones à GnRH de l'hypothalamus projettent leurs axones vers l'éminence médiane, au niveau de laquelle ils libèrent la GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire qui lui-même achemine la neuro-hormone jusqu'aux cellules gonadotropes de l'adénohypophyse (pour revue : Charlton, 2008). Chez les téléostéens, ce système porte n'existe pas et les neurones à GnRH projettent directement leurs axones à proximité des cellules gonadotropes de la *Pars Proximal Distalis* (PPD) (pour revue : Zohar et al., 2010). De plus, chez certains vertébrés, le cerveau peut aussi agir sur les cellules

gonadotropes de l'hypophyse grâce à la dopamine (DA) (pour revues : Dufour et al., 2010; Trudeau et al., 2010; Zohar et al., 2010).

La LH et la FSH sont libérées dans la circulation sanguine générale afin de relayer l'information cérébrale en contrôlant le fonctionnement des gonades. L'activité des gonades inclut la production des gamètes (ou gamétogénèse) et la production d'hormones, stéroïdes sexuels (stéroïdogénèse) et peptides gonadiques.

Ces hormones, en particulier les stéroïdes, agissent sur les tissus cibles et exercent des rétrocontrôles sur le cerveau et l'hypophyse.

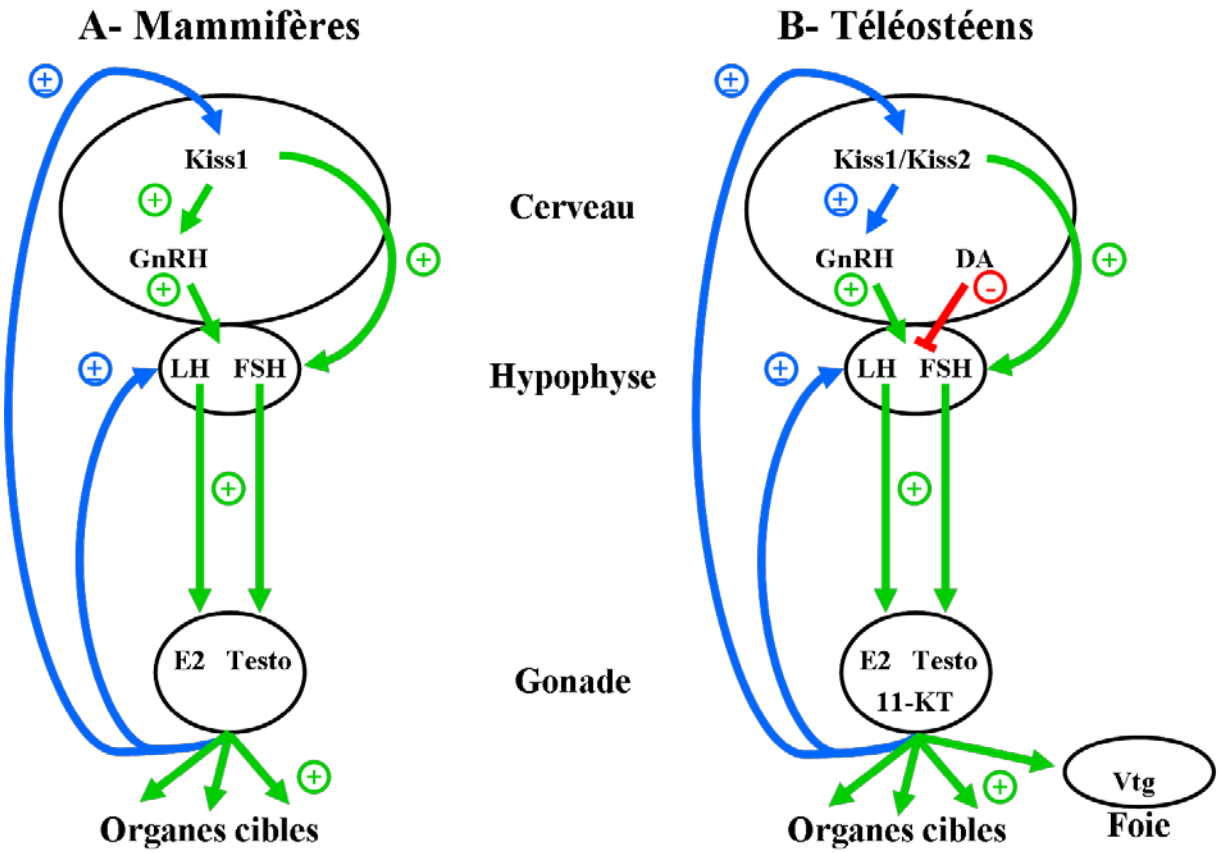


Figure 5 : Schéma des principaux acteurs de l'axe cerveau-hypophyse-gonades chez les mammifères (A) et chez les téléostéens (B). Les flèches vertes représentent des effets stimulateurs (+), les flèches rouges représentent des effets inhibiteurs (-) et les flèches bleues représentent de effet stimulateurs ou inhibiteurs selon le contexte (±). Kiss1 : gène codant les Kp1 ; Kiss1/Kiss2 : présence des gènes codant les Kp2 et chez certaines espèces présence du gène Kiss1 codant les Kp1 ; GnRH : gonadolibérine ; DA : dopamine ; LH : hormone lutéinisante ; FSH : hormone foliculo stimulante ; E2 : œstradiol ; Testo : testostérone ; 11-KT : 11-kétotéstostérone ; Vtg : vitellogénine.

a. Les GnRH

A l'heure actuelle, plus de 25 formes différentes de GnRH ont été décrites dont 14 sont présentes chez les vertébrés (pour revues : Kah et al., 2007; Tostivint, 2011). Les GnRH

de vertébrés se présentent sous la forme d'un petit peptide de 10 a.a. issu du clivage d'un précurseur, le prépro-GnRH. Bien que la structure des prépro-GnRH soit différente, les GnRH de chordés non-vertébrés se présentent aussi sous la forme d'un décapeptide (Adams et al., 2003). En revanche, les GnRH de protostomiens (mollusques : Bigot et al., 2012; Iwakoshi et al., 2002; Zhang et al., 2008b) ; et annélides : (Veenstra, 2010) se présentent sous la forme de peptides de 12 a.a. (Bigot et al., 2012; Tsai and Zhang, 2008). Parmi les protostomiens aucun homologue des GnRH n'a été clairement identifié chez les ecdyzozoaires. En revanche, les AKH (adipokinetic hormone) et corazonines présents chez ce phylum ont été rapprochés des GnRH (Lindemans et al., 2011).

D'un point de vue évolutif, la présence d'homologues des GnRH chez des protostomiens (mollusques et annélides), ainsi que chez des deutérostomiens (chordés), indique l'existence d'une GnRH chez l'ancêtre commun de ces deux *phyla*. Cela fait également des GnRH une des hormones les mieux conservées à travers les métazoaires.

Les récentes études de synténie, réalisées sur les GnRH de vertébrés, montrent que les 14 formes de GnRH se classent en trois types (Tostivint, 2011) :

- La GnRH de type 1 qui comprend plusieurs formes de GnRH dont la première forme identifiée chez les mammifères, la mGnRH (mammalian GnRH). Ce type de GnRH est exprimé principalement dans des neurones localisés dans le cerveau antérieur et qui envoient leurs axones en direction de l'éminence médiane. Ce GnRH joue un rôle majeur dans le système hypophysiotrope, gonadotrope.
- La GnRH de type 2 qui comprend une forme identifiée chez le poulet, *Gallus gallus* (chicken GnRH-II ou cGnRH-II) et retrouvée chez la majorité des vertébrés, ainsi qu'une forme identifiée chez la lamproie marine. Ce type est exprimé par des neurones localisés dans le mésencéphale rostral. La GnRH2 est exprimée chez les tétrapodes, la lamproie marine ainsi que chez tous les téléostéens étudiés à ce jour.
- La GnRH de type 3 ou sGnRH (salmon GnRH) est exprimée par des neurones localisés dans le cerveau antérieur de certains téléostéens uniquement. La GnRH3 participe aussi au contrôle hypophysiotrope chez ces espèces (pour revue : Oka, 2002).

Les effets des différentes GnRH sont spécifiquement modulés par l'intermédiaire de récepteurs à 7 domaines transmembranaires. C'est par l'intermédiaire de ces récepteurs que la GnRH (principalement mGnRH et sGnRH) va agir sur les cellules gonadotropes hypophysaires et induire la libération des gonadotropines.

b. La dopamine

La dopamine (DA) fait partie de la famille des catécholamines (CA). Les CA sont synthétisées à partir de la tyrosine. La DA, la noradrénaline et l'adrénaline sont les CA les plus abondantes dans le système nerveux central des vertébrés chez qui elles agissent en tant que neurotransmetteurs.

Chez certains téléostéens, le contrôle positif de la GnRH sur la synthèse et la libération des gonadotropines peut être contrebalancé par un contrôle négatif exercé par la DA. Cet effet inhibiteur de la DA a été montré pour la première fois chez le poisson rouge adulte (Chang and Peter, 1983a, b; Peter and Paulencu, 1980). Depuis, il a été mis en évidence chez d'autres téléostéens (pour revue : Dufour et al., 2010). La DA est capable d'inhiber la sécrétion basale ou induite de la LH, et ainsi de réguler les derniers stades de la gamétogénèse (maturation des ovocytes, ovulation et spermiation) chez les individus adultes. Son rôle inhibiteur sur les gonadotropines a également été décrit au moment de la puberté chez les juvéniles de certaines espèces (anguille européenne, *Anguilla anguilla* : Dufour et al., 1988; Vidal et al., 2004 ; mullet, *Mugil cephalus* : Aizen et al., 2005).

Cependant, l'intensité de ce rôle inhibiteur varie en fonction des espèces (pour revue : Dufour et al, 2010). De plus, chez certains téléostéens, comme par exemple chez le tambour brésilien *(Micropogonias undulatus*), aucune inhibition de la DA n'a été observé (Copeland and Thomas, 1989).

Les neurones dopaminergiques impliqués dans le contrôle de la fonction de reproduction ont été localisés dans le noyau préoptique antéro-ventral de l'aire préoptique (POA) chez le poisson rouge (Kah et al., 1984), la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Linard et al., 1996), et l'anguille européenne (Vidal et al., 2004). Ces neurones projettent leurs axones vers la PPD (Kah et al., 1987).

c. Les gonadotropines hypophysaires

La LH et la FSH appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques hypophysaires, au même titre que la thyrotropine (TSH pour Thyroid Stimulating Hormone) (Dos Santos et al., 2011). Chez les vertébrés, les hormones glycoprotéiques sont des protéines hétérodimériques constituées :

- d'une sous-unité α, commune à la FSH, LH et TSH d'une même espèce. Cette sous unité est également commune à la choriogonadotropine (CG) exprimée dans le placenta des primates et des équidés.

- d'une sous-unité β, spécifique de chacune des hormones glycoprotéiques ; c'est elle qui confère aux hormones leur spécificité d'action (pour revue : Combarnous et al., 2001).

C'est sous la forme hétérodimérique que les glycoprotéines peuvent se fixer à leurs récepteurs (pour revue : (Combarnous et al., 1997). L'association de la sous-unité α avec l'une des sous-unités β se fait de manière non covalente et la stabilité de l'hétérodimère ainsi formé est assuré par la région C-terminale de la sous unité β qui enserre la sous-unité α (Alvarez et al., 2009; Lapthorn et al., 1994).

La LH et la FSH sont produites et libérées par les cellules gonadotropes hypophysaires. Chez les mammifères, un même type cellulaire assume cette fonction alors que chez les téléostéens la LH et la FSH sont produites par deux types cellulaires différents (pour revue : Zohar et al., 2010).

Une fois dans la circulation sanguine ces hormones vont agir sur leur tissus cibles par l'intermédiaire de leurs récepteurs, FSHR et LHR, deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires (pour revue : Combarnous et al., 2001). Les gonades sont considérées comme les principaux tissus cibles de la LH et de la FSH. En effet, les gonadotropines vont induire la production et la maturation des gamètes (spermatozoïdes et ovules) ainsi que la synthèse et la libération de facteurs de stéroïdes sexuels.

d. Les stéroïdes sexuels

Les stéroïdes sexuels sont produits par les gonades à partir du cholestérol selon une chaîne de biosynthèse qui met en jeu un système enzymatique en cascade. Les trois classes principales de stéroïdes sexuels ainsi produits sont : les œstrogènes, les androgènes et les progestagènes.

Les progestagènes, dont la progestérone (P), sont les premiers produits de la chaine de biosynthèse. Ensuite sont produits les androgènes qui comprennent notamment la testostérone, la 11-kétotestostérone (11-KT, spécifique des téléostéens) et la 5α-dihydrotestostérone (DHT). Les œstrogènes, dont l'œstradiol (E2), sont les derniers produits de la chaîne et peuvent notamment être obtenus par aromatisation de la testostérone. La 11-KT et la DHT ne sont quant à elles pas aromatisables.

Au moment de la puberté, les stéroïdes sexuels agissent sur des tissus cibles présentant leurs récepteurs spécifiques afin d'induire notamment le développement des caractères sexuels secondaires. Chez les ovipares, les stéroïdes sexuels stimulent également la production de vitellogénine, une phospho-lipo-calcio-glycoprotéine de réserve produite par le

foie et incorporée par les ovocytes au cours de la vitellogénèse dite exogène (pour revue : Ho et al., 1982). Les stéroïdes sexuels exercent également des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur le cerveau et l'hypophyse (Burger et al., 2004; Dickey and Swanson, 1998; Gharib et al., 1990; Schmitz et al., 2005) (Figure 5).

3.2.2. Découverte du rôle du système kisspeptine dans la reproduction

L'hypogonadisme hypogonadotrope (HH) représente des pathologies liées à un dysfonctionnement de l'axe gonadotrope. Ce syndrome, dont les symptômes sont un faible taux de gonadotropines circulant, et en particulier une faible pulsatilité de la LH, se traduit par une puberté tardive ou dans les cas les plus graves par une absence de puberté et une incapacité à se reproduire. De nombreuses causes génétiques et moléculaires peuvent entrainer l'HH (pour revue : Bianco and Kaiser, 2009). Une majorité des patients atteints d'HH sont également anosmiques. L'association de ces symptômes est appelé syndrome de Kallmann et résulte d'une absence de migration des neurones des placodes olfactives au cours du développement embryonnaire. Ce sont dans ces placodes que se développent les neurones à GnRH-I. S'ils ne migrent pas jusque dans l'hypothalamus, ils ne peuvent pas jouer leur rôle dans l'axe hypothalamo-hypophysaire. D'autres causes peuvent être à l'origine de l'HH, notamment des mutations entrainant la perte de fonction du récepteur aux GnRH (pour revue : (Bianco and Kaiser, 2009).

En 2003, de nouvelles études réalisées sur des patients issus de la même famille et atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope (HH) ont montré que ces patients ne présentaient aucune mutation ni sur les gènes des récepteurs à la GnRH ni sur la GnRH elle-même (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Ces études ont également mis en évidence que les taux circulants des gonadotropines présentaient des constantes normales après traitements à la GnRH, démontrant ainsi que leur HH prenait sa source en amont du récepteur de la GnRH dans l'axe gonadotrope. Des analyses génétiques ont révélé que les patients présentaient une mutation homozygote sur le gène codant pour Kissr. Cette mutation entrainait la substitution d'une leucine^{148} en serine^{148} dans la séquence peptidique du récepteur. Ceci suggérait un rôle du système kisspeptine en amont du GnRH.

Des études menées en parallèle sur des souris présentant une mutation homozygote entrainant une perte de fonction du récepteur aux kisspeptines (GPR54-/-) ont révélé que ces souris mutées exprimaient un phénotype similaire à l'HH humain (Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). Ces souris présentaient des neurones à GnRH anatomiquement normaux, avec des projections vers l'éminence médiane, ce qui indiquait que

l'hypogonadisme des souris GPR54-/- n'était pas dû à une migration anormale des neurones à GnRH (Messager et al., 2005). Leurs contenus hypothalamiques en GnRH étaient également normaux, indiquant une synthèse normale de la GnRH. Des traitements à la GnRH ont induit une augmentation de la libération de LH indiquant que la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH était conservée. Etant donné les faibles concentrations circulantes en FSH et LH, la source de l'HH de ces souris se trouvait vraisemblablement au niveau de la libération de la GnRH (Seminara et al., 2003). Des injections de kisspeptine, à des concentrations stimulant fortement la libération de LH et FSH chez des souris sauvages, n'ont eu aucun effet sur les souris GPR54-/- (Messager et al., 2005). Ces études ont ainsi démontré une action directe de kisspeptine, via son récepteur, sur la libération de la GnRH.

A la suite de ces découvertes, d'autres modèles de mutation du système kisspeptine ont confirmé son rôle primordial dans la reproduction. En effet, la réalisation de souris double « Knock Out » (KO) pour le gène codant la kisspeptine a mené à l'observation de phénotypes similaires à ceux observés chez les souris GPR54-/- (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007; Lapatto et al., 2007). Chez l'homme, quelques cas de mutations activatrices de Kissr (Teles et al., 2008) et de Kiss (Silveira et al., 2010) ont été décrits ; ces mutations engendrent une puberté précoce. Topaloglu et collaborateurs ont récemment décrit un cas de mutation inactivatrice de Kiss1, résultant en un échec de la puberté (Topaloglu et al., 2012).

Cependant, malgré toutes ces preuves de l'implication du système kisspeptine dans le contrôle de la reproduction, une étude récente a rapporté une puberté normale chez des souris femelles ayant subit une ablation génétique de leurs neurones exprimant *Kiss1* (Mayer and Boehm, 2011). Les animaux étaient fertiles, même si leurs gonades étaient plus petites. Par contre, une ablation des neurones à kisspeptine chez des souris adultes a inhibé leur fertilité. Les auteurs ont conclu qu'il existerait une compensation de la perte des neurones exprimant *Kiss1*. Ces mécanismes de compensation apparaîtraient uniquement dans les phases précoces du développement et dans ce cas l'initiation et l'achèvement de la maturation sexuelle pourraient avoir lieu en l'absence du système kisspeptine (Mayer and Boehm, 2011). Etant donné que ces résultats sont en contradiction avec les études de souris mutantes « perte de fonction » ou KO pour Kiss ou son récepteur (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007; Funes et al., 2003; Lapatto et al., 2007; Messager et al., 2005; Seminara et al., 2003), les auteurs ont suggéré que ces différences pouvaient être dues à des souris ne partageant pas exactement le même fond génétique. Ils ont également rappelé que la perte d'une structure telle qu'un neurone est différente de la perte d'un gène (Mayer and Boehm, 2011). De plus, comme le propose Smith dans sa revue de 2012, l'ablation génétique rapportée dans cette publication

n'est peut-être pas complète, laissant un nombre limité mais suffisant de neurones exprimant kisspeptine pour induire la fertilité (Smith, 2012).

D'un point de vue évolutif, il serait toutes fois intéressant de rapprocher les résultats obtenus par Mayer et Boehm (2011) avec l'absence du système kisspeptine chez les oiseaux. Est-ce qu'au cours de l'évolution de ce groupe des mécanismes initialement compensatoires n'auraient pas pris le pas sur le système kisspeptine ?

3.2.3. Régulations des Kiss et Kissr au cours de la maturation sexuelle

Dès la découverte du rôle du système kisspeptine dans la reproduction et notamment l'entrée en puberté, les études ont porté sur le suivi de l'expression de Kiss et Kissr au moment de la puberté et au cours de la maturation sexuelle.

a. Chez les mammifères

Chez les rats mâle et femelle, Navarro et collaborateurs ont observé que l'expression hypothalamique de *Kiss-1* et *GPR54* était détectée pendant tout le développement post-natal, avec des niveaux maximaux au moment de la puberté (Navarro et al., 2004). De même, Han et al (2005) ont montré que l'expression de *Kiss1* augmentait fortement dans l'AVPV pendant la transition de juvénile à adulte (Han et al., 2005). Chez le singe (*Macaca mulatta*), une augmentation de l'expression de *Kiss-1* a été observée au moment de la puberté chez des mâles castrés et des femelles intactes, alors que l'expression de GPR54 restait la même (Shahab et al., 2005). Ces données renforcent la possible implication du système kisspeptine dans l'activation de l'axe gonadotrope à l'entrée en puberté chez les mammifères.

b. Chez les téléostéens

- Kiss

Chez le poisson-zèbre, Biran et al (2008) ont montré que chez la femelle, les niveaux en ARNm de *Kiss1* dans le cerveau augmentaient graduellement pendant les 2-8 premières semaines de vie pour présenter un pic à 12 semaines chez des poissons avec des follicules vitellogéniques matures. Chez cette même espèce, Kitahashi et al (2009) ont observé que les expressions de *Kiss1* et *Kiss2* augmentaient au début de la puberté et restaient élevées chez l'adulte.

Chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), l'expression de *Kiss2* est élevée chez les femelles vitellogéniques (Cowan et al., 2012).

Chez le poisson-globe, les niveaux en ARNm de *Kiss2* présentent un pic à la fois dans le cerveau et l'hypophyse chez les mâles matures et les femelles qui pondent (Shahjahan et al., 2010).

Chez le loup de mer, les niveaux en ARNm de *Kiss1* et *Kiss2* présentent des pics au début de la saison de ponte en Mars (Migaud et al., 2012).

Chez la sole sénégalaise femelle, l'expression de *Kiss2* est plus élevée pendant la saison de ponte, alors que chez le mâle, elle est plus forte vers la fin de l'hiver, juste avant la saison de ponte (Mechaly et al., 2012).

Chez le bar rayé, Zmora et al. (2012) ont récemment montré que l'expression de *Kiss1* et *Kiss2* était augmentée dans les cerveaux des poissons matures en comparaison de ceux de poissons juvéniles et prépubères.

Chez la femelle du maquereau (*Scomber japonicus*), l'expression cérébrale de *Kiss1* ne présente pas variation en fonction du stade de développement de l'ovaire, alors que celle de *Kiss2* décline graduellement du stade immature à la période après la ponte (Selvaraj et al., 2012; Selvaraj et al., 2010). Chez le mâle, les niveaux en ARNm des deux *Kiss* diminuent progressivement du stade immature à la spermiation, atteignant un niveau minimum pendant la période après la ponte (Selvaraj et al., 2010).

Chez les téléostéens, aucun profil général de régulation des kisspeptines ne semble se dégager au cours de la maturation sexuelle.

- Kissr

La première étude a été effectuée chez le tilapia en utilisant la technique de « laser-captured single-cell gene expression » (Parhar et al., 2004). Dans cette étude, *GPR54* était plus fortement exprimé (45-60%) par des neurones à GnRH1 and GnRH2 de poissons matures, que par des neurones de poissons immatures (5%).

Chez le mâle cobia (*Rachycentron canadum*), une augmentation des ARNm hypothalamiques de GPR54 est observée chez des poissons au début de la puberté (Mohamed et al., 2007).

Chez la femelle mullet, le début de la puberté est marquée par des niveaux plus élevés des transcrits de *GPR54*, qui baissent ensuite plus la puberté avance (Nocillado et al., 2007).

Chez l'espèce *Pimephales promelas*, Filby et al (2008) ont suivi l'expression hypothalamique de *kiss1r* et ils ont relié ses augmentations avec les étapes clés du développement des gonades chez les mâles et les femelles.

Chez les mâles et femelles tilapia, une augmentation de l'expression cérébrale de *GPR54* est observée avant l'apparition des ovocytes vitellogéniques et de la spermatogénèse active (Martinez-Chavez et al., 2008).

Chez le poisson-globe, les niveaux en ARNm de *kissr* dans le cerveau et l'hypophyse augmentent lors de la période de ponte (Shahjahan et al., 2010).

Chez le flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*), l'expression de *kissr* est plus forte pendant les stades de début de puberté en comparaison des autres stades (Mechaly et al., 2010).

Chez la sole mâle, l'expression de *Kiss2r* est diminue juste avant la saison de ponte. Chez la femelle, augmente fortement juste avant la saison de ponte (Mechaly et al., 2012).

Chez le loup de mer mâle, les niveaux de Kissr augmentent progressivement et présentent un pic pendant la spermatogénèse (Migaud et al., 2012).

Chez le poisson-zèbre, les deux récepteurs à kisspeptine présentent des profils d'expression cérébrale différents : l'expression de *kiss1ra* augmente vers la huitième semaine après fertilisation et décroît à 12 semaines, lorsque les gonades contiennent des ovocytes et spermatozoïdes bien développés ; au contraire, l'expression de *kiss1rb* présente un pic à 6 semaines et reste élevée jusqu'à 12 semaines (Biran et al., 2008).

Comme pour l'expression des kisspeptines, les profils d'expression des *Kissr* sont très variables d'une espèce de téléostéen à l'autre au cours de la maturation sexuelle.

3.2.4. Rétrocontrôles des stéroïdes sexuels

Il est établi que la libération de la GnRH et des gonadotropines est régulée, chez les deux sexes, par les stéroïdes sexuels via des rétrocontrôles positifs ou négatifs (Burger et al., 2004; Dickey and Swanson, 1998; Gharib et al., 1990; Schmitz et al., 2005). Qu'en est-il du système kisspeptine ?

a. Chez les mammifères

Les premières études menées sur l'influence des stéroïdes sexuels sur l'expression de *Kiss1* ont montré l'existence de rétrocontrôles stéroïdiens positifs. En effet, chez le rat les niveaux en ARNm de *Kiss1* augmentaient après orchidectomie des males (Irwig et al., 2004; Navarro et al., 2004) et ovariectomie des femelles (Navarro et al., 2004). A la suite de ces interventions, l'apport de stéroïdes, testostérone chez les mâles et oestradiol chez les femelles, a annulé l'augmentation observée (Navarro et al., 2004). L'expression de *Kiss1* dans l'ARC a également été régulée positivement par une ovariectomie chez le mouton (Smith et al., 2007;

Smith et al., 2008a), le porc (*Sus scrofa*) (Tomikawa et al., 2010) et le singe (Rometo et al., 2007). Comme chez le rat, un apport d'oestradiol était capable de prévenir cette augmentation chez ces trois espèces (Rometo et al., 2007; Smith et al., 2007; Smith et al., 2008a; Tomikawa et al., 2010). De plus chez le mouton, un apport de progestérone a également été capable d'inhiber l'expression de *Kiss1* après ovariectomie (Smith et al., 2008a). Dans l'hypophyse, l'expression de *Kiss1* diminue fortement chez des femelles rats ovariectomisées et une supplémentation en œstrogènes a permis de compenser cet effet (Richard et al., 2008). Un contrôle positif des œstrogènes a également été observé, *in vitro*, sur l'expression de *Kiss1* par des cellules hypophysaires de souris (Richard et al., 2008).

Par la suite, la coexistence de rétrocontrôles positifs et négatifs des stéroïdes sur l'expression de *Kiss1* a également été mise en évidence chez les mammifères. En effet, il a été montré, par hybridation *in situ*, que l'expression de *Kiss1* était régulée de façon différente selon les noyaux du cerveau antérieur (ARC et AVPV) chez la souris (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). Chez la femelle, l'expression de *Kiss1* augmente dans l'ARC alors qu'elle diminue dans l'AVPV après ovariectomie. L'apport d'œstrogènes a permis de contrebalancer les effets différentiels de l'ovariectomie sur l'expression de *Kiss1* dans chacun des deux noyaux (Smith et al., 2005a). Après castration, les mêmes régulations ont été obtenues chez le mâle. Ces régulations ont pu être compensées par un apport en testostérone (Smith et al., 2005b).

Il semblerait donc que chez les mammifères, l'expression de *Kiss1* soit soumis à l'influence des stéroïdes sexuels et que ces derniers exercent leur rétrocontrôles de manière positive ou négative selon les différentes populations de neurones exprimant *Kiss1* (pour revie : (Kanda and Oka, 2012).

L'expression de *Kiss1* est restée inchangée après traitement aux oestrogènes de souris ovariectomisées appartenant à une lignée KO pour le gène du récepteur α des œstrogènes (ERα). En revanche, l'expression de *Kiss1* a été régulée chez des souris KO-*ERβ* ovariectomisées et traitées aux œstrogènes (Smith et al., 2005a). De plus, il a été observé que presque tous les neurones exprimant *Kiss1* dans l'ARC et l'AVPV expriment aussi *ERα* (souris femelle: Clarkson et al., 2008; Smith et al., 2005a ; souris mâle : Smith et al., 2005b ; rat : Smith et al., 2006 ; mouton : Franceschini et al., 2006). Ces résultats ont fortement suggéré que les stéroïdes sexuels exercent leurs rétrocontrôles *via* ERα directement sur les neurones à Kiss1. Comme les neurones à GnRH n'expriment pas ERα, les auteurs ont émis l'hypothèse que ce sont les neurones à kisspeptine qui relaient les rétrocontrôles des stéroïdes

sexuels aux neurones à GnRH (Smith et al., 2005a). Chez le mouton, la plupart des neurones à Kiss1 expriment également le récepteur à la progestérone (Smith et al., 2008a) et chez la souris mâle, il y a coexpression de ERα et du récepteur aux androgènes (AR) dans les neurones à Kiss1 de l'ARC (Smith et al., 2005b).

b. Chez les téléostéens

Chez les téléostéens, l'influence des stéroïdes sexuels sur l'expression des kisspeptines a été beaucoup moins étudiée, et les recherches dans ce domaine se sont concentrées sur trois modèles, le médaka, le poisson zèbre et le poisson rouge. Globalement chez ces espèces, un effet positif des stéroïdes sexuels sur l'expression des kisspeptines a été observé.

Chez le médaka, l'expression de *kiss1* dans les neurones du noyau *ventralis tuberis* (NVT) a diminué après ovariectomie. L'apport d'œstrogène a permis de compenser cette diminution (Kanda et al., 2008; Kitahashi et al., 2009; Mitani et al., 2010). De plus, il a été montré que la 11-kétotestostérone, un androgène non-aromatisable en E2, n'a pas ce même effet. Cela suggérait que le rétrocontrôle devait être dû aux œstrogènes et leurs récepteurs (pour revue : Kanda and Oka, 2012). Une double hybridation *in situ* a permis de montrer que les neurones à Kiss1 du NVT exprimaient à la fois *ERα* et *ERβ* chez le médaka (Mitani et al., 2010). Chez le poisson-zèbre, l'administration d'œstradiol à des juvéniles a entrainé l'augmentation de l'expression de *kiss1, kiss2* et *gpr54-2* au niveau cérébral (Servili et al., 2011). Kanda et collaborateurs ont observé, chez un autre cyprinidé, le poisson rouge, que le nombre de neurones à Kiss2 diminuaient dans la POA après ovariectomie et que cette réduction était abolie par un implant d'œstrogène (Kanda et al., 2012). Bien que les rétrocontrôles observés, jusqu'à maintenant, chez les téléostéens soient positifs, ils ne concernent pas les mêmes composants du système kisspeptine selon les espèces (pour revue : Kanda and Oka, 2012).

3.2.5. Effets in vivo de traitements aux kisspeptines

Depuis la découverte de l'implication potentielle du système kisspeptine dans l'activation de l'axe cerveau-hypophyse-gonade en amont de la GnRH, de nombreuses études ont porté sur les effet *in vivo* de traitements aux kisspeptines ainsi que sur l'interaction entre le système kisspeptine et le système GnRH.

a. Chez les mammifères

Des injections intracérébroventriculaires ou systémiques (intrapéritonéales et intraveineuses) de kisspeptine sont capables de stimuler la libération de LH chez les rongeurs (rat: Irwig et al., 2004; Kinoshita et al., 2005; Matsui et al., 2004; Navarro et al., 2005a; Navarro et al., 2004; Patterson et al., 2006; Roa et al., 2006; Thompson et al., 2004; Tovar et al., 2006 ; souris: Gottsch et al., 2004), chez les ovins/bovins/caprins (mouton: Messager et al., 2005 ; génisse (*Bos taurus*) : Kadokawa et al., 2008 ; veau : Ezzat Ahmed et al., 2009 ; porc : Lents et al., 2008 ; chèvre (*Capra hircus*) : Hashizume et al., 2010; Saito et al., 2012), chez le singe (Plant et al., 2006; Seminara et al., 2006; Shahab et al., 2005) et chez l'humain: (Dhillo et al., 2005; George et al., 2011). Une stimulation de la libération de FSH peut également être observée après injection de kisspeptine (rat : Matsui et al., 2004; Navarro et al., 2005b; Roa et al., 2006; Thompson et al., 2004 ; human : Dhillo et al., 2005 ; porc: Lents et al., 2008 ; veau: Ezzat Ahmed et al., 2009). L'utilisation d'anticorps dirigés contre la kisspeptine bloque complètement le pic proestrien de LH (Kinoshita et al., 2005).

La stimulation de LH et FSH par la kisspeptine est observée chez des animaux prépubères, ainsi que des animaux adultes (rat : Navarro et al., 2004b; Navarro et al., 2004 ; chèvre : Saito et al., 2012), suggérant une implication de kisspeptine à la fois à la puberté et au moment de la reproduction. Cependant, plusieurs études ont montré une variation de la sensibilité de l'axe gonadotrope à la kisspeptine suivant les différents stades de la reproduction. La réponse de LH au traitement par la kisspeptine est plus importante pendant la phase préovulatoire du cycle menstruel chez la femme (Dhillo et al., 2007). Chez la ratte, Roa et al (2006) rapportent que l'effet de la kisspeptine sur LH est observé tout au long du cycle oestrien (avec un maximum à l'oestrus), alors que pour FSH il n'est présent qu'au diestrus. Chez les animaux saisonniers, la sensibilité de l'axe gonadotrope à la kisspeptine est également variable. Chez le mouton, les réponses de LH (Smith et al., 2009) et de GnRH (Li et al., 2011) à la kisspeptine sont plus fortes en dehors de la saison de reproduction. Pendant la saison de reproduction, la kisspeptine est plus efficace lors de la phase folliculaire tardive du cycle oestrien de la brebis (Smith et al., 2009). De la même manière, chez le hamster sibérien (*Phodopus sungorus*), les femelles en photopériode courte sont plus sensibles à un traitement à la kisspeptine que celles en photopériode longue (période de reproduction) (Mason et al., 2007). De plus, ces femelles ne sont plus sensibles à la kisspeptine à l'âge adulte, alors que les mâles le restent (Greives et al., 2011).

Depuis 2004, plusieurs études ont permis de mettre en évidence la stimulation des neurones à GnRH par la kisspeptine. L'augmentation de la sécrétion de LH et FSH, en

réponse à l'injection de kisspeptine(s), est inhibée par un prétraitement avec un antagoniste de la GnRH (rat: Irwig et al., 2004; Matsui et al., 2004 ; souris: Gottsch et al., 2004 ; singe: Shahab et al., 2005 ; hamster sibérien : Mason et al., 2007), ce qui démontre que l'effet stimulateur de kisspeptine sur LH passe bien par GnRH. Au niveau neuro-anatomique, les fibres immunoréactives à la kisspeptine projettent jusqu'aux neurones à GnRH (souris : Clarkson and Herbison, 2006 ; mouton : Smith et al., 2008a) et presque tous les neurones à GnRH expriment Kissr (rat : Han et al., 2005; Irwig et al., 2004 ; mouton : Smith et al., 2009). Cela suggère un effet direct des kisspeptines sur les neurones à GnRH. L'activation des neurones à GnRH est confirmée par l'induction de c-Fos dans les neurones à GnRH (Irwig et al., 2004; Matsui et al., 2004) et l'augmentation de GnRH dans le fluide cérébrospinal (mouton : Messager et al., 2005) après injections centrales de kisspeptine. L'utilisation de techniques d'électrophysiologie a également apporté des informations dans ce sens. En effet, il a été montré que la kisspeptine augmente directement l'excitabilité des neurones à GnRH. Chez les souris mâle et femelle adultes, la kisspeptine est capable d'induire une dépolarisation à long-terme des neurones à GnRH (Han et al., 2005). D'autres études ont ensuite permis d'approfondir les voies d'activation de ces neurones à GnRH par la kisspeptine (Liu et al., 2008; Pielecka-Fortuna et al., 2007; Quaynor et al., 2007; Zhang et al., 2008a).

a. Chez les téléostéens

Chez les téléostéens, peu d'études ont été menées sur les effets de traitements *in vivo* aux kisspeptines.

Une injection intrapéritonéale de Kp1(10) de souris à des individus de l'espèce *Pimephales promeleas*, au cours de leur puberté, a induit l'expression de *GnRH-3* et de *Kissr1* cérébrale (Filby et al., 2008). Chez le poisson-zèbre, l'administration intrapéritonéale de Kp2(10), mais pas de Kp1(10), a augmenté l'expression de *LHβ* et *FSHβ* dans l'hypophyse (Kitahashi et al., 2009). Chez le mérou à tâches oranges (*Epinephelus coioides*), l'injection intrapéritonéale de Kp2(10) a augmenté les niveaux de transcrits de *GnRH-1* dans l'hypothalamus et de *FSHβ* dans l'hypophyse (Shi et al., 2010).

Chez le poisson rouge, l'administration intrapéritonéale de kisspeptines homologues, à des femelles matures, a augmenté les concentrations plasmatiques en LH (Li et al., 2009). Chez le loup de mer, Felip et al. (2009) ont administré une injection intramusculaire de kisspeptines homologues chez des poissons prépubères et adultes et ils ont observé une meilleure efficacité de Kp2(10) par rapport à Kp1(10) vis-à-vis de la libération de LH et de FSH. Beck et collaborateurs (2012) ont récemment testé l'effet d'injections intramusculaires

de kisspeptine chez deux espèces de bar à différents stades de maturation sexuelle. Ils ont montré que kisspeptine pouvait médier l'initiation de la puberté chez le poisson et moduler la maturation gonadique (Beck et al., 2012).

3.2.6. Effets in vitro de traitements aux kisspeptines

L'action directe cérébrale a été étudiée uniquement chez les mammifères. Le Kp(10) humain est capable de stimuler la libération de GnRH par des explants hypothalamiques de rats (Thompson et al., 2004). De même, le traitement en perfusion de cellules neuronales GT1-7 par Kp(10) augmente l'amplitude et la durée du pic de GnRH (Quaynor et al., 2007). De plus, d'Anglemont de Tassigny et al. (2008) ont pu comparer l'effet d'un traitement à la kisspeptine sur des cultures organotypiques d'hypothalamus médiobasal (où se trouvent les fibres à GnRH) de souris sauvages et de souris GPR54-/- (d'Anglemont de Tassigny et al., 2008). Ils observent une induction de la libération de GnRH chez les souris sauvages, induction qui est absente chez les souris ne possédant pas de GPR54. Enfin, chez le mouton, un traitement à kisspeptine est capable de stimuler la libération de GnRH par des explants d'éminence médiane (Smith et al., 2011). Aucune étude de ce type n'a été réalisée chez des espèces non-mammaliennes. Ces études ont toutes montré un effet stimulateur des kisspeptines sur la libération de GnRH *in vitro*. Cet effet est également comparable aux résultats obtenus *in vivo*.

Les études *in vitro* sur l'action directe hypophysaire des kisspeptines ont principalement été menées sur des modèles mammifères mais également téléostéens. En effet, l'expression de *Kiss* et *Kissr* au niveau de l'hypophyse (mammifères : Gutiérrez-Pascual et al., 2007; Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001 ; téléostéens : Servili et al., 2011; Shahjahan et al., 2010) et plus précisément au niveau des cellules gonadotropes (rat : Richard et al., 2008 ; ovin: Smith et al., 2008b ; poisson rouge: Yang et al., 2010) suggérait un effet direct hypophysaire du système kisspeptine sur la LH et la FSH (pour revue : Richard et al., 2009).

Les premières études *in vitro* sur fragments d'hypophyse de rat mâles (Thompson et al., 2004) ou cellules hypophysaires dispersées (Matsui et al., 2004) n'ont montré aucun effet des différentes doses des kisspeptines sur la libération de LH et FSH. En revanche, en 2005, une stimulation de la libération de LH (Navarro et al., 2005a) et de FSH (Navarro et al., 2005b) par des hypophyses en culture sous l'effet de Kp(10) a été mise en évidence chez des rats puberts. Cette stimulation de la libération de LH a été confirmée chez des rats prépubères (Gutiérrez-Pascual et al., 2007). Cet effet direct stimulateur de kisspeptine a ensuite été

montré chez les bovins (Kadokawa et al., 2007; Suzuki et al., 2008), les porcins (Suzuki et al., 2008) et un primate, le babouin (*Papio anubis*) (Luque et al., 2011). Cette stimulation n'a été observée que chez des cellules hypophysaires de brebis en phase folliculaire du cycle oestrien (Smith et al., 2008b). Chez les téléostéens, seules des études sur le poisson rouge ont été effectuées et elles ont mené à des conclusions contradictoires. En effet, alors que deux d'entre elles ont montré un effet stimulateur de kisspeptine sur la libération (Chang et al., 2012; Yang et al., 2010) et l'expression (Yang et al., 2010) de LH, la troisième n'a enregistré aucun effet (Li et al., 2009).

L'effet direct des kisspeptines sur les cellules gonadotropes hypophysaires semble être dépendant de l'espèce et du stade de vie des individus étudiés. En raison d'un certain nombre d'études qui ont abouti à des résultats contradictoires, l'effet direct des kisspeptines sur l'hypophyse reste encore à l'heure actuelle controversé.

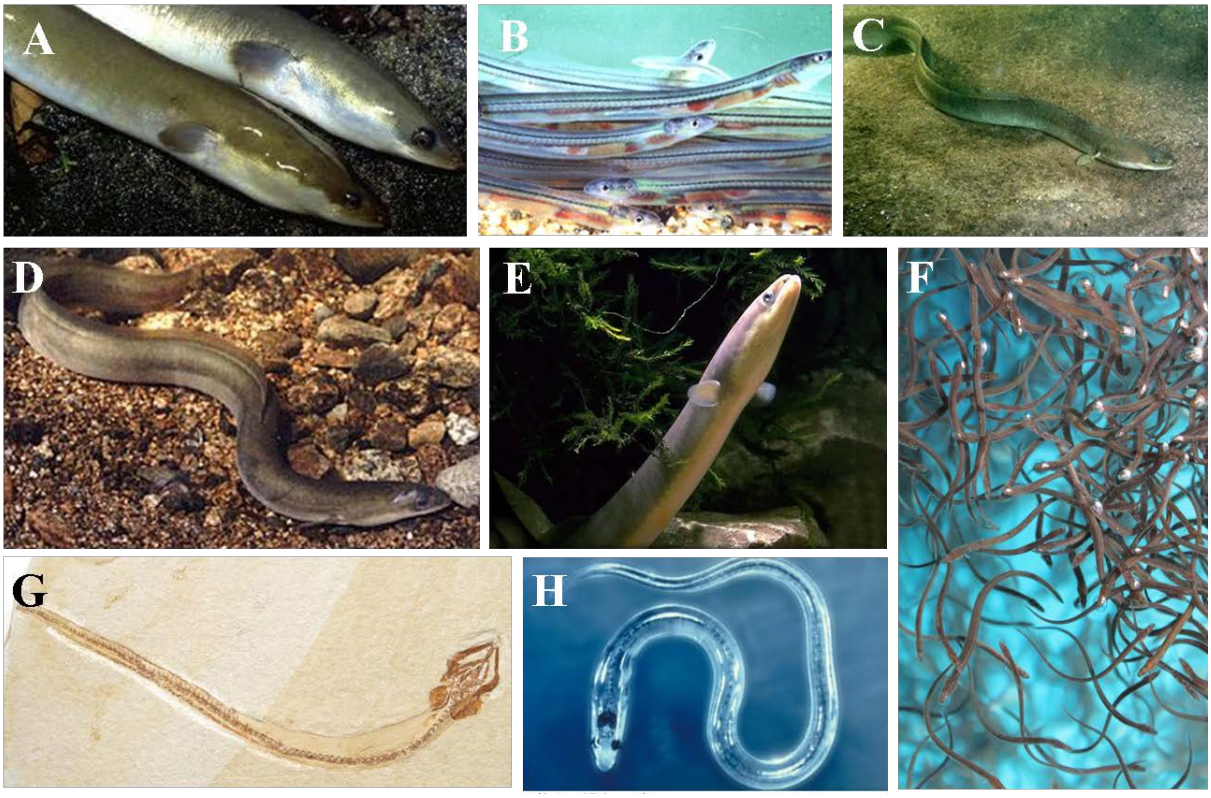


Figure 6 : Photos d'anguilles. (A) anguille argentée (haut) et anguille jaune (bas) ; (B) et (F) anguillettes ; (C), (D) et (E) anguilles jaunes ; (G) fossile d'anguille datant du crétacé et mis à jour au Liban ; (H) civelles transparente.

4. Problématique

L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'évolution du système kisspeptine à travers plusieurs modèles de vertébrés. Les études sur l'évolution phylogénétique des kisspeptines et

de leurs récepteurs ont pu être réalisées par l'analyse des génomes d'un certain nombre d'espèces occupant des positions clés dans la classification des vertébrés. Les études expérimentales ont été ciblées sur un modèle d'intérêt à la fois phylogénétique et physiologique, l'anguille européenne (Figure 6).

4.1. Modèle de l'anguille

4.1.1. Intérêt biologique de l'anguille

Figure 7 : Cycle biologique de l'anguille.

a. Le cycle de vie de l'anguille européenne

L'anguille européenne, *Anguilla anguilla*, est un actinoptérygien, téléostéen, élopomorphe, anguilliforme, anguillidé. C'est une espèce catadrome qui présente un développement indirect avec un stade larvaire dit leptocéphale, caractéristique des élopomorphes (Figure7). Les populations de cette espèce se répartissent le long des côtes et dans les hydrosystèmes européens et nord africains (Figure 8).

La ponte a lieu dans une région encore inconnue de la mer des Sargasses. Après l'éclosion, les larves, au stade leptocéphale, sont emportées par les grands courants océaniques jusqu'au talus continental (Kettle and Haines, 2006; Power and McCleave, 1983;

Schmidt, 1922). Cette migration de près de 6000 km est estimée durer de plusieurs mois à plus d'une année (Arai et al., 2000; Lecomte-Finiger, 1992).

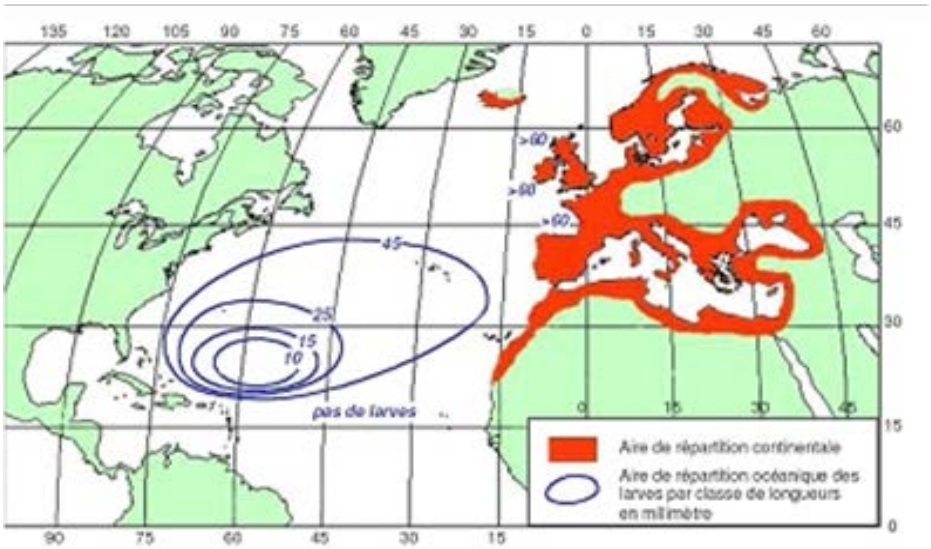


Figure 8 : Aire de répartition de l'anguille européenne (Anguilla anguilla). (Adam, 1997)

Une fois arrivées sur le plateau continental, les larves subissent une première métamorphose, dite larvaire, et deviennent des civelles transparentes (pour revue : Otake, 2003) (Figure 7). Ces civelles vont coloniser les eaux continentales douces ou saumâtres où elles vont peu à peu se développer et se pigmenter pour prendre le nom d'anguillettes. C'est à ce stade que va avoir lieu la différenciation sexuelle (Colombo et al., 1984).

Par la suite, les anguillettes vont se développer en anguilles jaunes, toujours à un stade juvénile (Figure 7). Cette période du cycle de vie de l'anguille correspond à une phase de croissance somatique et d'accumulation de réserves énergétiques en vue de la maturation sexuelle et de la migration vers la zone de frai océanique. C'est également à partir de ce stade que l'on peut observer un léger dimorphisme sexuel chez cette espèce. En effet, les femelles vont croitre durant sept à vingt ans et atteindre une taille supérieure à celle des mâles pour qui la croissance peut prendre de trois à dix ans.

La phase de croissance continentale se termine par une seconde métamorphose, appelée l'argenture (Figure 7). Cette métamorphose se traduit par de nombreux changements d'ordre morphologique (livrée argentée, augmentation du diamètre oculaire…), physiologique (développement des cellules à chlorure au niveau des branchies, épaississement de la vessie natatoire…) et comportemental (migration, entrée en jeûne et grégarisation) (pour revue : (Rousseau et al., 2011). Ces changements vont permettre de préparer les anguilles, non

seulement à affronter les différentes conditions environnementales rencontrées au cours de leur migration océanique (salinité, obscurité, hautes pressions) (Sébert et al., 2009) mais également les préparer à leur maturation sexuelle. A la différence de la métamorphose de la larve leptocéphale en civelle qui est sous le contrôle des hormones thyroïdiennes comme chez les amphibiens, les travaux réalisés au sein de notre équipe ont montré que l'argenture est principalement contrôlée par l'axe gonadotrope. L'argenture marque ainsi le début de la puberté chez l'anguille (Aroua et al., 2005). Au stade argenté, les anguilles femelles possèdent des ovocytes qui sont, selon les individus, en vitellogénèse dite « endogène » (stade « oil dropplet ») ou en début de vitellogénèse dite « exogène » (début d'incorporation de vitellogénine) (Aroua et al., 2005). A ce stade, le taux circulant de vitellogénine devient détectable (Aroua et al., 2005). Chez la majorité des mâles, les testicules contiennent des gonies, et chez certains quelque spermatocytes (pour revue : Dufour et al., 2003). L'argenture s'accompagne également d'une augmentation du taux plasmatique des stéroïdes sexuels chez les deux sexes (Aroua et al., 2005; Sbaihi et al., 2001). Le rapport gonadosomatique est de 1 à 2% chez les femelles et inférieur à 1% chez les mâles, des valeurs très inférieures à celles atteintes chez les anguilles après maturation expérimentale (de l'ordre de 40% chez les femelles et 10% chez les mâles). Tant que la migration océanique n'a pas lieu, les anguilles restent bloquées à ce stade pré-pubertaire (Figure 7). Jusqu'à maintenant, aucune anguille européenne mature n'a pu être observée dans son milieu naturel.

Ce cycle catadrome est commun aux 18 espèces d'anguilles décrites à ce jour (Minegishi et al., 2005). Cependant, le stade d'avancement de la puberté au moment du départ en mer peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, l'anguille japonaise, *Anguilla japonica*, subit un blocage pré-pubertaire moins fort que l'anguille européenne.

b. Maturation expérimentale de l'anguille

Un certain nombre d'études a cherché à reproduire en laboratoire les facteurs environnementaux qui pourraient influer sur la maturation sexuelle au cours de la migration et/ou à l'approche de la zone de frai (Palstra and van den Thillart, 2010; Sébert et al., 2007). Bien que ces études aient montré une influence de la pression hydrostatique (Sébert et al., 2007), de la nage (Palstra and van den Thillart, 2010; van Ginneken et al., 2007) etc, aucune d'entre elles n'a pour le moment permis d'obtenir des individus complètement matures.

En revanche, très tôt, des expériences ont tenté d'identifier les facteurs internes intervenant dans le processus de maturation. Les premiers travaux rendant compte d'une stimulation de la gamétogénèse chez l'anguille européenne ont été menés dans notre

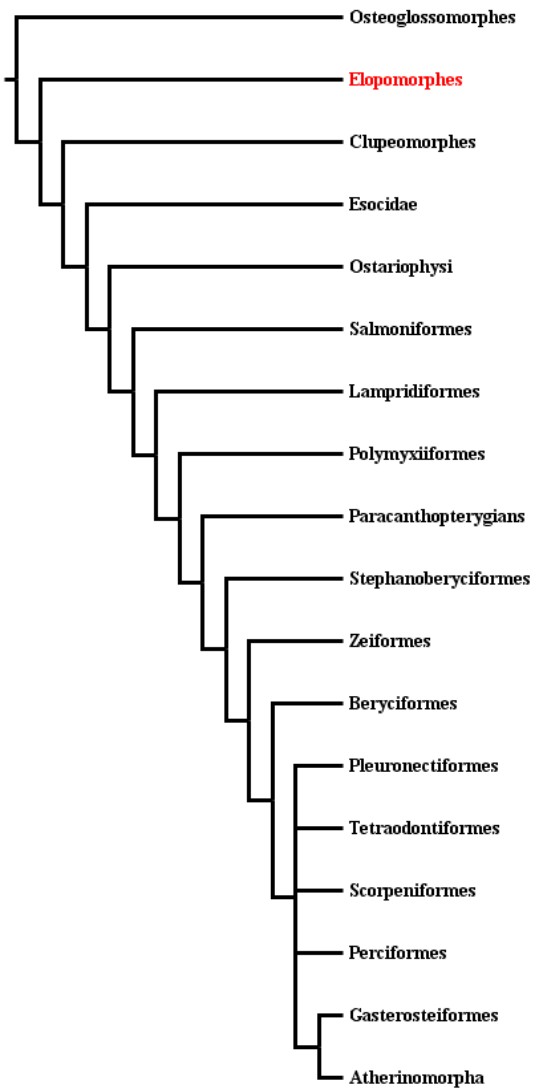
laboratoire sous la direction de Maurice Fontaine en 1936. Lors de ces expériences, après injection d'extraits d'urine de femmes enceintes à des anguilles mâles, la stimulation de spermatogénèse complète et l'émission de sperme ont été observées (Fontaine, 1936). Presque trente ans plus tard, le même groupe a réussi à induire, chez la femelle, la première maturation gonadique par injection d'extraits hypophysaires de carpe (Fontaine et al., 1964). Ces expériences ont donc suggéré que le blocage en pré-puberté des anguilles argentées n'était pas dû à un manque de sensibilité des gonades vis-à-vis des gonadotropines mais probablement à une déficience en gonadotropines circulantes. La mise au point de dosage radioimmunologiques de la LH (Dufour et al., 1983) et d'analyses par PCR quantitatives en temps réel de l'expression de la *LHβ* et de la *FSHβ* (Aroua et al., 2007) ont confirmé la faible expression de ces hormones chez les anguilles pré-pubères.

Figure 9 : Photos d'anguilles matures. (A) femelle (en haut) et mâle (en bas) en cours de maturation expérimentale ; (B) dissection d'une anguille mâle après maturation expérimentale, les testicules sont particulièrement développés ; (C) dissection d'une anguille femelle après maturation expérimentale, les ovaires occupent la majeure partie de la cavité corporelle.

Les expériences réalisées, par la suite dans notre équipe (Figure 9), se sont intéressées au rôle du contrôle cérébral dans cette déficience. Ces études ont notamment révélé que seul un double traitement avec un agoniste de GnRH et un anti-dopaminergique (le pimozide,

antagoniste des récepteurs de type D2) a pu stimuler la synthèse et la libération de LH, induisant ainsi la vitellogénèse (Dufour et al., 1988; Vidal et al., 2004). Il semblerait donc que l'arrêt de la maturation sexuelle des anguilles en pré-puberté résulte d'un double blocage cérébral dû à un manque de stimulation par la GnRH et une inhibition par la DA. Il s'agit de la plus forte inhibition dopaminergique décrite chez un téléostéen.

L'identification d'acteurs de l'axe cerveau-hypophyse-gonade, agissant en amont du double contrôle GnRH/DA, pourrait permettre de développer de nouvelles techniques de maturations expérimentales. Ces avancées permettraient d'améliorer la qualité des gamètes produites par les géniteurs, ce qui représente à l'heure actuelle l'un des facteurs limitants du processus de reproduction de l'anguille européenne en milieu contrôlé.



<u>Figure 10</u> : Classification phylogénétique des téléostéens. Le groupe des élopomorphes dont fait partie l'anguille européenne et indiqué en rouge (selon Lecointre et Le Guyader, 2001, éd. Belin)**.**

4.1.2. Intérêt phylogénétique des élopomorphes

Les élopomorphes, dont font partie les différentes espèces d'anguilles, forment un des groupes monophylétiques situés à la base de la classification des téléostéens (Figure 10). Du fait de cette position particulière, certains caractères, ou mécanismes physiologiques, mis en évidence chez l'anguille seraient susceptibles de refléter un état ancestral chez les téléostéens. C'est pourquoi, en plus de l'intérêt physiologique dû à son cycle de vie atypique, l'anguille présente un intérêt dans la compréhension de l'évolution des mécanismes liés aux grandes fonctions telles que la reproduction.

4.2. Génomes d'intérêt phylogénétique

Afin de mieux comprendre l'évolution de systèmes tels que celui des Kiss et des Kissr, il est impératif de prendre en compte les grands événements génomiques intervenus au cours de l'histoire des vertébrés. Parmi ces événements, il est important de citer les deux duplications génomiques globales (1R et 2R) survenues au début de la radiation des vertébrés (Dehal and Boore, 2005; Van de Peer et al., 2010) ainsi que la troisième duplication génomique globale (3R) propre aux téléostéens (Kasahara et al., 2007; Meyer and Van de Peer, 2005). La 1R et la 2R ont chacune entrainé le doublement du matériel génétique des ancêtres des vertébrés modernes et la 3R a permis le doublement du matériel génétique de l'ancêtre commun des téléostéens. Cela se traduit, dans les génomes actuels, par l'existence de familles géniques présentant jusqu'à quatre membres distincts chez la plupart des vertébrés, et jusqu'à huit membres chez les téléostéens (Dehal and Boore, 2005; Dos Santos et al., 2011; Henkel et al., 2012; Kasahara et al., 2007; Meyer and Van de Peer, 2005; Van de Peer et al., 2010).

Récemment, le génome de l'anguille européenne a été séquencé, partiellement assemblé et les bases de données ainsi générées ont été publiées (Henkel et al., 2012). Etant donné l'intérêt phylogénétique de l'anguille par rapport aux téléostéens et à la 3R, les données génomiques de l'anguille représentent un puissant outil dans l'étude de la conservation de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions, incluant celle de la reproduction.

Au même titre que pour l'anguille, plusieurs autres génomes appartenant à des espèces d'intérêt phylogénétique ont récemment été publiés. Parmi ces génomes, se trouvent ceux d'un cyclostome, la lamproie marine (*Petromyzon marinus*), d'un chondrichtyen, la chimère (*Callorhinchus milii*), d'un sarcoptérygien basal, le cœlacanthe (*Latimeria chalumnae*), et d'un actinoptérygien non-téléostéen, le lépisostée tacheté (*Lepisosteus oculatus*). Du fait de la

position occupée par les espèces dont ils sont issus, ces génomes représentent la clé de la compréhension de l'impact de la 1R et de la 2R dans l'histoire évolutive des Kiss et des Kissr.

Afin de mieux appréhender les différents processus de perte et de conservations des Kiss et des Kissr, nous avons également considéré les génomes suivants : de l'homme *(Homo sapiens*), en tant que représentant des euthériens, de l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*), en tant que représentant des protothériens, du lézard (*Anolis carolinensis*), en tant que représentant des sauriens, du poulet (*Gallus gallus*), en tant que représentant des oiseaux, du xénope (*Xenopus tropicalis*), en tant que représentant des amphibiens, du poisson zèbre (*Danio rerio*), du médaka (*Orysias latipes*), de l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) et du poisson globe (*Tetraodon nigroviridis*), en tant que représentants de différents groupes de téléostéens (Figure 11).

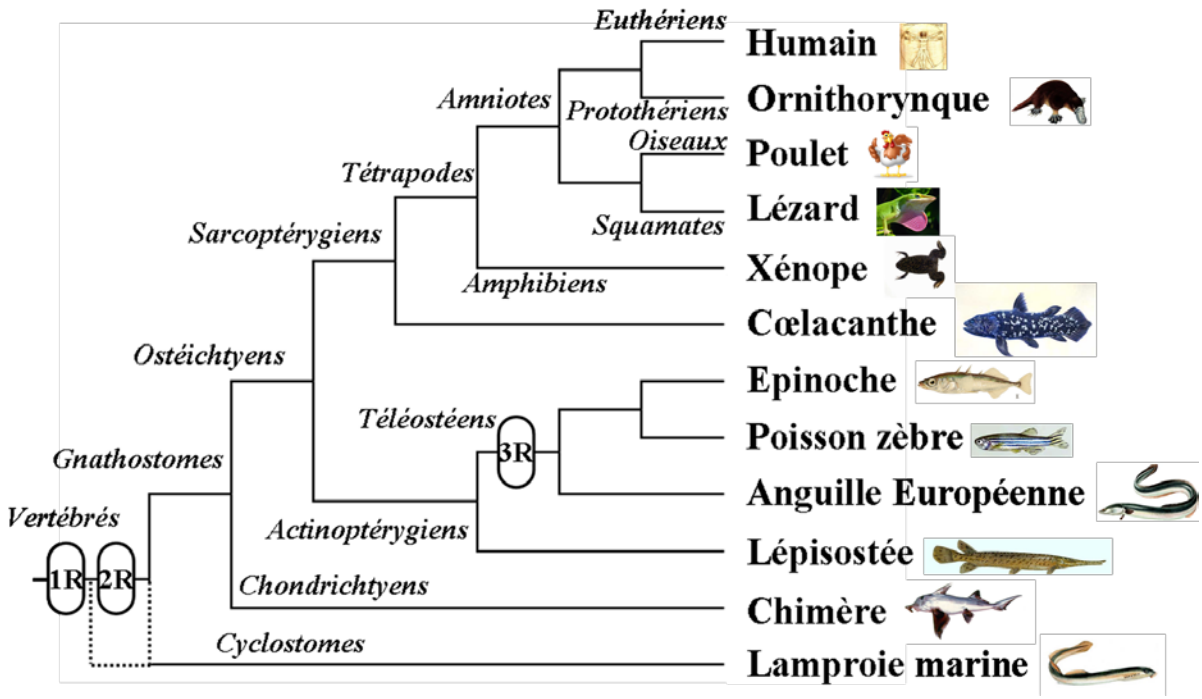


Figure 11 : Classification simplifiée des vertébrés. Les noms en italique indiquent le nom du groupe monophylétique qui s'applique au nœud ou à la branche la plus proche. En bout de branches terminales, sont indiqués les noms vernaculaires des espèces représentatives des groupes de vertébrés que nous avons pris comme modèle au cours de cette thèse. 1R : première duplication génomique globale chez les vertébrés ; 2R : deuxième duplication génomique globale chez les vertébrés ; 3R : duplication génomique globale propre aux téléostéens.

4.3. Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse a été d'étudier le système kisspeptine d'un point de vue à la fois évolutif et physiologique.

En s'appuyant sur la publication de nouveaux génomes d'espèces qui occupent des positions clés dans la classification des vertébrés, nous avons cherché à réévaluer la diversité des Kiss et des Kissr au sein de ce phylum.

Toujours en se basant sur des génomes d'espèces clés dans la classification des vertébrés, nous avons analysé les relations phylogénétiques, au sein des deux familles de gènes, *Kiss* et *Kissr*, afin de retracer leurs histoires évolutives.

En raison du grand nombre d'appellations qui coexistaient jusqu'à présent pour les Kiss ainsi que pour les Kissr, et des confusions que cela pouvait engendrer, nous avons revisité la classification de chacune de ces deux familles, afin de proposer une nomenclature simplifiée basée sur des critères phylogénétiques.

Un nombre croissant de travaux montre que le système kisspeptine peut jouer un rôle clé dans la fonction de reproduction des vertébrés. Nous avons donc abordé l'étude de ce système chez l'anguille européenne dont l'un des enjeux majeurs est l'identification de nouveaux facteurs intervenant dans la levée de son blocage pré-pubertaire.

L'anguille ayant révélé un système kisspeptine multiple, nous avons choisi de l'utiliser comme modèle pour aborder la question des mécanismes évolutifs mis en œuvre dans la conservation de plusieurs *Kiss* ou *Kissr* chez une même espèce.

Plus largement, la comparaison de l'histoire évolutive des *Kiss* avec celle des *Kissr* a permis d'envisager l'évolution du système kisspeptine dans son ensemble et de suggérer son rôle potentiel chez l'ancêtre commun des vertébrés.

Chapitre2

Matériels et Méthodes

1. Expérimentations *in vivo*

1.1. Provenance des animaux

Les maturations expérimentales ont été réalisées par deux de nos collaborateurs basés respectivement au Danemark, dans le cadre du projet européen Pro-Eel, et à Taïwan, dans le cadre de l'ANR Puberteel. Les anguilles européennes, *Anguilla anguilla*, utilisées dans cette étude proviennent de la ferme aquacole de Lyksvad, à Vamdrup au Danemark. Les anguilles japonaises, *Anguilla japonica*, utilisées ont été achetées à une ferme aquacole et gardées dans les installations de recherche du Département d'Aquaculture de l'Université Technique de Kaohsiung, Taïwan. Les individus utilisés dans ces expériences correspondent tous à des femelles au stade argenté.

1.2. Traitements gonadotropes

Pour chacun des deux protocoles impliquant les deux espèces d'anguilles, les individus ont été répartis en deux groupes : un groupe contrôle et un groupe traité.

Les anguilles européennes ont été gardées en eau de mer (36‰) et injectées de manière hebdomadaire avec des extraits hypophysaires de saumon durant quatre mois, afin d'induire la vitellogénèse. Ce traitement s'est achevé avec une injection de dihydroxy-progestérone, afin d'induire la ponte.

Les anguilles japonaises ont été gardées en eau douce et injectées de manière hebdomadaire avec des extraits hypophysaires de poisson chat durant 17 semaines.

Les anguilles des groupes contrôles ont été injectées de manière hebdomadaire avec une solution saline durant la période correspondant à leur espèce.

1.3. Prélèvement des organes

A la fin des expériences de maturation, les anguilles des groupes traités et des groupes contrôles ont été sacrifiées par décapitation. Le cerveau, l'hypophyse et les ovaires ont ensuite été prélevés et stockés dans du RNAlater à -20°C.

2. Expérimentations *in vitro*

2.1. Provenance des animaux

Les anguilles européennes utilisées pour les études *in vitro* ont été achetées à Gebr. Dil import-export B.V. basé à Akersloot en Hollande. Elles ont ensuite été maintenues dans des bacs continuellement renouvelés en eau douce du robinet.

2.2. Cultures primaires de cellules hypophysaires

Après décapitation, les hypophyses ont été prélevées et soumises à une méthode de dispersion enzymatique et mécanique mise au point par Montero et al (Montero et al., 1996). En résumé, les hypophyses ont été coupées en morceaux, puis incubées à 25°C dans une solution de trypsine facilitant la dissociation des cellules hypophysaires. Après arrêt de la réaction enzymatique, les hypophyses ont été soumises à une dispersion mécanique. Après estimation du nombre de cellules et de leur viabilité par un test de Bleu Trypan, les cellules ont été déposées à une densité variant de 50000 à 62500 cellules/puits, dans des boîtes de cultures de 96 puits prétraitées à la poly-L-lysine, permettant l'adhésion des cellules au fond des puits. Les cellules ont été incubées dans un milieu de culture M199 (contenant sels de Earle et bicarbonate de sodium) auquel ont été préalablement ajoutés pénicilline, streptomycine et fungizone (Gibco/Invitrogen). Les cultures ont été maintenues à 18°C sous une atmosphère saturée en humidité et à 3% de CO_2.

2.3. Traitement des cellules

Les différents kisspeptines utilisés ont été repris dans de l'eau ultra-pure. Par la suite, des solutions stock ont été préparées à une concentration de 10^{-4}M, pour chaque peptide, et stockées à -20°C. Des solutions intermédiaires ont été préparées, avant chaque traitement, par dilution des solutions stock dans le milieu de culture. Les concentrations finales testées dans les puits de culture étaient comprises entre 10^{-6}M et 10^{-10}M. Les puits contrôles ont été traités avec de l'eau ultra-pure. Les milieux de culture et traitements ont été renouvelés tous les 3 jours. Les cultures ont été arrêtées après différents temps, entre 24h et 13 jours. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit Cell-to-cDNA II Kit (Ambion Inc.) en suivant les indications du fournisseur.

3. Distributions tissulaires

3.1. Provenance des animaux

Les anguilles utilisées pour les distributions tissulaires ont été achetées au marché International de Rungis en France. Elles ont ensuite été maintenues dans des bacs continuellement renouvelés en eau douce du robinet.

3.2. Prélèvement des organes

Après une semaine de stabulation, huit anguilles femelles argentées ont été sacrifiées par décapitation. Le cerveau a été prélevé et disséqué en cinq parties : les bulbes olfactifs, le

télencéphale, le di-/mésencéphale, le cervelet et la moelle allongée (Figure 12). L'hypophyse, la rétine, les ovaires, le foie, une portion du tube digestif, du tissu adipeux, du rein, la rate et du muscle ont été également prélevés. Les testicules de huit mâles ont également été prélevés. Tous les tissus ont ensuite été stockés dans du RNAlater à -20°C. Les ARN totaux ont été extraits au Trizol Reagent selon les recommandations du fournisseur.

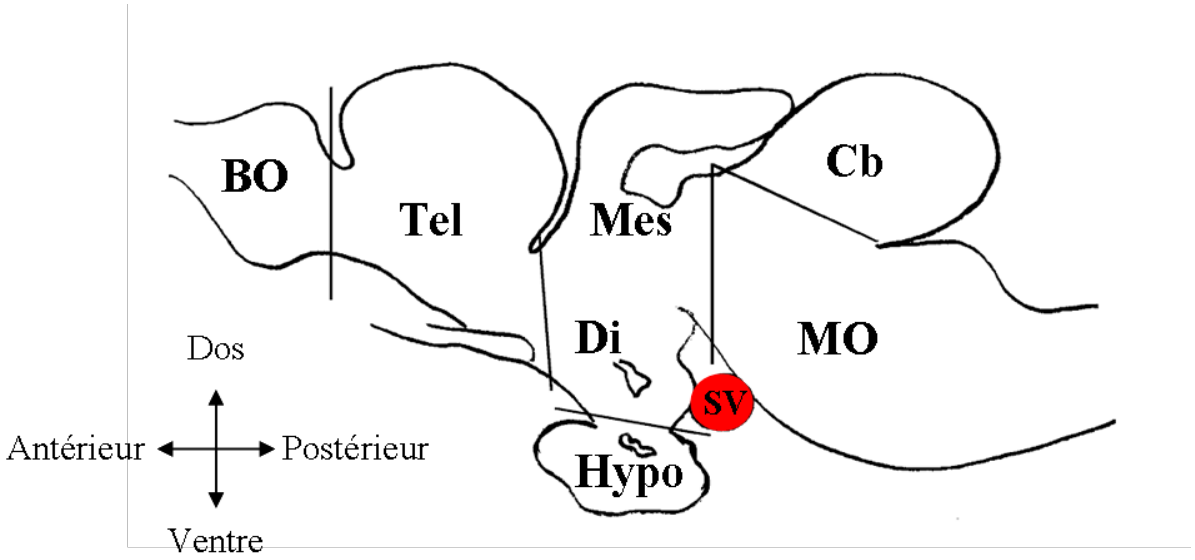


Figure 12 : Schéma d'une coupe longitudinale de cerveau d'anguille. Les trais entre les différents lobes du cerveau représentent les plan de coupe lors des dissections. Les ARN des différentes parties du cerveau ainsi obtenues ont été extraits et utilisés pour la détermination de la distribution tissulaire des *Kiss* et des *Kissr*. BO : bulbes olfactifs ; Tel : télencéphale ; Mes : mésencéphale ; Di : diencéphale ; Cb : *cerebelum* ; MO : *medula oblongata* ; Hypo : hypophyse ; SV : sac vasculaire

4. Clonages

4.1. Séquençage des ARNm codant *Kissr-2*, *Kiss2* et *Kiss1*

Les ARN totaux, extraits de la partie antérieure du cerveau d'anguille, ont été rétro-transcrits grâce au kit SMART™ RACE cDNA amplification Kit (Clontech), afin de pouvoir réaliser des PCR RACE sur l'ADNc obtenu. Les séquences d'ADNc, codant pour *Kissr-2*, *Kiss2* et *Kiss1*, ont été ensuite obtenues par la méthode de PCR RACE (Rapid Amplification of the cDNA Ends) en utilisant le kit Advantage® 2 PCR Kit (clontech).

- 3'RACE : les ADNc sont synthétisés à l'aide d'amorces oligo(dT) modifiées (3'RACE CDS Primer A) fournies dans le kit SMART™ RACE cRNA amplification (Clontech Laboratories Inc.). Puis, ces ADNc spécifiques de la RACE en 3' sont utilisés comme matrice pour l'amplification par PCR en présence de deux amorces. La première amorce est spécifique du gène d'intérêt, alors que la seconde amorce est universelle (UPM), car elle est

complémentaire de la séquence ajoutée par le 3'RACE CDS Primer A lors de la rétro-transcription des ARN.

- 5'RACE : les ADNc sont synthétisés à l'aide d'amorces oligo(dT) modifiées (5'RACE CDS Primer) et de l'oligo SMART II A relié à l'extrémité 5' de l'ARN (Clontech Laboratories Inc.). Puis, ces ADNc spécifiques de la RACE en 5' sont utilisés comme matrice pour l'amplification par PCR en présence de deux amorces. La première amorce est spécifique du gène d'intérêt, alors que la seconde amorce est universelle (UPM), car elle est complémentaire de la séquence ajoutée par le 5'RACE CDS Primer lors de la rétro-transcription des ARN.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume final de 50µl incubé dans un thermocycleur Conventional PCR 1988, BIO-RAD. Les produits des PCR RACE sont envoyés pour séquençage à la compagnie GATC.

4.2. Séquençage des ARNm codant *Kissr-1* et *Kissr-3*

Les ARN totaux, extraits de la partie antérieure du cerveau d'anguille, ont été rétro-transcrits grâce à la transcriptase inverse Super-Script III (Roche), afin de pouvoir réaliser des PCR classiques sur l'ADNc obtenu.

Les séquences d'ADNc, codant pour *Kissr-1* et *Kissr-3,* ont été obtenues par PCR classique en utilisant le kit Go-Taq (ProMega).

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume final de 50µl incubé dans un thermocycleur Conventional PCR 1988, BIO-RAD. Les produits des PCR RACE sont envoyés pour séquençage à la compagnie GATC.

5. Dosage par PCR quantitative en temps réel

L'expression de gènes (*Kissr-1, Kissr-2, Kissr-3, Kiss1, Kiss2, LHβ, FSHβ, TSHβ, GPα* et *actine-β*) a été mesurée par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Cette méthode permet de quantifier, tout au long de la chaine d'amplification, la quantité d'acide nucléique présente dans l'échantillon et donc d'évaluer le niveau d'expression d'un gène cible dans un tissu donné.

Après synthèse de l'ADNc simple brin au cours de la rétro-transcription des ARN, et grâce à des amorces spécifiques, le gène cible est amplifié et quantifié par qPCR. Les réactions sont réalisées avec le kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche). A chaque cycle de la réaction d'amplification, la quantité d'ADNc formée peut être suivie grâce à l'utilisation d'un intercalant fluorescent, le SYBR green. Une fois lié à l'ADN

double brin, il émet une lumière fluorescente détectée par le spectrofluorimètre intégré au thermocycleur. La quantité de lumière détectée est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé. La concentration en ARNm peut donc être calculée, elle est inversement proportionnelle au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre le seuil de détection de fluorescence. L'expression du gène cible est comparée à celle d'un gène de référence, l'*actine-β*.

6. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± SEM. Les moyennes ont été comparées grâce à un test-*t* de Student ou bien une ANOVA simple suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunn. Ces tests ont été réalisés en utilisant le logiciel de statistique Instat (GraphPad Software Inc., San Diego, Californie, USA).

7. Analyse de bases de données moléculaires

Afin de pouvoir comparer les différents *Kiss* entre eux et les différents *Kissr* entre eux, nous avons recherché les séquences nucléotidiques et peptidiques des deux composants du système kisspeptine dans les bases de données de NCBI, ENSEMBL et UCSC Genome Bioinformatics, toutes trois disponibles en ligne. Nous avons également utilisé les bases de données génomiques de l'anguille européenne qui sont disponibles depuis 2012 sur le site http://www.zfgenomics.org/sub/eel.

8. Analyses phylogénétiques

Afin de déterminer les relations phylogénétiques unissant les différents Kissr, d'une part, et les différents Kiss, d'autre part, nous avons réalisé des reconstructions phylogénétiques de ces deux familles de gènes en utilisant à chaque fois un maximum de séquences peptidiques pour chacune des familles. Nous avons utilisé la méthode de maximum de vraisemblance avec 1000 répétitions aléatoires de « bootstrap ». Le modèle de substitution des caractères de la matrice a été déterminé par l'outil en ligne ProTest.

9. Analyses synténiques

Afin de déterminer les relations d'orthologie entre les Kiss, d'une part, et les Kissr, d'autre part, nous avons réalisé une analyse synténique de chacune de ces deux familles de gènes.

L’analyse synténique consiste à étudier l’environnement génique d’un gène d’intérêt afin de dégager, au voisinage de ces gènes, des régions conservées entre les génomes de plusieurs espèces.

Nous avons réalisé cette analyse en prenant en compte les génomes de plusieurs espèces représentatives des principaux embranchements de vertébrés incluant: l’humain, l’ornithorynque, le poulet, le xénope, le cœlacanthe, le lépisostée, le poisson zèbre, le médaka, l’épinoche, le poisson globe et l’anguille européenne.

Chapitre 3

Mise en évidence du système kisspeptine chez l'anguille européenne : caractérisation d'un récepteur aux kisspeptines et étude *in vitro* de l'effet direct hypophysaire de différents kisspeptines sur l'expression des hormones gonadotropes d'anguille.

1. Introduction de l'article 1

La démarche développée dans ce chapitre a été mise en place avant le séquençage du génome de l'anguille. A cette époque, aucune information ne permettait encore d'affirmer l'existence d'un système kisspeptine chez notre modèle, bien que sa présence ait déjà été démontrée chez d'autres espèces de téléostéens (poisson zèbre, médaka, poisson rouge, loup de mer, etc.).

D'un point de vue fonctionnel, le rôle de Kiss et de Kissr dans la mise en place de la puberté grâce à leur action stimulatrice sur la libération de GnRH, était déjà établi chez les mammifères. Bien que *Kissr* soit détecté dans l'hypophyse de plusieurs mammifères, les différentes études menées sur l'action directe des kisspeptines sur l'expression, la synthèse et la libération des gonadotropines ont abouti à des conclusions divergentes.

Le but de cette étude a donc été, dans un premier temps, de mettre en évidence l'existence du système ou de l'un de ses composants chez l'anguille européenne. En utilisant une approche par PCR et des amorces dégénérées, nous avons pu déterminer l'existence d'un *Kissr* (dénommé *Kissr-2* dans les chapitres suivants) chez l'anguille. Par la suite, afin de mieux caractériser ce récepteur, nous avons étudié sa distribution dans différents organes. Cette distribution a montré, entre autres, une expression de *Kissr* dans l'hypophyse. Nous avons donc réalisé des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille que nous avons traitées avec différents kisspeptines hétérologues afin d'étudier la possibilité d'un effet directe sur les gonadotropines. Ces expériences ont révélé un effet direct inhibiteur de kisspeptines spécifiquement sur l'expression de la *LHβ*.

Ce chapitre décrit donc les premières découvertes relatives au système kisspeptine chez l'anguille européenne et sa probable implication dans l'axe gonadotrope chez cette espèce.

2. Article 1: First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla Anguilla.*

General and Comparative Endocrinology 173 (2011) 216–225

Contents lists available at ScienceDirect

General and Comparative Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygcen

First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*

J. Pasquier [a], A.-G. Lafont [a], J. Leprince [b], H. Vaudry [b], K. Rousseau [a], S. Dufour [a,*]

[a] *Laboratory of Biology of Aquatic Organisms and Ecosystems (BOREA), UMR CNRS 7208-IRD207-UPMC, Muséum National d'Histoire Naturelle, 7 rue Cuvier, CP32, 75231 Paris Cedex 05, France*

[b] *Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, INSERM U982, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 February 2011
Revised 24 May 2011
Accepted 26 May 2011
Available online 7 June 2011

Keywords:
Kisspeptin receptor
Pituitary cells
Gonadotropin
Teleost
European eel

ABSTRACT

The kisspeptin system has emerged as one of the main puberty gatekeepers among vertebrates. The European eel (*Anguilla anguilla*) is a remarkable model due to its phylogenetical position at the basis of teleosts, and its unique life cycle with a blockade of puberty before reproductive migration. We cloned the full-length coding sequence of a kisspeptin receptor (Kissr) in the eel. Comparison of Kissr sequences assigned the eel Kissr to a basal position in a clade including most of the known teleost Kissr, in agreement with the eel phylogenetical position. Eel Kissr tissue distribution was analyzed by quantitative real-time PCR. Eel Kissr was highly expressed in the brain, especially in the telencephalon and di-/mesencephalon, while a very low or undetectable expression was observed in various peripheral organs. A high expression of Kissr was also found in the pituitary indicating a possible direct pituitary role of kisspeptin. Primary cultures of eel pituitary cells were performed to investigate the direct effects of kisspeptin on pituitary hormone expression. Human/lamprey kisspeptin exerted a time- and dose-dependent inhibitory effect on LHβ expression. All other tested kisspeptins had a similar inhibitory effect on LHβ expression. The inhibitory effect of kisspeptins was exerted specifically on LHβ as no change was induced on the expression of other glycoprotein hormone subunits (GPα, FSHβ and TSHβ) nor of growth hormone. These data provide the first evidence for the existence, in the European eel, of a kisspeptin system, which may play a direct inhibitory role on pituitary LHβ expression.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The European eel, *Anguilla anguilla*, presents a complex life cycle, with a blockade of sexual maturation at a prepubertal stage (silver stage) as long as the oceanic reproductive migration has not been completed. This blockade is mainly due to a deficient production of pituitary gonadotropins [9,10]. One of the major challenges of the work on eel reproduction is to find factors able to stimulate the expression and release of gonadotropins. The comprehension of the mechanisms controlling reproduction in the eel is of particular interest considering the dramatic decline of wild populations [50] and the present impossibility to reproduce European eel in captivity. Moreover, as the eel is a representative species of a phylogenetically ancient group of teleosts (elopomorphs) [7], understanding the gonadotropin regulation in this species may provide new insight on ancestral regulatory mechanisms.

In 1996, the *Kiss1* gene was originally identified as an inhibitor of tumor metastasis and its protein was thus named metastin [19]. In 1999, GPR54 was cloned in the rat as an orphan receptor [20] and it is not until 2001 that the connection between Kiss1 and GPR54 was first established [34]. The *Kiss1* gene encodes for a preprohormone secondarily processed to give variants of kisspeptins, including kisspeptin-54, kisspeptin-14, kisspeptin-13 and kisspeptin-10 [18,32]. All kisspeptins share the same C-terminal 10-amino acid sequence [kisspeptin(10)], which is the minimal sequence required to bind their cognate receptor, GPR54 or kisspeptin receptor (Kissr), with high affinity [18,32].

Loss-of-function mutations of GPR54 in humans [8,46] and knock-out of GPR54 in mice [14,46] lead to hypogonadotrophic hypogonadism. Since this discovery, many other observations demonstrated the involvement of the kisspeptin system in the activation of the gonadotropic axis in mammals [41]. Kisspeptin cells in the brain are expressed in two groups of neurons, the arcuate nucleus (ARC) and the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), on which sex steroids exert their feedback differentially [47]. Moreover, it has been recently demonstrated that kisspeptin is co-expressed with neurokinin B and dynorphin in a single subpopulation of neurons in the ARC. This constitutes a central node in the control of reproduction, especially with roles in steroid feedback control of GnRH neurons [22].

* Corresponding author. Address: MNHN – UMR BOREA, 7 rue Cuvier, CP32, 75231 Paris Cedex 05, France. Fax: +33 (0) 1 40 79 36 18.
E-mail address: dufour@mnhn.fr (S. Dufour).

0016-6480/$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ygcen.2011.05.019

In an increasing number of teleost species, the components of the kisspeptin system have been identified and their involvement in the gonadotropic axis studied [12]. Kisspeptins and their receptors have also been characterized in amphibians [58]. In contrast, this system seems to have been lost in the avian lineage since neither kisspeptin nor kisspeptin receptor homologues have been found in bird genomes to date [55].

Although the hypothalamus represents the primary site of action for kisspeptin on reproduction by regulating GnRH secretion [11,29], a direct effect of kisspeptin at the pituitary level has been suggested in mammals [16,39]. Kisspeptin receptor and Kiss1 mRNA expression have been both detected in the pituitary [16,32] and especially in gonadotrophs [39,40,48]. These findings raised the possibility that kisspeptin may act as a hypophysiotropic factor. *In vitro* studies on pituitary actions of kisspeptin in mammals have yielded conflicting results, with no or stimulatory effects on LH release [39]. To date, only one study reported a direct pituitary effect of kisspeptin on pituitary hormone expression and release in teleosts. Using dispersed goldfish pituitary cells in culture and homologous kisspeptin, Yang et al. [60] showed that kisspeptin stimulated various pituitary hormones including LH release and expression.

In the present study, we investigated the direct pituitary actions of kisspeptin in the regulation of gonadotropin gene expression in the European eel, a model branching at the base of the teleost phylogeny. Firstly, the full coding sequence of eel Kissr was cloned. Secondly, its tissue distribution was determined by qRT-PCR. The presence of kisspeptin receptor in the eel pituitary suggested a possible direct pituitary effect of kisspeptin. To test this hypothesis, the effects of kisspeptin on the expression of various pituitary hormones, including LHβ and FSHβ, were determined by qRT-PCR, using eel pituitary cells in primary culture.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female silver European eels (*A. anguilla*) (body weight between 200 and 400 g) were acquired from Gebr. Dil import–export B.V. (Akersloot, The Netherlands). The silver prepubertal stage corresponds to the last continental phase of the eel life cycle, preceding the oceanic reproductive migration. Eels were maintained in aerated freshwater. They were not fed, as they are naturally fasting at the silver stage. Animal manipulations were performed according to the guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators.

2.2. Peptides

Different forms of kisspeptins, synthesized as previously described [23], were tested: human/lamprey kisspeptin1(10) [H/L-Kiss1(10)], human kisspeptin1(14) [H-Kiss1(14)], lamprey kisspeptin1(13) [L-Kiss1(13)], zebrafish kisspeptin1(10) [Zb-Kiss1(10)], zebrafish kisspeptin2(10) [Zb-Kiss2(10)], zebrafish kisspeptin1(15) [Zb-Kiss1(15)] and zebrafish kisspeptin2(15) [Zb-Kiss2(15)] (Table 1).

Table 1
Sequences of synthetic kisspeptins used on primary cultures of eel pituitary cells. H, human; L, lamprey; Zb, zebrafish. The length of the peptide is indicated between brackets.

Peptide ID	Sequence
H/L-Kiss1(10)	YNWNSFGLRF-NH_2
H-Kiss1(14)	DLPNYNWNSFGLRF-NH_2
L-Kiss1(13)	GSTYNWNSFGLRF-NH_2
Zb-Kiss1(10)	YNLNSFGLRY-NH_2
Zb-Kiss1(15)	QNVAYYNLNSFGLRY-NH_2
Zb-Kiss2(10)	FNYNPFGLRF-NH_2
Zb-Kiss2(15)	LARSKFNYNPFGLRF-NH_2

2.3. Cloning of Kissr

Eels were sacrificed by decapitation. The anterior part of the brain, including olfactory bulbs, telencephalon and mes-/diencephalon, was removed, stored in RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA) and kept frozen at −20 °C until extraction. Total RNA was extracted from the anterior part of the eel brain using mechanical homogenization in Trizol Reagent (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Following extraction, samples were submitted to a deoxyribonuclease I (Roche Ltd., Basel, Switzerland) treatment. One microgram of total RNA was then reversed transcribed with a SMART RACE cDNA amplification Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA., USA) using PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara BIO, Otsu, Japan). Highly conserved regions of transmembrane domains 2, 6, 7 of kisspeptin receptors from various teleost species were used to design degenerate primers (Table 2). A standard PCR was performed as follows: an initial step of polymerase activation for 3 min at 94 °C; then 40 cycles with 30 s at 94 °C for denaturing, 30 s at a temperature between 54 and 59 °C for annealing depending on the T_m of primers, 1 min at 72 °C for primer extension, and a single final extension step of 5 min at 72 °C. Partial fragments of eel Kissr cDNA were isolated with the QUIAquick gel extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and directly sequenced at GATC biotech Ltd. (Konstanz, Germany). Based on these fragments specific primers were synthesized (Eurofins, Ebersberg, Germany) especially for RACE PCR. Subsequently, using the Advantage 2 PCR Kit (Clontech), RACE PCR and nested RACE PCR with 5′cDNA or 3′cDNA as templates were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 3 min at 94 °C; then 10 cycles with 30 s at 94 °C for denaturing, 30 s at 70 °C for annealing, 90 s at 72 °C for primer extension; then 25 cycles with 30 s at 94 °C for denaturing, 30 s at 68 °C for annealing, 90 s at 72 °C for primer extension and a single final extension step of 5 min at 72 °C. PCR products of appropriate estimated size were isolated and directly sequenced (as described above). The full-length cDNA of the European eel Kissr was compiled using MEGA 4.0 software [52] and submitted to GenBank (Accession No. CBV36798.1).

2.4. Sequence analysis

2.4.1. Genome database analysis

The amino-acid sequences of zebrafish (*Danio Rerio*), xenopus (*Xenopus tropicalis*) and European eel Kissr were used to query lizard (*Anolis carolinensis*), stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), medaka (*Orysias latipes*) and sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genomes with the TBLASTN near exact match (short) algorithm (Ensembl Genome Browser). The exons and splicing junctions were defined using the Ensembl protein report service.

2.4.2. Protein secondary structure determination

The seven transmembrane domains were determined using TMHMM software (TMHMM Server v. 2.0).

2.4.3. Phylogenetic analysis

Amino-acid sequences of known and predicted Kissr were first aligned using ClustalW [53]. Identity (% of identical amino acids at the same position) and similarity (% of amino acids, identical or with similar physico-chemical properties at the same position)

Table 2
Primers used in the 3′ and 5′ RACE PCR and classical PCR amplification.

Primer ID	PCR type	5′–3′ Sequence	T_m (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
Kissr-F1	PCR	ATCATYTTYYTGSTBTGCTG	$54.24 < T_m < 57.07$	673	This study
Kissr-R1	PCR	GCGTAGGACATGCAGTTGG	58.68		This study
Kissr-F2	PCR	CTTCACCGCCACSCTYTAY	$59.10 < T_m < 59.67$	552	This study
Kissr-R2	PCR	GATGGGVCCCCAGCARAY	$59.10 < T_m < 64.76$		This study
Kissr-F	3′RACE	CCTCTCCGAGCGGACCATAGGCATAC	70.81	–	This study
Kissr-R	5′RACE	TGGAACAGGATGAAGAGCTGGATGGG	70.71	–	This study
UPM (long)	3′ and 5′ RACE	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	76.31	–	Advantage 2PCR Kit (Clontech)
UPM (short)	3′ and 5′ RACE	CTAATACGACTCACTATAGGGC	51.37	–	Advantage 2PCR Kit (Clontech)
NUP	3′ and 5′ RACE	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	61.02	–	Advantage 2PCR Kit (Clontech)

between two sequences were calculated using EMBOSS Matcher. The protein substitution matrix of the resulting alignment was determined as JTT using ProTest software [1]. Phylogenetic analysis of the Kissr sequence alignment was performed using a maximum likelihood method using RaxML software [49] with 1000 bootstrap replicates.

2.5. Tissue distribution

2.5.1. Sample collection for tissue distribution

Tissues were collected from six female silver eels to investigate the distribution of Kissr expression. Eels were sacrificed by decapitation. The following organs were quickly removed, stored in RNA-later and kept frozen at −20 °C until extraction: brain, pituitary, ovary, eye, muscle, intestine, adipose tissue and liver. Brain was dissected into five parts according to [45]: olfactory bulbs, telencephalon, di-/mes-encephalon, cerebellum and medulla oblongata.

2.5.2. Tissue RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from samples was extracted using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. Samples were homogenized by sonication for a few seconds in Trizol. Following extraction, samples were submitted to a deoxyribonuclease I (Roche) treatment. First strand cDNA was synthesized using 400 ng of total RNA and a SuperScript III First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. cDNA was stored at −20 °C for use in qRT-PCR studies.

2.6. Primary culture of eel pituitary cells and in vitro treatments

2.6.1. Dispersion and culture

Dispersion and primary culture of pituitary cells were performed using an enzymatic and mechanical method as described by Montero et al. [31]. Briefly, pituitaries were sectioned into slices and incubated at 25 °C in a solution of porcine type II trypsin (Sigma). After 1 h, the trypsin solution was replaced by a solution of DNase (Sigma) and soya bean trypsin inhibitor (Sigma) for 10 min. Pituitary slices were then washed with calcium-free phosphate buffer (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) and mechanically dispersed by repeated passages through a plastic transfer pipette (Falcon, Duscher, Brumath, France). After estimating the number of viable cells by Trypan Blue coloration (Sigma), cells were plated on 96-well plates (60,000 cells/well) pre-coated with poly-L-lysine (Sigma). Cultures were performed in serum-free culture medium (CM: Medium 199 with Earle's salt, sodium bicarbonate, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 250 ng/ml fungizone (Gibco)) at 18 °C under 3% CO_2 and saturated humidity.

2.6.2. Treatments

Kisspeptin stock solutions (10^{-4} M) were prepared in ultrapure water and stored at −20 °C. Stock solutions were diluted in culture medium just before addition to the culture wells. Kisspeptin treatments were started on Day 0 (24 h after pituitary cell plating). Replicates of five wells for control and each treated group were used. Culture medium was changed and kisspeptin solutions added to the cells on Day 0, Day 3, Day 7 and Day 10. Cultures were stopped on Days 1, 3, 7, 10 and 13 depending on the experiment. The effects of treatments were tested in at least three independent experiments performed on different cell preparations from different batches of fish. Figures display the results of a representative experiment.

2.6.3. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was directly extracted in wells using the Cell-to-cDNA II Kit (Ambion Inc.) according to the manufacturer's instructions. Cells were washed with sterile PBS (Gibco) and lysed with Cell Lysis II Buffer (80 μl/well). The lysates were digested with RNase-free DNase I (Roche). Four microliters of RNA solution of each sample was then reversed transcribed with a SuperScript III First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). The cDNA samples obtained were stored at −20 °C until qRT-PCR.

2.7. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

2.7.1. Primers

2.7.1.1. Design of primers for eel Kissr. Kissr specific primers were designed based on the full-length European eel sequence obtained in this study using Primer3 Software (Whitehead Institute/Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA, USA) (Table 3). To optimize the assay, different annealing temperature were tested according to the T_m of primers. To check their specificity, amplification products were sequenced at GATC biotech Ltd.

2.7.1.2. Design of primers for eel thyroid-stimulating hormone beta subunit (TSHβ). Based on the nucleotide sequence of the European eel TSHβ [36,42], gene specific primers were designed and the assay was optimized as described above (Table 3).

2.7.1.3. Other gene primers. Gene specific primers were previously designed based on the nucleotide sequence of the European eel GPα [37], FSHβ [44], LHβ [38], GH [15] and β-actin cDNA [59], the latter being used as reference gene (for details of the primers, see [3] and Table 3).

All primers were purchased from Eurofins.

2.7.2. SYBR Green assay

2.7.2.1. Protocol. Quantitative assays of eel actin, Kissr and pituitary hormone gene expression were set up using the light cycler system with SYBR Green I sequence-unspecific detection. The PCRs were prepared with 4 μl of diluted cDNA template, 2 μl of PCR grade water, 2 μl of SYBR Green master mix and 1 μl of each forward and reverse primer (500 nM each at final concentration). qRT-PCRs for all genes were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 10 min at 95 °C; then 41 cycles with 15 s at 95 °C

Table 3
Gene-specific primers (F for forward and R for reverse) were designed for amplification and quantification of mRNAs of various European eel pituitary hormones and kisspeptin receptor by qRT-PCR using actin-β as a reference gene. GH, Growth hormone; GPα, glycoprotein α subunit; LHβ, luteinizing hormone β subunit; FSHβ, follicle-stimulating hormone β subunit; TSHβ, thyroid stimulating hormone β subunit; Kissr, kisspeptin receptor.

Gene	Primer	5′–3′ Sequence	T_m (°C)	Amplicon size (bp)	Ref.
Actin-β	Actin-β F	AGTATTTGCGCTCGGGTG	58.25	225	[3]
	Actin-β R	CAGCCTTCCTTCCTGGGT	58.60		
GH	GH F	ACCGTCACCTACATCCTTCAT	56.89	182	[3]
	GH R	AAATCGGATGGGTACTTGCTG	59.79		
GPα	GPα F	TGCCGACTCCAGGAGAATAA	59.21	183	[3]
	GPα R	TGTTATCCAGCCTTGTCACC	57.01		
LHβ	LHβ F	TCACCTCCTTGTTTCTGCTG	57.43	143	[3]
	LHβ R	TAGCTTGGGTCCTTGGTGATG	60.83		
FSHβ	FSHβ F	TCTCGCCAACATCTCCATC	58.09	99	[3]
	FSHβ R	AGAATCCTGGGTGAAGCACA	59.09		
TSHβ	TSHβ F	ACTTCTGCGTGGCCATCAAC	61.99	95	This study
	TSHβ R	GGACTACCAGGCGCTTCACC	62.80		
Kissr	Kissr F	GTGGGACTAATCGGGAACT	54.91	113	This study
	Kissr R	CAGGAAGATGATGTCTGTGG	54.87		

for denaturing, 5 s at 60 °C for annealing, 10 s at 72 °C for primer extension, 5 s at 83 °C to avoid measurement of non-specific annealing; and a single final extension step of 5 min at 72 °C. Each PCR run contained a non-template control (cDNA was substituted by water) for each primer pairs to confirm that reagents were not contaminated. The efficiency of all primers was tested and the specificity of each reaction was assessed by melting curve analysis to ensure the presence of only one product, and by sequencing.

2.7.2.2. qRT-PCR for tissue distribution. Pools from all individual cDNA samples were made for each tissue. Serial dilutions of each tissue pool were run in duplicate for the target Kissr gene to assess qRT-PCR efficiency. Individual tissue samples were then analyzed in duplicate by qRT PCR. The specificity of each reaction was assessed by melting curve analysis to ensure the presence of only one PCR product. The cDNA pool of brain tissues was used as a common standard curve and also included in each run as a calibrator [59]. Normalization of data was performed using total RNA content of each sample.

2.7.2.3. qRT-PCR for cell culture experiments. For each cell culture experiment, serial dilutions of a cDNA pool made from all culture wells were run in duplicate for the target (GPα, LHβ, FSHβ, TSHβ, GH) and the reference (β-actin) genes. This allowed to assess qRT-PCR efficiency and to be used as a standard curve for each gene. Each culture well cDNA sample was then analyzed in duplicate by qRT-PCR for each target and reference gene expression. The cDNA pool used for the standard curve was also included in each run as a calibrator. Normalization was performed using reference gene (β-actin) expression.

2.8. Statistical analysis

Results are given as mean ± SEM. Means were compared by Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test, using Instat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Cloning of eel Kissr

After the sequencing of the RACE PCR products, the whole sequence obtained was 1472 bp in length (Fig. 1A). The 5′ and 3′ UTR were, respectively, 218 and 168 bp in length. Once translated, the 1086-bp coding sequence gives a 361-aa length protein with seven conserved transmembrane domains. Each of those seven transmembrane domains is made of an alpha helix (αH). According to the TMHMM software, the seven αH are positioned as follows: αH1 from aa 36 to 58, αH2 from aa 71 to 93, αH3 from aa 108 to 127, αH4 from aa 148 to 170, αH5 from aa 198 to 220, αH6 from aa 256 to 278, αH7 from aa 293 to 315 (Fig. 1A). The closest protein sequences from this receptor appeared to be teleost GPR54 (or Kissr) among which goldfish (*Carassius auratus*) GPR54a with 84.2% of identity and 90.7% of similarity and zebrafish (*D. rerio*) Kiss1ra with 83.9% of identity and 88.8% of similarity.

3.2. Phylogenetic analysis of Kissr

In addition to the cloning of a European eel Kissr, we searched for putative Kissr genes present in other vertebrate species using Ensemble Genome Browser. We found Kissr candidate genes in the genomes of several vertebrates including lizard (in scaffold 10), stickleback (in chromosome group III), and sea lamprey (in super contig 847) (Fig. 1B).

Our phylogenetic analysis (Fig. 2) clustered the teleost kisspeptin receptors into two separate groups. The major teleost Kissr group, named teleost clade A in the present study, encompassed the eel Kissr and most of the known teleost Kissrs. Eel Kissr branched at the base of this group in agreement with the basal phylogenetic position of *A. anguilla* among teleosts. The sister group of teleost clade A was composed of two amphibian Kissr, xenopus GPR54-2, and bullfrog GPR54. The other teleost Kissr cluster, named teleost clade B in this study, grouped the additional kisspeptin receptors characterized in a few teleost species, medaka GPR54-1, zebrafish Kiss1rb and goldfish GPR54b. Teleost clade B was more closely related to the mammalian kisspeptin receptors than clade A.

3.3. Tissue distribution of eel Kissr

As shown in Fig. 3, eel Kissr mRNA was differentially expressed in the organs investigated. The highest levels of Kissr mRNA expression were observed in the brain and pituitary. In the brain, Kissr mRNA was mostly expressed in the telencephalic and di-mesencephalic areas and to a lesser extent in the *medulla oblongata*, olfactory bulbs and *corpus cerebellum*. The peripheral organs, intestine, ovary, eye and muscle exhibited a very low expression level of Kissr while adipose tissue and liver had no detectable expression.

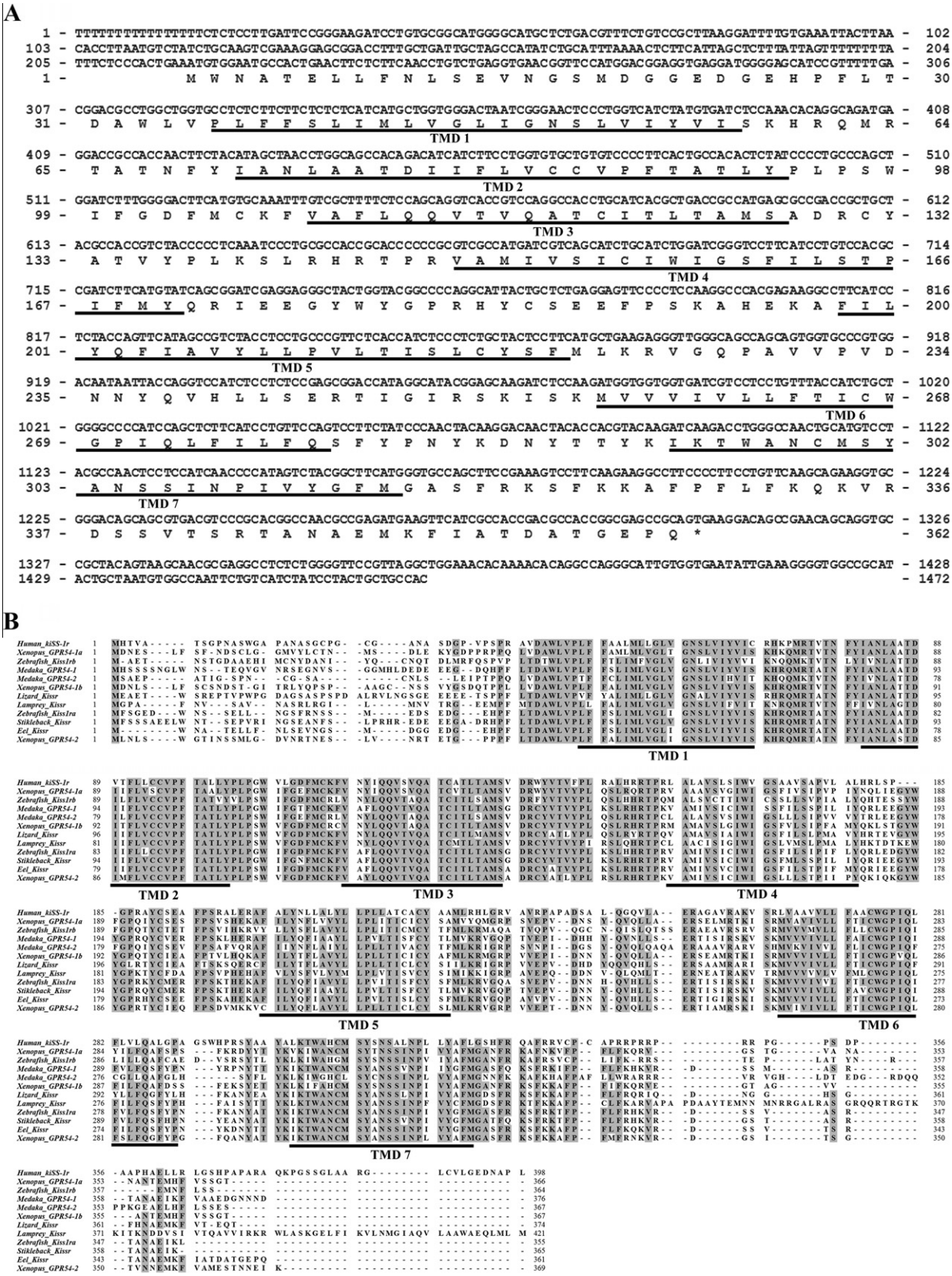


Fig. 1. Molecular cloning of eel Kissr. (A) Nucleotide and deduced amino-acid sequence of the cDNA encoding the eel Kissr. Nucleotides (top) are numbered from 5′ to 3′. The amino-acid residues (bottom) are numbered beginning with the first methionine residue in the ORF. The asterisk (∗) indicates the stop codon. The predicted seven transmembrane domains (TMD) are underlined. (B) Alignment of the amino-acid sequences of Kissr from eel and other vertebrates. The entire amino-acid sequences were aligned. Conserved amino-acid residues are shaded. The predicted seven TMD are underlined.

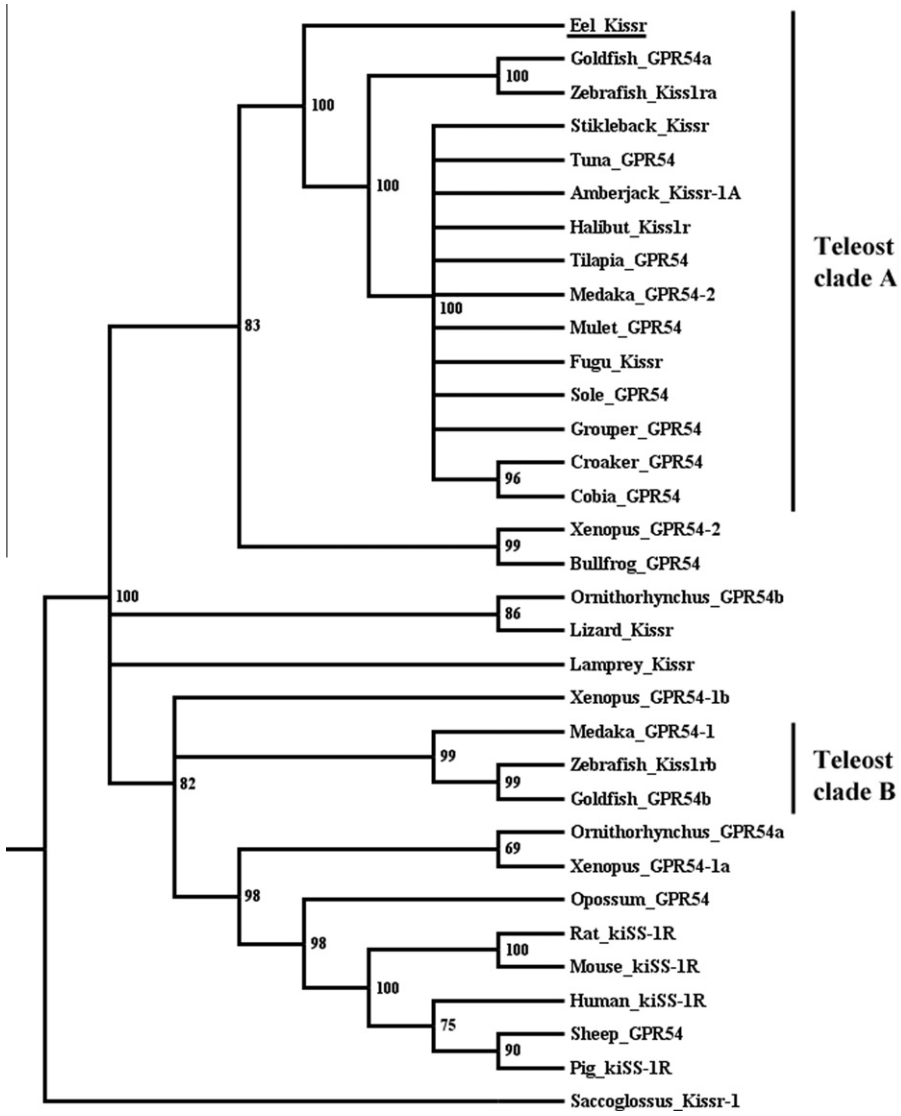


Fig. 2. Phylogenetic tree of the vertebrate Kisspeptin receptor (Kissr) constructed based on the amino-acid sequence of Kissr using the maximum likelihood method with 1000 bootstrap replicates. The number shown at each branch node indicates the bootstrap value (%); only values and branching above 50% are indicated. Some of the sequences used for this phylogenetic reconstruction were taken from NCBI database: human kiss-1R (*Homo sapiens*: NP_115940.2), mouse kiss-1R (*Mus musculus*: NP_444474.1), rat kiss-1R (*Ratus norvegicus*: NP_076482.1), pig kiss-1R (*Sus scrofa*: NP_001038089.1), sheep GPR54 (*Ovis aries*: ADI50282.1), ornithorhynchus GPR54a (predicted *Ornithorhynchus anatinus*: XP_001507133.1), ornithorhynchus GPR54b (predicted *Ornithorhynchus anatinus*: XP_001515272.1), bullfrog GPR54 (*Rana catesbeiana*: ACD44939.1), sole GPR54 (*Solea senegalensis*: ABW96362.1), tilapia GPR54 (*Oreochromis niloticus*: BAD34454.1), mulet GPR54 (*Mugil cephalus* :ABG76790.1), croaker GPR54 (*Micropogonias undulatus*, ABC75101.1), cobia GPR54 (*Rachycentron canadum*: ABG82165.1), goldfish GPR54a (*Carassius auratus*: ACK77792.1), goldfish GPR54b (*Carassius auratus*: ACK77793.1), zebrafish Kiss1ra (*Danio rerio*: NP_001099149.1), zebrafish Kiss1rb (*Danio rerio*: NP_001104001.1), opossum GPR54 (predicted *Monodelphis domestica*: XP_001374752.1), fugu Kissr (*Takifugu niphobles*: BAJ15876.1), grouper GPR54 (*Epinephelus coioides*: ACT65994.1), tuna GPR54 (*Thunnus maccoyii*: ACT78954.1), xenopus GPR54-2 (*Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis*: ACJ50537), xenopus GPR54-1b (*Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis*: ACJ50536), xenopus GPR54-1a (*Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis*: ACJ50535), saccoglossus Kissr-1 (*Saccoglossus kowalevskii*: NP_001161573), amberjack Kissr-1A (*Seriola lalandi*: ACT78955), halibut Kiss1r (*Hippoglossus hippoglossus*: ADC96613.1). The sequences of lizard Kissr (*Anolis carolinensis*), medaka GPR54-1 and GPR54-2 (*Oryzias latipes*) [21], stickleback Kissr (*Gasterosteus aculeatus*) and lamprey Kissr (*Petromyzon marinus*) were predicted from their genome, available at Ensembl Genome Browser server. The tree was rooted using the sequences of the hemichordata *Saccoglossus* GPR54-1. The cloned sequence, in this study, of European eel Kissr (*Anguilla Anguilla*: CBV36798.1) is underlined.

3.4. Cell culture experiments

3.4.1. Kinetics of the effects of human/lamprey-kisspeptin1(10) on LHβ and FSHβ mRNA levels

Eel pituitary cells were treated with 10^{-6} M H/L-Kiss1(10) and the cultures were stopped after 1, 3, 7, 10 and 13 days (Fig. 4). From 1 to 3 days of treatment, H/L-Kiss1(10) had no significant effect, whereas from 7 to 13 days of treatments, H/L-Kiss1(10) had a significant inhibitory effect on LHβ mRNA levels with, respectively, 58% of inhibition after 7 days of treatment ($P < 0.01$), 63% of inhibition after 10 days of treatment ($P < 0.01$) and 52% of inhibition after 13 days of treatment ($P < 0.001$), as compared to controls (Fig. 4B). In contrast, H/L-Kiss1(10) had no effect on FSHβ mRNA levels whatever the duration of treatment (Fig. 4A). According to this, 10-day treatments were applied for the following experiments.

3.4.2. Dose-dependent effect of H/L-Kiss1(10) on LHβ mRNA levels

The effects of various concentrations of H/L-Kiss1(10) (from 10^{-12} to 10^{-6} M) were tested over 10 days of culture (Fig. 5A). H/L-Kiss1(10) had no significant effect on LHβ mRNA levels at concentrations of 10^{-12} and 10^{-10} M, but significantly inhibited LHβ mRNA levels at 10^{-8} and 10^{-6} M, with, respectively, 40% of inhi-

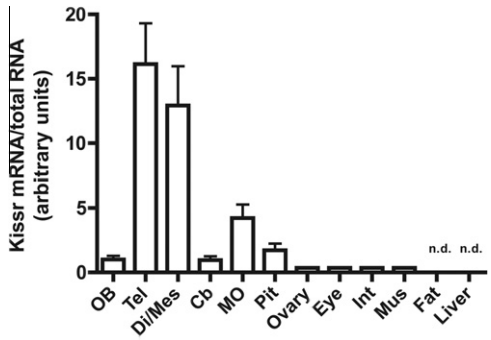


Fig. 3. Tissue distribution of eel Kissr mRNA as analyzed by qRT-PCR in various parts of the brain, in the pituitary and peripheral tissues. Olfactory bulbs (OB), telencephalon (Tel), di-/mes-encephalon (Di/Mes), cerebellum (Cb), medulla oblongata (MO), pituitary (Pit), ovary (Ovary), eye (Eye), intestine (Int), muscle (Mus), adipose tissue (Fat) and liver (Liver). The relative abundance of Kissr mRNA was normalized to the amount of total RNA. Each bar represents mean ± SEM from six individuals.

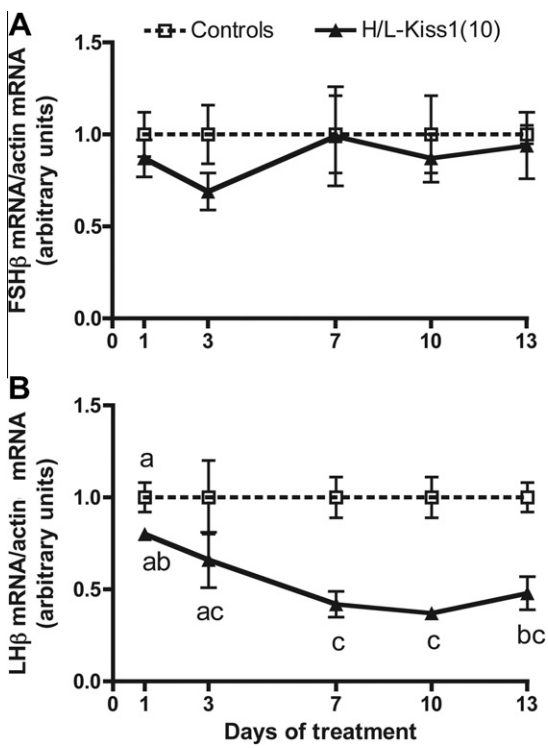


Fig. 4. Time course of the effect of Human/Lamprey Kiss1(10) on FSHβ (A) and LHβ (B) expression in primary culture of eel pituitary cells. Pituitary cells were incubated with 10^{-6} M H/L-Kiss1(10) and the incubation was stopped after, respectively, 1, 3, 7, 10 or 13 days of treatment. LHβ and FSHβ mRNA levels were quantified by qRT-PCR. Data were normalized against β-actin. Each point represents mean ± SEM from five well replicates. Different letters indicate significant differences, ANOVA.

bition ($P < 0.05$) and 49% of inhibition ($P < 0.01$) as compared to controls.

3.4.3. Effects of different forms of kisspeptins on LHβ mRNA levels

The effects of various kisspeptins, H/L-Kiss1(10), H-Kiss1(14), L-Kiss1(13), Zb-Kiss1(10), Zb-Kiss1(15), Zb-Kiss2(10), Zb-Kiss2(15) were tested at a concentration of 10^{-8} M over 10 days of culture (Fig. 5B). All tested peptides exerted a significant inhibitory effect on LHβ expression ranging from 36% to 75% of inhibition compared to controls.

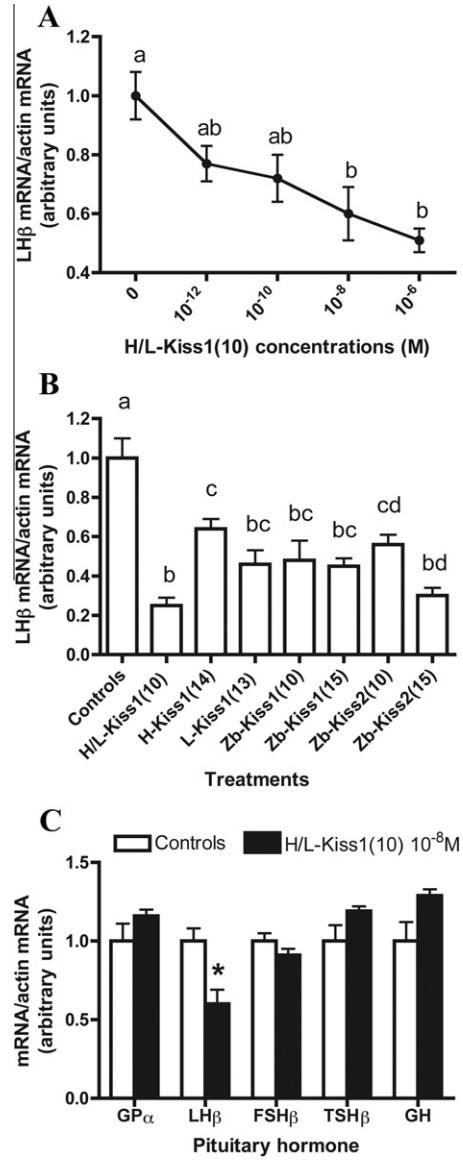


Fig. 5. Effect of 10 day-treatment with kisspeptins on pituitary hormone expression by cultured eel pituitary cells. Data were normalized against β-actin. Each point represents mean ± SEM from five well replicates. (A) Effect of various concentrations (10^{-12}–10^{-6} M) of Human/Lamprey Kiss1(10) on LHβ mRNA levels. Different letters indicate significant differences, ANOVA. (B) Effect of various kisspeptins at 10^{-8} M on LHβ mRNA levels. Different letters indicate significant differences, ANOVA. (C) Effect of Human/Lamprey Kiss1(10) at 10^{-8} M on the expression of various pituitary hormones. *$P < 0.05$ *versus* controls, Student's *t*-test.

3.4.4. Effect of H/L-Kiss1(10) on other pituitary hormone mRNA levels

To test whether the inhibitory effect of kisspeptin was specific to LHβ expression, the action of 10^{-8} M H/L-Kiss1(10) was investigated on other pituitary hormones (Fig. 5C). After 10 days of treatment, H/L-Kiss1(10) had an inhibitory effect on LHβ mRNA levels with 40% of inhibition compared to controls ($P < 0.05$). In contrast, the peptide had no effect on TSHβ nor on FSHβ nor on common α glycoprotein subunit (GPα) mRNA levels. Similarly, H/L-Kiss1(10) did not induce any change in GH mRNA levels.

4. Discussion

4.1. Cloning of an eel Kissr

In the present study, a new G-protein coupled receptor, related to the kisspeptin receptor (GPR54/Kissr), was characterized in the

European eel. Phylogenetic analysis indicated that the eel Kissr branches at the base of a clade (named in this study teleost clade A) which includes most of the teleost Kissrs described to date. This phylogenetic position is consistent with the basal position of elopomorphs in the phylogeny of teleosts. The sister group to this teleost clade A is composed of xenopus GPR54-2 and bullfrog GPR54. This suggests that these amphibian Kissrs and teleost clade A Kissrs derive from a common ancestral Kissr subtype. This Kissr subtype would have been present in the common ancestor of actinopterygian and sarcopterygian lineages and may have been lost in the mammalian lineage. An additional Kissr has been evidenced in a few teleost species (medaka, zebrafish and goldfish), forming a second teleost Kissr clade (named in this study teleost clade B). Teleost clade B is more closely related than teleost clade A to mammalian Kissr and to the other amphibian Kissr subtypes (xenopus GPR54-1a and b). Future studies will aim at looking for the potential presence of a clade B Kissr in the eel.

The teleost clade A, which includes the present eel Kissr, comprises the *kiss1r* of the sole (*Solea senegalensis*) which is, to date, the only species for which two splice isoforms of the receptor, *kiss1r_v1* and *kiss1r_v2*, have been described [28]. We searched, by performing targeted PCRs in the exon 3–4 junction region, for the possible presence of splice isoforms of eel Kissr in the eel brain and gonads, as for the sole Kissr, but could not detect any splice variants in the eel.

4.2. Tissue distribution of eel Kissr

In the European eel, we observed that Kissr mRNA was primarily expressed in the brain especially in the telencephalon and in the di-/mes-encephalon areas, which are known to contain GnRH neurones in the eel [30]. Using laser capture microdissection, Parhar et al. [35] were the first to observe, in the tilapia (*Oreochromis niloticus*), expression of Kissr mRNA in GnRH neurons. In the fathead minnow (*Pimephales promelas*), Kissr expression was detected predominantly in the telencephalon and moderately in the olfactory bulbs/tracts, optic tectum and hypothalamus/midbrain tegmentum [13]. In the zebrafish and goldfish, both forms of Kissr are intensely expressed in the telencephalon, diencephalon, midbrain and hindbrain [4,24]. In the tilapia and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), Kissr expression is highest in the brain compared to other examined organs [25,27]. In the sole, which possesses splice isoforms of *kiss1r*, *kiss1r_v1* mRNA levels significantly exceed those of the splice variant *kiss1r_v2* in the brain [28].

The kisspeptin receptor was also well detectable in the eel pituitary gland. Kissr expression has already been observed in male and female tilapia pituitaries [25]. Both *gpr54a* and *gpr54b* are expressed in the goldfish pituitary [24] while only the *kiss1rb* isoform is detected in the zebrafish pituitary [4].

In the European eel, we found that expression of Kissr was low in peripheral organs including ovary, eye, intestine and muscle. Kissr mRNA was even undetectable in eel adipose tissue and liver. Similarly, in the tilapia, Kissr expression levels are close to detection limits in the tested peripheral organs, *i.e.* heart, kidney, liver, gonad and muscle [25]. In zebrafish, only *kiss 1rb* mRNA is present in the testis and ovary, whereas only *kiss 1ra* is expressed in non-gonadal tissues such as spleen, gill, kidney, intestine, pancreas, muscle and adipose tissue [4], suggesting tissue specific expression. A differential tissue distribution of two Kissr is also observed in another cyprinid, the goldfish, where *gpr54a* is expressed exclusively in the gonads and adipose tissue, while *gpr54b* is expressed in all peripheral tissues examined [24]. Future studies will aim at investigating the presence of a potential second Kissr in the European eel and analyzing its tissue distribution. In the sole, the predominant splice isoform in the gonads, the heart, kidney and gall bladder is *kiss1r_v2*, whereas intestine only expresses *kiss1r_v1* [28].

4.3. Direct pituitary effect of kisspeptins

As we found a significant expression of Kissr mRNA in the eel pituitary, we have looked for a possible direct pituitary effect of kisspeptin, using primary cultures of eel pituitary cells. We observed an unexpected inhibitory effect of H/L-Kiss1(10) on LHβ expression. This inhibitory effect was time-dependent from 1 to 13 days of treatment, and was dose-dependent for concentrations ranging from 10^{-12} to 10^{-6} M.

Kisspeptin(10) can be classified into three groups according to their N- and C-terminal amino-acid residues. Kisspeptin1(10) possess a Y residue in the first and the tenth positions and are called "Y–Y form", except human and lamprey Kiss1(10) which are called the "Y–F form". All kisspeptin2(10) possess a F residue in the first and the tenth positions, and are called "F–F form". Since the sequence of eel kisspeptin is still unknown, we have tested the effect of representatives of the three known kisspeptin-10 groups [H/L-Kiss1(10), Zb-Kiss1(10) and Zb-Kiss2(10)]. We found that all peptides inhibited LHβ expression. Longer forms of kisspeptins were also tested [H-Kiss1(14), L-Kiss1(13), Zb-Kiss1(15) and Zb-Kiss2(15)], and they also exerted an inhibitory effect on eel LHβ expression.

To the best of our knowledge, this is the first report describing an inhibitory effect of kisspeptin on gonadotropin expression. Moreover, the inhibitory effect of the peptide on LHβ was specific, since kisspeptin did not affect the expression of any of the other pituitary glycoprotein hormone subunits (GPα, FSHβ, TSHβ) nor that of GH.

Considering the relatively long incubation period (several days) required to get a significant inhibitory effect of kisspeptin on LHβ expression, one may hypothesize the involvement of local production of autocrine/paracrine factors [40]. Development of *in situ* hybridization studies will allow revealing if Kissr is expressed by LH cells themselves and/or by other cell types in the eel pituitary. Future studies, at the protein level, will also aim at assessing whether the inhibitory effect of kisspeptin on eel LHβ subunit expression is also evidenced on LH synthesis and release.

The direct pituitary effect of kisspeptin in vertebrates is still controversial [39]. The first studies in rat static cultures of anterior pituitary fragments and pituitary cells failed to demonstrate a direct effect of kisspeptins on either LH or FSH secretion [26,54]. However, other studies showed that kisspeptin could induce LH release (rat: [16,33]; bovine: [51]; ovine: [48]). Concerning FSH, Navarro et al. [33] reported a positive effect of kisspeptin, not on basal, but on GnRH-stimulated FSH release in rat. To date, in teleosts, only one study reported a direct pituitary effect of kisspeptin on pituitary hormone expression and release. Using dispersed pituitary cells in culture and homologous kisspeptin1(10) ("Y–Y form"), Yang et al. [60] showed that kisspeptin1(10) stimulated LH release in goldfish after short term treatment (from 30 to 180 min). This effect was not specific of LH since releases of prolactin (PRL) and GH were also elevated. Messenger RNA levels were unaltered after this short-term treatment, but an increase in the expression of the three pituitary genes (LHβ, PRL, and GH) could be observed after longer incubation (24 h) with kisspeptin1(10) [60]. Another study in the same species failed to show any *in vitro* effect of homologous kisspeptin2(10) ("F–F form") on LH secretion [24].

These data indicate that in teleosts as in mammals, the direct pituitary effect of kisspeptin may largely vary. Considering the very unique life cycle of the eel, one may speculate that the direct inhibitory effect of kisspeptin on pituitary LH expression may represent one of the species-specific mechanisms of the prepubertal blockade of eel sexual maturation at the pre-migratory silver stage. It

will be relevant to investigate whether the inhibitory effect of kisspeptin may be stage-dependent, by conducing similar studies on eels at the previous juvenile sedentary stage ("yellow" eels) as well as on experimentally maturing eels.

4.4. Diversity of pituitary effects of RFamide peptides

Kisspeptins belong to the RFamide superfamily of regulatory peptides. Among this superfamily, the GnIH (gonadotropin inhibitory hormone) group is characterized by its conserved C-terminus LPXRFamide motif (X = Q or L). GnIH peptides were first discovered in birds [56] for their *in vitro* inhibitory effect on gonadotropin release and expression [5,56]. They were then described in mammalian species with the same inhibitory effect [6]. In the bullfrog (*Rana catesbeiana*), the GnIH homologue (fGRP) and the fGRP-related peptide (fGRP-RP-2), both encoded by the same gene and cleaved from the same precursor, were identified as mature peptides [17,57]. In contrast to GnIH action in birds, those two peptides had no effect on gonadotropin release, while they were able to stimulate PRL and GH release by bullfrog anterior pituitary cells in culture [17,57]. In the goldfish, three peptides encoded by the same gene and presenting the LPXRFamide motif at their C-terminus were identified as GnIH-related peptides and named gfLPXRFa-1, -2 and -3 [43]. They were reported to stimulate the release of anterior pituitary hormones (LH, FSH, GH) from pituitary cells of sockeye salmon [2]. These data, combined with our unexpected observation of a specific inhibitory effect of kisspeptin on LHβ expression in the eel, suggest a large diversity in the effects of the RFamide peptides according to species. Further studies are needed to clarify the pituitary effects of the various RF-amide peptides in vertebrates.

To conclude, the present study provided evidence for the existence of a kisspeptin system in the eel and revealed, for the first time in any vertebrate species, an inhibitory action of kisspeptin on the gonadotrope axis, *via* a direct effect on pituitary LH expression. Future studies will aim at characterizing endogenous kisspeptin and other RFamide peptides in the European eel and comparing their direct regulatory effects on pituitary function.

Acknowledgments

We thank Dr. F.-A. Weltzien (Norwegian School of Veterinary Science, Olso, Norway) for his contribution in eel Kissr cloning. We also thank E. Ryckelynck and his team from Nodaiwa (Paris, France) for their kind cooperation. J.P. is a recipient of a PhD fellowship from the Ministry of Research and Education. This work was supported by grants from the National Research Agency PUBERTEEL No. ANR-08-BLAN-0173 to K.R. and S.D., FrenchKiSS No. ANR-07-BLAN-0056-04 to J.L. and H.V., and from the European Community PRO-EEL No. 245257 to A.G.L. and S.D.

References

[1] F. Abascal, R. Zardoya, D. Posada, ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution, Bioinformatics 21 (2005) 2104–2105.
[2] M. Amano, S. Moriyama, M. Iigo, S. Kitamura, N. Amiya, K. Yamamori, K. Ukena, K. Tsutsui, Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon, J. Endocrinol. 188 (2006) 417–423.
[3] S. Aroua, F.A. Weltzien, N. Le Belle, S. Dufour, Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids, Gen. Comp. Endocrinol. 153 (2007) 333–343.
[4] J. Biran, S. Ben-Dor, B. Levavi-Sivan, Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates, Biol. Reprod. 79 (2008) 776–786.
[5] N.A. Ciccone, I.C. Dunn, T. Boswell, K. Tsutsui, T. Ubuka, K. Ukena, P.J. Sharp, Gonadotrophin inhibitory hormone depresses gonadotrophin alpha and follicle-stimulating hormone beta subunit expression in the pituitary of the domestic chicken, J. Neuroendocrinol. 16 (2004) 999–1006.
[6] I.J. Clarke, Y. Qi, T. Puspita Sari, J.T. Smith, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals, Front. Neuroendocrinol. 30 (2009) 371–378.
[7] M.C.C. De Pinna, Teleostean monophyly, in: M.L.J. Stiassny, L.R. Parenti, G.D. Johnson (Eds.), Interrelationships of Fishes, Academic Press, New York, 1996, pp. 147–162.
[8] N. de Roux, E. Genin, J.C. Carel, F. Matsuda, J.L. Chaussain, E. Milgrom, Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 10972–10976.
[9] S. Dufour, E. Burzawa-Gerard, N. Le Belle, M. Sbaihi, B. Vidal, Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*, in: K. Aida, K. Tsukamoto, K. Yamauchi (Eds.), Eel Biology, Springer, Tokyo, 2003, pp. 373–383.
[10] S. Dufour, F.-A. Weltzien, M.-E. Sébert, N. Le Belle, B. Vidal, P. Vernier, C. Pasqualini, Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications, Ann. NY Acad. Sci. 1040 (2005) 9–22.
[11] H.M. Dungan, D.K. Clifton, R.A. Steiner, Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion, Endocrinology 147 (2006) 1154–1158.
[12] A. Elizur, The KiSS1/GPR54 system in fish, Peptides 30 (2009) 164–170.
[13] A.L. Filby, R. van Aerle, J. Duitman, C.R. Tyler, The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish, Biol. Reprod. 78 (2008) 278–289.
[14] S. Funes, J.A. Hedrick, G. Vassileva, L. Markowitz, S. Abbondanzo, A. Golovko, S. Yang, F.J. Monsma, E.L. Gustafson, The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system, Biochem. Biophys. Res. Commun. 312 (2003) 1357–1363.
[15] C. Gong, G. Cao, R. Xue, C. Zhang, Sequence and structure of encoding eel growth hormone gene, Shuichan Xuebao 26 (2002) 295–300.
[16] E. Gutierrez-Pascual, A.J. Martinez-Fuentes, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, M.M. Malagon, J.P. Castano, Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion, J. Neuroendocrinol. 19 (2007) 521–530.
[17] A. Koda, K. Ukena, H. Teranishi, S. Ohta, K. Yamamoto, S. Kikuyama, K. Tsutsui, A novel amphibian hypothalamic neuropeptide: isolation, localization, and biological activity, Endocrinology 143 (2002) 411–419.
[18] M. Kotani, M. Detheux, A. Vandenbogaerde, D. Communi, J.M. Vanderwinden, E. Le Poul, S. Brezillon, R. Tyldesley, N. Suarez-Huerta, F. Vandeput, C. Blanpain, S.N. Schiffmann, G. Vassart, M. Parmentier, The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54, J. Biol. Chem. 276 (2001) 34631–34636.
[19] J.H. Lee, M.E. Miele, D.J. Hicks, K.K. Phillips, J.M. Trent, B.E. Weissman, D.R. Welch, KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, J. Natl. Cancer Inst. 88 (1996) 1731–1737.
[20] D.K. Lee, T. Nguyen, G.P. O'Neill, R. Cheng, Y. Liu, A.D. Howard, N. Coulombe, C.P. Tan, A.T. Tang-Nguyen, S.R. George, B.F. O'Dowd, Discovery of a receptor related to the galanin receptors, FEBS Lett. 446 (1999) 103–107.
[21] Y.R. Lee, K. Tsunekawa, M.J. Moon, H.N. Um, J.I. Hwang, T. Osugi, N. Otaki, Y. Sunakawa, K. Kim, H. Vaudry, H.B. Kwon, J.Y. Seong, K. Tsutsui, Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates, Endocrinology 150 (2009) 2837–2846.
[22] M.N. Lehman, L.M. Coolen, R.L. Goodman, Minireview: Kisspeptin/Neurokinin B/Dynoprphin (KNDy) cells of arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion, Endocrinology 151 (2010) 3479–3489.
[23] J. Leprince, P. Gandolfo, J.L. Thoumas, C. Patte, J.L. Fauchere, H. Vaudry, M.C. Tonon, Structure–activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes, J. Med. Chem. 41 (1998) 4433–4438.
[24] S. Li, Y. Zhang, Y. Liu, X. Huang, W. Huang, D. Lu, P. Zhu, Y. Shi, C.H. Cheng, X. Liu, H. Lin, Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*), J. Endocrinol. 201 (2009) 407–418.
[25] C.C. Martinez-Chavez, M. Minghetti, H. Migaud, GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia, Gen. Comp. Endocrinol. 156 (2008) 224–233.
[26] H. Matsui, Y. Takatsu, S. Kumano, H. Matsumoto, T. Ohtaki, Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat, Biochem. Biophys. Res. Commun. 320 (2004) 383–388.
[27] A.S. Mechaly, J. Vinas, C. Murphy, M. Reith, F. Piferrer, Gene structure of the Kiss1 receptor-2 (Kiss1r-2) in the Atlantic halibut: insights into the evolution and regulation of Kiss1r genes, Mol. Cell. Endocrinol. 317 (2009) 78–89.
[28] A.S. Mechaly, J. Vinas, F. Piferrer, Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*), Biol. Reprod. 80 (2009) 60–69.
[29] S. Messager, Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty, J. Neuroendocrinol. 17 (2005) 687–688.
[30] M. Montero, B. Vidal, J.A. King, G. Tramu, F. Vandesande, S. Dufour, O. Kah, Immunocytochemical localization of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.), J. Chem. Neuroanat. 7 (1994) 227–241.
[31] M. Montero, N. Le Belle, B. Vidal, S. Dufour, Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release, Gen. Comp. Endocrinol. 104 (1996) 103–115.

[32] A.I. Muir, L. Chamberlain, N.A. Elshourbagy, D. Michalovich, D.J. Moore, A. Calamari, P.G. Szekeres, H.M. Sarau, J.K. Chambers, P. Murdock, K. Steplewski, U. Shabon, J.E. Miller, S.E. Middleton, J.G. Darker, C.G. Larminie, S. Wilson, D.J. Bergsma, P. Emson, R. Faull, K.L. Philpott, D.C. Harrison, AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1, J. Biol. Chem. 276 (2001) 28969–28975.
[33] V.M. Navarro, J.M. Castellano, R. Fernandez-Fernandez, S. Tovar, J. Roa, A. Mayen, R. Nogueiras, M.J. Vazquez, M.L. Barreiro, P. Magni, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, Endocrinology 146 (2005) 156–163.
[34] T. Ohtaki, Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino, Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, Nature 411 (2001) 613–617.
[35] I.S. Parhar, S. Ogawa, Y. Sakuma, Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish, Endocrinology 145 (2004) 3613–3618.
[36] B. Pradet-Balade, C. Salmon, A. Hardy, B. Querat, Heterogeneity of eel thyrotropin beta mRNAs is due to a minisatellite in the 3′ untranslated region of the gene, Gene 215 (1998) 251–257.
[37] B. Quérat, M. Jutisz, Y.A. Fontaine, R. Counis, Cloning and sequence analysis of the cDNA for the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit of the European eel, Mol. Cell. Endocrinol. 71 (1990) 253–259.
[38] B. Quérat, M. Moumni, M. Jutisz, Y.A. Fontaine, R. Counis, Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative beta subunit of the type-II gonadotrophin from the European eel, J. Mol. Endocrinol. 4 (1990) 257–264.
[39] N. Richard, S. Corvaisier, E. Camacho, M.L. Kottler, KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights, Peptides 30 (2009) 123–129.
[40] N. Richard, G. Galmiche, S. Corvaisier, A. Caraty, M.L. Kottler, KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone, J. Neuroendocrinol. 20 (2008) 381–393.
[41] J. Roa, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function, Front. Neuroendocrinol. 29 (2008) 48–69.
[42] C. Salmon, J. Marchelidon, Y.A. Fontaine, J.C. Huet, B. Quérat, Cloning and sequence of thyrotropin beta subunit of a teleost fish: the eel (*Anguilla anguilla* L.), C. R. Acad. Sci. III 316 (1993) 749–753.
[43] K. Sawada, K. Ukena, H. Satake, E. Iwakoshi, H. Minakata, K. Tsutsui, Novel fish hypothalamic neuropeptide, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 6000–6008.
[44] M. Schmitz, S. Aroua, B. Vidal, N. Le Belle, P. Elie, S. Dufour, Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel, Neuroendocrinology 81 (2005) 107–119.
[45] M.E. Sébert, C. Legros, F.A. Weltzien, B. Malpaux, P. Chemineau, S. Dufour, Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function, J. Neuroendocrinol. 20 (2008) 917–929.
[46] S.B. Seminara, S. Messager, E.E. Chatzidaki, R.R. Thresher, J.S. Acierno Jr., J.K. Shagoury, Y. Bo-Abbas, W. Kuohung, K.M. Schwinof, A.G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, U.B. Kaiser, S.A. Slaugenhaupt, J.F. Gusella, S. O'Rahilly, M.B. Carlton, W.F. Crowley Jr., S.A. Aparicio, W.H. Colledge, The GPR54 gene as a regulator of puberty, N. Engl. J. Med. 349 (2003) 1614–1627.
[47] J.T. Smith, Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects, Peptides 30 (2009) 94–102.
[48] J.T. Smith, A. Rao, A. Pereira, A. Caraty, R.P. Millar, I.J. Clarke, Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo, Endocrinology 149 (2008) 1951–1959.
[49] A. Stamatakis, M. Ott, Efficient computation of the phylogenetic likelihood function on multi-gene alignments and multi-core architectures, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 363 (2008) 3977–3984.
[50] R. Stone, Ecology. Freshwater eels are slip-sliding away, Science 302 (2003) 221–222.
[51] S. Suzuki, H. Kadokawa, T. Hashizume, Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells, Anim. Reprod. Sci. 103 (2008) 360–365.
[52] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, Mol. Biol. Evol. 24 (2007) 1596–1599.
[53] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673–4680.
[54] E.L. Thompson, M. Patterson, K.G. Murphy, K.L. Smith, W.S. Dhillo, J.F. Todd, M.A. Ghatei, S.R. Bloom, Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, J. Neuroendocrinol. 16 (2004) 850–858.
[55] K. Tsutsui, G.E. Bentley, L.J. Kriegsfeld, T. Osugi, J.Y. Seong, H. Vaudry, Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction, J. Neuroendocrinol. 22 (2010) 716–727.
[56] K. Tsutsui, E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii, P.J. Sharp, A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release, Biochem. Biophys. Res. Commun. 275 (2000) 661–667.
[57] K. Ukena, A. Koda, K. Yamamoto, T. Kobayashi, E. Iwakoshi-Ukena, H. Minakata, S. Kikuyama, K. Tsutsui, Novel neuropeptides related to frog growth hormone-releasing peptide: isolation, sequence, and functional analysis, Endocrinology 144 (2003) 3879–3884.
[58] H.N. Um, J.M. Han, J.I. Hwang, S.I. Hong, H. Vaudry, J.Y. Seong, Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals, Ann. NY Acad. Sci. 1200 (2010) 67–74.
[59] F.A. Weltzien, C. Pasqualini, P. Vernier, S. Dufour, A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase, Gen. Comp. Endocrinol. 142 (2005) 134–142.
[60] B. Yang, Q. Jiang, T. Chan, W.K. Ko, A.O. Wong, Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level, Gen. Comp. Endocrinol. 165 (2009) 60–71.

Chapitre 4

Origine et histoire évolutive des récepteurs aux kisspeptines chez les vertébrés : apports des nouveaux génomes et étude de la conservation des *Kissr* chez l'anguille par détermination de leur distribution tissulaire et de leur régulation au cours d'une maturation expérimentale.

1. Introduction de l'article 2

Le chapitre qui suit s'inscrit dans un contexte différent du précédent. A cette époque, plusieurs génomes d'intérêt phylogénétique, y compris celui de l'anguille européenne, ont été rendus accessibles. Nos recherches de récepteurs aux kisspeptines dans ces nouvelles bases de données ont révélé l'existence de deux *Kissr* supplémentaires chez l'anguille, portant à trois le nombre de récepteurs aux kisspeptines chez cette espèce. Jusque là, le maximum de *Kissr* identifiés chez les téléostéens était de deux. Nos recherches ont également mis en évidence la présence de quatre *Kissr* chez un sarcoptérygien basal, le cœlacanthe, et chez un actinoptérygien non-téléostéen, le lépisostée tacheté. Le nombre maximal de *Kissr*, chez les vertébrés, était jusqu'à lors de trois chez le xénope.

Devant l'augmentation de la diversité potentielle des *Kissr* chez les vertébrés, il devenait impératif de revisiter la classification au sein de cette famille de gène. Il était également important de déterminer quels événements évolutifs avaient pu conduire à une telle diversité chez les vertébrés.

L'analyse phylogénétique des Kissr de vertébrés a permis de définir quatre clades : Kissr-1, Kissr-2, Kissr-3 et Kissr-4. L'analyse des régions génomiques conservées, ou synténies, à proximité des *Kissr* pour plusieurs espèces de vertébrés a permis d'arriver à la même conclusion que pour l'analyse phylogénétique, à savoir l'existence de quatre *Kissr* paralogues. De plus, les synténies ont permis de conclure à une origine unique des quatre *Kissr* avant les deux premières duplications génomiques globales (1R et 2R) survenues très tôt dans l'histoire évolutive des vertébrés. L'impact de la 3R, propre aux téléostéens, sur le nombre de *Kissr* aurait été masqué par de nombreuses pertes dans cette lignée.

Néanmoins, certains téléostéens possèdent toujours un système kisspeptine avec plusieurs *Kissr*. Afin de mieux comprendre les mécanismes évolutifs conduisant à la conservation de multiples copies d'un gène, nous avons étudié les distributions tissulaires des trois *Kissr* d'anguille, ainsi que leurs régulations au cours d'une maturation expérimentale. Les résultats de ces deux expériences suggèrent qu'un processus de sub-fonctionnalisation des *Kissr* dans la fonction de reproduction de l'anguille aurait permis la conservation d'une telle diversité.

2. Article 2: Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family.

Multiple Kisspeptin Receptors in Early Osteichthyans Provide New Insights into the Evolution of This Receptor Family

Jérémy Pasquier[1], Anne-Gaëlle Lafont[1], Shan-Ru Jeng[2], Marina Morini[1], Ron Dirks[3], Guido van den Thillart[3], Jonna Tomkiewicz[4], Hervé Tostivint[5], Ching-Fong Chang[6], Karine Rousseau[1], Sylvie Dufour[1]*

1 Muséum National d'Histoire Naturelle, Research Unit BOREA, Biology of Aquatic Organisms and Ecosystems, CNRS 7208- IRD207- UPMC, Paris, France, **2** National Kaohsiung Marine University, Department of Aquaculture, Kaohsiung, Taiwan, **3** Leiden University, ZF-screens B.V. and Institute of Biology, Leiden, The Netherlands, **4** Technical University of Denmark, National Institute of Aquatic Resources, Charlottenlund, Denmark, **5** Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7221 CNRS/MNHN Evolution des Régulations Endocriniennes, Paris, France, **6** National Taiwan Ocean University, Department of Aquaculture and Center of Excellence for Marine Bioenvironment and Biotechnology, Keelung, Taiwan

Abstract

Deorphanization of GPR54 receptor a decade ago led to the characterization of the kisspeptin receptor (*Kissr*) in mammals and the discovery of its major role in the brain control of reproduction. While a single gene encodes for *Kissr* in eutherian mammals including human, other vertebrates present a variable number of *Kissr* genes, from none in birds, one or two in teleosts, to three in an amphibian, xenopus. In order to get more insight into the evolution of *Kissr* gene family, we investigated the presence of *Kissr* in osteichthyans of key-phylogenetical positions: the coelacanth, a representative of early sarcopterygians, the spotted gar, a non-teleost actinopterygian, and the European eel, a member of an early group of teleosts (elopomorphs). We report the occurrence of three *Kissr* for the first time in a teleost, the eel. As measured by quantitative RT-PCR, the three eel *Kissr* were differentially expressed in the brain-pituitary-gonadal axis, and differentially regulated in experimentally matured eels, as compared to prepubertal controls. Subfunctionalisation, as shown by these differences in tissue distribution and regulation, may have represented significant evolutionary constraints for the conservation of multiple *Kissr* paralogs in this species. Furthermore, we identified four *Kissr* in both coelacanth and spotted gar genomes, providing the first evidence for the presence of four *Kissr* in vertebrates. Phylogenetic and syntenic analyses supported the existence of four *Kissr* paralogs in osteichthyans and allowed to propose a clarified nomenclature of *Kissr* (*Kissr-1* to *-4*) based on these paralogs. Syntenic analysis suggested that the four *Kissr* paralogs arose through the two rounds of whole genome duplication (1R and 2R) in early vertebrates, followed by multiple gene loss events in the actinopterygian and sarcopterygian lineages. Due to gene loss there was no impact of the teleost-specific whole genome duplication (3R) on the number of *Kissr* paralogs in current teleosts.

Citation: Pasquier J, Lafont A-G, Jeng S-R, Morini M, Dirks R, et al. (2012) Multiple Kisspeptin Receptors in Early Osteichthyans Provide New Insights into the Evolution of This Receptor Family. PLoS ONE 7(11): e48931. doi:10.1371/journal.pone.0048931

Editor: Hubert Vaudry, University of Rouen, France

Received July 20, 2012; **Accepted** October 2, 2012; **Published** November 20, 2012

Copyright: © 2012 Pasquier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: JP is a recipient of a PhD fellowship from the Ministry of Research and Education. This work was supported by grants from the National Research Agency, PUBERTEEL number ANR-08-BLAN-0173 to SRJ, CFC, KR and SD, and from the European Community, 7th Framework Programme, PRO-EEL number 245257 to AGL, RD, GT, JT and SD. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sylvie.dufour@mnhn.fr

Introduction

In 1999, a novel G protein-coupled receptor named GPR54 was cloned from the rat brain [1]. GPR54 ligands were later shown to be kisspeptins, previously described as metastasis suppressors, encoded by *Kiss1* gene [2]. As soon as this link between kisspeptins and GPR54 was unveiled, major discoveries in the field of reproductive endocrinology were realised. Kisspeptin and its receptor (GPR54/Kissr) emerged as major upstream regulators of the gonadotropic axis in mammals, by their key roles in the control of GnRH, mediation of steroid feedbacks, as well as initiation of puberty [3].

In mammalian species, a single gene, named *Kiss1r*, encodes for the kisspeptin receptor. To date the only exception is the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), a non-placental mammal, in which two receptors are present [4]. Contrasting situations are found in other tetrapods, as shown by a lack of *Kissr* in birds and up to three *Kissr* paralogous genes in an amphibian species, the xenopus (*Xenopus tropicalis*) [4]. In teleosts, at least one *Kissr* is present in all species investigated so far (for review [5]). A second *Kissr* gene could be evidenced in some species including zebrafish (*Danio rerio*) [6], goldfish (*Carassius auratus*) [7], medaka (*Oryzias latipes*) [4], and striped bass (*Morone saxatilis*) [8]. However, this second paralog is lacking in the genomes of other teleosts, such as fugu (*Takifugu niphobles*), tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*) and stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Concerning cyclostomes, we recently identified one *Kissr* gene in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome [9]. The homology relationships between the various *Kissr* and the evolutionary events that led to such diversity are still ambiguous.

Recently the genomes of three osteichthyan species of particular phylogenetic interest have been published: the coelacanth, *Latimeria chalumnae*, a representative of early sarcopterygians

(coelacanth genome project, Broad Institute), the spotted gar, *Lepisosteus oculatus*, a non-teleost actinopterygian [10], and the European eel, *Anguilla anguilla*, a member of an early group of teleosts (elopomorphs) [11]. In the present study, we investigated the presence of *Kissr* in the genome of those relevant species.

We previously initiated the study of *Kissr* in the eel [9]. Due to its phylogenetical position, the eel may provide insights into ancestral regulatory functions in teleosts [12], the largest group of vertebrates. Furthermore, its striking biological cycle, with a blockade of sexual maturation as long as the reproductive oceanic migration is not performed, makes the eel a powerful model to investigate neuroendocrine mechanisms of puberty [13]. We formerly cloned the cDNA of one *Kissr* from the European eel brain [9].

In the present study, we report the occurrence of two additional *Kissr* in the eel, providing the first evidence for three *Kissr* in a teleost species. We also identified four *Kissr* in both coelacanth and spotted gar genomes, providing the first evidence for the presence of four *Kissr* in vertebrate species. Phylogenetic and syntenic analyses allowed us to assess the existence of four *Kissr* paralogs in osteichthyans and to raise new hypotheses on the origin and evolutionary history of vertebrate *Kissr* family. These data also let us propose a clarified *Kissr* nomenclature, based on these four paralogons. Finally, in order to get some insights into the potential process driving the conservation or the loss of multiple *Kissr*, we focused on the analyses of their tissue distributions and regulations during experimental maturation in the eel.

Materials and Methods

Animals

European eels (*Anguilla anguilla*) were at the prepubertal "silver" stage, which corresponds to the last continental phase of the eel life cycle, preceding the oceanic reproductive migration. Cloning and tissue distribution were performed using female and male eels purchased from Rungis International Market (Rungis, France) and transferred to MNHN, France. Eel manipulations were performed according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture and Fisheries; Veterinary Department for Animal Health and Protection, under the supervision of authorised investigators (agreement N°I-75UPMC-F1-07). Experimental gonadal maturation was performed on farmed female eels at the DTU Aqua research facility at Lyksvad Fishfarm, Vamdrup, Denmark. Eel manipulations and experimental maturation were performed according to the guidelines of Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries; Danish Veterinary and Food Administration (Approval reference for maturation experimentations: 2010/561-1783 "artificial reproduction of European eel"). Pain, suffering and stress were attempted minimized during transport and rearing throughout the experiments. All eels were anesthetized using benzocaine before sacrifice and whenever needed in relation to treatment.

Identification of *Kissr* sequences

European eel genome database analysis. The TBLASTN algorithm of the CLC DNA Workbench software (CLC bio, Aarhus, Denmark) was used to retrieve the genomic sequences of three *Kissr* (named *Kissr-1*, *Kissr-2* and *Kissr-3*) from the European eel genome database [11]. The peptidic sequences of the previously characterized eel Kissr (named here Kissr-2) [9], of the two zebrafish *Kissr*, and of the three xenopus Kissr were used as queries.

Coelacanth and spotted gar genomic database analyses. The TBLASTN algorithm (search sensitivity: near exact matches (short)) of the *e*!ENSEMBL website was used to retrieve the genomic sequences of four coelacanth *Kissr* and four spotted gar *Kissr* from their genomic databases, respectively. The peptidic sequences of the three eel Kissr identified in the present study, of the three xenopus Kissr and of the two predicted platypus Kissr were used as queries.

The exons and splicing junctions were predicted using the empirical nucleotidic splicing signatures, *i.e.* intron begins with "GT" and ends with "AG". The 7 transmembrane domains were determined using TMHMM software (TMHMM Server v. 2.0).

Phylogenetic analysis

Amino-acid sequences of 51 known or predicted *Kissr* were first aligned using ClustalW [14], then manually adjusted. The JTT (Jones, Taylor and Thornton) protein substitution matrix of the resulting alignment was determined using ProTest software [15]. Phylogenetic analysis of the Kissr sequence alignment was performed using the maximum likelihood method (RaxML software [16]), with 1,000 bootstrap replicates.

Identity and similarity percentages between two sequences were calculated using EMBOSS Matcher.

Syntenic analysis

The synteny analyses of the eel *Kissr-1*, *Kissr-2*, *Kissr-3* genomic regions were manually performed using CLC DNA Workbench 6 software and the European eel genome database. The analyses of the neighbouring genes of the four predicted spotted gar *Kissr* were performed using the preliminary gene annotation of the genome assembly LepOcu1 generated by Ensembl release 67. Synteny maps for the genomic neighbourhoods of the *Kissr* genes in human, platypus, lizard (*Anolis carolinensis*), xenopus, zebrafish, medaka, stickleback, tetraodon and coelacanth (as well as of the corresponding region in chicken (*Gallus gallus*) were performed using the PhyloView of Genomicus v67.01 web site [17]. The analysis of the neighbouring genes of the four predicted coelacanth *Kissr* paralogs was completed by the automatic and manual gene annotation of the coelacanth genome.

Cloning of the full-length cDNAs encoding eel Kissr-1 and Kissr-3

Total RNA from eel brain (di-/mes-encephalon) was extracted using Trizol reagent and reverse-transcripted as previously described [9]. 5′ and 3′ UTR genomic sequences of predicted *Kissr-1* and *Kissr-3* were used to design specific primers (Table S1) in order to amplify by PCR their full coding sequences (CDS). Standard PCRs were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 3 min at 94°C; then 40 cycles with 30 s at 94°C for denaturing, 30 s at various temperatures (54°C for *Kissr-1* and 66°C for *Kissr-3*) for annealing, 1 min 30 s at 72°C for primer extension, and a single final extension step of 5 min at 72°C. PCR products were purified with the QUIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and inserted in a pCR™4-TOPO® TA vector provided by the TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen). The vectors were then transfected in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). After the bacteria containing a vector with insert had grown in miniprep cultures, vectors were extracted and purified using QUIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Their inserts were then sequenced at GATC biotech Ltd (Konstanz, Germany). The obtained sequences were submitted to EMBL.

Kissr tissue distribution in the eel

Various tissues were collected from eight freshwater female silver European eels to investigate the distribution of *Kissr-1*, *Kissr-2* and *Kissr-3* expressions, using qPCR. Eels were sacrificed by decapitation. The following organs were sampled, stored in RNAlater (Ambion-Inc, Austin, TX, USA) and kept frozen at −20°C until RNA extraction: brain, pituitary, ovary, muscle, eye, liver, adipose tissue, kidney, intestine and spleen. The brain was dissected into five parts [18]: olfactory bulbs, telencephalon, di-/mes-encephalon, *cerebellum* and *medulla oblongata*. In addition, testes from eight freshwater male silver European eels were also sampled.

Eel experimental maturation

Farmed female silver European eels transferred to seawater (36‰) received weekly injections of salmon pituitary extract for four months to induce vitellogenesis followed by one dihydroxy-progesterone injection to induce final oocyte maturation and ovulation, according to [19]. Analyzes were performed on nine matured eels and seven controls. After sacrifice, anterior brain divided in two parts (olfactory bulbs/telencephalon; di-/mesen-cephalon), pituitary and ovary were dissected and stored in RNAlater and kept frozen at −20°C until RNA extraction.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Eel *Kissr-1*, *Kissr-2* and *Kissr-3* specific primers (Table S1) were designed based on the full-length European eel CDS sequences cloned in this study (*Kissr-1* and *Kissr-3*) and previously [9] (*Kissr-2*), using Primer3 Software (Whitehead Institute/Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA). The *Kissr-3* qPCR primers were designed in exon-3, to quantify the expression level of the three *Kissr-3* mRNA splicing isoforms at once. To optimize the assays, different annealing temperatures were tested according to the melting temperature (Tm) of primers. To assess their specificity, amplification products were sequenced at GATC Biotech Ltd. Primers for European eel *LHβ*, *mGnRH* and reference gene *β-actin* were as previously designed [18,20] (Table S1). All primers were purchased from Eurofins (Ebersberg, Germany).

Quantitative assays of eel *Kissr-1*, *Kissr-2*, *Kissr-3*, *mGnRH*, *LH-β* and *β-actin* mRNAs were performed using the LightCycler® System (Roche, Ltd. Basel, Switzerland) with SYBER Green I sequence-unspecific detection as previously described [18,20,21]. The qPCR primers are listed in Table S1. The qPCRs were prepared with 4 µl of diluted cDNA template, 2 µl of PCR grade water, 2 µl of SYBR Green master mix and 1 µl of each forward and reverse primer (0.5 pmole each at final concentration). The qPCRs were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 10 min at 95°C; then 41 cycles with 15 s at 95°C for denaturing, 5 s at 60°C (*Kissr-1*, *Kissr-2*, *mGnRH*, *LH-β* and *β-actin*) or 62°C (*Kissr-3*) for annealing, 10 s at 72°C for primer extension, 5 s at 83°C to avoid measurement of non-specific annealing; and a single final extension step of 5 min at 72°C. Each qPCR run contained a non-template control (cDNA was substituted by water) for each primer pairs to confirm that reagents were not contaminated. The efficiency of all primers was tested and the specificity of each reaction was assessed by melting curve analysis to ensure the presence of only one product, and by sequencing. Individual tissue samples were then analyzed in duplicate by qPCR. Serial dilutions of cDNA pool of brain tissues were run in duplicate and used as a common standard curve and also included in each run as a calibrator. Normalisation of data was performed using total RNA content for the tissue distribution samples, and using *β-actin* mRNA level for experimental maturation samples.

Statistical analysis

Results are given as mean ± SEM. Means were compared by Student's *t*-test using Instat (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif., USA).

Results and Discussion

Characterization of three European eel *Kissr*

Genomic prediction of three eel *Kissr* genes. We used the deduced peptidic sequence from the previously cloned European eel *Kissr* cDNA [9] (considered as *Kissr-2* in the present study) as a query to retrieve *Kissr* sequences in the European eel genome. TBLASTN results revealed the presence of three different *Kissr* genes, called *Kissr-1*, -2, -3, each made of 5 exons and 4 introns (Fig. S1), that constitutes the conserved structure of *Kissr* genes. The lengths of exon-2, exon-3 and exon-4 are the same for all three genes with 125 bp, 136 bp and 239 bp, respectively. The exon-1 of *Kissr-1*, *Kissr-2* and *Kissr-3* is 235 bp, 214 bp and 229 bp, respectively. The exon-5 is 348 bp, 372 bp and 351 bp, respectively. This leads to predicted *Kissr-1*, *Kissr-2* and *Kissr-3* CDS of 1083 bp, 1086 bp and 1080 bp, respectively.

Cloning of eel *Kissr* cDNAs. Using European eel specific *Kissr-1* primers, PCRs performed on brain cDNAs led to a single product. Its sequence (EMBL: HE802271) encompassed partial 5′ and 3′ UTRs of 199 bp and 102 bp, respectively, and a full CDS of 1083 bp. Once translated, the cloned *Kissr-1* CDS gives a 360-aa receptor, exhibiting the seven transmembrane domains (TMD) characteristic of the GPCR family (Fig. 1A).

The previously cloned eel *Kissr* cDNA [9] is named *Kissr-2* in the present study.

Using European eel specific *Kissr-3* primers, PCRs performed on brain cDNAs led to the isolation of three different products (EMBL: HE802272, HE802273 and HE802274). Their sequence revealed three *Kissr-3* isoforms – named here *Kissr-3*_v1 (Fig. 1B), *Kissr-3*_v2 and *Kissr-3*_v3 (Fig. S2). The partial 5′ and 3′ UTR are 167 and 147 bp for all three isoforms. The *Kissr-3*_v1 isoform corresponds to the 5 predicted exons from the eel genome. Once translated, it gives a 359-aa receptor exhibiting the seven conserved TMD (Fig. 1B). The *Kissr-3*_v2 CDS corresponds to the 5 predicted exons, minus the 76 first nucleotides of the exon-2 that are missing (Fig. S2A). The loss of these 76 nucleotides results in a shift of the *Kissr-3* reading frame and the occurrence of a first premature termination codon at position 280 pb. Once translated, it gives a 93-aa protein. This shorter protein exhibits a single TMD encoded by exon-1. The *Kissr-3*_v3 CDS corresponds to exon-1, exon-3, exon-4 and exon-5, while exon-2 is completely missing (Fig. S2B). The loss of exon-2 results in a shift of the *Kissr*-3 reading frame without the occurrence of any premature termination codon. Once translated, it gives a 361-aa protein, which exhibits only one TMD encoded by exon-1. The presence of the three *Kissr-1*, *-2*, and *-3* transcripts and of the three *Kissr-3* mRNA isoforms was also observed in Japanese eel (*Anguilla japonica*) brain cDNAs (data not shown).

To date, only one or two *Kissr* genes had been found in the genome of teleosts (reviewed by [5]), so the eels provide the first evidence of the presence of three *Kissr* genes in teleosts. Until now three *Kissr* genes had been found only in an amphibian species, xenopus [4].

In addition to this *Kissr* gene diversity, European and Japanese eels present three *Kissr-3* mRNA isoforms revealing similar alternative splicing in both species. The existence of *Kissr* mRNA splicing isoforms has been described in two other teleosts, the sole (*Solea senegalensis*) [22] and the zebrafish [23]. In the sole, two isoforms were identified for the single *Kissr* (*Kissr-2* type) gene

A European eel Kissr-1

```
   1 - TTGTCCTGCTGCTTGATATTACACACATTCATAGTAAAATGTCCTGTGTTTATTCTAGTCTCAACAGAATGTTATCTATTAAAAGATGAATTAACACTGGAC
 103 - ATTTTACTGTGTAAGCCAACTATGTAACGTGCATGTACTACAATAAGGACACGCGCAAGGCATAACAGCCTTTTAAAATGTTTTACGTTCCAAGGTTATGCT
   1 -                                                                                                   M  L
 205 - CGGCGTGCCCCCGAACAGCTCAGGATCCGCTGTTCTTGGTAACGAGTCCTGCAAGTTGGCGAAGCTCTGCAACGATTCAGCCAAATTCGAGCCCCCGTTTCT
   3 -  G  V  P  P  N  S  S  G  S  A  V  L  G  N  E  S  C  K  L  A  K  L  C  N  D  S  A  K  F  E  P  P  F  L
 307 - GGTAGACGCATGGCTCGTGCCGCTTCTCTTCGCTATTTTAATGGTGATCGGACTGGCAGGAAATTCACTGGTCATCTATGTGATTTCTAAACACAAGAGAAC
  37 -  V  D  A  W  L  V  P  L  L  F  A  I  L  M  V  I  G  L  A  G  N  S  L  V  I  Y  V  I  S  K  H  K  R  T
                                                   TMD1
 409 - GCAAACTGCAACTAACTTCTATATTGCTAACCTGGCAACCACTGACATCATTTTTCTGGTGTGCTGTGTTCCATTCACTGCCGTGCTGTATCCGCTTCCCAG
  71 -  Q  T  A  T  N  F  Y  I  A  N  L  A  T  T  D  I  I  F  L  V  C  C  V  P  F  T  A  V  L  Y  P  L  P  S
                                                   TMD2
 511 - CTGGGTCTTTGGTGACTTCATGTGCAAGTTCGTCAGCTATATCCAACAGGTGTCAGCACAGGCAACCTGTGTAACACTGACAGCAATGAGTGTGGATCGTTG
 105 -  W  V  F  G  D  F  M  C  K  F  V  S  Y  I  Q  Q  V  S  A  Q  A  T  C  V  T  L  T  A  M  S  V  D  R  W
                                                                                   TMD3
 613 - GTATGTCACTGTATGCCCACTGCGTTCCCTGAGTTGTCGAACCCCACAAGTTACCACGCTGGTCAGCATTGGAATCTGGATCGGCTCGTTCCTGGTGTCTGT
 139 -  Y  V  T  V  C  P  L  R  S  L  S  C  R  T  P  Q  V  T  T  L  V  S  I  G  I  W  I  G  S  F  L  V  S  V
                                                                                                   TMD4
 715 - GCCAGTGCCAATGTACAGCAAGACCATGCTGGGTGAGTGGTATGGTCCCCAGGTCTACTGCACAGAGAATTTCCCCACTCTTTTCCACAAGAAGGCTTTCAT
 173 -  P  V  P  M  Y  S  K  T  M  L  G  E  W  Y  G  P  Q  V  Y  C  T  E  N  F  P  T  L  F  H  K  K  A  F  I

 817 - TCCCTACAACTTCCTGGCTGTGTACATGCTCCCACTGGTAACCACCTGCATCTGCTACATGGTTATGCTGAATCGCATGGGTCACACCTTTGTGGAGCCTCT
 207 -  P  Y  N  F  L  A  V  Y  M  L  P  L  V  T  T  C  I  C  Y  M  V  M  L  N  R  M  G  H  T  F  V  E  P  L
                                   TMD5
 919 - TGAAAACAACCACCAGCTGCAGGTCTTGTCGGAGCGCTCCGTGGCCATGAAGACCAAAGTTTCCCGCATGGTGGTGGTGATCGTGCTGCTCTTCACTTTGTG
 241 -  E  N  N  H  Q  L  Q  V  L  S  E  R  S  V  A  M  K  T  K  V  S  R  M  V  V  V  I  V  L  L  F  T  L  C

1021 - CTGGGGCCCCATCCAGTTCTACATCCTTGCGCAGGCCTTCAGTCCGCACTTCCGTCACAACTACTGCACCTATAAGCTGAAGATCTGGGCCCACTGCATGTC
 275 -  W  G  P  I  Q  F  Y  I  L  A  Q  A  F  S  P  H  F  R  H  N  Y  C  T  Y  K  L  K  I  W  A  H  C  M  S
        TMD6
1123 - CTACACCAACTCTTGCATCAACCCCATTGTTTATGCCTTCATGGGCGTCAATTTCCGCAAAGCCTTCAAACGAGCTTTCCCTTGCATTTTCAAACAGCGTGT
 309 -  Y  T  N  S  C  I  N  P  I  V  Y  A  F  M  G  V  N  F  R  K  A  F  K  R  A  F  P  C  I  F  K  Q  R  V
                TMD7
1225 - GGCAGTTGCCCAGCCAGCACATGGCACTGCCAACACTGAAATGCACTTTTTCTCTTAGACCTCCTAAACTAAGTCTGTTGGTTTCTTGTGTGCTTAAAGATT
 343 -  A  V  A  Q  P  A  H  G  T  A  N  T  E  M  H  F  F  S  *
1327 - TTCCTGAGACAATCTGGCTCATGACCCCAAACAAGCTGGGACTGGCTCTGTTGACCTC
```

B European eel Kissr-3_v1

```
   1 - ATATTAAAGGCAGGGGACAGACTGGTGCTCCTGCTTTCCACCAGACCGCAACCCCATGGGCTGCTGCCCCACGCTGTGATTGGCTGGGACTCTCAGGCTGCT
 103 - GCAGGCTCAGTTCTATAGGCCTGGACTTGCCGTGATTGGCTGGCATTGTGAGGACGCCGGTTACCATGGAGGACGGATGGCAACCGAACGGCACCGCCGCTC
   1 -                                                                                 M  E  D  G  W  Q  P  N  G  T  A  A  P
 205 - CACCGTGCGACCCGGACGCGGCGTGCAACGGCTCGGCGCTGGCGCTCCTGACTCCGCCCCTGCTGGTGGACGCCTGGCTGGTTCCCCTGTTCTTCGCCATCA
  14 -   P  C  D  P  D  A  A  C  N  G  S  A  L  A  L  L  T  P  P  L  L  V  D  A  W  L  V  P  L  F  F  A  I  I

 307 - TCATGCTGCTCGGCCTTGTGGGAAACTCCCTGGTCATCTACGTGGTCACCAAGCACCGGCAGATGAAGACGGTCACTAACTTCTACATCGCGAATCTGGCAA
  48 -  M  L  L  G  L  V  G  N  S  L  V  I  Y  V  V  T  K  H  R  Q  M  K  T  V  T  N  F  Y  I  A  N  L  A  T
            TMD1
 409 - CCACTGACATCCTATTCCTGGTGTGTTGTGTTCCCTTCACTGCAACCCTCTACCCCCTGCCCAGCTGGGTGTTTGGGGACTTTATGTGCAGACTGGTCAACT
  82 -  T  D  I  L  F  L  V  C  C  V  P  F  T  A  T  L  Y  P  L  P  S  W  V  F  G  D  F  M  C  R  L  V  N  Y
                TMD2
 511 - ACCTTCAACAGGTGACGGTGCAGGCGACCTGCATCACGCTGTCGGCCATGAGCGTGGATCGCTGCTACGTGACCGTTTATCCTCTTCAGTCCCTACGCCATC
 116 -  L  Q  Q  V  T  V  Q  A  T  C  I  T  L  S  A  M  S  V  D  R  C  Y  V  T  V  Y  P  L  Q  S  L  R  H  R
                     TMD3
 613 - GAACGCCACGCATGGCCATGGCCGTCAGCATCGCCATCTGGACAGGGTCGCTGGGACTCTCTGTGCCTGTGGCGGTGTACCAGCGGCTGGAGACGGGGTACT
 150 -   T  P  R  M  A  M  A  V  S  I  A  I  W  T  G  S  L  G  L  S  V  P  V  A  V  Y  Q  R  L  E  T  G  Y  W
                                                   TMD4
 715 - GGTACGGCCCGCAGGTGTACTGCACCGAGTCCTTCCCCTCCCCCGAGCGCCAGAAGGCCTTCATCCTCTACACCTTCCTGGCGGTCTACCTGCTGCCGCTGC
 184 -   Y  G  P  Q  V  Y  C  T  E  S  F  P  S  P  E  R  Q  K  A  F  I  L  Y  T  F  L  A  V  Y  L  L  P  L  L
                                                                                                   TMD5
 817 - TCACCATCTGCCTGTGCCACGCCTTCATGCTCAAACGCATGGGCCAGCCCGCGGTGGAGCCCGCAGACAACAGCTACCAGGTGCAGGTGCTGGCGGAGAGGG
 218 -  T  I  C  L  C  H  A  F  M  L  K  R  M  G  Q  P  A  V  E  P  A  D  N  S  Y  Q  V  Q  V  L  A  E  R  A

 919 - CGGAGGCGGTGCGGACGCGGATCTCGCGCATGGTGGTGGTGATGGTGCTGCTCTCCACCGTCTGCTGGGGCCCCATCCAGCTGTCCGTCCTGTACCAGGCCC
 252 -   E  A  V  R  T  R  I  S  R  M  V  V  V  M  V  L  L  S  T  V  C  W  G  P  I  Q  L  S  V  L  Y  Q  A  L
                                                                                   TMD6
1021 - TCCACCCGGCCACGCGCAGGAGCTACGCCCTCTACAAACTGAAGATCTGGGCCCACTGCATGTCCTACTCCAGCTCCTCCGTCAACCCCATCATCTACGCCT
 286 -   H  P  A  T  R  R  S  Y  A  L  Y  K  L  K  I  W  A  H  C  M  S  Y  S  S  S  S  V  N  P  I  I  Y  A  F
                                                                                         TMD7
1123 - TCATGGGAGCGAACTTCAGAAAGTCCTTCAGAAAGGCCTTTCCTTTCATCTTCAAACGCAGGGCCGGGAGAACAGCGGGGGCCTCGGCCAACACAGAGCTGC
 320 -  M  G  A  N  F  R  K  S  F  R  K  A  F  P  F  I  F  K  R  R  A  G  R  T  A  G  A  S  A  N  T  E  L  H

1225 - ACTACCTTTCATCCGGAACATGAAGGACCGCAAAAGGCCAGGCTGCATCACACATACACACACACATGTACATGCACACACACACACACACACACACTCC
 354 -   Y  L  S  S  G  T  *
1327 - CTCAGGACAGAGAAAACAGGCTAAAAAAAAAAGCAGTGCGTTTGGACACTGACACGCTTATATCCGAC
```

Figure 1. Molecular cloning of eel *Kissr-1* and *Kissr-3_v1*. Nucleotide and deduced amino-acid sequence of the cDNA encoding the eel *Kissr-1* (A) and *Kissr-3_v1* (B). Nucleotides (top) are numbered from 5′ to 3′. The amino-acid residues (bottom) are numbered beginning with the first methionine residue in the ORF. The asterisk (*) indicates the stop codon. The predicted seven transmembrane domains (TMD) are underlined and the cysteines involved in a disulphide bridge are shaded in grey.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g001

present in this species and they differ by the retention of intron III, while in the eel they differ by partial or complete deletion of exon-2 in *Kissr-3* [22]. In the zebrafish, five isoforms were identified for *Kiss1rb* (*Kissr-3* type), while no splicing isoform was observed concerning *Kiss1ra* (*Kissr-2* type). Among the five zebrafish *Kiss1rb* isoforms, one of them, called *KRBDP1*, resulted from the deletion of exon-2 and corresponds to eel *Kissr-3_v3* [23]. Even though the existence of other *Kissr* mRNA isoforms in the eel cannot be excluded, the three genes and several isoforms described here highlight the *Kissr* molecular diversity in basal teleosts. They also could reflect an ancestral post-transcriptional regulatory process of *Kissr*.

Genomic prediction of four coelacanth and four spotted gar *Kissr* genes

To further assess the *Kissr* diversity in vertebrates, we investigated the presence of these genes in the genomes of the spotted gar, a non-teleost actinopterygian, and the coelacanth, a basal sarcopterygian, two species of relevant phylogenetical positions. We performed a TBLASTN in both genomes (Ensembl) using the three European eel, the two zebrafish and the three xenopus Kissr proteins as queries. The TBLASTN results revealed the existence of four *Kissr* genes in both coelacanth and spotted gar genomes, named here *Kissr-1*, *Kissr-2*, *Kissr-3* and *Kissr-4*.

Four *Kissr* genes in the coelacanth genome. The four predicted *Kissr* genes of coelacanth are made of 5 exons and 4 introns. The predicted CDS and the exon-exon junctions of each putative transcript are shown in Fig. S3. Once translated, the putative transcripts lead to four predicted proteins, *i.e.* coelacanth Kissr-1, Kissr-2, Kissr-3 and Kissr-4, of 368-aa, 367-aa, 377-aa and 367-aa, respectively (Fig. S3).

Four *Kissr* genes in the spotted gar genome. The four predicted *Kissr* genes of spotted gar are also made of 5 exons and 4 introns. Although *Kissr-1* exon-4 and *Kissr-4* exon-5 are partial due to the current status of the genome, the predicted CDS and the exon-exon junctions of each putative transcript are shown in Fig. S4. Once translated, the putative transcripts lead to four predicted proteins, *i.e.* spotted gar Kissr-1 to 4 of 318-aa, 362-aa, 382-aa, and 385-aa, respectively (Fig. S4).

In both coelacanth and spotted gar, all predicted Kissr proteins present the typical seven TMD of the GPCR family (Fig. S3 and S4).

These new findings evidence for the first time the potential existence of four *Kissr* paralogs in vertebrate species, representatives of the sarcopterygian (coelacanth) and the actinopterygian (spotted gar) lineages.

Phylogenetic analysis of the *Kissr* family

Other genomic database analyses. In addition to the characterisation and/or the prediction of European eel, coelacanth and spotted gar *Kissr*, we used the ENSEMBL Genome Browser to retrieve the sequences of two *Kissr* in the medaka genome (GPR54-1, chromosome 17 and GPR54-2, chromosome 9; [4]), and to search for new candidate *Kissr* genes in the genomes of other vertebrates. We found one putative *Kissr* gene, named here *Kissr-2*, in several teleost genomes, stickleback (chromosome group III), tetraodon (chromosome 15-random) and cod (*Gadus morhua*; scaffold 377), one *Kissr* in a cyclostome genome, sea lamprey (scaffold GL478157; [9]), and one in the lizard genome (chromosome 2).

Phylogenetic analysis. Based on an alignment of 51 Kissr peptidic sequences (Fig. S5), and assuming ambulacrarian (acorn worm, *Saccoglossus kowalevskii*, and purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Table S2)) Kissr as outgroup, a phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood method (the list of sequences and accession numbers is provided in Table S2). As shown in Fig. 2, it clusteres the vertebrate Kissr into four main clades, which are supported by significant bootstrap values (99, 90, 73, and 90%, respectively). Based on this analysis and the determination of those four clades, we propose the following new nomenclature of the different Kissr.

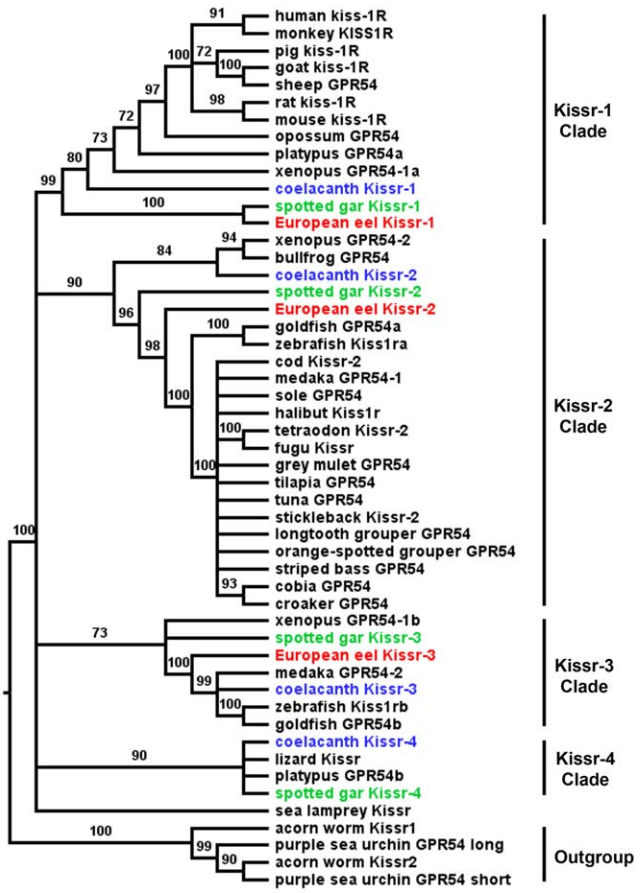


Figure 2. Consensus phylogenetic tree of the vertebrate kisspeptin receptors (Kissr). This phylogenetic tree was constructed based on the amino-acid sequences of Kissr (for the references of each sequence see Table S2) using the Maximum Likelihood method with 1,000 bootstrap replicates. The number shown at each branch node indicates the bootstrap value (%); only values and branching above 70% are indicated. The tree was rooted using the two sequences of the hemichordata acorn worm GPR54-1 and GPR54-2 and the two sequences of echinodermata purple sea urchin Kissr_short and Kissr_-long. The European eel Kissr and predicted coelacanth and spotted gar Kissr are coloured in red, blue and green, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g002

The first clade mainly encompasses sarcopterygian Kissr including all eutherian Kissr, a metatherian Kissr (*Monodelphis domestica*; opossum GPR54), a prototherian Kissr (platypus GPR54a), a xenopus Kissr (GPR54-1a) and coelacanth Kissr-1. In addition, two actinopterygian Kissr, spotted gar and European eel Kissr-1, branch together at the base of this clade. This is the first evidence of the presence of an ortholog to eutherian Kissr in actinopterygians. Acknowledging the presence of eutherian (including human) Kissr, which have been the first to be discovered, this clade was named Kissr-1 clade. The eel is up to now the only teleost presenting an ortholog (eel Kissr-1) to mammalian Kissr.

The second clade, named Kissr-2, clusters mainly actinopterygian Kissr, *i.e.* spotted gar Kissr-2 and most of the previously described teleost Kissr including zebrafish Kiss1ra, goldfish GPR54a, medaka GPR54-1 and European eel Kissr-2. This clade also clusters together three sequences from sarcopterygian species, xenopus GPR54-2, bullfrog (*Rana catesbeiana*) GPR54 and coelacanth Kissr-2.

The third clade, named Kissr-3, clusters two sarcopterygian Kissr (xenopus GPR54-1b and coelacanth Kissr-3) and some actinopterygian Kissr (spotted gar Kissr-3 and a few teleost Kissr: zebrafish Kiss1rb, goldfish GPR54b, medaka GPR54-2 and European eel Kissr-3).

The fourth clade, named Kissr-4, clusters three sarcopterygian Kissr (platypus GPR54b, lizard Kissr and coelacanth Kissr-4) with one actinopterygian Kissr, the spotted gar Kissr-4.

This phylogenetic analysis suggests the existence of four distinct paralogous Kissr in osteichthyans. Furthermore, it shows that each sarcopterygian Kissr is orthologous to actinopterygian Kissr. This is specially highlighted by the relationship between the four coelacanth and spotted gar Kissr.

Syntenic analysis of *Kissr* genes

In order to test the results obtained with the phylogenetic analysis, we performed a syntenic analysis of the *Kissr* neighbouring genes, an approach which is applied to determine gene orthology relationships as well as the origin and evolutionary history of gene families. For this analysis (Fig. 3), we considered the following vertebrate representatives: mammals (eutherian: human and prototherian: platypus), bird (chicken), squamate (lizard), amphibian (xenopus), basal sarcopterygian (coelacanth), non-teleost actinopterygian (spotted gar) and teleosts (zebrafish, medaka, stickleback, tetraodon and European eel). As already reported (for review: [5,24–26]), genomic synteny analysis shows that birds do not possess any *Kissr* gene.

The mammalian, amphibian, coelacanth, spotted gar and European eel genes from Kissr-1 clade are positioned in genomic regions containing common loci, including *PALM*, *PTBP1*, *LPPR3*, *MED16*, *ARID3A*, *WDR18*, *GRIN3B*, *C19orf6*, *GADD45B* and *DIRAS1*, exhibiting well conserved synteny (Fig. 3A). This supports the orthology of the *Kissr-1* genes. Syntenic analysis suggests that the other teleost genomes do not contain any *Kissr-1* gene, though the above-mentioned neighbouring genes are present in the corresponding genomic regions (Fig. 3A). The eel currently provides a unique example of *Kissr-1* ortholog in teleosts.

The amphibian, coelacanth, spotted gar and teleost genes from Kissr-2 clade are positioned in genomic regions containing common loci, including *PTPRF*, *KDM4A*, *ST3GAL3*, *DPH2*, *ATPV60B*, *B4GALT2*, *CCDC24*, *KIF2C*, *PTCH2*, *EIF2B3*, *ZCCHC11*, *GLIS1*, *GADD45A*, *DIRAS3*, *LPAR3*, *ZNF644*, *PTBP2* and *PALMD*, exhibiting well conserved synteny (Fig. 3B). This supports the orthology of the *Kissr-2* genes. European eel *Kissr-2* orthology is only supported by the presence of partial *GLIS1* due to the small size of the scaffold. Syntenic analysis suggests that squamate (lizard) and mammalian genomes do not contain any *Kissr-2* gene, though the above-mentioned neighbouring genes are present in the corresponding genome regions (Fig. 3B).

The amphibian, teleost (zebrafish, medaka, European eel) and spotted gar *Kissr-3* genes are positioned in genomic regions containing common loci including *PSAT1*, *ISCA1*, *ZCCHC6*, *GADD45G*, *DIRAS2*, *PALM2*, *LPAR1* and *PTBP3*, exhibiting conserved synteny (Fig. 3C). This supports the orthology of the *Kissr-3* genes. Syntenic analysis suggests that the other teleost and tetrapod genomes do not contain any *Kissr-3* gene, though the above-mentioned neighbouring genes are present in the corresponding genome regions. The coelacanth predicted *Kissr-3* is split into the scaffolds JH131603.1 and JH131921.1, which are too small to contain any other gene (Fig. 3C).

Platypus and lizard *Kissr-4* gene neighbouring regions present only *RETN* gene in common, due to the small size of the platypus scaffold (Fig. 3D). Assemblage of three scaffolds (JH133705.1, JH132986.1, and JH127844) from coelacanth genome allowed us to reveal a *Kissr-4* neighbouring region comprising *LPAR2*, *STXBP2* and *EPHX3* genes, with *STXBP2* and *EPHX3*, being also present in lizard and spotted gar *Kissr-4* region (Fig. 3D). These data suggest that *Kissr-4* genes can be considered as orthologous. Syntenic analysis also suggests that the genomes from placental mammals, amphibian and teleosts do not contain any *Kissr-4* gene, though they present in a common region some conserved genes including *CAMSAP3*, *XAB2*, *STXBP2*, *RETN*, *RAB3D*, *PALM3*, *NOTCH3*, *EPHX3*, *WIZ* and *LPAR2* (Fig. 3D).

This syntenic analysis of *Kissr* genes delineated four different conserved genomic regions among osteichthyans. For each conserved genomic region, *Kissr* genes from various species clustered in the corresponding phylogenetic Kissr clade. Thus, the results of the syntenic analysis fully validated the orthology relationships of the phylogenetic analysis and further supported our proposal for a new nomenclature.

Evolutionary history of *Kissr* family

Origin of the four *Kissr* present in basal osteichthyans. So far, the presence of *Kissr* has been characterised in two non-vertebrate species, the purple sea urchin and the acorn worm (Table S2). This revealed the existence of at least one ancestral *Kissr* before the vertebrate emergence. The predictions of four *Kissr* in the genomes of a basal sarcopterygian, the coelacanth, and of an actinopterygian, the spotted gar, together with the results of both phylogenetic and syntenic analyses, enabled us to hypothesise the existence of at least four *Kissr* paralogous genes in the common osteichthyan ancestor of the sarcopterygian and actinopterygian lineages. A remaining question was to infer whether these four genes resulted from the duplications of one or multiple ancestral *Kissr* genes.

It is currently admitted that two rounds of whole genome duplication (1R and 2R) occurred in the early vertebrate evolutionary history, resulting in four-fold replicates of the ancestral genome. Even though numerous genomic rearrangements and loss events occurred during the vertebrate radiation, the vestiges of these two successive genome duplications can be revealed in the current vertebrate species by the existence of numerous four-fold repeated regions (tetra-paralogon) carrying paralogous genes [27].

Our syntenic analysis demonstrated that the current osteichthyan *Kissr* genes are localised in four different genomic regions. In the Fig. 3, in addition to the *Kissr* genes, we could reveal paralogs from eight gene families present among the four syntenic regions of the osteichthyan representative species. The eight considered

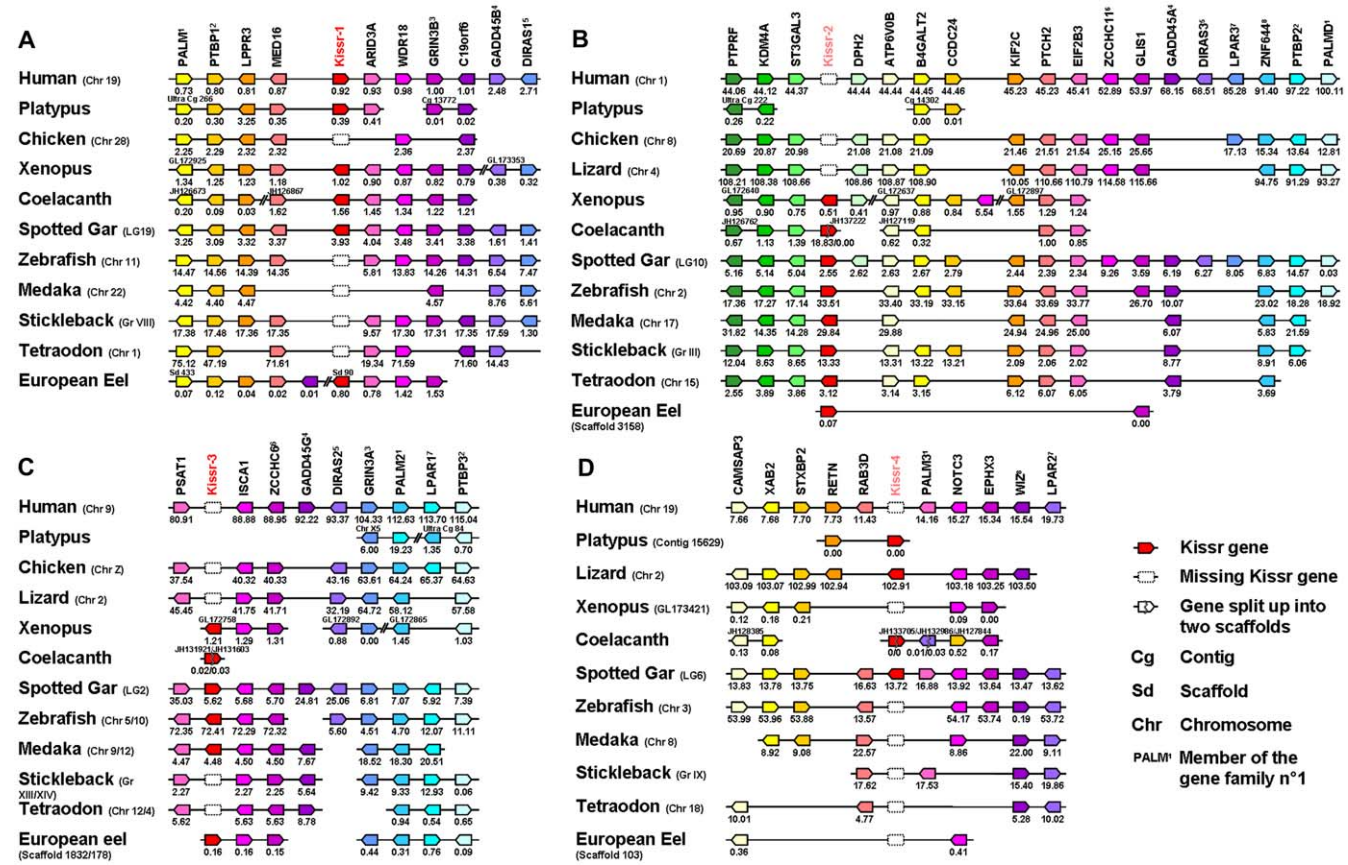


Figure 3. Conserved genomic synteny of osteichthyan *Kissr*. Genomic synteny maps comparing the orthologs of *Kissr-1* (A), *Kissr-2* (B), *Kissr-3* (C), *Kissr-4* (D) loci and their neighbouring genes. Analyses were performed on the genomes of human (*Homo sapiens*), platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), lizard (*Anolis carolinensis*), chicken (*Gallus gallus*), xenopus (*Xenopus (Silurana) tropicalis*), coelacanth (*Latimeria chalumnae*), spotted gar (*Lepisosteus oculatus*), zebrafish (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*) and European eel (*Anguilla anguilla*). This map was established using the PhyloView of Genomicus v67.01 web site, manual annotation of European eel genome using CLC DNA Workbench 6 software and the gene annotation of the coelacanth and spotted gar genomic databases (see section 2). *Kissr* genes are named according to our proposed nomenclature (*Kissr-1* to *Kissr-4*). The other genes are named after their human orthologs according to Human Genome Naming Consortium (HGNC). Orthologs of each gene are shown in the same color. Each of the eight conserved gene families is identified by an exponent number. The direction of arrows indicates the gene orientation, with the position of the gene (in 10^{-6} base pairs) indicated below. The full gene names and detailed genomic locations are given in Table S3.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g003

families are PALM (4 paralogs), PTBP (3 paralogs), GRIN3 (2 paralogs), GADD45 (3 paralogs), DIRAS (3 paralogs), ZCCHC (2 paralogs), LPAR (3 paralogs) and ZNF644/WIZ (2 paralogs). Fig. 4 focuses on the comparison of these four conserved *Kissr* syntenic regions in one sarcopterygian, the human, and one actinopterygian, the spotted gar, two species chosen for their genomic assembly in chromosomes and their phylogenetic positions among osteichthyans. Fig. 4 shows that the members of these eight gene families delineate a tetra-paralogon with the four conserved genomic regions of both human and spotted gar. This syntenic observation strongly suggests that the four *Kissr* resulted from "en-bloc" duplications of a unique ancestral genomic region.

Recently, two studies proposed reconstructions of the genomes of vertebrate and chordate ancestors. In the first study, ten proto-chromosomes of the ancestral vertebrate karyotype and their linkage to the corresponding tetra-paralogons in the human genome were hypothesised [28]. The second study proposed a reconstruction into seventeen proto-chromosomes of the last chordate ancestor genome and their linkage to the human tetra-paralogons [29]. Considering these two studies, together with our localisation of the four *Kissr* syntenic regions in the human genome, we can hypothesise that the corresponding tetra-paralogons resulted from the duplications of one single region localised on the proto-chromosome-A of the vertebrate ancestor and on the proto-chromosome-1 of the last chordate ancestor. From these analyses, we can infer that the four *Kissr* paralogons may have resulted from the two successive rounds of whole genome duplication (1R and 2R) that occurred in basal vertebrates (Fig. 5).

To date, the exact timing of the 2R occurrence is uncertain and the impact of this event on the cyclostomes is still debated [30,31]. In our study, neither phylogenetic nor syntenic analyses enabled us to specifically relate the sea lamprey *Kissr* to one of the four osteichthyan *Kissr*. The currently available data also led to a polytomy of the four Kissr clades and did not cluster them into two major clades, each of them divided in two sub-clades, which would have reflected the successive 1R and 2R. In the future, increasing number of characterised Kissr sequences, especially from Kissr-3 and Kissr-4 clades, may bring sufficient new information to resolve this polytomy. Though kisspeptin genes have been characterised in chondrichthyans, it could be of particular interest to investigate the

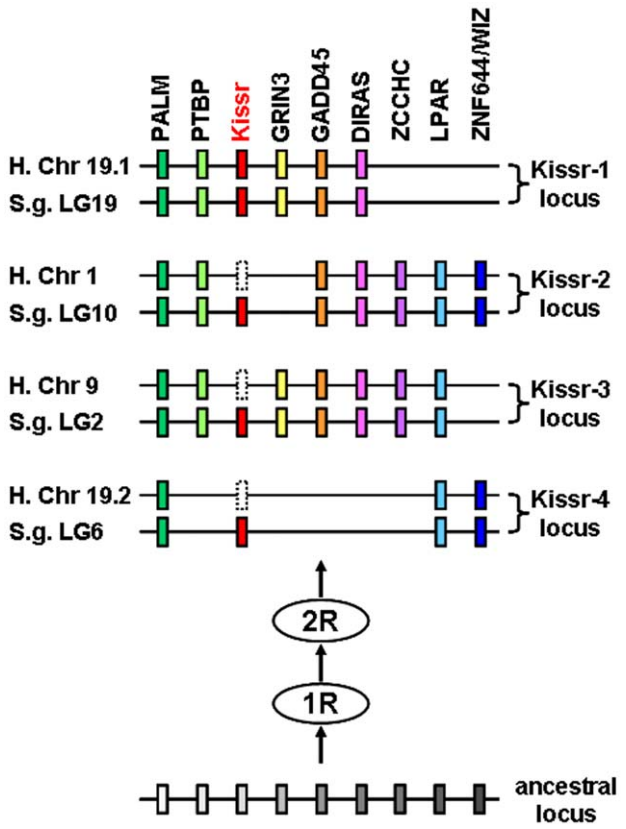


Figure 4. Proposed origin of osteichthyans *Kissr* loci based on human and spotted gar *Kissr* tetra-paralogons. The paralogous genes of each of the eight identified families delineate four tetra-paralogons in both human and spotted gar. This suggests a common origin of the four loci before the two whole genome duplication rounds (1R and 2R) occurred in the early vertebrate history.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g004

presence of its receptor in this lineage to further assess *Kissr* history in early gnathostomes.

A subsequent history of losses. Our study suggests that four *Kissr* paralogs would have been present in ancestral gnathostomes, resulting from 1R and 2R. It also shows that these four paralogons are still present in two early emerged osteichthyans, a sarcopterygian, the coelacanth and an actinopterygian, the spotted gar. All other vertebrate species investigated so far possess less *Kissr* genes (from 3 to none) indicating multiple events of *Kissr* losses in both the sarcopterygian and actinopterygian lineages (Fig. 5).

In tetrapods (sarcopterygians), *Kissr-4* would have been lost in amphibians, *Kissr-1*, *-2* and *-3* being present in the xenopus, while in amniotes the losses would have first concerned *Kissr-2* and *Kissr-3*, *Kissr-1* and *Kissr-4* being present in a prototherian mammal (Fig. 5). Further alternative losses occurred in amniotes, with only *Kissr-1* remaining in eutherian mammals, but only *Kissr-4* in squamates (lizard) (Fig 5). Finally, an additional loss would have led to the complete absence of *Kissr* in birds.

In teleosts (actinopterygians), a third round of whole genome duplication (3R) is supposed to have occurred specifically in the early history of this group. The 3R is usually considered as one of the main factors that drove the large radiation and adaptative success of the teleost lineage [11,32]. As four *kissr* were present in basal actinopterygians, the teleost-specific 3R implied the potential existence of up to eight *Kissr* genes in the early teleost history. However, our results show that the largest number of *Kissr* exhibited by current teleosts is three in the eel, and that each of them is orthologous to one of the coelacanth and spotted gar *Kissr*. This indicates that 3R did not impact the number of *Kissr* in teleosts, suggesting an early loss of teleost-specific duplicated *Kissr* genes, before the emergence of the elopomorphs (Fig. 5). Apart from the eel, only one or two *Kissr* genes have been described so far in teleosts, indicating additional loss events after the emergence of the elopomorphs (Fig. 5).

The occurrence of these many independent loss events may have led to the current situation of *Kissr* in the various vertebrate lineages. Indeed, some species seem to be more conservative than others, and it is of particular interest to clarify what may have driven the conservation or the loss of *Kissr*.

Conservation of multiple *Kissr*: the example of the eel

As shown by the present study, the eel is one of the most conservative species among current vertebrates, as three different *Kissr* have been retained. Conservation of multiple *Kissr* may reflect evolutionary processes such as neo- or sub-functionalisation. The comparative analyses of eel Kissr peptidic sequences and eel *Kissr* tissue distribution and regulation may constitute the first steps in the understanding of such processes.

Comparison of eel Kissr peptidic sequences. The analysis of the peptidic sequences deduced from the three cloned eel *Kissr* cDNAs revealed a conserved disulfide bridge between cysteines at positions 112/192 for Kissr-1, 105/185 for Kissr-2 and 110/190 for Kissr-3. The seven TMD of each receptor comprise 23 aa, except for TMD3 of Kissr-1 and Kissr-2 which comprise 18 aa and 19 aa, respectively. The pairwise comparison of the three peptidic sequences revealed 60.5% identity for Kissr-1/Kissr-2, 63.3% for Kissr-1/Kissr-3, and 63.4% for Kissr-2/Kissr-3. These low identities are mostly due to differences between the N-terminal extracellular domains (28.6% to 40.5% identity) and between the C-terminal intracellular domains (43.6% to 58.3% identity) (Fig. S6). Differences within the N-terminal domains could reflect variations in ligand binding properties, while those in the C-terminal domain may correspond to differences in G protein association properties and activation of intracellular signalling pathways. Future studies, including recombinant receptors and characterization of endogenous ligands, will aim at further investigating the potential differences in the structure/function of three eel Kissr.

Differential tissue distribution of the three eel *Kissr*. Specific qPCR were developped for each eel *Kissr* and applied to the analysis of their respective tissue distribution (Fig. 6).

Kissr-1 mRNA was expressed in all parts of the brain and in the pituitary. Its highest expression level was found in the gonads, in both ovary and testis. Low *Kissr-1* mRNA levels were measured in muscle, retina and fat tissue, while its expression was close to the limit of detection in the other peripheral tissues investigated (liver, kidney, intestine, and spleen).

Kissr-2 mRNA was also expressed in the brain and pituitary, with the highest transcript levels in the telencephalic and di-/mes-encephalic areas, in agreement with our previous study [9]. A low expression of *Kissr-2* mRNA was measured in the testis, while its expression in the ovary and all the other peripheral organs was close to the limit of detection.

Kissr-3 mRNA was highly expressed in the di-/mes-encephalic area and to a much lesser extent in the other parts of the brain. Transcript level was close to the limit of detection in the pituitary. Low expression of *Kissr-3* mRNA was measured in the gonads, ovary and testis, as well as in the muscle, while its expression in the other peripheral organs was close to the limit of detection.

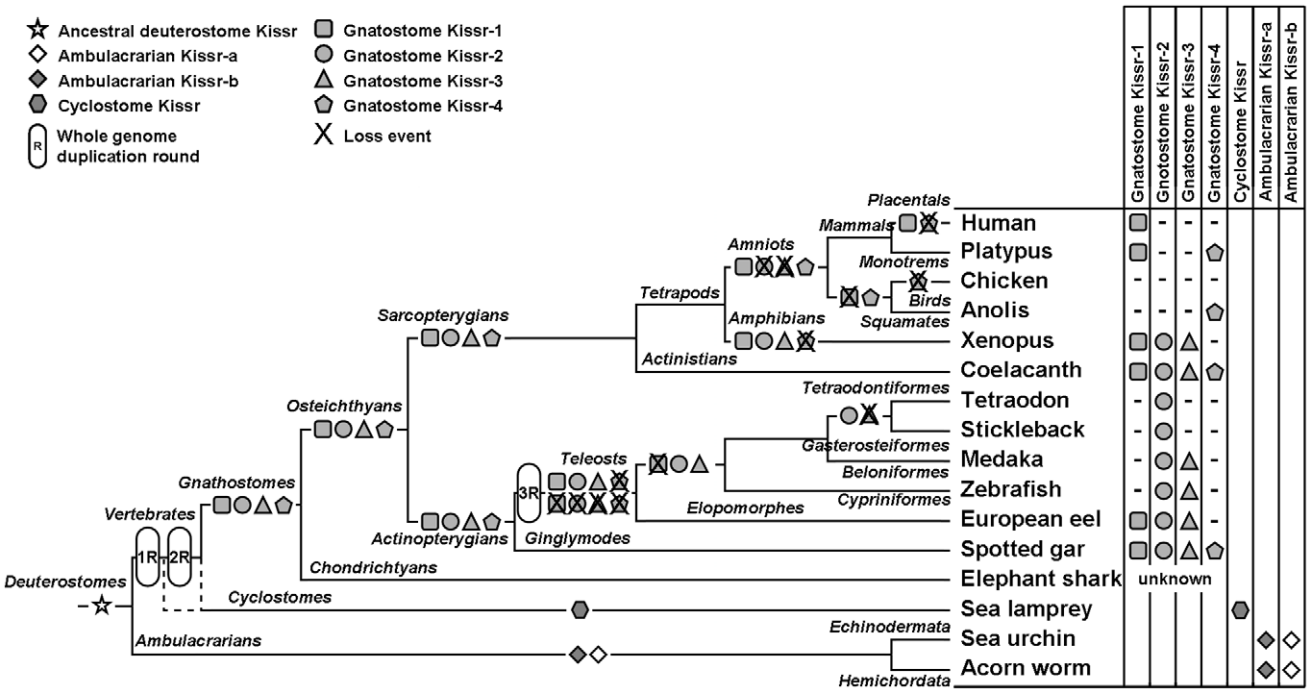


Figure 5. Current status and proposed evolutionary history of *Kissr* family. This representation is based on the phylogenetic and synteny analyses. The names of the main phyla are given on the corresponding branches. The names of the current representative species of each phylum are given at the end of the final branches, together with the symbol of the *Kissr* gene they possess. This hypothesis assumes the presence of the four *Kissr* paralogs in the osteichthyan lineage resulting from the two rounds of vertebrate whole genome duplication. Multiple subsequent *Kissr* gene loss events are indicated in the actinopterygian and sarcopterygian lineages.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g005

The three eel *Kissr* thus appear mainly expressed in the eel Brain-Pituitary-Gonad (BPG) axis, which highlights the potential involvement of the kisspeptin system in the eel reproductive function. Considering the phylogenetic position of the eel, this tissue distribution could reflect an ancestral role of the kisspeptin system in reproduction, which would have been largely conserved across vertebrate evolution. The three *Kissr* transcripts are all highly expressed in the eel brain, but with various relative levels according to brain regions. Both *Kissr-1* and *Kissr-2* are expressed in the pituitary, where they may mediate direct kisspeptin effects as previously investigated [9]. *Kissr-1* is also highly expressed in both the ovary and testis. Thus, the three eel *Kissr* present a differential distribution among BPG axis that suggests differential putative roles in the control of eel reproduction and implies a potential sub-functionalisation of the three receptors.

In the other teleosts, only *Kissr-2* and for some species *Kissr-3* have been described so far. As in the eel, they are expressed in the BPG axis (grey mullet, *Mugil cephalus* [33]; zebrafish [6,34]; fathead minnow, *Pimephales promelas* [35]; tilapia, *Oreochromis niloticus* [36,37]; goldfish [7]; fugu [38]). In xenopus, which presents the three orthologs of eel *Kissr* [4], all three receptors are expressed in the brain, while only *GPR54-1a* (*kissr-1*) and *GPR54-2* (*kissr-2*) mRNA are detected in the pituitary, similarly to the eel. In placental mammals, only *Kissr-1* ortholog is present and expressed in the brain, pituitary (human [2,39]; mouse [40]) and ovary (rat [41]; human and marmoset [42]), where a role in local control of ovarian functions has been suggested.

Differential regulation of the three eel *Kissr* by experimental maturation. Gonadal development in the silver eel is blocked at a pre-pubertal stage due to a deficient production of pituitary gonadotropins, which results from a dual brain blockade: lack of stimulation by GnRH and direct inhibition by dopamine (for review: [43]). Experimental gonadal maturation was induced in female silver eels according to classical hormonal treatments [19]. The expressions of the three *Kissr* were analyzed by qPCR in the BPG axis, which are the major sites of *Kissr* expression in the eel.

In the brain (Fig. 7), *Kissr-1* transcript level was significantly up-regulated in matured eels as compared to control ones (x3.73, $P<0.0001$ in olfactory bulbs/telencephalon and x7.15, $P<0.0001$ in di-/mes-encephalon), while no changes were recorded for *Kissr-2* nor *Kissr-3*. In the pituitary (Fig. 7), *Kissr-1* and *Kissr-2* transcript levels were significantly down-regulated in matured eels compared to controls (x0.42; $P<0.05$ and x0.14; $P<0.01$, respectively), while *Kissr-3* remained at the limit of detection. In the ovary (Fig. 7), *Kissr-3* transcript level was significantly down-regulated in matured eels (x 0.39; $P=0.01$), while *Kissr-1* transcript levels did no change significantly and *Kissr-2* remained at the limit of detection.

We also analyzed by qPCR the expression of brain *mGnRH* and pituitary *LHβ*. Significant increases in mRNA levels for brain *mGnRH* (x5.6; $P<0.001$) and pituitary *LHβ* (x206; $P<0.0001$) were measured in matured eels, as compared to control eels (data not shown) in agreement with our previous studies [20,44,45].

A parallel study was performed on the regulation of the three *Kissr* transcript levels in experimentally matured Japanese female eels. Eels were treated according to Jeng et al. [46]. As for the European eel, a differential regulation was evidenced. This was shown by selective increase in brain *Kissr-1*, decreases in pituitary *Kissr-1* and *Kissr-2* and decrease in ovarian *Kissr-3* transcripts, in matured eels as compared to controls (data not shown).

Those results clearly evidence a differential regulation of the three eel *Kissr*, with receptor- and tissue- specific variations. The

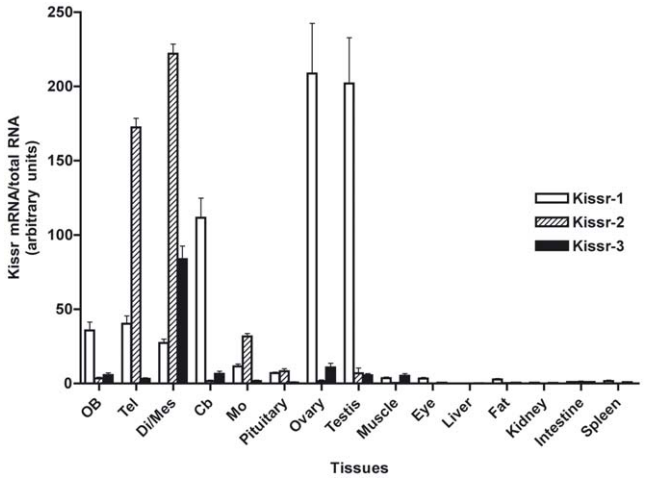


Figure 6. Tissue distribution of the expression of the three eel *Kissr* mRNAs. Olfactory bulbs (OB), telencephalon (Tel), di-/mes-encephalon (Di/Mes), cerebellum (Cb), medulla oblongata (MO), pituitary, ovary, testis, muscle, eye, liver, adipose tissue (Fat), kidney, intestine and spleen. The relative expression of each *Kissr* mRNA was normalised to the amount of total RNA. Each bar represents mean ± SEM from 8 individuals.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g006

selective up-regulation of *Kissr-1* expression in the brain suggests that *Kissr-1* may contribute to enhance kisspeptin stimulatory control of GnRH at puberty in the eel. Similarly, brain *Kissr-1* expression increases at the onset of puberty in mammals (rodent [47]; monkey [48]). This role may have shifted to *Kissr-2* in other teleosts, which lack *Kissr-1* ortholog. For instance, parallel variations in the brain expressions of *Kissr-2* ortholog and *GnRH* were observed during sexual maturation/puberty in several teleosts (cobia, *Rachycentron canadum* [49]; grey mullet [33]; fathead minnow [35]; Nile tilapia [36]). We recently revealed an unexpected inhibition by kisspeptins of *LHβ* expression in eel pituitary cells *in vitro*, providing the first evidence of an inhibitory role of kisspeptin on gonadotropic function [9]. In the present study, we observed a down-regulation of eel *Kissr-1* and *Kissr-2* in the pituitary, while *LHβ* expression largely increased. This suggests that the inhibitory control of kisspeptin on *LHβ* expression could be removed during the sexual maturation by the down regulation of its receptors in the pituitary. *Kissr-3* was down-regulated in the ovary implying a potential involvement of this receptor in ovarian function. Future studies should aim at clarifying the role of kisspeptin system at gonadal level in teleosts.

The regulation of the expression of the three *Kissr* in the BPG tissues reinforces the hypothesis of a conserved ancestral role in vertebrate reproductive function. In addition to their differential distribution in the BPG axis, their differential regulations further strengthen the potential sub-functionalisation of the three *Kissr* paralogs for the control of eel reproductive function.

Our previous studies, including castration experiments and steroid treatments, demonstrated that the activation of mGnRH and LH in matured eel result from a positive feedback by sex steroids [44,45,50,51]. Increasing data support a role of brain kisspeptin system in the mediation of steroid feedbacks on GnRH neurons in mammals (for review: [52,53]) and recently in teleosts (medaka [54]; goldfish [55]; zebrafish [34]). Future studies will aim at investigating the role of sex steroids in the differential regulation of *Kissr* paralogs in the eel.

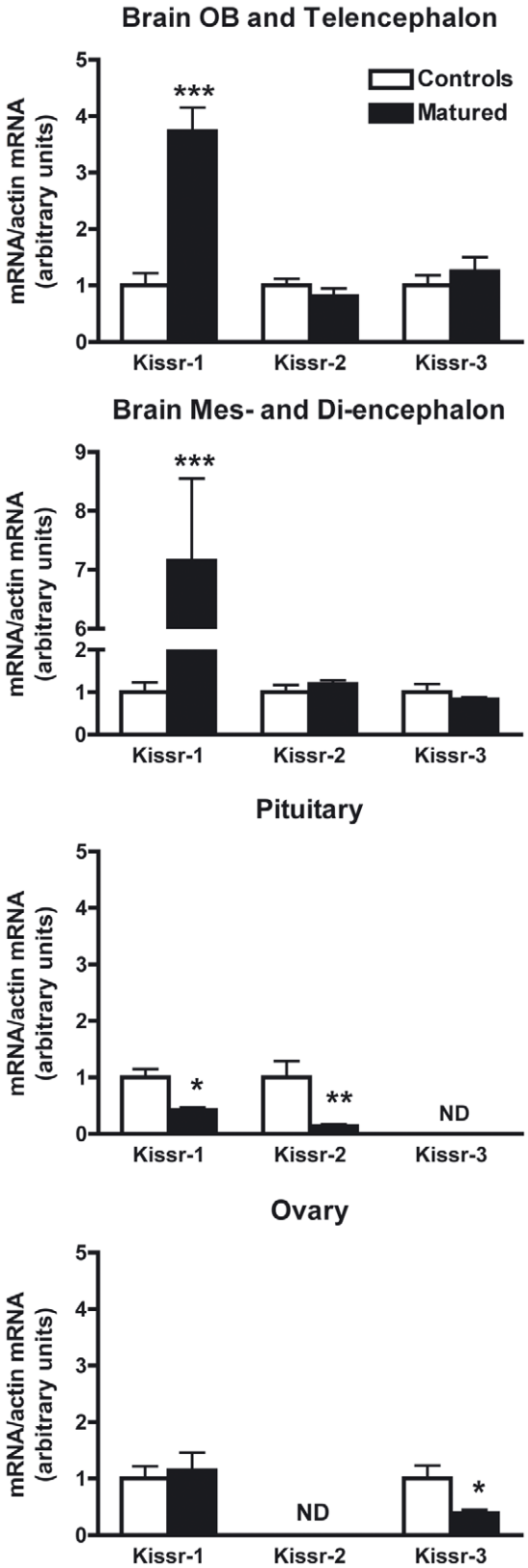


Figure 7. Regulations of the three eel *Kissr* expressions during experimental maturation. The relative expression of each *Kissr* mRNA was normalised to *ß-actin* mRNA. Each bar represents mean ± SEM from 7 control and 9 matured female eels. Significant difference between control and matured groups: *$P<0.05$, **$P<0.01$ and *** $P<0.001$ (Student's t test). N.D. = Non detectable.
doi:10.1371/journal.pone.0048931.g007

Conclusions

In conclusion, our study provides the first evidence of multiple *Kissr* paralogs in basal osteichthyans, with the cloning of three *Kissr* in a basal teleost, the eel, and the prediction of four *Kissr* in a non-teleost actinopterygian, the spotted gar, and four *Kissr* in a basal sarcopterygian, the coelacanth. Phylogenetic and syntenic analyses support the existence of four *Kissr* paralogs in osteichthyans, leading to the proposal of a new, simplified classification and nomenclature (*Kissr-1* to *4*). The four *Kissr* paralogs may have arisen during the two rounds of whole genome duplication (1R and 2R) in early vertebrates, followed by multiple gene loss events in the various groups of actinopterygian and sarcopterygian lineages. In particular, no impact of teleost-specific 3R can be recorded on the number of *Kissr* paralogs in current teleosts. Sub-functionalisation of the three eel *Kissr*, as shown by differences in their sequences, tissue distributions and regulations during sexual maturation, may have represented significant evolutionary constraints for the conservation of multiple *Kissr* paralogs in this species.

Supporting Information

Figure S1 Three eel *Kissr* gene sequences. Genomic sequences of the eel *Kissr-1* extracted from the scaffold 90.1 (A), *Kissr-2* extracted from the scaffold 3158.1 (B) and *Kissr-3* extracted from the scaffold 1832.1 (C) (European eel genome [11]). Nucleotides are numbered from 5′ to 3′. The five exons of each gene are shaded in grey.
(DOC)

Figure S2 Molecular cloning of eel *Kissr-3* splicing variants *Kissr-3_v2* and *Kissr-3_v3*. Nucleotide and deduced amino-acid sequence of the cDNAs encoding the eel Kissr-3_v2 (A) and Kissr-3_v3 (B). Nucleotides (top) are numbered from 5′ to 3′. The amino-acid residues (bottom) are numbered beginning with the first methionine residue in the ORF. The asterisk (*) indicates the stop codon. The predicted transmembrane domains (TMD) are underlined.
(DOC)

Figure S3 Prediction of four *Kissr* CDS from the coelacanth genome. Nucleotide and deduced amino-acid sequences of the CDS encoding the coelacanth Kissr-1 (A), Kissr-2 (B), Kissr-3 (C) and Kissr-4 (D). Nucleotides (top) are numbered from 5′ to 3′. The amino-acid residues (bottom) are numbered beginning with the first methionine residue in the ORF. The asterisk (*) indicates the stop codon. The predicted transmembrane domains (TMD) are underlined. The exon-exon junctions are represented by two nucleotides coloured in red.
(DOC)

Figure S4 Prediction of four *Kissr* CDS from the spotted gar genome. Nucleotide and deduced amino-acid sequences of the CDS encoding the spotted gar Kissr-1 (A), Kissr-2 (B), Kissr-3 (C) and Kissr-4 (D). Nucleotides (top) are numbered from 5′ to 3′. The amino-acid residues (bottom) are numbered beginning with the first methionine residue in the ORF. The asterisk (*) indicates the stop codon. The predicted transmembrane domains (TMD) are underlined. The exon-exon junctions are represented by two nucleotides coloured in red.
(DOC)

Figure S5 Alignment of the amino-acid sequences of 51 Kissr used for the phylogenetic analysis. The amino-acid sequences were aligned by ClustalW and manually adjusted. The identical amino-acid residues between sequences are shaded in black and the similar (with similar physico-chemical properties) amino-acid residues are shaded in grey. Sequence references are listed in Table S2.
(TIF)

Figure S6 Alignment of the deduced amino-acid sequences of the three eel Kissr. The entire amino-acid sequences were aligned by ClustalW and manually adjusted. The identical amino-acid residues between the three sequences are shaded in black and the similar (with similar physico-chemical properties) amino-acid residues are shaded in grey.
(TIF)

Table S1 European eel gene specific primers. Specific primers (F for Forward and R for Reverse) were designed for PCR and qPCR amplifications. *Kissr*, kisspeptin receptor; *LHβ*, Luteinizing Hormone β subunit; *mGnRH*, mammalian Gonadotrophin Releasing Hormone.
(XLS)

Table S2 References of the Kissr sequences used in the phylogenetic analysis.
(XLS)

Table S3 Names, references and locations of the genes used in the synteny analysis.
(XLS)

Acknowledgments

We thank Dr. B. Quérat (CNRS, Paris, France) for his helpful advices and discussions concerning phylogeny and synteny. We are grateful to Dr C. Henkel (ZF-screen, Leiden, Netherlands) for his work on the European eel genome, P. Lauesen (Billund Aquaculture Service, Billund, Denmark), M. Krüger-Johnsen (DTU aqua, Copenhagen, Denmark) and C. Graver (Danish Eel Farmer's Association, Ribe, Denmark) for performing eel maturation experiment, and S. Baloche (CNRS, Paris, France) for her technical assistance. Special thanks to L. Hardman and C. Atkinson (European Programme Erasmus, Keele University, Keele, UK/MNHN, Paris, France) for English correction. We also thank Eric Ryckelynck and his team from Nodaiwa (Paris, France) for their kind cooperation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SD CFC KR SRJ. Performed the experiments: JP SRJ MM JT. Analyzed the data: JP AGL SRJ HT. Contributed reagents/materials/analysis tools: RD GvdT. Wrote the paper: JP AGL KR SD. Provided comments on the manuscript: JP AGL SRJ MM RD GvdT JT HT CFC KR SD.

References

1. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, et al. (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. FEBS Lett 446: 103–107.
2. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, et al. (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J Biol Chem 276: 34631–34636.
3. Roa J, Navarro VM, Tena-Sempere M (2011) Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. Biol Reprod 85: 650–660.
4. Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, et al. (2009) Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. Endocrinology 150: 2837–2846.
5. Tena-Sempere M, Felip A, Gomez A, Zanuy S, Carrillo M (2012) Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. Gen Comp Endocrinol 175: 234–243.
6. Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B (2008) Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. Biol Reprod 79: 776–786.

7. Li S, Zhang Y, Liu Y, Huang X, Huang W, et al. (2009) Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (Carassius auratus). J Endocrinol 201: 407–418.
8. Zmora N, Stubblefield J, Zulperi Z, Biran J, Levavi-Sivan B, et al. (2012) Differential and Gonad Stage-Dependent Roles of Kisspeptin1 and Kisspeptin2 in Reproduction in the Modern Teleosts, Morone Species. Biol Reprod.
9. Pasquier J, Lafont AG, Leprince J, Vaudry H, Rousseau K, et al. (2011) First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, Anguilla anguilla. Gen Comp Endocrinol 173: 216–225.
10. Amores A, Catchen J, Ferrara A, Fontenot Q, Postlethwait JH (2011) Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. Genetics 188: 799–808.
11. Henkel CV, Burgerhout E, de Wijze DL, Dirks RP, Minegishi Y, et al. (2012) Primitive duplicate Hox clusters in the European eel's genome. PLoS One 7: e32231.
12. Pasqualini C, Weltzien FA, Vidal B, Baloche S, Rouget C, et al. (2009) Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tissue-specific transcription, and regulation by sex steroids. Endocrinology 150: 1377–1392.
13. Dufour S, Burzawa-Gerard E, Le Belle N, Sbaihi M, Vidal B (2003) Reproductive endocrinology of the European eel, Anguilla anguilla. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K, editors. Eel Biology. Tokyo: Springer. pp. 373–383.
14. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673–4680.
15. Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics 21: 2104–2105.
16. Stamatakis A, Ott M (2008) Efficient computation of the phylogenetic likelihood function on multi-gene alignments and multi-core architectures. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363: 3977–3984.
17. Muffato M, Louis A, Poisnel CE, Roest Crollius H (2010) Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. Bioinformatics 26: 1119–1121.
18. Sébert ME, Legros C, Weltzien FA, Malpaux B, Chemineau P, et al. (2008) Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. J Neuroendocrinol 20: 917–929.
19. Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Hirose K (1996) Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture 139: 291–301.
20. Aroua S, Weltzien FA, Le Belle N, Dufour S (2007) Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids. Gen Comp Endocrinol 153: 333–343.
21. Weltzien FA, Pasqualini C, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, et al. (2005) Brain expression of tyrosine hydroxylase and its regulation by steroid hormones in the European eel quantified by real-time PCR. Ann NY Acad Sci 1040: 518–520.
22. Mechaly AS, Vinas J, Piferrer F (2009) Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (Solea senegalensis). Biol Reprod 80: 60–69.
23. Onuma TA, Duan C (2012) Duplicated Kiss1 receptor genes in zebrafish: distinct gene expression patterns, different ligand selectivity, and a novel nuclear isoform with transactivating activity. FASEB J 26: 2941–2950.
24. Akazome Y, Kanda S, Okubo K, Oka Y (2010) Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. J Fish Biol 76: 161–182.
25. Um HN, Han JM, Hwang JI, Hong SI, Vaudry H, et al. (2010) Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. Ann N Y Acad Sci 1200: 67–74.
26. Kim DK, Cho EB, Moon MJ, Park S, Hwang JI, et al. (2012) Molecular Coevolution of Neuropeptides Gonadotropin-Releasing Hormone and Kisspeptin with their Cognate G Protein-Coupled Receptors. Front Neurosci 6: 3.
27. Dehal P, Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. PLoS Biol 3: e314.
28. Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, et al. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. Nature 453: 1064–1071.
29. Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, Morishita S (2007) Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. Genome Res 17: 1254–1265.
30. Kuraku S (2008) Insights into cyclostome phylogenomics: pre-2R or post-2R. Zoolog Sci 25: 960–968.
31. Kuraku S, Meyer A, Kuratani S (2009) Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? Mol Biol Evol 26: 47–59.
32. Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, et al. (1998) Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. Science 282: 1711–1714.
33. Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A (2007) Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, Mugil cephalus. Gen Comp Endocrinol 150: 278–287.
34. Servili A, Le Page Y, Leprince J, Caraty A, Escobar S, et al. (2011) Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. Endocrinology 152: 1527–1540.
35. Filby AL, van Aerle R, Duitman J, Tyler CR (2008) The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. Biol Reprod 78: 278–289.
36. Martinez-Chavez CC, Minghetti M, Migaud H (2008) GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. Gen Comp Endocrinol 156: 224–233.
37. Parhar IS (2005) GnRH and gpcr: laser-captured single cell gene profiling. Fish Physiol Biochem 31: 153–156.
38. Shahjahan M, Motohashi E, Doi H, Ando H (2010) Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. Gen Comp Endocrinol 169: 48–57.
39. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, et al. (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. J Biol Chem 276: 28969–28975.
40. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, et al. (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem Biophys Res Commun 312: 1357–1363.
41. Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, et al. (2006) Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? Endocrinology 147: 4852–4862.
42. Gaytan F, Gaytan M, Castellano JM, Romero M, Roa J, et al. (2009) KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. Am J Physiol Endocrinol Metab 296: E520–531.
43. Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C (2010) Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. J Fish Biol 76: 129–160.
44. Dufour S, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA (1989) Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, Anguilla anguilla. Fish Physiology and Biochemistry 7: 157–162.
45. Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP, Dufour S (1995) Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (Anguilla anguilla). Neuroendocrinology 61: 525–535.
46. Jeng SR, Pasquier J, Yueh WS, Chen GR, Lee YH, et al. (2012) Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (Anguilla japonica) reveals steroid dependent and independent mechanisms. Gen Comp Endocrinol 175: 163–172.
47. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, et al. (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.
48. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, et al. (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 2129–2134.
49. Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA (2007) Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. J Mol Endocrinol 38: 235–244.
50. Dufour S, Montero M, Le Belle N, Bassompierre M, King JA, et al. (1993) Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, Anguilla anguilla. Fish Physiology and Biochemistry 11: 99–106.
51. Schmitz M, Aroua S, Vidal B, Le Belle N, Elie P, et al. (2005) Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. Neuroendocrinology 81: 107–119.
52. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL (2010) Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology 151: 3479–3489.
53. Garcia-Galiano D, van Ingen Schenau D, Leon S, Krajnc-Franken MA, Manfredi-Lozano M, et al. (2011) Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. Endocrinology 153: 316–328.
54. Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, et al. (2008) Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (oryzias latipes). Endocrinology 149: 2467–2476.
55. Kanda S, Karigo T, Oka Y (2012) Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. J Neuroendocrinol.

Chapitre 5

Caractérisation de deux *Kiss* chez l'anguille, étude de leur conservation par détermination de leur distribution tissulaire et de leur régulation au cours d'une maturation expérimentale.

1. Introduction de l'article 3

Grâce au séquençage du génome de l'anguille européenne, nous avons pu prédire, chez cette espèce, deux gènes codant pour des kisspeptines (voir chapitre 6). Dans ce chapitre 5, nous avons cloné et séquencé les ADNc codant pour les précurseurs de *Kiss1* et *Kiss2* à partir d'extraits de cerveau. Cela nous a permis de prédire, par des modèles mathématiques, les sites de clivages potentiels des prépro-kisspeptines et d'en déduire les séquences des kisspeptines matures présents chez l'anguille.

Comme pour les récepteurs, les distributions tissulaires des deux *Kiss*, ainsi que leurs régulations au cours de la maturation expérimentale, ont été étudiées. Les deux *Kiss* sont exprimés principalement dans le cerveau et l'hypophyse, mais seul *Kiss2* est régulé dans ces organes, au cours de la maturation sexuelle.

La comparaison des régulations des récepteurs (chapitre 4) avec celles de *Kiss2*, ainsi que l'effet inhibiteur *in vitro* des kisspeptines sur l'expression de la *LHβ* hypophysaire (chapitre 3), suggèrent une implication différentielle du système kisspeptine entre le cerveau et l'hypophyse chez l'anguille.

2. Article 3: The two Kisspeptin genes of the European eel are expressed in the brain-pituitary axis and differentially regulated during experimental maturation.

The two Kisspeptin genes of the European eel are expressed in the brain-pituitary axis and differentially regulated during experimental maturation.

Jérémy Pasquier [1], Anne-Gaëlle Lafont [1], Florian Denis [1], Jonna Tomkiewicz [2], Karine Rousseau [1], and Sylvie Dufour [1]

In preparation

[1] Research Unit BOREA, Biology of Aquatic Organisms and Ecosystems, CNRS 7208- IRD207- UPMC - Muséum National d'Histoire Naturelle, 75231 Paris Cedex 05, France.

[2] University of Denmark, National Institute of Aquatic Resources, 2920 Charlottenlund, Denmark

Keywords: kisspeptins, tissue distribution, experimental maturation, European eel

Abstract

The European eel (*Anguilla Anguilla*) presents a blockade at pre-pubertal (silver) stage due to a deficient production of gonadotropins. We, recently, initiated the study of the kisspeptin system, one of the major gatekeepers of puberty in mammals, in the European eel. We previously predicted the sequence of two *Kiss* genes in the newly published European eel genome. In the present study we achieved the cloning and sequencing of *Kiss1* and *Kiss1* cDNAs, from a total ARN extract of eel brain. From the obtained sequences, candidates for mature peptides have been predicted. Tissue distributions of *Kiss1* and *Kiss2* were investigated by qPCR. They revealed that both were mainly expressed in the brain and the pituitary of the European eel. Nevertheless, differential regulations after experimental maturation were reported. Indeed, *Kiss1* expression was not regulated in the brain-pituitary axis, while *Kiss2* expression was increased in the brain and the pituitary after maturation. This suggests that Kiss2 rather than Kiss1 may be involved in sexual maturation process of the European eel.

1. Introduction

The European eel, *Anguilla anguilla*, presents a complex life cycle, with a blockade of sexual maturation at a prepubertal stage (silver stage) as long as its oceanic reproductive migration is prevented. This blockade is due to a deficient production of pituitary gonadotropins (Dufour et al., 2003; Dufour et al., 2005). The understanding of the mechanisms regulating the gonadotropic axis and controlling eel reproduction is of particular interest, considering the drastic decline of wild populations (Stone, 2003) and the current lack of self-sustained aquaculture of this species. Furthermore, as the eel is a representative species of an early group of teleosts (the elopomorphs) (De Pinna, 1996), the comprehension of such mechanisms in this species may provide new insights on evolution and ancestral regulations of endocrine systems.

In 1996, kisspeptin was first discovered as a metastasis suppressor peptide in human melanoma (Lee et al., 1996). In 1999, an orphan receptor, GPR54, was cloned in the rat (Lee et al., 1999) and it was not until 2001 that it was identified as the cognate receptor of kisspeptin (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001). In 2003, a major breakthrough in reproductive endocrinology was achieved, as GPR54 gene was shown to be essential for puberty in human (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003) and mice (Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). Ten years later, kisspeptin system is still considered as a major puberty gatekeeper and reproductive regulator, mediating GnRH and sex steroid effects on gonadotropins (García-Galiano et al., 2012; Pinilla et al., 2012).

To date, the kisspeptin system has been identified in various vertebrate species, leading to the discovery of multiple genes encoding kisspeptins (from *Kiss1* to *Kiss3*) (Biran et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; Lee et al., 2009; Pasquier et al., submited) as well as multiple genes encoding their receptors (from *Kissr-1* to *Kissr-4*) (Biran et al., 2008; Felip et al., 2009; Lee et al., 2009; Pasquier et al., 2012).

To date, mature kisspeptins have been purified only from two vertebrate species, the human and the xenopus. In human, which possess only one Kiss gene, multiple mature peptides (Kp1), including a mature peptide of 54-aa long [Kp1(54)], a Kp1(14), a Kp1(13) and a Kp1(10), were isolated from placental extracts (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001). In the xenopus, a species presenting three *Kiss* genes including *Kiss2*, only a Kp2(12) has been isolated by HPLC (Lee et al., 2009). All mature kisspeptins cleaved from the same precursor share the same C-terminal 10-aa sequence, which is the minimal sequence required to specifically bind their cognate receptor, Kissr (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001).

In the eel, three Kissr have been recently characterised, i.e. *Kissr-1*, *Kissr-2* and *Kissr-3* (Pasquier et al., 2012; Pasquier et al., 2011). Their tissue distribution and their regulation profiles during experimental maturation were analysed by qPCR and it was hypothesised that kisspeptin system could play a role in the reproductive function of the European eel (Pasquier et al., 2012). Furthermore, it has been demonstrated that heterologous kisspeptins can exert a specific *in vitro* inhibitory effect on the *LHβ* expression by primary culture of eel pituitary cells, strengthening the hypothesis of a potential involvement of kisspeptin system in the eel gonadotropic axis (Pasquier et al., 2011). Recently, two ORFs containing the conserved sequences of *Kiss1* and *Kiss2* genes were identified (Pasquier et al., 2012) in the European eel genome (Henkel et al., 2012).

In the present study, we report the cloning of two eel Kiss transcripts (*Kiss1* and *Kiss2*) corresponding to the two previously identified ORFs. Using specific qPCR approach, we, then, investigate the *Kiss1* and *Kiss2* distributions in various eel tissues as well as their regulation in the brain-pituitary-gonad (BPG) axis during experimental maturation.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

European eels (*Anguilla anguilla*) were at the prepubertal "silver" stage, which corresponds to the last continental phase of the eel life cycle, preceding the oceanic reproductive migration. Cloning and tissue distribution were performed using female and male eels purchased from Rungis International Market (Rungis, France) and transferred to MNHN, France. Eel manipulations were performed according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture and Fisheries; Veterinary Department for Animal Health and Protection under the supervision of authorised investigators (agreement N°I-75UPMC-F1-07). Experimental gonadal maturation was performed on farmed female eels at the DTU Aqua research facility at Lyksvad Fishfarm, Vamdrup, Denmark. Eel manipulations and experimental maturation were performed according to the guidelines of Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries; Danish Veterinary and Food Administration (Approval reference for maturation experimentations: 2010/561-1783 “artificial reproduction of European eel”). Pain, suffering and stress were attempted minimized during transport and rearing throughout the experiments. All eels were anesthetized using benzocaine before sacrifice and whenever needed in relation to treatment.

2.2. cDNA encoding European eel *Kiss1* and *Kiss2*

Total RNA from eel brain (di-/mesencephalon) was extracted using Trizol reagent and reverse-transcripted as previously described (Pasquier et al., 2011).

Predicted genomic sequences of eel *Kiss1* and *Kiss2* were used to design specific *Kiss1* and *Kiss2* primers, respectively (Table 1). Using the Advantage 2 PCR Kit (Clontech), RACE PCRs with 5’cDNA or 3’cDNA as templates were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 3 min at 94°C; then 10 cycles with 30s at 94°C for denaturing,

30s at 70°C for annealing, 90s at 72°C for primer extension; then 25 cycles with 30s at 94°C for denaturing, 30s at 68°C for annealing, 90s at 72°C for primer extension and a single final extension step of 5min at 72°C. PCR products of appropriate estimated size were sequenced at GATC biotech Ltd (Konstanz, Germany). The partial cDNA of each European eel *Kiss* were compiled using MEGA 5.0 software and the two obtained mRNA sequences were submitted to EMBL (Accession numbers: Kiss1: XXXXX; Kiss2: XXXXX).

Even after many attempts, the sequencing of the 5' RACE PCR amplicon systematically failed before reaching the 5' end of the *Kiss1* transcript certainly due to a highly GC rich region. While, both 3' and 5' ends of *Kiss2* transcript were reached using RACE PCRs.

2.3. *Kiss* tissue distribution in the European eel

Various tissues were collected from eight freshwater female silver European eels to investigate the distribution of *Kiss1* and *Kiss2* expressions, using qPCR. Eels were sacrificed by decapitation. The following organs were sampled, stored in RNAlater (Ambion-Inc, Austin, TX, USA) and kept frozen at –20°C until RNA extraction: brain, pituitary, ovary, muscle, eye, liver, adipose tissue, kidney, intestine, gill and spleen. The brain was dissected into five parts (Sébert et al., 2008): olfactory bulbs, telencephalon, di-/mes-encephalon, *cerebellum* and *medulla oblongata*. In addition, testes from eight freshwater male silver European eels were also sampled.

2.4. Eel experimental maturation

Farmed female silver European eels transferred to seawater (36 ‰) received weekly injections of salmon pituitary extract for four months, as previously described (Pasquier et al., 2012). Analyzes were performed on nine matured eels and seven controls. After sacrifice,

anterior brain (divided in two parts: olfactory bulbs/telencephalon; di-/mesencephalon), pituitary and ovary were dissected, stored in RNAlater and kept frozen at –20°C until RNA extraction.

2.5. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Eel *Kiss1* and *Kiss2* specific primers (Table 1) were designed based on the European eel CDS sequences cloned in this study, and using Primer3 Software (Whitehead Institute/Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA). To optimize the assays, different annealing temperatures were tested according to the melting temperature (Tm) of primers. To assess their specificity, amplification products were sequenced at GATC Biotech Ltd. Primers for European eel *β-actin* were designed as previously (Aroua et al., 2007) (Table 1). All primers were purchased from Eurofins (Ebersberg, Germany).

Quantitative assays of eel *Kiss1, Kiss2,* and *β-actin* mRNAs were performed using the LightCycler® System (Roche, Ltd. Basel, Switzerland) with SYBER Green I sequence-unspecific detection as previously described (Aroua et al., 2007; Sébert et al., 2008; Weltzien et al., 2005). The qPCR primers are listed in Table 1. The qPCRs were prepared with 4 µl of diluted cDNA template, 2 µl of PCR grade water, 2 µl of SYBR Green master mix and 1 µl of each forward and reverse primer (0.5 pmole each at final concentration). The qPCRs were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 10 min at 95°C; then 41 cycles with 15s at 95°C for denaturing, 5 s at 60°C for annealing, 10 s at 72°C for primer extension, 5 s at 83°C to avoid measurement of non-specific annealing; and a single final extension step of 5 min at 72°C. Each qPCR run contained a non-template control (cDNA was substituted by water) for each primer pairs to confirm that reagents were not contaminated. The efficiency of all primers was tested and the specificity of each reaction was assessed by melting curve analysis to ensure the presence of only one product, and by sequencing.

Individual tissue samples were then analyzed in duplicate by qPCR. Serial dilutions of cDNA pool of brain tissues were run in duplicate and used as a common standard curve and also included in each run as a calibrator. Normalisation of data was performed using total RNA content for the tissue distribution samples, and using *β-actin* mRNA level for experimental maturation samples.

2.6. Prediction of peptidic features

Mature peptides were predicted from the kisspeptin precursors using NeuroPred tool (Amare et al., 2006). Signal peptide of Kisspeptin precursors were predicted using SignalP tool (Petersen et al., 2011).

2.7. Statistical analysis

Results are given as mean ± SEM. Means were compared by Student's *t*-test using Instat (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif., USA).

3. Results

3.1. Characterisation of European eel kisspeptins

3.1.1. Cloning of European eel *Kiss1* and *Kiss2* cDNAs

Using European eel specific *Kiss1* primers, RACE PCRs, performed on brain cDNAs, led to the identification of a partial *Kiss1* transcript sequence (EMBL: XXXX) encompassing partial 3' UTRs of 30 bp, and a partial CDS of 314 bp. Once translated, the cloned *Kiss1* CDS gives a 103-aa kisspeptin precursor exhibiting a 10-aa sequence (YNWNSFGLRY) characteristic of the kisspeptin family (Fig. 1A).

Using European eel specific *Kiss2* primers, RACE PCRs, performed on brain cDNAs, led to the isolation of the complete *Kiss2* transcript sequence (EMBL: XXXX). The sequence

encompasses 5' and 3' UTR of 114 and 495 bp, respectively, and a CDS of 402 bp. Once translated, the cloned *Kiss2* CDS gives a 134-aa kisspeptin precursor exhibiting a 10-aa sequence (FNRNPFGLRF) characteristic of the kisspeptin family (Fig. 1B).

The comparison of both *Kiss1* mRNA and *Kiss2* mRNA to the European eel genome revealed that each transcript is encoded by two exons. Concerning Kiss2, the first exon encodes a 21-aa signal peptide. Both *Kiss1* and *Kiss2* exons-2 encode the Kiss1 and Kiss2 mature peptides, respectively, including the characteristic 10-aa sequences of the kisspeptin family.

3.1.2. Prediction of European eel mature kisspeptin

Considering the predicted kisspeptin precursors, each 10-aa conserved sequence is followed at its C-terminal side by a proteolytic cleavage and α-amidation site (Eipper et al., 1992), *i.e.* GK-Stop motif for Kiss1 and GKR motif for Kiss2 precursor (Fig. 1).

Using NeuroPred software (Amare et al., 2006), we predicted two alkaline N-terminal end cleavage sites for each kisspeptin precursor, *i.e.* 6 aa and 22 aa upstream Kiss1 10-aa conserved sequence and 3 aa and 42 aa upstream the Kiss2 10-aa conserved sequence (Fig. 1).

The identification of the potential N-terminal and C-terminal cleavage sites of each precursor led to the prediction of two larger than 10-aa mature peptides for each kisspeptin. Kiss1 precursor could be cleaved in a 31-aa mature peptide [Kp1(31)] and a 15-aa mature peptide [Kp1(15)]. Kiss2 precursor could be cleaved in a 51-aa mature peptide [Kp2(51)] and a 12-aa mature peptide [Kp2(12)].

3.2. Tissue distribution of European eel *Kiss1* and *Kiss2* mRNAs

Specific qPCR protocols were developed for each eel *Kiss* and applied to the analysis of their respective tissue distribution (Fig. 2).

3.2.1. *Kiss1* mRNA distribution

Kiss1 mRNA was mainly expressed in the di-/mesencephalon part of the brain and in the pituitary. Low *Kiss1* mRNA levels were measured in the eye and the testis. Its expression was close to the limit of detection in the telencephalon, *cerebellum* and muscle while it was under the limit of detection in the other investigated tissues (olfactory bulbs, *medulla oblongata*, ovary, kidney, adipose tissue, liver, intestine and spleen) (Fig. 2).

3.2.2. *Kiss2* mRNA distribution

Kiss2 mRNA was mainly expressed in di-/mesencephalon part of the brain. A low expression of *Kiss2* mRNA was measured in the *medulla oblongata*, the pituitary and testis. Its expression was under the limit of detection in the other tissues (olfactory bulbs, telencephalon, *cerebellum*, ovary, kidney, adipose tissue, liver, muscle, intestine and spleen) (Fig. 2).

3.3. Regulation of eel *Kiss* expressions during experimental sexual maturation

Experimental gonadal maturation was induced in female silver eels according to classical hormonal treatments (Ohta et al., 1996). The expressions of the two *Kiss* were analyzed by qPCR in the brain-pituitary axis, which encompasses the major sites of *Kiss* expression in the eel.

In the olfactory bulbs/telencephalon part of the brain (Fig. 3A), *Kiss2* transcript level was significantly up-regulated in matured eels as compared to control ones (x30.08, $P<0.001$), while *Kiss1* remained at the limit of detection.

In the di-/mes-encephalon (Fig. 3B), a trend of Kiss2 up-regulation can be observed in matured eels as compared to control ones, while no regulation of *Kiss1* transcript level was recorded in this brain region.

In the pituitary (Fig. 3C), *Kiss2* transcript level was significantly up-regulated in matured eels as compared to controls (x3.92; $P<0.05$), while no regulation of *Kiss1* transcript level was observed.

4. Discussion

4.1. Characterisations of European eel *Kiss1* and *Kiss2*

4.1.1. Cloning of *Kiss1* and *Kiss2*

In order to check the previously predicted *Kiss1* and *Kiss2* gene sequences (Pasquier et al., submited) and to further investigate their structures, we performed specific RACE PCR on *Kiss1* and *Kiss2* transcripts. The sequencing of the RACE PCR products and the comparison of their sequences to the European eel genome revealed a partial *Kiss1* mRNA made, at least, of two exons and a complete *Kiss2* mRNA made of two exons. This structure into two exons represents the conserved structure of Kiss genes (Tena-Sempere et al., 2012).

Once translated, both *Kiss1* and *Kiss2* transcripts encode for two proteins presenting the characteristics of the kisspeptin precursors. Among those characteristics, Kiss1 and Kiss2 precursors present the conserved kisspeptin-10 sequences, *i.e.* YNWNSFGLRY for Kiss1 and FNRNPFGLRF for Kiss2. Moreover, kisspeptin1-10 [Kp1(10)] and kisspeptin2-10 [Kp2(10)] are followed at their C-terminal ends by a cleavage and α-amidation site, *i.e.* G-K-Stop and G-K-R motifs, respectively. Both kisspeptin-10 sequences are encoded by the final exon of each transcript in accordance with what has been observed in other species (Tena-Sempere et al., 2012).

4.1.2. Prediction of mature peptides

Using the NeurPred tool, we were able to predict N-terminal cleavage sites for each kisspeptin precursor. The predictions of those N-terminal cleavage sites in addition to the C-

terminal α-amidation sites have delineated potential mature peptides that could be directly cleaved from Kiss1 and Kiss2 precursors. Thus, the best candidates for mature peptides in the European eel are Kp1(31), Kp1(15), Kp2(51) and Kp2(12).

The presence of cleavage sites delineating a mature Kp1(15) seems to be conserved among teleosts (Tena-Sempere et al., 2012). In contrast, the presence of a glutamic acid (E) at the first position of the eel mature Kp1(15) seems to be a unique feature among teleosts. Interestingly, the presence of a E at the first position of a mature Kp1 is observed in the case of Kp1(16) in the sarcopterygians and a representative of actinopterygians, the spotted gar (*Lepisosteus oculatus*). This particular amino acid could indicate a potential N-terminal pyroglutamylation of those peptides (ex: pyro-ENFSSYNWNSFGLRY-amide).

The existence of a mature Kp2(12) has been proven in xenopus (Lee et al., 2009) and the presence of a basic cleavage site 3 aa upstream Kp2(10) seems to be also conserved among teleosts such as in European eel.

Although kisspeptin-10 is considered as the minimal sequence to specifically activate Kissr (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001), *in silico* analysis did not provide evidence of the existence of mature Kp1(10) and Kp2(10) in any vertebrate including the European eel. As heterologous Kp(10), including human Kp1(10), induced the higher inhibitory effect on LH expression (Pasquier et al., 2011), we cannot exclude the potential existence of mature eel Kp1(10) and eel Kp2(10) resulting, for example, from the degradation of a larger mature peptide. Eel Kp1(10) is identical to the rat Kp1(10), while eel Kp2(10) is unique due to the presence of an arginine (R) at its third position. The presence of an arginine at this position has only been reported so far in the Kp1(10) of the musk shrew (*Suncus murinus*) (Inoue et al., 2011). Further studies should aim at testing the functional properties of each predicted mature peptides of the European eel.

4.2. *Kiss1* and *Kiss2* mRNA distributions in the European eel gonadotropic axis

In this study, European eel *Kiss1* and *Kiss2* mRNA present both similar and differential tissue distributions.

Both eel *Kiss1* and *Kiss2* mRNA are highly expressed in the brain and mainly in the di-/mes-encephalon part. In other teleosts presenting two *Kiss* genes, such as sea bass (*Dicentrarchus labrax*), zebrafish, medaka and chub mackerel (*Scomber japonicus*), *Kiss1* and *Kiss2* mRNAs are also highly expressed in the brain, indicating the conserved importance of kisspeptins in the teleost central nervous system. However, studies demonstrated that each transcript was located in different brain nuclei. Using ISH (Escobar et al., 2012; Kanda et al., 2012; Ogawa et al., 2012; Servili et al., 2011) and laser-capture microdissection coupled with real-time PCR (Kitahashi et al., 2009), *Kiss1* mRNA has been observed in the ventral *habenula*. In contrast, *Kiss2* mRNA has been found in the preoptic region (Escobar et al., 2012; Kanda et al., 2012; Ogawa et al., 2012) and in the hypothalamus (Escobar et al., 2012; Kanda et al., 2012; Kitahashi et al., 2009; Shimizu et al., 2012). In zebrafish, it has been evidenced that only Kiss2 neurons send projections to GnRH neurons and pituitary, suggesting a more marked involvement of *Kiss2* than *Kiss1* in the regulation of the gonadotropic activity of this species (Servili et al., 2011).

Both European eel *Kiss1* and *Kiss2* mRNAs are also highly expressed in the pituitary. In contrast, only *Kiss2* expression has been detected in zebrafish pituitary and only *Kiss1* expression in the sea bass and chub mackerel pituitaries (Escobar et al., 2012; Kanda et al., 2012; Kitahashi et al., 2009; Shimizu et al., 2012). In the sea bass pituitary, *Kiss1* mRNA was selectively expressed in most of the FSHβ positive cells but never in LHβ positive cells (Escobar et al., 2012).

In a previous study, we showed the expression of the three eel *Kissr* in the brain and *Kissr-1* and *Kissr-2* in the pituitary (Pasquier et al., 2012). This further supports the potential

involvement of the kisspeptin system in the gonadotropic axis and the reproductive function of the European eel.

The eel *Kiss2* and *Kiss1* expression levels were under the detection limit in the ovary and poorly expressed in the testis, while we previously showed a large expression of *Kissr-1* in both gonads (Pasquier et al., 2012). This could reflect a potential endocrine action of *Kiss1* and/or *Kiss2* on European eel gonads.

In the peripheral organs which do not belong to the brain-pituitary-gonad (BPG) axis, eel *Kiss1* and *Kiss2* expression levels were under the detection limit except in the eye where *Kiss1* mRNA was well expressed. In the sea bass, both *Kiss1* and *Kiss2* mRNA were expressed in the liver and adipose tissue. In addition, *Kiss1* was expressed in the gill while *Kiss2* was expressed in the intestine and pancreas. In zebrafish and medaka, *Kiss1* mRNA was poorly expressed in the peripheral organs while *Kiss2* mRNA was expressed in the intestine, heart and kidney. In the chub mackerel, both *Kiss1* and *Kiss2* were expressed in gill, heart, liver, intestine, pancreas and adipose tissue. This demonstrates a species dependent pattern of *Kiss* expressions in the peripheral organs which could be completed by a sex and stage dependent pattern as shown by Felip and co-workers. In addition, as the three eel *Kissr* were also poorly expressed in the peripheral organs compared to the organs involved in the gonadotropic axis, we can hypothesise a more marked involvement of kisspeptin system in the reproductive function than in any other function of the European eel. Their regulation during experimental maturation provides additional information on the potential respective roles of *Kiss1* and *Kiss2* in the sexual maturation process.

4.3. Differential regulation of European eel *Kiss1* and *Kiss2* during experimental maturation

Experimental maturations of silver female European eels, consisting of weekly SPE injections during four months, were performed to remove the pre-pubertal blockade by triggering the BPG axis directly at the gonad level. Such experiment is known to increase the steroidogenesis and release of testosterone and estradiol in blood circulation. Both sex steroid hormones can then exert feedback controls on brain and pituitary (Dufour et al., 2003; Dufour et al., 1989; Dufour et al., 1988; Dufour et al., 1993). In the present experiment, we showed an increase in brain *GnRH* and pituitary *LHβ* expressions (data not shown), both due to sex steroid positive feedbacks.

In the present study, we also showed no regulation of *Kiss1* expression while *Kiss2* expression was up-regulated in the brain and pituitary in matured eels. In other teleosts, such as in grass pufferfish, a marked increase of *Kiss2* expression was also noticed in the brain and pituitary during the natural sexual maturation (Shahjahan et al., 2010). In zebrafish, Kitahashi et al did not show any changes of *Kiss2* expression during puberty (Kitahashi et al., 2009), while it was recently demonstrated that the number of Kiss2 neurons increased under estradiol treatment (Servili et al., 2011). These observations suggest that sex steroid positive feedback effects could be mediated through Kiss2 in the eel.

In zebrafish, *Kiss1* expression increased to reach a maximum at pre-pubertal stage, which means that the expression rate stay constant during the puberty (Kitahashi et al., 2009). These could mean that eel *Kiss1* could be involved at an earlier pubertal stage of the European eel maturation. Its expression could be regulated during the silvering process since it represents the first step of the puberty onset in European eel.

Thus, both *Kiss1* and *Kiss2* could play a part in the European eel sexual maturation but not at the same time. Further investigations should focus on the comparisons of the *Kiss1* and

Kiss2 expression levels between yellow and silver eels. Interestingly, a recent study has reported both importance of *Kiss1* and *Kiss2* and their alternating actions during the reproduction of stripped bass (Zmora et al, 2012).

For the same maturation experiment, we previously showed an increase of *Kissr-1* expression in the brain in matured versus control eels (Pasquier et al., 2012). Those observations support the hypothesis of a stimulatory effect of kisspeptin system at the brain level, as *Kiss2* and *Kissr-1* transcripts are up-regulated in this tissue.

In the pituitary, *Kiss2* expression was increased, while *Kissr-1* and *Kissr-2* expressions decreased in matured versus control eels (Pasquier et al., 2012). We also previously demonstrated an *in vitro* inhibitory effect of heterologous kisspeptins on *LHβ* expression by eel pituitary cells in culture (Pasquier et al., 2011). Our data suggested that the inhibition of kisspeptin system on *LHβ* expression could be removed during sexual maturation by down regulation of *Kissr-1* and *Kissr-2* in the pituitary. Concerning the up-regulation of *Kiss2* mRNa in the pituitary, we may also raise the hypothesis that this may reflect a potential endocrine role of *Kiss2* on peripheral tissues.

The role of the kisspeptin system in the European eel reproductive function appeared as very complex. Further investigations on kinetic expression of *Kiss* and *Kissr* mRNAs and protein quantification should aim at clarifying the exact role of each kisspeptin system component in the puberty and sexual maturation processes of the eel.

Conclusion

In the present study, we cloned both *Kiss1* and *Kiss2* mRNAs and from the sequences of those two transcripts, we deduced the sequences of Kiss1 and Kiss2 peptidic precursors. We also predicted multiple mature peptides cleaved from each precursor. The tissue distribution of *Kiss1* and *Kiss2* mRNA revealed that both transcripts were predominantly

expressed in the brain-pituitary axis that strengthened the hypothesis of a potential involvement of kisspeptin system in the eel reproductive function. During experimental maturation, the up-regulation of *Kiss2* in the brain and pituitary, while *Kiss1* did not change, suggested a more marked involvement of *Kiss2* than *Kiss1* in the eel sexual maturation.

References

Amare, A., Hummon, A.B., Southey, B.R., Zimmerman, T.A., Rodriguez-Zas, S.L., Sweedler, J.V., 2006. Bridging neuropeptidomics and genomics with bioinformatics: Prediction of mammalian neuropeptide prohormone processing. J Proteome Res 5, 1162-1167.

Aroua, S., Weltzien, F.A., Le Belle, N., Dufour, S., 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids. Gen. Comp. Endocrinol. 153, 333-343.

Biran, J., Ben-Dor, S., Levavi-Sivan, B., 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. Biol. Reprod. 79, 776-786.

De Pinna, M.C.C., 1996. Teleostean monophyly. In: Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R., Johnson, G.D. (Eds.), Interelationships of Fishes. Academic press, New York, pp. 147-162.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., 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.

Dufour, S., Burzawa-Gerard, E., Le Belle, N., Sbaihi, M., Vidal, B., 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, Anguilla anguilla. In: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K. (Eds.), Eel Biology. Springer, Tokyo, pp. 373-383.

Dufour, S., Le Belle, N., Baloche, S., Fontaine, Y.A., 1989. Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, Anguilla anguilla. Fish Physiology and Biochemistry 7, 157-162.

Dufour, S., Lopez, E., Le Menn, F., Le Belle, N., Baloche, S., Fontaine, Y.A., 1988. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. Gen Comp Endocrinol 70, 20-30.

Dufour, S., Montero, M., Le Belle, N., Bassompierre, M., King, J.A., Millar, R.P., Peter, R.E., Fontaine, Y.A., 1993. Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, Anguilla anguilla. Fish Physiology and Biochemistry 11, 99-106.

Dufour, S., Weltzien, F.A., Sebert, M.E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Pasqualini, C., 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. Ann N Y Acad Sci 1040, 9-21.

Eipper, B.A., Stoffers, D.A., Mains, R.E., 1992. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. Annu Rev Neurosci 15, 57-85.

Escobar, S., Felip, A., Gueguen, M.M., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O., Servili, A., 2012. Expression of kisspeptinsin the brain and pituitary of the european sea bass (Dicentrarchus labrax). J Comp Neurol.

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gómez, A., 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. Mol Cell Endocrinol 312, 61-71.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., 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.

García-Galiano, D., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2012. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. J Neuroendocrinol 24, 22-33.

Henkel, C.V., Burgerhout, E., de Wijze, D.L., Dirks, R.P., Minegishi, Y., Jansen, H.J., Spaink, H.P., Dufour, S., Weltzien, F.A., Tsukamoto, K., van den Thillart, G.E., 2012. Primitive duplicate Hox clusters in the European eel's genome. PLoS One 7, e32231.
Inoue, N., Sasagawa, K., Ikai, K., Sasaki, Y., Tomikawa, J., Oishi, S., Fujii, N., Uenoyama, Y., Ohmori, Y., Yamamoto, N., Hondo, E., Maeda, K., Tsukamura, H., 2011. Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (Suncus murinus). Proc Natl Acad Sci U S A 108, 17527-17532.
Kanda, S., Karigo, T., Oka, Y., 2012. Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. J Neuroendocrinol.
Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. Endocrinology 150, 821-831.
Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J. Biol. Chem. 276, 34631-34636.
Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., O'Dowd, B.F., 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. F.E.B.S. Lett. 446, 103-107.
Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. J Natl Cancer Inst 88, 1731-1737.
Lee, Y.R., Tsunekawa, K., Moon, M.J., Um, H.N., Hwang, J.I., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H.B., Seong, J.Y., Tsutsui, K., 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. Endocrinology 150, 2837-2846.
Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., Harrison, D.C., 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. J. Biol. Chem. 276, 28969-28975.
Ogawa, S., Ng, K.W., Ramadasan, P.N., Nathan, F.M., Parhar, I.S., 2012. Habenular Kiss1 neurons modulate the serotonergic system in the brain of zebrafish. Endocrinology 153, 2398-2407.
Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K., 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture 139, 291-301.
Pasquier, J., Lafont, A.-G., Jeng, S.-R., Morini, M., Dirks, R., van den Thillart, G., Tomkiewicz, J., Tostivint, H., Chang, C.-F., Rousseau, K., Dufour, S., 2012. Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. PLoS One.
Pasquier, J., Lafont, A.-G., Tostivint, H., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., submited. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. Frontiers in neuroendocrinology.
Pasquier, J., Lafont, A.G., Leprince, J., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, Anguilla anguilla. Gen Comp Endocrinol 173, 216-225.
Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8, 785-786.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. Physiol Rev 92, 1235-1316.
Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 349, 1614-1627.
Servili, A., Le Page, Y., Leprince, J., Caraty, A., Escobar, S., Parhar, I.S., Seong, J.Y., Vaudry, H., Kah, O., 2011. Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. Endocrinology 152, 1527-1540.
Shahjahan, M., Motohashi, E., Doi, H., Ando, H., 2010. Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. Gen Comp Endocrinol 169, 48-57.
Shimizu, Y., Tomikawa, J., Hirano, K., Nanikawa, Y., Akazome, Y., Kanda, S., Kazeto, Y., Okuzawa, K., Uenoyama, Y., Ohkura, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Gen, K., Oka, Y., Yamamoto, N., 2012. Central distribution of kiss2 neurons and peri-pubertal changes in their expression in the brain of male and female red seabream Pagrus major. Gen Comp Endocrinol 175, 432-442.
Stone, R., 2003. Ecology. Freshwater eels are slip-sliding away. Science 302, 221-222.
Sébert, M.E., Legros, C., Weltzien, F.A., Malpaux, B., Chemineau, P., Dufour, S., 2008. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. J. Neuroendocrinol. 20, 917-929.
Tena-Sempere, M., Felip, A., Gomez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. Gen Comp Endocrinol 175, 234-243.
Weltzien, F.A., Pasqualini, C., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Dufour, S., 2005. Brain expression of tyrosine hydroxylase and its regulation by steroid hormones in the European eel quantified by real-time PCR. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1040, 518-520.

Figure legends

<u>Figure 1</u>: Molecular cloning of eel partial *Kiss1* mRNA (A) and complete *Kiss2* mRNA (B). Nucleotides (top) are numbered from 5' to 3'. The exon-exon juctions are represented by two nucleotides colored in red. The deduced amino-acid residues (bottom) are numbered beginning with the first methionine residue in the ORF (in green for Kiss2) or with the first codon of the known sequence (for Kiss1 partial mRNA). The asterisk (*) indicates the stop codon and signal peptide sequence is underlined. Conserved kisspeptin1-10 and kisspeptin2-10 are shaded in black. C-terminal proteolytic α-amidation sites are shaded in grey and predicted N-terminal cleavage sites are coloured in blue.

<u>Figure 2</u>: Tissue distribution of the expression of the two eel *Kiss* mRNAs. Olfactory bulbs (OB), telencephalon (Tel), di-/mesencephalon (Di/Mes), cerebellum (Cb), medulla oblongata (MO), pituitary, ovary, testis, muscle, eye, liver, adipose tissue (Fat), kidney, intestine and spleen. The relative expression of each *Kissr* mRNA was normalised to the amount of total RNA. Each bar represents mean ± SEM from 8 individuals.

<u>Figure 3</u>: Regulations of the two eel *Kiss* expressions during experimental maturation. The relative expression of each *Kiss* mRNA was normalised to *ß-actin* mRNA. Each bar represents mean ± SEM from 7 control and 9 matured female eels. Significant difference between control and matured groups: $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ (Student's t test). N.D. = Non detectable.

Table 1

gene	Name	Sequence 5'-3' (bp)	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	PCR type	Reference
Kiss1	Kiss1 RACE 3'	CGCCACAAGCGGCCAAGAAG	68.97	?	RACE PCR	This study
	Kiss1 RACE 5'	CCCGCTTCTTGGCCGCTTGT	69,41	?		
	Kiss1 qPCR F	GGTCTCTTAGGTACACCCCGT	57.93	87	qPCR	This study
	Kiss1 qPCR R	ACAGCTCCTCGCTCATTTG	57.54			
Kiss2	Kiss2 RACE 3'	AGGGCCACATTTCCTGCCGACT	68.77	?	RACE PCR	This study
	Kiss2 RACE 5'	CCGAACGGATTGCGGTTGAATTTG	70.44	?		
	Kiss2 qPCR F	ACGGACGACTCAGGTTCTCT	57.33	144	qPCR	This study
	Kiss2 qPCR R	GCCCTCGATTTCACTGTCTT	57.76			
β-actin	β-actin F	CAGCCTTCCTTCCTGGGT	58.60	225	qPCR	Aroua et al, 2007
	β-actin R	AGTATTTGCGCTCGGGTG	58.25			

Figure 1

A

```
  1 -  TCTCCATGGTGACCATCAGGTTTGGGGAGACCAGGTCTCTTAGGTACACCCCGTACACTGCA
  1 -     S  M  V  T  I  R  F  G  E  T  R  S  L  R  Y  T  P  Y  T  A

 63 - GATGAAGACCCAGAGATTGCAGCCATGCGGGTCCTGAGGCAAATGAGCGAGGAGCTGTCGACC
 21 -  D  E  D  P  E  I  A  A  M  R  V  L  R  Q  M  S  E  E  L  S  T

126 - GAGGCCCCGCCCTACCCGCACCGCCCCGCCCACTGGCCCACCGCACTGGCCAATCCACTGCCG
 42 -  E  A  P  P  Y  P  H  R  P  A  H  W  P  T  A  L  A  N  P  L  P

189 - GGAGGGGCCGGCCTTCCCAGGAGGTCGTGGTGGTGGTACCCCGAGGTGCCGCCACAAGCGGCC
 63 -  G  G  A  G  L  P  R  R  S  W  W  W  Y  P  E  V  P  P  Q  A  A

252 - AAGAAGCGGGAAAACTTCTCCTCCTACAACTGGAACTCTTTCGGTTTACGTTATGGGAAATGA
 84 -  K  K  R  E  N  F  S  S  Y  N  W  N  S  F  G  L  R  Y  G  K  *

315 - CTCGGAAGCGAGCTGTCAATCACTCTAACC
```

B

```
  1 - AGGCAACTCATCTTCAGTATCACAGCTAACCAGAAAGGGTTTGTAATACGAAGCTGGGCTATA
 64 - TAAGAGAAACACACTGTTTAATGTGTGTAGTTTTTGTTTCATACATCTAATATGAGTAGATTC
  1 -                                                   M  S  R  F

127 - GCGTTGCTGTTGGTTTTTGCGGTAGTTTGCTTTTGCGGAGCAATGGGAAAATCACAAAACGCA
  5 -  A  L  L  L  V  F  A  V  V  C  F  C  G  A  M  G  K  S  Q  N  A

190 - TTTCTTTCTGCTGAGCGGACGGACGACTCAGGTTCTCTGTATCCAGAGCGTGCGTCTGCTGGG
 26 -  F  L  S  A  E  R  T  D  D  S  G  S  L  Y  P  E  R  A  S  A  G

253 - GTCTGGGACCGCTCTAAAGTACTGAGAGAAGTCACGGGTCCGAATTATTCAGACGAAGCAGAT
 47 -  V  W  D  R  S  K  V  L  R  E  V  T  G  P  N  Y  S  D  E  A  D

316 - CTCTGCTTCTTCCTGAAAGACAGTGAAATCGAGGGCCACATTTCCTGCCGACTCCGATACTCT
 68 -  L  C  F  F  L  K  D  S  E  I  E  G  H  I  S  C  R  L  R  Y  S

379 - CGAAGCAAATTCAACCGCAATCCGTTCGGTCTCCGTTTTGGAAAACGTGAGTGGAGTTACCTT
 89 -  R  S  K  F  N  R  N  P  F  G  L  R  F  G  K  R  E  W  S  Y  L

442 - CCCAAGAGCAAAACTGCAAAACCCGGGACAAGCAAGCTTCTCCCCTATCTACTGTACATCCAA
110 -  P  K  S  K  T  A  K  P  G  T  S  K  L  L  P  Y  L  L  Y  I  Q

505 - GAGCGGAAAGCCTGACTGGACAAGCAGTCCTCATCCATGGGTTTTTGAAATTTTATGATAACT
131 -  E  R  K  A  *

568 - GAGATATGTTCATTCCAATTTCCATATTACGCCACATGTTAAACATTGTCATTGTGTGTGTTA
631 - ATTAAAACGTCCTGTATTCTGTTAAACACATATGTTGTCCAGTGAAATGGTCAGATGACCACC
694 - TTTAAGTAGACGGATTTGCTTTTTAACAGGATATTTTATGTGAAGACATTATTAATTTAATCA
757 - ATCAAGCCTACGTTAATGTTAGGAAAATATTTATTTGTTTGCATTATATTCGCGTAGCCAGTT
820 - TTATTGTGCCGGTGGCAACAATGTCCATTGTGAGTGCTTTTCGCCCATGCCTCTATTATATTT
883 - GAGCAAATAGAATTAGTGTCACCAGAAACCACAAGGGCGCGAGGAGTACAAGTTTTCTTTTCA
946 - GTACTTTTCATAATGGAAATGAGCTGTGTATCTTGAAACGATCAATGAGGTGGTTTAATCAGA
1009 - AATAAAAGCGGATAAA
```

Figure 2

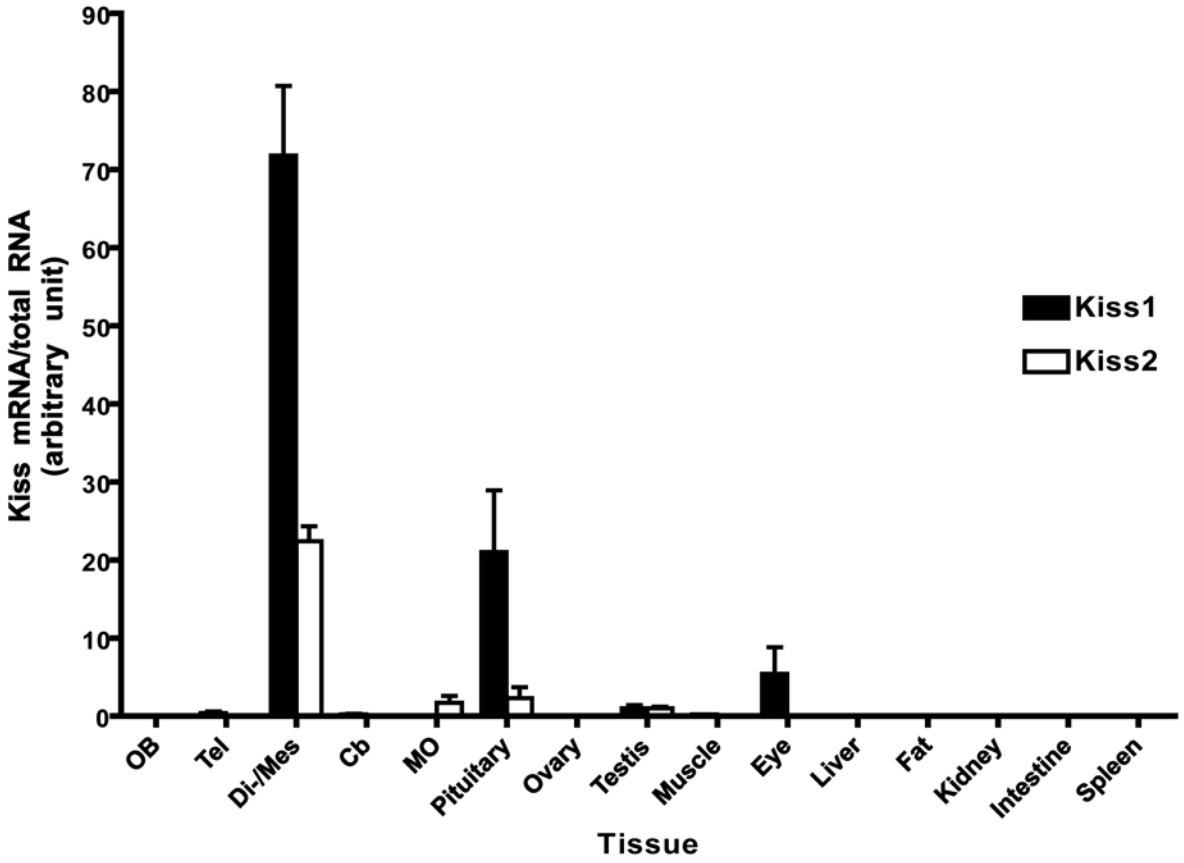
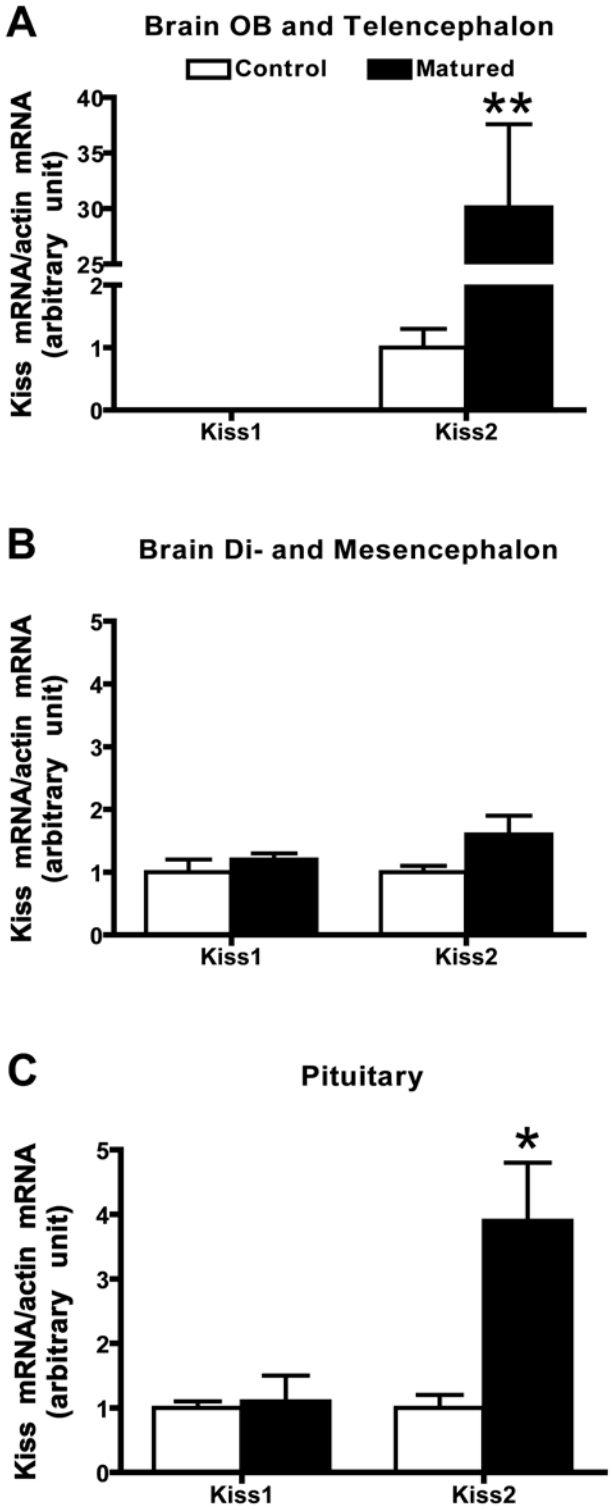

Kiss mRNA/total RNA
(arbitrary unit)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Kiss1
Kiss2
OB
Tel
Di-/Mes
Cb
MO
Pituitary
Ovary
Testis
Muscle
Eye
Liver
Fat
Kidney
Intestine
Spleen
Tissue

Figure 3


A
Brain OB and Telencephalon
Control
Matured
Kiss mRNA/actin mRNA (arbitrary unit)
40
35
30
25
2
1
0
**
Kiss1
Kiss2
B
Brain Di- and Mesencephalon
Kiss mRNA/actin mRNA (arbitrary unit)
5
4
3
2
1
0
Kiss1
Kiss2
C
Pituitary
Kiss mRNA/actin mRNA (arbitrary unit)
5
4
3
2
1
0
*
Kiss1
Kiss2

Chapitre 6

Origine et histoire évolutive des kisspeptines chez les vertébrés : apports des nouveaux génomes et comparaison des histoires évolutives des *Kiss* et des *Kissr* chez les vertébrés.

1. Introduction de l'article 4

Etant donné que la réévaluation de la diversité des *Kissr* nous a permis d'éclaircir certaines zones d'ombre de leur histoire évolutive, nous avons procédé de la même manière pour les *Kiss*. Nous avons donc recherché l'existence de *Kiss* dans les nouvelles bases de données génomiques. Nous avons notamment pu identifier l'existence de trois *Kiss* chez deux nouvelles espèces de vertébrés, le cœlacanthe et la chimère, alors que jusqu'à présent seul le xénope en possédait autant.

L'analyse phylogénétique des différents *Kiss* de vertébrés s'est avérée inadaptée à l'établissement d'une classification claire au sein de cette famille de gènes. En revanche, l'analyse des synténies a révélé l'existence de trois *Kiss* paralogues chez les vertébrés, *Kiss1*, *Kiss2* et *Kiss3*. Elle a également mis en évidence la possible existence d'un quatrième paralogue, *Kiss4*, jamais observé jusqu'à ce jour. De plus, il semblerait que, comme pour les différents *Kissr*, les trois *Kiss* de vertébrés descendent d'un même ancêtre commun ayant subi la 1R et 2R. L'impact de la 3R aurait encore une fois été annulé par des pertes de gènes chez les téléostéens. Le *Kiss4*, quant à lui, aurait été perdu très précocement au cours de l'évolution des vertébrés.

Il nous est apparu intéressant de comparer l'histoire évolutive des *Kiss* à celle des *Kissr* afin de mieux comprendre l'histoire du système dans son ensemble. De cette comparaison est ressortie une image plus complexe du système que celle présentée par les différents auteurs jusqu'à présent. En effet, chaque lignée de vertébrés peut posséder sa propre combinaison de *Kiss* et de *Kissr* ce qui confirmerait la plasticité de ce système à travers l'évolution des vertébrés.

2. Article 4: Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features.

Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features

Jérémy Pasquier[a], Anne-Gaëlle Lafont[a], Hervé Tostivint[b], Hubert Vaudry[c], Karine Rousseau[a], and Sylvie Dufour[a]

Submitted to Frontiers in Neuroendocrine Science; status: minor revisions

[a] Research Unit BOREA, Biology of Aquatic Organisms and Ecosystems, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 7208- Institut de Recherche pour le Développement (IRD) 207- Université Pierre et Marie Curie (UPMC) - Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), 75231 Paris Cedex 05, France.

[b] UMR 7221 CNRS/MNHN Evolution des Régulations Endocriniennes, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75231 Paris Cedex 05, France

[c] Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, INSERM U982, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

Running title: Evolutionary history of Kisspeptins and Kisspeptin receptors

Number of words: 4 648; *Number of figures:* 5; Number of supporting data: 1 Table, 4 Figures

Correspondence should be addressed to:

Dr. Sylvie Dufour

MNHN - UMR BOREA

7 rue Cuvier, CP32

75231 Paris Cedex 05 – France

E-mail: sylvie.dufour@mnhn.fr

Abstract

During the past decade, the kisspeptin system has been identified in various vertebrates, leading to the discovery of multiple genes encoding both peptides (Kiss) and receptors (Kissr). The investigation of recently published genomes from species of phylogenetic interest, such as a chondrichthyan, the elephant shark, an early sarcopterygian, the coelacanth, a non-teleost actinopterygian, the spotted gar, and an early teleost, the European eel, allowed us to get new insights into the molecular diversity and evolution of both *Kiss* and *Kissr* families. We identified four *Kissr* in the spotted gar and coelacanth genomes, providing the first evidence of four *Kissr* genes in vertebrates. We also found three *Kiss* in the coelacanth and elephant shark genomes revealing two new species, in addition to xenopus, presenting three *Kiss* genes. Considering the increasing diversity of kisspeptin system, phylogenetic and synteny analyses enabled us to clarify both *Kiss* and *Kissr* classifications. We also could trace back the evolution of both gene families from the early steps of vertebrate history. Four *Kissr* and four *Kiss* paralogs may have arisen *via* the two whole genome duplication rounds (1R & 2R) in early vertebrates. This would have been followed by multiple independent *Kiss* and *Kissr* gene losses in the sarcopterygian and actinopterygian lineages. In particular, no impact of the teleost-specific 3R could be recorded on the numbers of teleost *Kissr* or *Kiss* paralogs. The origin of their diversity *via* 1R & 2R, as well as the subsequent occurrence of multiple gene losses, represent common features of the evolutionary histories of *Kiss* and *Kissr* in vertebrates. In contrast, comparisons revealed un-matching numbers of *Kiss* and *Kissr* genes in some species, as well as a large variability of *Kiss/Kissr* couples according to species. These discrepancies support independent features of the *Kiss* and *Kissr* evolutionary histories across vertebrate radiation.

1. Introduction

As increasing vertebrate genomes have been explored, the understanding of their structure and evolution has progressed in parallel. Indeed, the comparison of their gene organisation shades the light on various large-scale genomic events that occurred along vertebrate radiation. Among those events, in the early stages of their history, vertebrates experienced two rounds of whole genome duplication (1R & 2R), resulting in four-fold-repeated genomes (Dehal and Boore, 2005). These two events can be traced through the study of gene families currently presenting up to four paralogs. In addition, the comparison of teleost genomes with other vertebrate genomes revealed a teleost-specific third round of whole genome duplication (3R), resulting in up to eight paralogs in the same gene family in this lineage (Amores et al., 1998).

In 1996, kisspeptin was first discovered as an anti-metastatic peptide in human carcinoma (Lee et al., 1996). In 2001, the orphan receptor GPR54 was identified as the cognate receptor of kisspeptin (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001). Two years later, both kisspeptin and its receptor were evidenced as key players of the reproductive function in mammals (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). They act upstream the gonadotropic axis mediating GnRH and steroid effects on gonadotropin secretion, and are considered as major puberty gatekeepers and reproduction regulators (Pinilla et al., 2012). To date, the kisspeptin system has been identified in various vertebrate species, leading to the discovery of multiple genes encoding kisspeptins as well as multiple genes encoding its receptors (Biran et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; Lee et al., 2009).

Concerning *Kiss* and *Kissr* diversity, contrasting situations are found in the different vertebrate phyla. Indeed, in eutherian species, one single gene, named *Kiss1r*, encodes the kisspeptin receptor and one single gene, named *Kiss1*, encodes kisspeptin. In prototherians,

such as platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), two kisspeptins and two receptors are present (Lee et al., 2009). To date, in teleosts, two situations have been reported. One *Kiss* gene and one *Kissr* gene are present in some species such as fugu (*Takifugu niphobles*), tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*) and stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). In contrast, a second *Kiss* as well as a second *Kissr* genes have been evidenced in some species including zebrafish (*Danio rerio*) (Biran et al., 2008), goldfish (*Carassius auratus*) (Li et al., 2009), medaka (*Oryzias latipes*) (Lee et al., 2009), and striped bass (*Morone saxatilis*) (Zmora et al., 2012). Until recently the maximum number of *Kiss* and *Kissr* genes was found in an amphibian species, the xenopus (*Silurana tropicalis*), with three paralogs of each gene. In birds, on the opposite, neither *Kiss* nor *Kissr* have been found.

So far, in all these cases, a matching number of *Kiss* and *Kissr* genes has been reported, leading to the suggestion of the occurrence of “paired Kiss/Kissr “systems (Kim et al., 2012).

The recent publications of genomes from representative species of key phylogenetic positions makes it possible to revisit the diversity, the origin and the evolution of *Kiss* and *Kissr* in vertebrates. These genomes include a chondrichthyan, the elephant shark (*Callorhinchus milii*) (Venkatesh et al., 2007), a representative of early sarcopterygians, the coelacanth (*Latimeria chalumnae*, coelacanth genome project, Broad Institute), a non-teleost actinopterygian, the spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) (Amores et al., 2011), and an early teleost (elopomorphe), the European eel (*Anguilla anguilla*) (Henkel et al., 2012). Gene characterisation, phylogenetic and syntenic analyses allowed us to provide new insights on the respective evolutionary histories of *Kiss* and *Kissr* families. Furthermore, the comparison of proposed *Kiss* and *Kissr* phylogenetic histories highlighted common processes as well as divergent events leading to discuss the existence of conserved Kiss/Kissr couples among the various vertebrate lineages.

2. Diversity and evolutionary history of *Kissr* in vertebrates

2.1. Diversity and classification of *Kissr*

2.1.1. Current data

A single gene, named *Kiss1r*, encoding the kisspeptin receptor has been found in eutherian mammals including humans, while two receptors are present in a prototherian, the platypus (Lee et al., 2009). Various situations are observed in other tetrapods, as shown by the lack of *Kissr* in birds and up to a maximum of three *Kissr* paralogous genes in the xenopus (Lee et al., 2009). In teleosts, at least one *Kissr* is present in all species investigated so far (for review (Tena-Sempere et al., 2012). A second *Kissr* gene could be evidenced in some species including zebrafish (Biran et al., 2008), goldfish (Li et al., 2009), medaka (Lee et al., 2009), and striped bass (Zmora et al., 2012). However, these second paralogs are lacking in the genomes of other teleosts, such as fugu, tetraodon and stickleback (Pasquier et al., in press). In chondrichthyans, no *Kissr* has been identified to date. Concerning cyclostomes, the existence of one *Kissr* gene has been reported in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) (Pasquier et al., 2011).

2.1.2. New advances in *Kissr* gene characterisation

a. Multiple Kissr in early osteichthyans

Recently, we described three *Kissr* genes in the genome of a basal teleost, the European eel, providing the first evidence of the existence of three *Kissr* genes in a teleost species (Pasquier et al., in press). Furthermore, we described four *Kissr* in the genome of a non-teleost actinopterygian, the spotted gar, as well as in the genome of a basal sarcopterygian, the coelacanth (Pasquier et al., in press). This provided the first evidence for four *Kissr* genes in vertebrate species and revealed a larger diversity of *Kissr* than previously described.

b. Search for Kissr in chondrichthyans

So far, no *Kissr* sequence has been reported in chondrichthyans. Our search in the elephant shark genome has only led to the identification of multiple partial sequences, corresponding at least to two *Kissr* (unpublished data). Ongoing sequencing of other chondrichthyan genomes, such as dogfish (*Scyliorhinus canicula*), may provide more insights into the *Kissr* diversity in the sister group of osteichthyans.

2.1.3. Phylogeny, synteny and classification of *Kissr*

Phylogenetic analysis of 51 peptidic Kissr sequences clustered the osteichthyan Kissr into four clades, each one encompassing a coelacanth and spotted gar Kissr (Pasquier et al., in press). Clade-1 mainly encompassed mammalian Kissr including human Kiss1r, as well as xenopus Kissr-1a, European eel Kissr-1, spotted gar Kissr-1 and coelcanth Kissr-1. Clade-2 mainly encompassed teleost Kissr including European eel Kissr-2, as well as amphibian, spotted gar and coelacanth Kissr-2. Clade-3 encompassed a few teleost Kissr including European eel Kissr-3 as well as xenopus Kissr1b, spotted gar and coelacanth Kissr-3. Clade-4 encompassed two early osteichthyan (spotted gar and coelacanth) Kissr-4 and two tetrapod Kissr (lizard and platypus) (Pasquier et al., in press).

Synteny analysis of Kissr neighboring genes, performed on eleven representative vertebrate species including the European eel, coelacanth and spotted gar, fully supported the phylogenetic repartition of Kissr in four clades. Based on this classification, we proposed a new nomenclature of the Kissr family (Kissr-1, Kissr-2, Kissr-3 and Kissr-4).

2.2. Evolutionary history of *Kissr*

2.2.1. Origin of *Kissr* diversity *via* 1R & 2R

Synteny analysis revealed that the four *Kissr* neighboring genomic regions were highly conserved, each presenting paralogs from eight gene families *i.e. PALM, PTBP,*

GRIN3, GADD45, DIRAS, ZCCHC, LPAR, ZNF644/WIZ (Pasquier et al., in press). The hypothesis of the potential existence of four *Kissr* paralogons in vertebrates had been previously raised by Lee et al (2009) and Kim et al (2012), although only a maximum of three *Kissr* genes had been evidenced. Our finding of four *Kissr* genes, located on four paralogous genomic regions, in coelacanth and spotted gar, provides direct evidence validating this former hypothesis. These four *Kissr* paralogons likely resulted from the two successive genomic duplications (1R & 2R) of a single ancestral genomic region (Fig. 1).

Recently, one study proposed the reconstruction of ten proto-chromosomes of the ancestral vertebrate karyotype and their linkage to the corresponding tetra-paralogons in the human genome (Nakatani et al., 2007). Considering our localisation of the four *Kissr* syntenic regions in the human genome, we can hypothesize that the corresponding tetra-paralogons resulted from the duplications of one single region localized on the proto-chromosome-A of the vertebrate ancestor (Pasquier et al., in press).

2.2.2. A subsequent history of *Kissr* losses

a. Multiple loss events in sarcopterygian and actinopterygian lineages

Since the spotted gar and the coelacanth are the only two vertebrate species in which we evidenced four paralogous *Kissr*, we can hypothesize multiple *Kissr* loss events to explain the status of this receptor in current vertebrates (Fig 2A). In the sarcopterygian lineage, *Kissr-4* may have been lost in amphibians, while *Kissr-1* and *Kissr-2* would have been lost in early amniots. Subsequent additional losses may have led to the presence of only *Kissr-1* in eutherian mammals and to the absence of any *Kissr* in birds.

b. No impact of the teleost-specific-3R on Kissr number in current species

Considering the presence of four *Kissr* in a non-teleost actinopterygian, the spotted gar, the teleost-specific 3R could have resulted in the potential existence of up to eight *Kissr* genes. However, we only found three *Kissr* in the European eel, representing the current

maximum number of this gene in teleosts. Furthermore, each eel *Kissr* is orthologous to a different tetrapod *Kissr*, supporting the absence of any teleost-specific *Kissr*. Synteny analysis demonstrated that each of the four *Kissr* paralogous genomic regions, present in the spotted gar, was duplicated in zebrafish, in agreement with the 3R. This analysis also indicated that all 3R-copies of *Kissr* were lacking in the corresponding duplicated regions (Fig 1). This suggests an early loss of duplicated *Kissr* genes, which would have suppressed the impact of the 3R on the number of *Kissr* in teleosts (Fig 2A). Additional successive deletions may have led to the presence of three *Kissr* in a basal teleost (the eel), two *Kissr* in a cypriniforme (zebrafish) and only one Kissr in a more recent teleost (stickleback) (Fig 2A).

3. Diversity and evolutionary history of *Kiss* in vertebrates

3.1. Diversity and classification of *Kiss*

3.1.1 Current data

In contrast to the receptor proteins which present several conserved domains, the *Kiss* genes encode precursors which are highly variable among vertebrates, except for the short sequence of the mature decapeptide [Kp(10)]. This makes difficult to obtain *Kiss* mRNA sequences by classical molecular strategies. Genomic database analyses thus represent the best approach to characterize the *Kiss* set for a given species. However, the small characteristic sequence of *Kiss*, encoding Kp(10), could be missing in genomic databases due to sequencing or assembly limitations.

All previously investigated osteichthyan species, possessed the same number of *Kiss* genes as *Kissr* genes: one Kiss in eutherian mammals, two in prototherians, three in amphibians, none in birds, and one or two in teleosts (Lee et al., 2009). In chondrichthyans, two *Kiss* genes are present in the elephant shark genome (Lee et al, 2009), while our current investigation also suggests the existence of at least two *Kissr* genes. In cyclostomes, two *Kiss*

genes also exist (Lee et al 2009), while only one *Kissr* could be predicted until now (Pasquier et al, 2011).

3.1.2 New advances in *Kiss* gene characterisation

To further assess the *Kiss* diversity in vertebrates, we re-investigated the presence of these genes in the genome of the elephant shark, the coelacanth, the spotted gar and the European eel, representative species from four groups of relevant phylogenetical positions. We performed TBLASTN in the four genomes resulting in the identification of several open reading frames (ORF) containing conserved sequences coding for *Kiss* genes.

a. Two Kiss genes in the European eel genome

The two ORFs containing *Kiss* are 296 bp and 327 bp long, respectively (Supporting Fig 1). Once translated, each of them leads to a peptidic sequence encompassing a decapeptide: YNWNSFGLRY [European eel Kp1(10)] and FNRNPFGLRF [European eel Kp2(10)], respectively (Fig. 3). The C-terminal end of the Kp1(10) sequence is followed by a GK-Stop motif, while the Kp2(10) sequence is followed by a GKR motif. The sequences "X-G-Basic-Basic" or "X-G-Basic" are characteristic of the conserved proteolytic cleavage and α-amidation sites of neuropeptides (Eipper et al., 1992). Assuming that all vertebrate *Kiss* genes are made of two exons (for review (Tena-Sempere et al., 2012), the ORFs coding for these decapeptides could encompass the exon-2 for each eel *Kiss* gene.

b. Two Kiss genes in the spotted gar genome

The two ORFs containing *Kiss* are 348 bp and 300 bp long, respectively (Supporting Fig 2). Once translated, each of them leads to a peptidic sequence presenting a putative decapeptide: YNWNSFGLRY [spotted gar Kp1(10)] and FNFNPFGLRF [spotted gar Kp2(10)], respectively (Fig. 3). The C-terminal ends of these two sequences are followed by a GKR motif. The ORFs coding for these decapeptides could encompass the exon-2 for each spotted gar *Kiss* gene.

c. Three Kiss genes in the coelacanth genome

The three ORFs containing *Kiss* are 363 bp, 396 bp and 81 bp long, respectively (Supporting Fig 3). Once translated, each of them leads to a peptidic sequence encompassing a putative decapeptide: YNWNTFGLRY [coelacanth Kp1(10)], FNFNPFGLRF [coelacanth Kp2(10)] and FNWNSFGLRF [coelacanth Kp3(10)], respectively (Fig. 3). The C-terminal ends of the Kp1(10) and the Kp2(10) sequences are followed by a GKR motif, while the Kp3(10) is followed by a GKK motif. The ORF coding for the Kp1(10) and the Kp2(10) could encompass the exon-2 for coelacanth *Kiss1* and *Kiss2*. Seven amino acids up-stream the sequence of the Kp3(10), a stop codon appears suggesting that coelacanth *Kiss3* gene could have a different intro-exon structure compared to what has been described so far or it can suggest that this gene is no longer expressed.

d. A third Kiss gene in the elephant shark genome

While two *Kiss* (*Kiss1* and *Kiss2*) were previously identified (Lee et al., 2009), we were able to localize a new ORF of 315 bp containing a third *Kiss* (Supporting Fig 4). Once translated, it leads to a peptidic sequence encompassing the decapeptide YNLNSFGLKF [elephant shark Kp3(10)] (Fig 3). The C-terminal end of this peptide is followed by a GKR motif. This ORF could encompass the exon-2 of the elephant shark *Kiss3*.

3.1.3. Kiss sequence alignment and comparisons

The alignment of 56 kisspeptin precursors revealed a high variability of their amino-acid sequences except for the sequences corresponding to Kp(10) and its few surrounding amino-acids which, in contrast, are highly conserved (data not shown). Such a pattern, which is representative of many other neuropeptide precursors, provides poor phylogenetic information within alignment matrix. This lack of information makes the use of phylogenetic analysis inappropriate to establish homology relationships within this kind of peptide precursor family.

3.1.4. Novel Kp(10)

Among the new Kiss genes predicted in the present study, four of them encode novel Kp(10) (Fig. 3). The singularity of the elephant shark Kp3(10) is the presence of a lysine (K) instead of an arginine (R) at the ninth position. The coelacanth Kp1(10) provides the first case of a threonine (T) at the third position. The coelacanth Kp3(10) is the only one to present both a phenylalanine (F) at the first position and a serine (S) at the third position. The European eel Kp2(10) presents at its third position an arginine (R), which possesses different physical and chemical properties from amino acids commonly present at this position. Up to now, only the musk shrew (*Suncus murinus*) Kp1(10) presented an arginine at the third position and it was evidenced that its kisspeptin system was involved in the reproductive function as in other mammals (Inoue et al 2011). Since the impacted positions by the amino-acid substitutions have not been characterised as highly critical for Kp(10) functional properties (Curtis et al., 2010; Gutiérrez-Pascual et al., 2009), those new Kp(10) may have conserved their functionality. Since Kp(10) is considered as the smallest required sequence to specifically bind to the receptor (Kotani et al., 2001), it could be of interest to test all those peptides in future pharmacological studies in order to assess their structure/function relationships.

3.1.5. Syntenic analysis and classification of *Kiss* genes

In order to classify the different *Kiss* paralogs, we performed a syntenic analysis of the *Kiss* neighbouring genes. We considered the following vertebrate representatives: mammals (human), birds (chicken), squamates (lizard), amphibians (xenopus), basal sarcopterygians (coelacanth), non-teleost actinopterygians (spotted gar) and teleosts (zebrafish, stickleback, and European eel).

The human *Kiss1*, xenopus *Kiss1a*, coelacanth *Kiss1*, spotted gar *Kiss1* and zebrafish *Kiss1* are positioned in genomic regions containing common loci, including *TEAD3*, *NAV1*,

PPP1R12B, PPFIA4, MYBPH, KCNC4, REN, GOLT1A, PLEKHA6, PPP1R15B, PIK3C2B and *SYT6*, thus exhibiting well conserved synteny (Fig. 4A). This supports the orthology of these *Kiss* genes, all considered as *Kiss1* genes. Syntenic analysis suggests that the stickleback, lizard and chicken genomes do not contain any *Kiss1* gene, although the above-mentioned neighbouring genes are present in the corresponding genomic regions (Fig. 4A). The peptidic sequence of eel Kiss1 presents many similarities to the other Kiss1, but the eel *Kiss1* gene is located on too small scaffolds to contain any other gene, preventing from any syntenic analysis.

The lizard *Kiss2*, coelacanth *Kiss2*, spotted gar *Kiss2*, zebrafish *Kiss2*, stickleback *Kiss2* and European eel *Kiss2* genes are positioned in genomic regions containing common loci including *STRAP, PLEKHA5, GOLT1B, C12orf39, GYS2, LDHB, KCNJ8, ABCC9, CMAS, SYT10, NAV3, PPFIA2* and *KCNC2*, thus exhibiting well conserved synteny (Fig. 4B). This supports the orthology of these *Kiss* genes, all considered as *Kiss2* genes. Syntenic analysis suggests that human and chicken genomes do not contain any *Kiss2* gene, although the above-mentioned neighbouring genes are present in the corresponding genomic region (Fig. 4B).

The coelacanth *Kiss3* and the xenopus *Kiss1b* genes are positioned in genomic regions containing common loci, including *TEAD2, PIH1D1* and *ALDH16A1*, thus exhibiting well conserved synteny (Fig. 4C). This supports the orthology of these two *Kiss* genes, both considered here as *Kiss3* genes. Syntenic analysis suggests that human, lizard, spotted gar and teleost genomes do not contain any *Kiss3* gene, although the above-mentioned neighbouring genes are present in the corresponding genomic regions (Fig. 4C). Syntenic analysis also suggests that the whole considered region is absent from the chicken genome.

Our syntenic analysis demonstrated that the *Kiss* genes are localized in three different genomic regions.

3.2. Evolutionary history of Kiss

3.2.1. Origin of *Kiss* diversity *via* 1R & 2R

This syntenic analysis also allowed us to investigate the origin of the multiple *Kiss* genes evidenced in vertebrates.

The three conserved genomic regions, presenting *Kiss* genes, also comprise other paralogs from eleven gene families: *TEAD* (4 paralogs), *NAV* (3 paralogs), *PPFIA* (4 paralogs), *KCNC* (4 paralogs), *GOLT1* (2 paralogs), *PLEKHA* (4 paralogs), *PPP1R15* (2 paralogs), *PIK3C2* (3 paralogs), *SYT* (4 paralogs), *GYS* (2 paralogs) and *PTH* (2 paralogs) (Fig. 4A-C). The members of those families are present among the three *Kiss* syntenic regions and they also delineate a fourth conserved region (Fig. 4D), which does not present any *Kiss* gene in the osteichthyan representative species studied so far. Thus, the four conserved regions delineated by the eleven gene families can be considered as paralogous (tetra-paralogon).

Considering the reconstruction of the ancestral vertebrate chromosomes, their linkage to the tetra-paralogons in the human genome (Nakatani et al., 2007) and our localisation of the four *Kiss* syntenic regions in the human genome (on Chromosomes 1, 11, 12 and 19), we can hypothesize that the *Kiss* tetra-paralogons resulted from the duplications of one single genomic region localized on the proto-chromosome-D of the vertebrate ancestor. Therefore, we can infer that the current three *Kiss* genes may have resulted from a single ancestral gene duplicated through 1R & 2R that occurred in early steps of vertebrate evolution (Fig. 5).

3.2.2. A subsequent history of *Kiss* losses

a. Multiple loss events in sarcopterygians and actinopterygians

The 1R & 2R events should have resulted in four different *Kiss* genes in vertebrates. Since the fourth *Kiss* gene (referenced as *Kiss4* in this study) has not been evidenced in any

species studied so far, we can hypothesize an early loss of this gene after the 2R. As only a chondrichthyan, the elephant shark, and two sarcopterygians, the coelacanth and xenopus, still present three *Kiss* genes, whereas all other species possess less than three *Kiss*, we can hypothesize multiple additional events of *Kiss* losses in vertebrates (Fig. 2B).

In tetrapods, *Kiss3* would have been lost in amniotes. Further alternative losses may have occurred in this lineage, with only *Kiss1* remaining in eutherian mammals and only *Kiss2* in squamates (lizard). Finally, additional losses would have led to the complete absence of *Kiss* in birds (Fig 2B).

b. No impact of the teleost-specific-3R on Kiss number in current species

In the actinopterygian lineage, the teleost-specific 3R and the presence of two *Kiss* in a non-teleost actinopterygian, the spotted gar, implied the potential existence of at least four *Kiss* genes in the early teleost history. However, our study showed that so far the largest number of *Kiss* exhibited by current teleosts is two. Furthermore, each teleost *Kiss* is orthologous to a different tetrapod *Kiss*, indicating that no teleost-specific *Kiss* exists. Synteny analysis revealed that each of the four *Kiss* genomic regions present in the spotted gar is duplicated in teleosts in agreement with the 3R event but that duplicated *Kiss* genes are lacking (Fig 4 and 5). This suggests an early loss of duplicated *Kiss* genes suppressing the impact of the 3R on the number of *Kiss* in teleosts (Fig 2B). Additional deletion may have led to the presence of only *Kiss2* in gasterosteiforms (the stickleback) (Fig 2B).

Kiss evolutionary history was punctuated by numerous loss events through vertebrate radiation (Fig. 2B).

4. Comparison of the evolutionary histories of *Kiss* and *Kissr* in vertebrates

The new data concerning *Kiss* and *Kissr* diversities enabled to improve their respective classifications and evolutionary histories. A remaining challenge is to elucidate whether *Kiss*

and *Kissr* families have experienced parallel histories during vertebrate radiation. The comparative study of the current status of both components in vertebrates allows a better understanding of the whole system.

4.1. Features in agreement with parallel histories

4.1.1. Origin of the *Kiss* and *Kissr* multiplicity *via* 1R and 2R

Our syntenic studies suggest that the vertebrate *Kiss* and *Kissr* families both resulted from the successive duplications of a single ancestral gene through the 1R & 2R (Fig 2). Thus, *Kiss* and *Kissr* experienced, in parallel, the two first genome duplication rounds resulting in four copies of each gene in the early steps of the vertebrate evolutionary history (Fig. 2). While *Kissr* gene homologs were characterized in non-vertebrate species, tracing back the presence of an ancestral *Kissr* in early deuterostomes, *Kiss* genes have not yet been evidenced in non-vertebrate species.

4.1.2. Subsequent history of gene losses

Both *Kiss* and *Kissr* families were composed of four genes in the early steps of the vertebrate history. However, most of the current vertebrate species investigated so far present less than four copies of *Kiss* and *Kissr* genes. The current numbers of both *Kiss* and *Kissr* genes suggest that both families underwent numerous independent loss events across vertebrate history (Fig. 2).

4.1.3. No impact of the teleost-specific 3R

Thee teleost lineage, which has experienced a third whole genome duplication round (3R), could have been expected to possess up to eight *Kiss* and *Kissr* genes. However, the analyses of the *Kiss* and *Kissr* within teleost genomes revealed a maximum of three *Kissr* and two *Kiss* genes and did not reveal any 3R-specific copies of *Kiss* or *Kissr* genes. This suggests that the teleost-specific 3R did not impact the current number of *Kiss* or *Kissr* genes,

reflecting massive losses of the 3R-copies of both *Kiss* and *Kissr* genes in early teleosts (Fig. 2).

4.2. Features in opposition to parallel histories: independent loss events

4.2.1. Un-matching number of *Kiss* and *Kissr* in some species

In the current gnathostomes, we observed a maximum of four *Kissr* but only three *Kiss* paralogs. This difference suggests that this lineage inherited the four *Kissr* copies resulting from the 1R & 2R, whereas the fourth *Kiss* may have been lost before or at an early stage of the gnathostome emergence (Fig. 2). This situation was observed in an early sarcopterygian, the coelacanth, while an even larger difference in *Kissr* (four) and *Kiss* (two) numbers was found in the spotted gar, reflecting an additional independent loss of *Kiss* in the actinopterygian lineage. An un-matching number of *Kissr* (three) and *Kiss* (two) was also observed in an early teleost, the European eel, while additional losses may have led to equal numbers of *Kissr* and *Kiss* in more recent teleosts (two or one according to the species). These variations in *Kissr/Kiss* numbers reflect different timing of *Kiss* and *Kissr* loss events. Those hypotheses suggest that *Kiss* losses occurred independently among the different gnathostome lineages and also independently from the *Kissr* losses.

4.2.2. Various Kiss/Kissr combinations across vertebrates

The hypothesis of independent *Kiss* and *Kissr* evolutionary histories is also strengthened by the comparison of the gene sets present in species with even matching numbers of *Kiss* and *Kissr*. For example, lizard and stickleback both present the *Kiss2* gene, whereas they possess different *Kissr, i.e. Kissr-4* in the lizard and *Kissr-2* in the stickleback (Fig. 2). The same observation can be done comparing the kisspeptin systems of platypus and zebrafish, which both present the *Kiss1* and *Kiss2* genes, whereas their sets of receptors are completely different, *i.e. Kissr-1* and *Kissr-4* in platypus *versus Kissr-2* and *Kissr-3* in

zebrafish (Fig 2). These observations strongly suggest a large variety of *Kiss* and *Kissr* combinations, resulting from independent loss events. These data shade new lights on the evolution of the kisspeptin system in vertebrates and challenge the former hypothesis of a conservation of *Kiss/Kissr* couples across vertebrate evolution. This diversity among vertebrates opens new research avenues for comparative physiology and endocrinology of kisspeptin system.

4.2.3 What could have favored the independent evolutions of *Kiss* and *Kissr*?

In vitro studies, including tests on recombinant receptors, evidenced large cross-activities between kisspeptin receptors and various homologous or heterologous kisspeptides (Biran et al., 2008; Lee et al., 2009; Li et al., 2009). Such a property could have promoted the independence of the *Kiss* and *Kissr* evolutionary histories. This could explain the situation of species presenting un-matching numbers of *Kiss* and *Kissr* genes, as well as the high variability of *Kiss/Kissr* gene combinations across vertebrate species. In the case of the presence of multiple *Kiss/Kissr* genes in a given species, anatomical relationships between projections of Kiss neuron and target cells expressing Kissr may provide cues for determining Kiss/Kissr functional couples. Thus, *in situ* hybridization and immunocytochemical studies allowed revealing specific Kiss/Kissr couples in zebrafish which presents two *Kiss* and two *Kissr* genes (Servili et al, 2011). All these data underline the importance of investigating the gene diversity, the anatomical organization and the functional properties of the kisspeptin system in various species, regarding the potential high variability of this system among vertebrates.

5. Conclusion

Kisspeptin system is known to play a role in many physiological processes such as antimetastasis, energy metabolism homeostasis, pregnancy and puberty onset. Even though

this system has been widely studied in the last few years, its diversity and evolutionary history remained unclear. Thanks to the newly published genomes of osteichthyans of key phylogenetical positions, we were able to provide new data on the diversity of *Kiss* and *Kissr* genes, to clarify the classification of these genes and to bring new insights on the evolutionary history of these gene families. Four *Kissr* and four *Kiss* genes may have arisen via the 1R & 2R in early vertebrates. This would have been followed by multiple independent *Kiss* and *Kissr* gene loss events in the sarcopterygian and actinopterygian lineages. In particular, due to massive *Kiss* and *Kissr* gene losses, no impact of the teleost-specific 3R can be recorded on the number of *Kissr* or *Kiss* paralogs in current teleost species. The comparison of both *Kiss* and *Kissr* gene status in the current vertebrates supports the independence of the *Kiss* and *Kissr* evolutionary histories across vertebrate radiation. It also underlines a large diversity of *Kiss*/*Kissr* possible combinations that needs to be taken into account in future comparative studies.

Acknowledgements

We thank Dr. B. Quérat (CNRS, Paris, France) for his helpful advices and discussions concerning phylogeny and synteny. We also thank all the different consortiums at the initiative of sequencing, assembly, annotation and publication of genomes, in particular the consortiums of the European eel genome, the spotted gar genome, the coelacanth genome, the elephant shark genome and the sea lamprey genome. Our thanks also include the authors of the Ensembl genome browser web site and all web sites providing free access to their genomic databases. We thank the authors of the Genomicus web site providing a very useful and friendly tool for synteny analysis. J.P. is a recipient of a PhD fellowship from the Ministry of Research and Education. This work was supported by grants from the National Research Agency, PUBERTEEL N° ANR-08-BLAN-0173 to K.R. and S.D, and from the

European Community, 7th Framework Programme, PRO-EEL N° No. 245257 to A-G.L. and S.D..

References

Amores, A., Catchen, J., Ferrara, A., Fontenot, Q., Postlethwait, J.H., 2011. Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. Genetics 188, 799-808.

Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., Westerfield, M., Ekker, M., Postlethwait, J.H., 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. Science 282, 1711-1714.

Biran, J., Ben-Dor, S., Levavi-Sivan, B., 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. Biol. Reprod. 79, 776-786.

Curtis, A.E., Cooke, J.H., Baxter, J.E., Parkinson, J.R., Bataveljic, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Murphy, K.G., 2010. A kisspeptin-10 analog with greater in vivo bioactivity than kisspeptin-10. Am J Physiol Endocrinol Metab 298, E296-303.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., 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.

Dehal, P., Boore, J.L., 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. PLoS Biol 3, e314.

Eipper, B.A., Stoffers, D.A., Mains, R.E., 1992. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. Annu Rev Neurosci 15, 57-85.

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gómez, A., 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. Mol Cell Endocrinol 312, 61-71.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., 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.

Gutiérrez-Pascual, E., Leprince, J., Martínez-Fuentes, A.J., Ségalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., Pinilla, L., Tonon, M.C., Malagón, M.M., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., Castaño, J.P., 2009. In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. Mol Pharmacol 76, 58-67.

Henkel, C.V., Burgerhout, E., de Wijze, D.L., Dirks, R.P., Minegishi, Y., Jansen, H.J., Spaink, H.P., Dufour, S., Weltzien, F.A., Tsukamoto, K., van den Thillart, G.E., 2012. Primitive duplicate Hox clusters in the European eel's genome. PLoS One 7, e32231.

Kim, D.K., Cho, E.B., Moon, M.J., Park, S., Hwang, J.I., Do Rego, J.L., Vaudry, H., Seong, J.Y., 2012. Molecular Coevolution of Neuropeptides Gonadotropin-Releasing Hormone and Kisspeptin with their Cognate G Protein-Coupled Receptors. Front Neurosci 6, 3.

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. Endocrinology 150, 821-831.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J. Biol. Chem. 276, 34631-34636.

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. J Natl Cancer Inst 88, 1731-1737.

Lee, Y.R., Tsunekawa, K., Moon, M.J., Um, H.N., Hwang, J.I., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H.B., Seong, J.Y., Tsutsui, K., 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. Endocrinology 150, 2837-2846.

Li, S., Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Huang, W., Lu, D., Zhu, P., Shi, Y., Cheng, C.H., Liu, X., Lin, H., 2009. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (Carassius auratus). J. Endocrinol. 201, 407-418.

Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., Harrison, D.C., 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. J. Biol. Chem. 276, 28969-28975.

Nakatani, Y., Takeda, H., Kohara, Y., Morishita, S., 2007. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. Genome Res 17, 1254-1265.

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Jeng, S.-R., Morini, M., Dirks, R., van den Thillart, G., Tomkiewicz, J., Tostivint, H., Chang, C.-F., Rousseau, K., Dufour, S. Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. PLoS One, in press.
Pasquier, J., Lafont, A.G., Leprince, J., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, Anguilla anguilla. Gen Comp Endocrinol 173, 216-225.
Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. Physiol Rev 92, 1235-1316.
Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 349, 1614-1627.
Tena-Sempere, M., Felip, A., Gomez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. Gen Comp Endocrinol 175, 234-243.
Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, Y.H., Halpern, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C., Strausberg, R.L., Brenner, S., 2007. Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (Callorhinchus milii) genome. PLoS Biol 5, e101.
Zmora, N., Stubblefield, J., Zulperi, Z., Biran, J., Levavi-Sivan, B., Munoz-Cueto, J.A., Zohar, Y., 2012. Differential and Gonad Stage-Dependent Roles of Kisspeptin1 and Kisspeptin2 in Reproduction in the Modern Teleosts, Morone Species. Biol Reprod.

Legends to figures

Figure 1: Proposed origin of osteichthyan *Kissr* tetra-paralogons. The paralogous genes of each of the eight identified families delineate four paralogons in the spotted gar, coelacanth and human genomes and a duplicated tetra-paralogon in the zebrafish genome. This suggests a common origin of the four *Kissr* before the two whole genome duplication rounds (1R & 2R) occurred in the early vertebrate history. This also suggests no impact of the 3R on *Kissr* number in current teleosts. Chr: chromosome; LG: linkage group.

Figure 2: Current status and proposed evolutionary history of *Kissr* genes (A) *Vs* current status and proposed evolutionary history of *Kiss* genes (B). (1) vertebrates, (2) gnathostomes, (3) osteichthyans, (4) actinopterygians, (5) sarcopterygians, (6) teleosts, (7) tetrapods, (8) amniots, (9) eutelosts, (10) diapsides, (11) mammals. The names of the current representative species of each phylum are given at the end of the final branches, together with the symbol of the *Kiss* and *Kissr* genes they possess. These hypotheses assume the presence of four *Kiss* and four *Kissr* paralogs in the vertebrate lineage resulting from the two rounds of vertebrate whole genome duplication. Multiple subsequent gene loss events are indicated in the various lineages.

Figure 3: Sequence alignment of vertebrate Kp(10). At each position, identical amino acids are shaded in dark grey and similar amino acids in light grey. Newly identified sequences are underlined and unique sequences are marked by an asterisk.

Figure 4: Conserved genomic synteny of osteichthyan *Kiss*. Genomic synteny maps comparing the orthologs of *Kiss1* (A), *Kiss2* (B), *Kiss3* (C), *Kiss4* (D) loci and their

neighbouring genes. Analyses were performed on the genomes of human (*Homo sapiens*), platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), lizard (*Anolis carolinensis*), chicken (*Gallus gallus*), xenopus *(Silurana tropicalis*), coelacanth (*Latimeria chalumnae*), spotted gar (*Lepisosteus oculatus*), zebrafish (*Danio rerio*), stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and European eel (*Anguilla anguilla*). This map was established using the PhyloView of Genomicus v67.01 web site, manual annotation of the European eel genome using CLC DNA Workbench 6 software and the gene annotation of the coelacanth and spotted gar genomic databases. *Kiss* genes are named according to our proposed nomenclature (*Kiss1* to *Kiss4*). The other genes are named after their human orthologs according to the Human Genome Naming Consortium (HGNC). Orthologs of each gene are shown in the same color. The direction of arrows indicates the gene orientation, with the position of the gene (in 10^{-6} base pairs) indicated below. The full gene names and detailed genomic locations are given in Supporting Table 1. Chr: chromosome; LG: linkage group; Gr: group; Sc: scaffold; Cg: contig.

Figure 5: Proposed origin of osteichthyan *Kiss* tetra-paralogons. The paralogous genes of each of the eleven identified families delineate four paralogons in spotted gar, coelacanth and human genomes and a duplicated tetra-paralogon in the zebrafish genome. This suggests a common origin of the three *Kiss* before the two whole genome duplication rounds (1R & 2R) occurred in the early vertebrate history. This also suggests no impact of the 3R on *Kiss* number in current teleost species. Chr: chromosome; LG: linkage group.

Figure 1

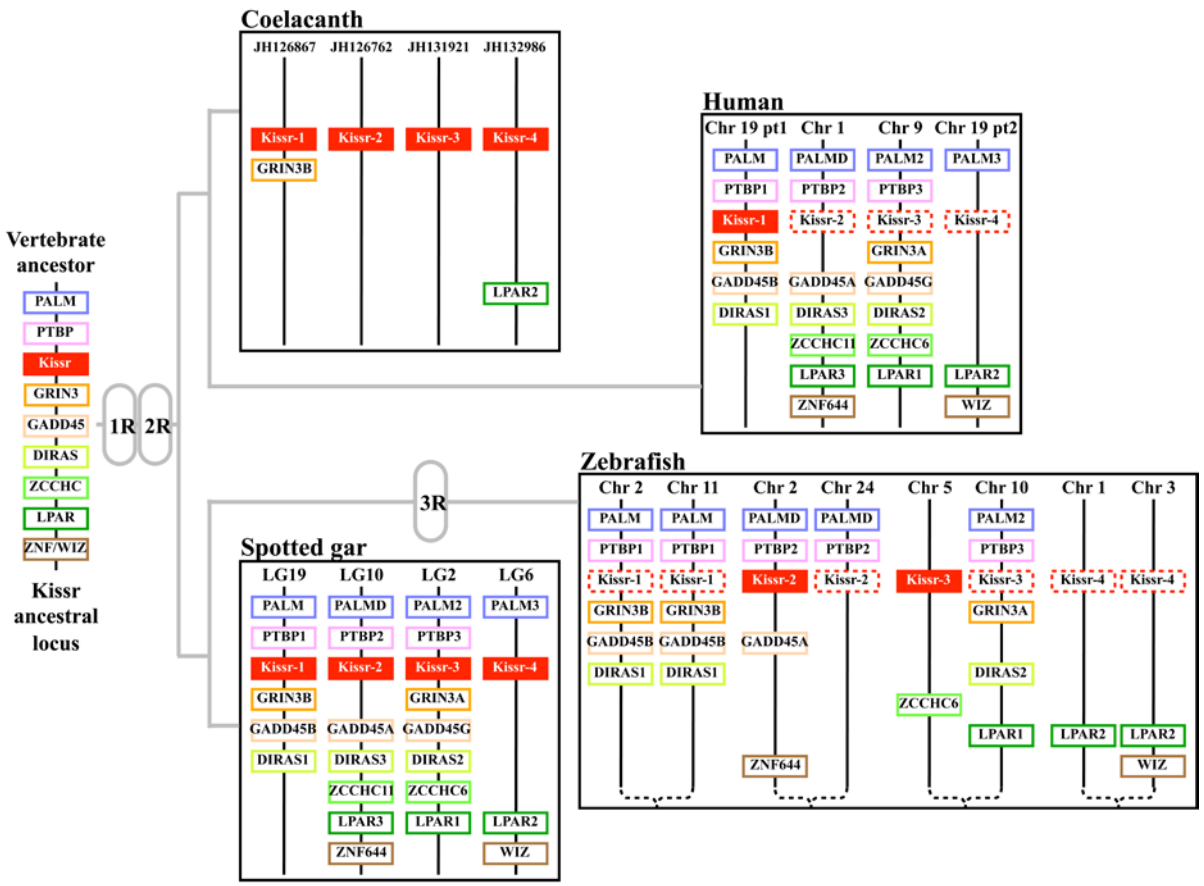

Coelacanth
JH126867
JH126762
JH131921
JH132986
Kissr-1
Kissr-2
Kissr-3
Kissr-4
GRIN3B
LPAR2
Human
Chr 19 pt1
Chr 1
Chr 9
Chr 19 pt2
PALM
PALMD
PALM2
PALM3
PTBP1
PTBP2
PTBP3
Kissr-1
Kissr-2
Kissr-3
Kissr-4
GRIN3B
GRIN3A
GADD45B
GADD45A
GADD45G
DIRAS1
DIRAS3
DIRAS2
ZCCHC11
ZCCHC6
LPAR3
LPAR1
LPAR2
ZNF644
WIZ
Vertebrate ancestor
PALM
PTBP
Kissr
GRIN3
GADD45
DIRAS
ZCCHC
LPAR
ZNF/WIZ
Kissr ancestral locus
1R
2R
3R
Spotted gar
LG19
LG10
LG2
LG6
Zebrafish
Chr 2
Chr 11
Chr 2
Chr 24
Chr 5
Chr 10
Chr 1
Chr 3

Figure 2

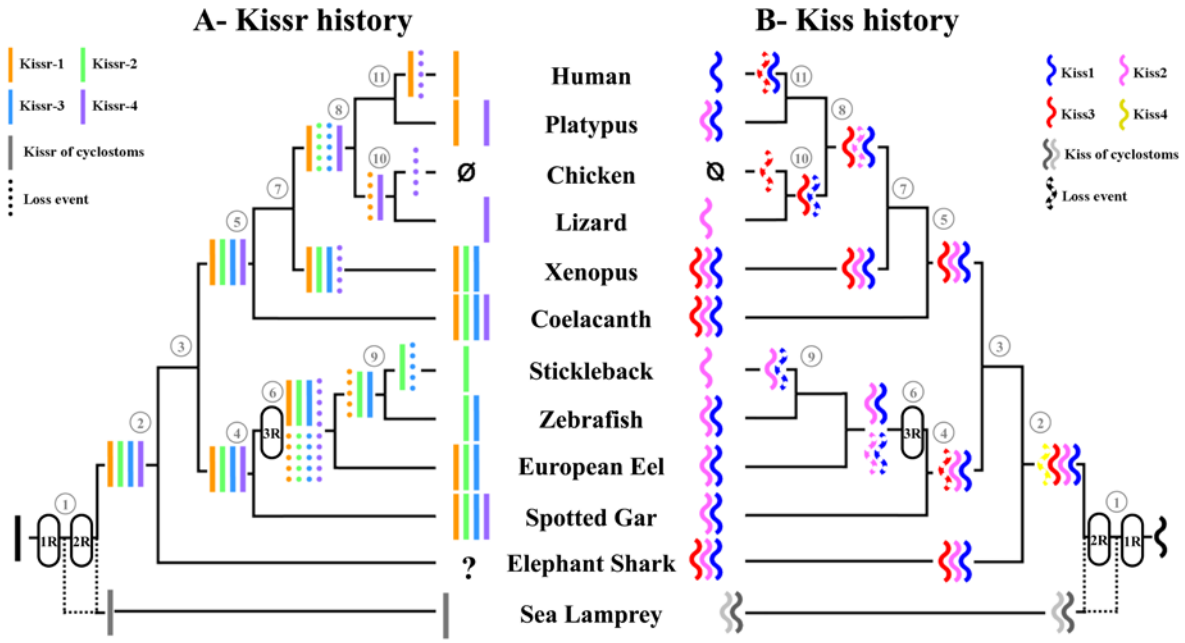

A- Kissr history
B- Kiss history
Kissr-1
Kissr-2
Kissr-3
Kissr-4
Kissr of cyclostoms
Loss event
Kiss1
Kiss2
Kiss3
Kiss4
Kiss of cyclostoms
Loss event
Human
Platypus
Chicken
Lizard
Xenopus
Coelacanth
Stickleback
Zebrafish
European Eel
Spotted Gar
Elephant Shark
Sea Lamprey
1R
2R
3R
?

Figure 3

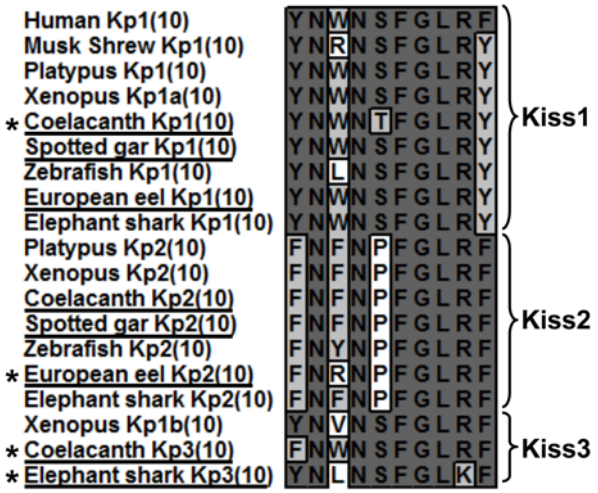

Human Kp1(10) Y N W N S F G L R F
Musk Shrew Kp1(10) Y N R N S F G L R Y
Platypus Kp1(10) Y N W N S F G L R Y
Xenopus Kp1a(10) Y N W N S F G L R Y
* Coelacanth Kp1(10) Y N W N T F G L R Y
Spotted gar Kp1(10) Y N W N S F G L R Y
Zebrafish Kp1(10) Y N L N S F G L R Y
European eel Kp1(10) Y N W N S F G L R Y
Elephant shark Kp1(10) Y N W N S F G L R Y
Kiss1
Platypus Kp2(10) F N F N P F G L R F
Xenopus Kp2(10) F N F N P F G L R F
Coelacanth Kp2(10) F N F N P F G L R F
Spotted gar Kp2(10) F N F N P F G L R F
Zebrafish Kp2(10) F N Y N P F G L R F
* European eel Kp2(10) F N R N P F G L R F
Elephant shark Kp2(10) F N F N P F G L R F
Kiss2
Xenopus Kp1b(10) Y N V N S F G L R F
* Coelacanth Kp3(10) F N W N S F G L R F
* Elephant shark Kp3(10) Y N L N S F G L K F
Kiss3

Figure 4

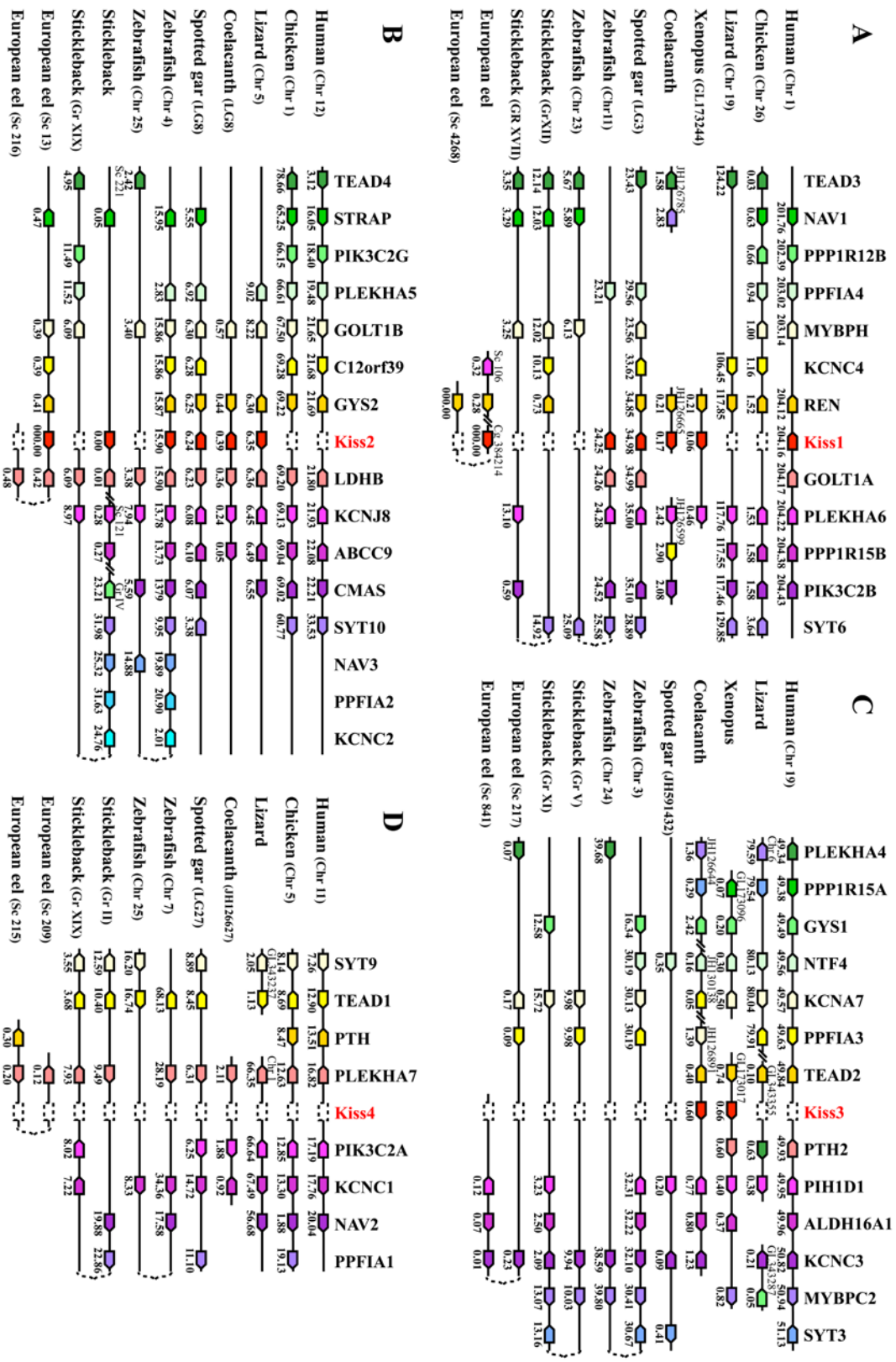
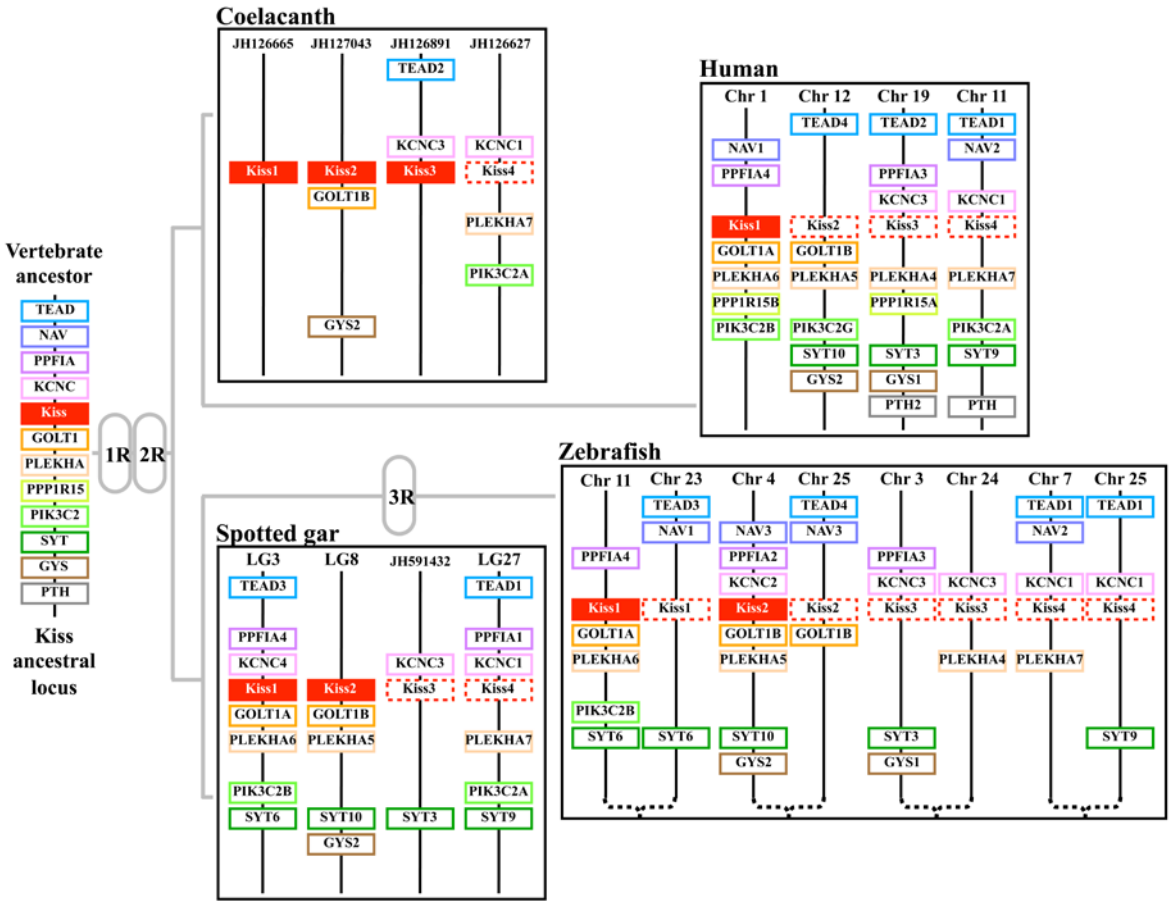

A
Human (Chr 1)
Chicken (Chr 26)
Lizard (Chr 19)
Xenopus (GL173244)
Coelacanth
Spotted gar (LG3)
Zebrafish (Chr11)
Zebrafish (Chr 23)
Stickleback (GrXII)
Stickleback (GR XVII)
European eel
European eel (Sc 4268)
TEAD3
NAV1
PPP1R12B
PPFIA4
MYBPH
KCNC4
REN
Kiss1
GOLT1A
PLEKHA6
PPP1R15B
PIK3C2B
SYT6
B
Human (Chr 12)
Chicken (Chr 1)
Lizard (Chr 5)
Coelacanth (LG8)
Spotted gar (LG8)
Zebrafish (Chr 4)
Zebrafish (Chr 25)
Stickleback
Stickleback (Gr XIX)
European eel (Sc 13)
European eel (Sc 216)
TEAD4
STRAP
PIK3C2G
PLEKHA5
GOLT1B
C12orf39
GYS2
Kiss2
LDHB
KCNJ8
ABCC9
CMAS
SYT10
NAV3
PPFIA2
KCNC2
C
Human (Chr 19)
Lizard
Xenopus
Coelacanth
Spotted gar (JH591432)
Zebrafish (Chr 3)
Zebrafish (Chr 24)
Stickleback (Gr V)
Stickleback (Gr XI)
European eel (Sc 217)
European eel (Sc 841)
PLEKHA4
PPP1R15A
GYS1
NTF4
KCNA7
PPFIA3
TEAD2
Kiss3
PTH2
PIH1D1
ALDH16A1
KCNC3
MYBPC2
SYT3
D
Human (Chr 11)
Chicken (Chr 5)
Lizard
Coelacanth (JH126627)
Spotted gar (LG27)
Zebrafish (Chr 7)
Zebrafish (Chr 25)
Stickleback (Gr II)
Stickleback (Gr XIX)
European eel (Sc 209)
European eel (Sc 215)
SYT9
TEAD1
PTH
PLEKHA7
Kiss4
PIK3C2A
KCNC1
NAV2
PPFIA1

Figure 5


Coelacanth
JH126665
JH127043
JH126891
JH126627
TEAD2
KCNC3
KCNC1
Kiss1
Kiss2
Kiss3
Kiss4
GOLT1B
PLEKHA7
PIK3C2A
GYS2
Human
Chr 1
Chr 12
Chr 19
Chr 11
TEAD4
TEAD2
TEAD1
NAV1
NAV2
PPFIA4
PPFIA3
KCNC3
KCNC1
Kiss1
Kiss2
Kiss3
Kiss4
GOLT1A
GOLT1B
PLEKHA6
PLEKHA5
PLEKHA4
PLEKHA7
PPP1R15B
PPP1R15A
PIK3C2B
PIK3C2G
PIK3C2A
SYT10
SYT3
SYT9
GYS2
GYS1
PTH2
PTH
Vertebrate ancestor
TEAD
NAV
PPFIA
KCNC
Kiss
GOLT1
PLEKHA
PPP1R15
PIK3C2
SYT
GYS
PTH
Kiss ancestral locus
1R
2R
3R
Spotted gar
LG3
LG8
JH591432
LG27
TEAD3
TEAD1
PPFIA4
PPFIA1
KCNC4
KCNC3
KCNC1
Kiss1
Kiss2
Kiss3
Kiss4
GOLT1A
GOLT1B
PLEKHA6
PLEKHA5
PLEKHA7
PIK3C2B
PIK3C2A
SYT6
SYT10
SYT3
SYT9
GYS2
Zebrafish
Chr 11
Chr 23
Chr 4
Chr 25
Chr 3
Chr 24
Chr 7
Chr 25
TEAD3
TEAD4
TEAD1
TEAD1
NAV1
NAV3
NAV3
NAV2
PPFIA4
PPFIA2
PPFIA3
KCNC2
KCNC3
KCNC3
KCNC1
KCNC1
Kiss1
Kiss1
Kiss2
Kiss2
Kiss3
Kiss3
Kiss4
Kiss4
GOLT1A
GOLT1B
GOLT1B
PLEKHA6
PLEKHA5
PLEKHA4
PLEKHA7
PIK3C2B
SYT6
SYT6
SYT10
SYT3
SYT9
GYS2
GYS1

Chapitre 7

Discussion générale et perspectives

Au commencement de cette thèse, il nous est apparu fondamental, au vue de la diversité croissante des composants du système et de la complexité de classification qui en découlait, de réévaluer la diversité des Kiss et des Kissr au sein des vertébrés, ainsi que leurs relations phylogénétiques. Ceci nous a permis de proposer une nouvelle classification et une nouvelle nomenclature pour Kiss et pour Kissr. Les résultats des analyses de synténie ont également fourni des informations cruciales permettant de retracer et de confronter les histoires évolutives des Kiss, d'une part, et des Kissr, d'autre part, depuis les premiers vertébrés jusqu'aux espèces actuelles.

1. Histoires évolutives des Kiss et des Kissr

L'un des objectifs de cette thèse était de mieux comprendre la diversité du système kisspeptine ainsi que l'origine de cette diversité chez les vertébrés. En effet, ces dernières années ont vu apparaître un nombre croissant d'acteurs au sein du système kisspeptine, passant d'un Kiss et d'un Kissr chez les mammifères placentaires, à deux Kiss et deux Kissr chez certains téléostéens, et jusqu'à trois Kiss et trois Kissr chez le xénope (Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012). Cependant, ces découvertes ont été accompagnées par une confusion dans la dénomination de ces nouveaux acteurs entre les espèces et parfois même au sein de la même espèce. Bien que certains auteurs aient tenté d'homogénéiser les nomenclatures de Kiss et Kissr, le manque de données phylogénétiques reliant les différents Kiss et les différents Kissr entre eux avait fait échouer les tentatives d'adoption d'une nomenclature claire pour chacun des deux groupes de gènes (Akazome et al., 2010; Gottsch et al., 2009; Kim et al., 2012; Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012).

1.1. Réévaluation de la diversité spécifique des *Kiss* et des *Kissr* chez les vertébrés

L'un des principaux obstacles à la classification de ces deux familles de gènes résidait dans la sous-représentation de certains types de *Kiss*, d'une part, ou de *Kissr*, d'autre part. Ceci a entrainé, par exemple, l'assimilation du Kiss1b de xénope, seul représentant de son groupe, dans le groupe des Kiss1, minimisant ainsi le nombre effectif de paralogues de *Kiss* chez les vertébrés (Lee et al., 2009). C'est pourquoi, avant de revisiter les classifications respectives des *Kiss* et des *Kissr*, nous avons recensé un maximum de séquences de ces deux familles de gènes à partir des bases de données moléculaires, incluant les génomes de nombreuses espèces (voir Chapitre1 section 4.2.). Au cours de cette thèse, nous avons eu la chance de pouvoir bénéficier du séquençage du génome d'un téléostéen basal, l'anguille européenne (Henkel et al., 2012), ainsi que des publications de nouveaux génomes provenant

d'espèces clés de la classification des vertébrés, telles qu'un sarcoptérygien basal, le cœlacanthe, un actinoptérygien non-téléostéen, le lépisostée tacheté, et un chondrichtyen, la chimère.

L'exploration de ces génomes d'intérêt phylogénétique nous a permis de mettre en évidence pour la première fois trois *Kissr* chez un téléostéen, l'anguille européenne, et pour la première fois quatre *Kissr* chez deux vertébrés dont un actinoptérygien, le lépisostée tacheté et un sarcoptérygien, le cœlacanthe (Pasquier et al., 2012). Ces observations ont donc permis de porter à quatre le nombre maximum de *Kissr* présents dans une même espèce de vertébrés et à trois le maximum de *Kissr* chez les téléostéens. Concernant les chondrichtyens, jusqu'à présent, aucun récepteur aux kisspeptines n'a été clairement décrit. Cependant, nos observations indiqueraient l'existence d'au moins deux récepteurs dans les bases de données génomiques de la chimère. En revanche, comme précédemment évoqué, aucune séquence de *Kissr* n'est ressortie de l'analyse des génomes d'oiseaux, renforçant l'idée d'une perte du système kisspeptine dans cette lignée.

Concernant les *Kiss*, nous avons mis en évidence deux gènes chez l'anguille et le lépidostée tacheté, deux représentants des actinoptérygiens. Nous avons également montré l'existence de trois *Kiss* chez le cœlacanthe (Pasquier et al., en révision). La relecture du génome de la chimère nous a également révélé la présence d'un troisième *Kiss*, alors que les deux premiers gènes avaient déjà été identifiés par Lee et collaborateurs en 2009. Ainsi, contrairement aux *Kissr*, l'exploration des génomes de vertébrés n'a pas révélé une plus grande diversité spécifique des *Kiss*. En revanche, elle nous a permis de révéler trois *Kiss* chez deux nouvelles espèces, la chimère et le cœlacanthe (Pasquier et al., en révision), en plus du xénope déjà référencé (Lee et al., 2009).

Nos résultats ont donc permis d'accroitre les connaissances concernant la diversité spécifique du système kisspeptine. Afin de classer ces nouveaux gènes et ainsi appréhender la diversité globale des *Kiss* et des *Kissr* au sein des vertébrés, nous avons entrepris les analyses phylogénétiques et synténiques des *Kiss* et des *Kissr* de ce phylum.

1.2. Réévaluation de la diversité globale des Kiss et des Kissr au sein des vertébrés

Notre analyse phylogénétique des récepteurs a regroupé les séquences protéiques des Kissr de vertébrés en quatre clades distincts, comprenant chacun au moins une séquence provenant d'un sarcoptérygien (cœlacanthe) et une séquence provenant d'un actinoptérygien (lépisostée). L'analyse synténique, réalisée sur les régions génomiques conservées au voisinage des différents *Kissr* de plusieurs espèces représentatives des différentes lignées de

vertébrés, a également montré que, chez les espèces considérées, les différents *Kissr* se répartissent sur quatre régions génomiques distinctes. Les résultats des analyses phylogénétiques et synténiques concordent puisque les *Kissr* formant chacun des quatre clades se retrouvent dans les mêmes régions génomiques. Cela prouve donc que la famille des *Kissr* est formée de quatre paralogues chez les vertébrés. Nous avons choisi de rebaptiser ces paralogues *Kissr-1*, *Kissr-2*, *Kissr-3* et *Kissr-4* (Pasquier et al., 2012).

En raison d'une faible information phylogénétique contenue dans les séquences protéiques des prépro-kisspeptines, l'analyse phylogénétique de cette famille s'est révélée non informative pour l'établissement d'une classification phylogénétique des *Kiss*. En revanche, l'analyse synténique, réalisée sur les régions génomiques conservées au voisinage des différents *Kiss* de plusieurs espèces représentatives des différentes lignées de vertébrés, a dégagé trois régions génomiques distinctes sur lesquelles se répartissent les *Kiss*. Cela démontre que, chez les vertébrés, la famille des *Kiss* est composée d'au moins trois paralogues que nous avons dénommés *Kiss1*, *Kiss2* et *Kiss3* (ancien Kiss1b du xenope) (Pasquier et al., en révision).

Grâce à la réévaluation de la diversité des *Kiss* et des *Kissr*, nous avons acquis une vision plus complète de ce système au sein des vertébrés. La démonstration de l'existence de trois *Kiss* paralogues et quatre *Kissr* paralogues nous a conduit à une nouvelle classification et à une nouvelle nomenclature pour chacune des deux familles de gènes, basées sur ces données phylogénétiques et synténiques.

Certains auteurs avaient déjà émis l'hypothèse de l'existence de quatre paralogues dans la famille des *Kissr* et de trois paralogues dans la famille des *Kiss* (Akazome et al., 2010; Kim et al., 2012; Lee et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012; Um et al., 2010). Cependant, le peu de données ne leur avait pas permis de confirmer l'existence de ces paralogues, ni de déterminer s'ils résultaient d'événements génomiques globaux ou locaux, communs ou non à l'ensemble des vertébrés.

1.3. Tétra-paralogons et origine unique pour chacune des deux familles de gènes

Nos analyses synténiques nous ont permis d'approfondir cette question, et de démontrer le rôle des changements génomiques globaux et communs aux vertébrés, dans l'apparition des paralogues de *Kiss* et de *Kissr*. Parmi les grands moteurs de diversité génétique, il est important de souligner le rôle des deux premières duplications génomiques globales (1R et 2R) survenues durant les premières phases de la radiation des vertébrés (Dehal and Boore, 2005; Van de Peer et al., 2010). Ces deux duplications ont eu pour résultat majeur

de quadrupliquer le génome de l'ancêtre commun des vertébrés (Dehal and Boore, 2005; Dos Santos et al., 2011; Kasahara et al., 2007; Tostivint, 2011; Van de Peer et al., 2010). Bien que des événements de pertes et des réarrangements chromosomiques aient eu lieu au cours de l'évolution, les génomes des espèces actuelles présentent encore de nombreuses familles géniques composées de 1 à 4 membres, ainsi que les vestiges de l'organisation génomique ancestrale, antérieure à la 1R et 2R (Dos Santos et al., 2011; Kasahara et al., 2007; Tostivint, 2011; Van de Peer et al., 2010). L'étude de ces familles de gènes dans leur environnement génique proche permet de délimiter des régions génomiques conservées et paralogues, appelées paralogons. La détermination de quatre régions conservées et paralogues, ou téra-paralogon, conduit le plus souvent à l'hypothèse d'une origine unique de ces paralogons, antérieure à la 1R et 2R (Dos Santos et al., 2011; Tostivint, 2011).

Notre analyse synténique des *Kissr* montre la présence de 8 familles de gènes (*PALM, PTBP, GRIN3, GADD45, DIRAS, ZCCHC, LPAR* et *ZNF644/WIZ*) dont les membres se répartissent sur quatre régions conservées, au voisinage direct de chacun des quatre *Kissr*. Cela révèle que les 4 *Kissr* paralogues sont situés dans un tétra-paralogon que l'on retrouve aussi bien chez les actinoptérygiens que chez les sarcoptérygiens (Pasquier et al., 2012). Les quatre *Kissr* de vertébrés seraient donc issus des duplications successives (1R et 2R) d'un gène ancestral unique. Notre analyse phylogénétique montre une polytomie, à la base des quatre clades de Kissr, ne permettant pas de résoudre directement les liens d'homologie entre les *Kissr* résultants de la 2R. Une étude récente de la phylogénie des *PALM*, une famille de gènes présente à proximité des *Kissr* dans les génomes, vient d'être publiée (Hultqvist et al., 2012). Cette étude peut nous permettre d'affiner, de manière indirecte, les relations d'homologie entre les *Kissr*. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que *Kissr-1* et *Kissr-3* seraient tous deux issus d'un même gène ancestral juste avant la 2R. De la même manière, *Kissr-2* et *Kissr-4* partageraient un ancêtre commun juste avant cet événement de duplication génomique.

L'analyse synténique des *Kiss* montre la présence de 11 familles de gènes (*TEAD, NAV, PPFIA, KCNC, GOLT1, PLEKHA, PPP1R15, PIK3C2, SYT, GYS* et *PTH*) dans les trois régions conservées au voisinage direct de chacun des trois *Kiss* (Pasquier et al., en révision). De plus, les membres de certaines de ces familles se répartissent sur une quatrième région génomique, délimitant ainsi un quatrième paralogon qui ne présente pas de *Kiss* (*Kiss4*) chez les espèces étudiées (Pasquier et al., en révision). Cela montre que, comme pour les *Kissr*, les trois *Kiss* paralogues sont localisés sur des régions génomiques faisant partie d'un tétra-paralogon que l'on retrouve aussi bien chez les actinoptérygiens que chez les sarcoptérygiens

(Pasquier et al, en révision). Les trois *Kiss* de vertébrés seraient donc issus des duplications successives (1R et 2R) d'un gène ancestral unique. A notre connaissance, aucune information ne permet, pour le moment, de résoudre plus finement les relations d'homologie entre les trois *Kiss* résultants de la 2R.

En résumé, en plus de soutenir les bases de la classification des *Kiss* et des *Kissr*, les analyses synténiques de ces deux familles géniques nous ont révélé que la diversité respective au sein de chaque famille serait issue d'un ancêtre unique ayant subi successivement les 1R et 2R.

1.4 Identification des chromosomes ayant hébergé les Kiss et Kissr ancestraux

Récemment, deux études se sont intéressées à la reconstruction des proto-chromosomes de l'ancêtre commun des vertébrés juste avant la 1R (Nakatani et al., 2007), d'une part, et à la reconstruction des proto-chromosomes de l'ancêtre commun des chordés (Putnam et al., 2008), d'autre part.

La première étude a proposé la reconstitution de 10 proto-chromosomes de l'ancêtre commun des vertébrés par comparaison de plusieurs génomes de vertébrés entre eux, dont ceux de l'humain et du poulet. Considérant les localisations des tétra-paralogons des deux familles de gènes dans les génomes de vertébrés modernes, nous avons suggéré que le gène ancestral des *Kiss* aurait été situé sur le proto-chromosome-D, et celui des *Kissr* sur le proto-chromosome-A, de l'ancêtre commun des vertébrés (Pasquier et al., 2012; Pasquier et al., en révision).

La deuxième étude a proposé la reconstitution de 17 proto-chromosomes de l'ancêtre commun des chordés par comparaison entre le génome de l'humain et de celui de l'amphioxus. De même, nous avons suggéré que le gène ancestral des *Kissr* aurait été situé sur le proto-chromosome-1 de l'ancêtre commun des chordés (Pasquier et al., 2012). Concernant *Kiss*, les données ne nous ont pas permis d'identifier sur quel proto-chromosome de l'ancêtre commun des chordés aurait été localisé l'ancêtre des *Kiss*.

1.5. Evénements indépendants de perte des Kiss et des Kissr selon les lignées de vertébrés

La diversité constatée des *Kiss* et des *Kissr* résulterait des 1R et 2R, cela signifierait donc qu'immédiatement après la 2R les vertébrés auraient possédé 4 copies de *Kiss* (de *Kiss1* à *Kiss4*), ainsi que 4 copies de *Kissr* (de *Kissr-1* à *Kissr-4*) (Pasquier et al., 2012; Pasquier et al., en révision) (Figure 13). Or, toutes les espèces de vertébrés, étudiées lors de cette thèse,

présentent un nombre de *Kissr* inférieur ou égal à quatre et un nombre de *Kiss* inférieur ou égal à trois (Pasquier et al., 2012; Pasquier et al., en révision). Cela suppose que les nombres actuels de *Kiss* et de *Kissr* résulteraient, d'une part, des 1R et 2R et, d'autre part, de pertes survenues au cours de l'évolution des vertébrés.

Etant donné que les quatre paralogues de *Kissr* sont présents chez le cœlacanthe et le lépisostée, cela montre qu'ils auraient été conservés tous les quatre, au moins jusque chez les ancêtres communs des sarcoptérygiens et des actinoptérygiens (Pasquier et al., 2012). Puis des pertes, indépendantes dans chacune des deux lignées, auraient conduit jusqu'à l'état actuel des *Kissr*, par exemple 3 chez le xénope, 1 chez les mammifères placentaires et 0 chez les oiseaux.

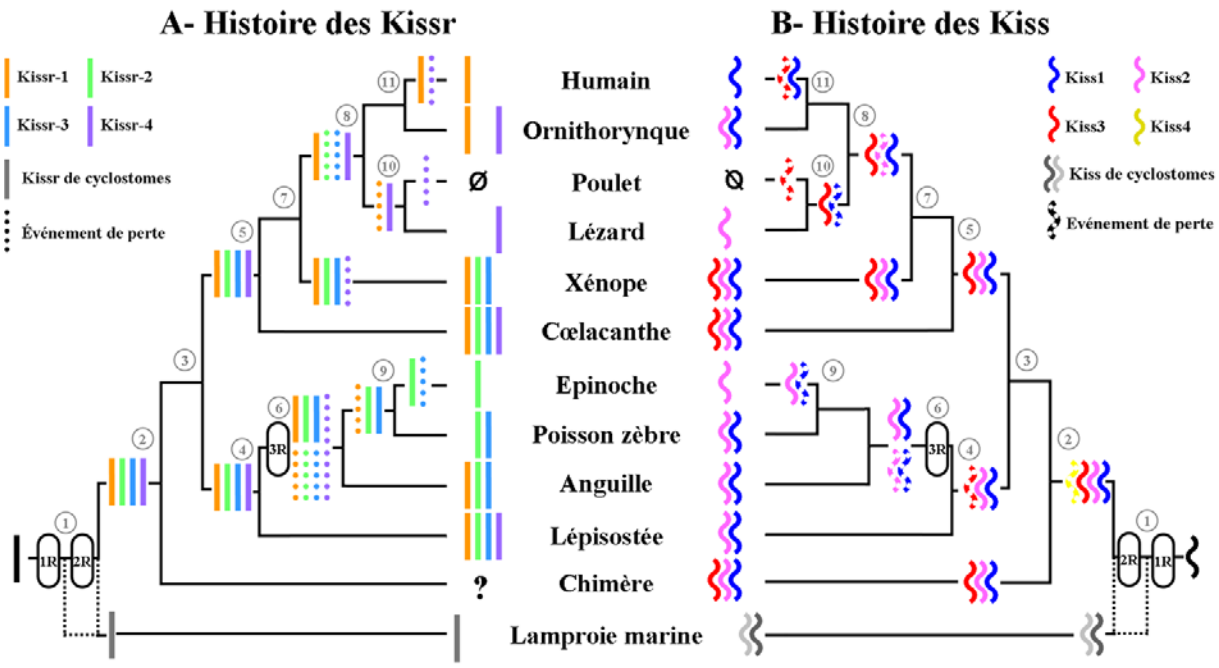


Figure 13 : Situation des Kissr (A) et des Kiss (B) chez les vertébrés actuels et comparaison de leurs histoires évolutives. (1) vertébrés, (2) gnathostomes, (3) ostéichtyens, (4) actinoptérygiens, (5) sarcoptérygiens, (6) téléostéens, (7) tétrapodes, (8) amniotes, (9) eutéléostéens, (10) diapsides, (11) mammifères. Selon (Pasquier et al., en révision)

Concernant *Kiss*, étant donné que seuls trois paralogues ont été clairement identifiés dans les génomes de vertébrés actuels, nous pouvons supposer une perte précoce du quatrième paralogue (*Kiss4*) au cours de l'évolution des vertébrés (Pasquier et al., 2012). Cette perte serait survenue avant la divergence des actinoptérygiens et des sarcoptérygiens (Pasquier et al., en révision). Puis, comme pour les récepteurs, des pertes indépendantes seraient survenues

dans les lignées de sarcoptérygiens et d'actinoptérygiens pour arriver à l'état actuel des *Kiss*, par exemple 3 chez le xénope, 1 chez les mammifères placentaires et 0 chez les oiseaux.

1.6. La 3R et le cas particulier des téléostéens

Au sein des vertébrés, les téléostéens représentent le groupe le plus diversifié d'un point de vue spécifique, écologique et de stratégies reproductives (Gross, 1996; Ravi and Venkatesh, 2008). Il est communément admis que cette diversité résulte d'une plus grande richesse génétique, elle-même due à un troisième événement global de duplication génomique (3R) propre à cette lignée (Kasahara et al., 2007; Meyer and Van de Peer, 2005). De ce fait, les téléostéens possèdent potentiellement deux copies de chaque gène présent chez les actinoptérygiens.

Concernant *Kissr*, le lépisostée, un actinoptérygien non-téléostéen qui n'a pas subi l'impact de la 3R, possède les quatre paralogues. Ceci confirme que les actinoptérygiens ont bien hérité les quatre copies issues de la 2R. Cela indique également qu'après la 3R, les ancêtres des téléostéens modernes auraient pu posséder jusqu'à huit copies du récepteur. Or, au cours de cette thèse, nous avons recensé un maximum de trois *Kissr* chez les téléostéens, avec l'exemple de l'anguille européenne. De plus, les analyses phylogénétiques et synténiques ont révélé qu'il n'existe qu'une copie de chaque paralogue chez les téléostéens. Ceci suggère que de nombreuses pertes de gènes, apparues au cours de l'histoire évolutive des téléostéens, ont annulé l'effet de la 3R pour les gènes de cette famille, chez les espèces considérées (Pasquier et al., 2012) (Figure 13).

De la même manière, le lépisostée possédant deux *Kiss* paralogues, les téléostéens ancestraux auraient pu posséder au moins quatre copies de *Kiss*. Or, les espèces actuelles ne présentent pas plus de deux *Kiss*. Les analyses synténiques ont révélé que seuls *Kiss1* et *Kiss2* sont encore présents et qu'il n'existe qu'une copie de chacun de ces gènes dans les génomes analysés. Comme pour les récepteurs, un certain nombre de pertes au cours de l'évolution ont concouru à annuler l'impact de la 3R sur le nombre actuel de *Kiss* chez les téléostéens (Pasquier et al., en révision) (Figure 13).

1.7. Indépendance des histoires évolutives des Kiss et des Kissr

Chez les vertébrés, les parcours évolutifs des *Kiss* et des *Kissr* semblent relativement convergents. En effet, chacune des deux familles est issue d'un gène ancestral unique présent chez l'ancêtre commun des vertébrés. Ces gènes uniques auraient subi successivement la 1R et la 2R, produisant ainsi quatre copies de *Kiss* et quatre copies de *Kissr*. Puis des pertes de

gènes sont survenues dans les lignées des actinoptérygiens et des sarcoptérygiens. Dans le cas des téléostéens, elles ont même annihilé l'effet de la 3R sur le nombre de *Kiss* et de *Kissr*. Suite à ces événements, de nombreuses espèces présentent le même nombre de *Kiss* que de *Kissr*, comme par exemple : 3 *Kiss*/3 *Kissr* chez un amphibien (le xénope), 2 *Kiss*/2 *Kissr* chez des téléostéens (poisson zèbre, poisson rouge, médaka, loup de mer) et chez un protothérien (l'ornithorynque), et 1 *Kiss*/1 *Kissr* chez les euthériens, certains téléostéens (épinoche, sole, poisson globe, fugu) et un squamate (le lézard) (Figure 13).

Cette concordance des nombres est pour le moins troublante, mais en y regardant de plus près, ces observations n'ont pas valeur de loi. En effet, nous avons montré que plusieurs espèces, étudiées au cours de cette thèse, présentent un nombre de *Kiss* inférieur au nombre de *Kissr*, comme, par exemple, l'anguille européenne avec 2 *Kiss* et 3 *Kissr*, le lépisostée avec 2 *Kiss* et 4 *Kissr*, ou le cœlacanthe avec 3 *Kiss* et 4 *Kissr*. Nos observations indiquent donc une tendance à la diminution du nombre de gènes codant pour les ligands, par rapport au nombre de gènes codant pour les récepteurs chez ces espèces (Pasquier et al., en révision). On ne peut toutefois pas exclure que certains gènes n'aient pas pu être identifiés dans les génomes.

Nous avons pu observer d'autres discordances. En effet, même chez des espèces possédant un nombre identique de *Kiss* et de *Kissr*, nous avons pu mettre en évidence des combinaisons de paralogues de *Kiss/Kissr* différentes. Par exemple, la comparaison entre le lézard et l'épinoche, qui possèdent tous les deux 1 *Kiss* et 1 *Kissr*, montre très clairement que les deux espèces possèdent le *Kiss2*, combiné avec *Kissr-4* dans le cas du lézard, mais combiné avec *Kissr-2* chez l'épinoche (Pasquier et al., en révision) (Figure 13).

Les différences dans le nombre de *Kiss* et de *Kissr* chez certaines espèces, ainsi que l'existence de combinaisons différentes de *Kiss/Kissr* entre les espèces, indiquent que les événements de perte de gènes se sont produits de façon indépendante entre les *Kiss* et les *Kissr*, et selon les lignées de vertébrés. Ceci révèle donc des histoires évolutives relativement indépendantes entre les kisspeptines et leurs récepteurs.

L'une des questions soulevées par ce constat concerne les processus de conservation d'un système kisspeptine multiple comme chez certains téléostéens, par rapport à un système simple comme chez les mammifères placentaires. Quels mécanismes évolutifs, tels que la néo- ou la sub-fonctionnalisation, peuvent mener à la conservation de plusieurs *Kiss* et plusieurs *Kissr* chez un organisme? Etant donné que l'exemple du système kisspeptine simple a été très largement étudié chez les mammifères, nous nous sommes concentrés sur le modèle multiple que nous avons décrit chez l'anguille européenne qui, contrairement aux autres téléostéens, présente trois *Kissr* dont *Kissr-1* orthologue des *Kissr-1* de mammifères.

2. Exemple de conservation et de sub-fonctionnalisation des multiples *Kiss* et *Kissr* dans le contrôle de la reproduction : le cas de l'anguille

Afin de mieux comprendre l'organisation et le rôle du système kisspeptine chez l'anguille, nous avons, tout d'abord, déterminé les profils d'expression tissulaire des *Kiss* et des *Kissr*. Nous avons ensuite étudié la régulation des différents composants du système, au cours d'une maturation sexuelle expérimentale réalisée sur des femelles argentées. Nous nous sommes également intéressés à l'effet direct *in vitro* des kisspeptines sur l'activité hypophysaire de l'anguille.

2.1. Distribution des *Kiss* et *Kissr* majoritairement dans l'axe gonadotrope

L'analyse par qPCR a révélé que les deux *Kiss* d'anguille sont majoritairement exprimés dans le cerveau et plus particulièrement dans le di-/mésencéphale (Pasquier et al., en révision). Par des approches d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et de microdissection laser, la répartition des neurones à *Kiss* a été étudiée chez des téléostéens possédant également deux *Kiss* (Poisson zèbre : Servili et al., 2011 ; poisson rouge : Kanda et al., 2012 ; médaka : Kitahashi et al., 2009; Mitani et al., 2010 ; loup de mer : Escobar et al., 2012 ; bar rayé : Zmora et al., 2012). Chez toutes ces espèces, *Kiss2* est toujours exprimé dans le diencéphale. En ce qui concerne *Kiss1*, il est exprimé dans des noyaux du mésencéphale et chez certaines espèces (médaka et loup de mer), dans le diencéphale. Chez le bar rayé, il a même été observé une co-expression de *Kiss1* et *Kiss2* par des neurones du diencéphale (Zmora et al., 2012). Chez l'anguille, l'expression des deux *Kiss* dans le di-/mésencéphale est en accord avec les localisations obtenues par ces approches plus résolutives. L'application de telles techniques, chez l'anguille, permettrait de circonscrire plus précisément les régions exprimant les *Kiss* et de savoir si les neurones de ces régions co-expriment, ou non, *Kiss1* et *Kiss2*.

Concernant les récepteurs, les trois *Kissr* sont exprimés dans toutes les régions du cerveau, mais avec un taux d'expression relative différentielle (Pasquier et al., 2012). Ceci semblerait indiquer un nombre de cibles varié pour les kisspeptines. En particulier, ils sont exprimés dans le télencéphale et le di-/mésencéphale qui abritent la majorité des neurones à GnRH de cette espèce (Montero et al., 1995). Historiquement, le premier *Kissr* (*Kissr-2*) identifié chez un téléostéen a été localisé dans des neurones à GnRH de plusieurs noyaux cérébraux chez le tilapia (Parhar et al., 2004). Chez le poisson zèbre, qui possède *Kissr-2* et *Kissr-3*, les deux *Kissr* sont également répartis dans plusieurs noyaux cérébraux, mais il semblerait que seul *Kissr-2* interviendrait dans la communication entre les neurones à Kiss et

les neurones à GnRH (Servili et al., 2011). Chez le bar rayé, qui possède également *Kissr-2* et *Kissr-3*, ces deux récepteurs se répartissent dans plusieurs noyaux et il semble qu'ils soient tous les deux exprimés par des neurones à GnRH1 (Zmora et al., 2012). Etant donné la variabilité des *Kissr* impliqués dans l'interaction avec les neurones à GnRH chez les téléostéens étudiés, aucune participation d'un des trois *Kissr* d'anguille dans cette fonction n'est à exclure. De plus, étant donné que l'anguille possède Kissr-1 comme les mammifères, et Kissr-2 et Kissr-3 comme les autres téléostéens, l'étude précise de leur expression, en particulier vis-à-vis des neurones à GnRH, sera d'autant plus intéressante à réaliser.

Au niveau hypophysaire, *Kiss1* et *Kiss2* sont également bien exprimés, ainsi que les récepteurs *Kissr-1* et *Kissr-2*, mais pas *Kissr-3*. La présence des récepteurs dans l'hypophyse semble indiquer une potentielle action directe des kisspeptines sur la fonction hypophysaire. Etant donnée l'expression de *Kiss1* et *Kiss2* dans cet organe, l'action pourrait être autocrine ou paracrine. Une approche d'hybridation *in situ*, couplée à de l'immunohistochimie, pourrait aider à identifier le ou les type(s) cellulaire(s) qui produisent ou qui sont cibles des kisspeptines chez l'anguille. Chez les téléostéens qui possèdent également deux *Kiss*, la présence des deux formes dans l'hypophyse a été relatée chez le poisson rouge (Li et al., 2009; Yang et al., 2010) avec *Kiss1* principalement exprimé dans les cellules à GH (Yang et al., 2010). Chez le poisson zèbre, seul *Kiss2* a été détecté dans l'hypophyse (Servili et al., 2011) alors que chez le loup de mer seul *Kiss1* a été détecté dans cet organe, et plus particulièrement dans les cellules à FSH (Escobar et al., 2012). Chez le poisson globe, qui ne possède que *Kiss2*, ce gène est exprimé dans l'hypophyse (Shahjahan et al., 2010). En ce qui concerne les récepteurs, *Kissr-2* et *Kissr-3* ont été détectés dans l'hypophyse de poisson rouge (Li et al., 2009; Yang et al., 2010), avec une expression de *Kissr-2* dans les cellules à LH, GH et prolactine. En revanche, seul *Kissr-3* est exprimé par l'hypophyse de poisson zèbre (Biran et al., 2008). Chez le tilapia, qui ne possède que *Kissr-2*, ce gène est bien exprimé dans l'hypophyse. Ceci démontre que, bien que le système kisspeptine semble être présent à l'échelle hypophysaire chez tous les téléostéens, la nature, la diversité et le rôle des acteurs mis en jeu peuvent différer d'une espèce à l'autre.

Dans les gonades, *Kissr-1* présente un très fort niveau d'expression à la fois dans les testicules et les ovaires chez l'anguille. *Kissr-2* et *Kissr-3* sont également exprimés dans les testicules et *Kissr-3* dans les ovaires. Les gonades pourraient ainsi représenter des cibles pour les kisspeptines alors que les niveaux d'expression de *Kiss1* et *Kiss2* sont très faibles (testicules), voir indétectables (ovaires). Les kisspeptines pourraient donc agir de manière endocrine sur les gonades d'anguille, principalement par l'intermédiaire de *Kissr-1* qui n'a,

pour le moment, pas été identifié chez d'autres téléostéens. La présence de *Kissr-1* a été mise en évidence dans les ovaires de certains mammifères (rat : Castellano et al., 2006 ; Homme et marmouset (*Callithrix jacchus*) : Gaytan et al., 2009). L'hypothèse d'un rôle des kisspeptines dans le contrôle de l'ovulation a été émise.

Concernant les autres organes périphériques, les *Kissr* sont à la limite du seuil de détection dans la plupart des tissus, excepté pour *Kissr-1* qui est faiblement exprimé dans le muscle, la rétine et le tissu adipeux, ainsi que *Kissr-3* que l'on retrouve faiblement exprimé dans le muscle. *Kiss1* et *Kiss2* sont, quant à eux, indétectables dans tous les tissus testés, à l'exception de la rétine, où *Kiss1* se révèle être bien exprimé. Chez l'anguille, le couple *Kiss1/Kissr1* se retrouve donc exprimé dans l'œil, au niveau de la rétine. Chez le médaka, *Kiss1* et *Kiss2* sont également exprimé dans l'œil (Felip et al., 2009; Kanda et al., 2008) et chez le poisson globe, *Kissr-2* est exprimé dans la rétine (Shahjahan et al., 2010). *Kiss1*, *Kiss2* et *Kiss3* sont exprimés dans la rétine chez le xénope (Lee et al., 2009). L'accroissement du diamètre oculaire étant un critère de détermination du stade de développement sexuel de l'anguille (Durif et al., 2000), il serait, par conséquent, très intéressant de se pencher sur le rôle potentiel du système kisspeptine dans l'œil d'anguille.

Bien que les composants du système kisspeptine soient distribués de manière différentielle chez l'anguille, ils sont néanmoins produits majoritairement par les tissus composant l'axe cerveau-hypophyse-gonade. Leurs distributions laissent donc envisager une implication de ce système dans la fonction de reproduction de l'anguille. Si cette hypothèse est vraie, il se peut que les niveaux d'expression des *Kiss*, et/ou des *Kissr*, soient affectés au cours de la maturation sexuelle. C'est pourquoi, afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié la régulation d'expression des *Kiss* et des *Kissr*, entre un groupe témoin d'anguilles femelles argentées et un groupe d'anguilles femelles maturées expérimentalement.

2.2. Régulations différentielles des Kiss et des Kissr au cours d'une maturation expérimentale d'anguilles femelles

Le protocole de maturation expérimentale consiste en des injections d'extraits hypophysaires d'autres espèces de téléostéens afin de pallier la déficience en gonadotropines (LH et FSH), chez les anguilles argentées. Les réponses physiologiques, observées lors de ce type d'expérience, correspondent donc, principalement, à l'action des gonadotropines exogènes au niveau des gonades. Au niveau cérébral et hypophysaire, les régulations, observées sur la GnRH et les gonadotropines endogènes, résultent des rétrocontrôles des stéroïdes sexuels (Dufour et al., 1989; Dufour et al., 1993; Montero et al., 1995).

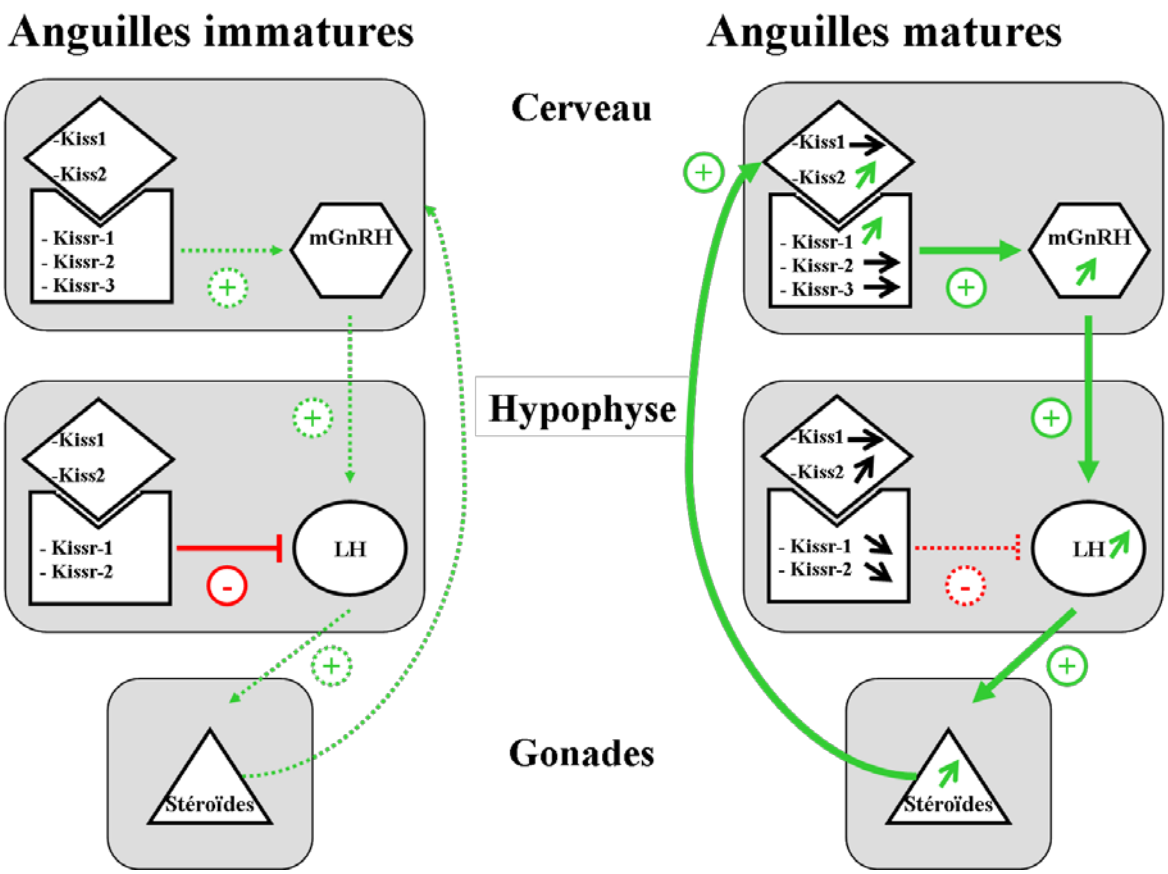


Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'implication potentielle du système kisspeptine sur l'axe cerveau-hypophyse-gonade au cours de la maturation sexuelle de l'anguille européenne. Les flèches vertes représentent des effets stimulateurs (+), les flèches rouges représentent des effets inhibiteurs (-). Les flèches en traits plein représentent des effets observables alors que les flèches en pointillés représentent des effets négligeables. KissX : kisspeptine de type X ; Kissr-X : récepteur de type X liant les kisspeptines; GnRH : gonadolibérine ; LH : hormone lutéinisante ; FSH : hormone foliculo stimulante.

Au cours de cette expérience, nous avons observé une augmentation des expressions de *Kiss2* et *Kissr-1*, en parallèle de celle de *mGnRH*, dans le cerveau des anguilles maturées, par rapport aux anguilles témoins (Figure 14). Etant donnée la position du système kisspeptine en amont de la GnRH chez les vertébrés, cela semble indiquer que le rétrocontrôle positif des stéroïdes sexuels sur mGnRH pourrait passer par le système kisspeptine et, plus particulièrement, Kiss2/Kissr-1 au niveau du cerveau d'anguille (Pasquier et al., 2012; Pasquier et al., en révision). Le rôle des neurones à kisspeptine dans la médiation des rétrocontrôles stéroïdiens a été démontré chez des mammifères et des téléostéens (pour revue : Kanda and Oka, 2012).

Au niveau de l'hypophyse, l'expression de *Kiss2* a augmenté. Les expressions de *Kissr-1* et *Kissr-2*, les deux seuls récepteurs exprimés dans l'hypophyse, ont diminué chez les anguilles matures (Figure14). Comme mentionné précédemment, des données plus précises

sur la nature des cellules hypophysaires exprimant les *Kiss* et les *Kissr* permettraient d'émettre des hypothèses sur l'impact physiologique de ces variations opposées. L'hypophyse étant un organe endocrine, l'hypothèse d'une sécrétion des produits de *Kiss2,* dans la circulation sanguine générale, pourrait aussi être envisagée.

Au niveau des ovaires, seule l'expression de *Kissr-3* a diminué chez les anguilles matures. Cependant, l'ovaire est un organe qui connaît de grands changements physiologiques et morphologiques au cours de la maturation, incluant un accroissement de la taille des ovocytes par accumulation de réserves maternelles, dont des ARN. Il est donc difficile de dissocier les variations d'expressions dues à une réponse physiologique des variations dues à l'accumulation des réserves maternelles.

On peut noter que, parmi les composants du système kisspeptine, aucune régulation de *Kiss1* n'a été observée entre le groupe d'anguilles témoins et le groupe d'anguilles mûres, quel que soit le tissu considéré (cerveau, hypophyse ou ovaire). *Kiss1* pourrait tout à fait jouer un rôle dans la fonction de reproduction sans être régulé, ou bien être régulé à d'autres moments du cycle de vie, comme, par exemple, au cours de l'argenture qui initie les prémices de la puberté. Il pourrait aussi être impliqué dans d'autres fonctions, comme cela a été suggéré pour *Kiss1* chez le poisson zèbre (Servili et al., 2011).

En conclusion, nos résultats suggèrent une implication différentielle des trois *Kissr* et des deux *Kiss* dans la fonction de reproduction de l'anguille. Ceci indiquerait une sub-fonctionnalisation des composants du système kisspeptine. *Kiss2* et *Kissr-1* pourraient jouer un rôle stimulateur sur l'expression de *mGnRH* et relayer les rétrocontrôles positifs des stéroïdes sexuels, au cours de la maturation de l'anguille (Figure 14).

En outre, la présence de *Kiss* et *Kissr* dans l'hypophyse nous a conduit à étudier l'effet direct des kisspeptines sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille.

2.3. Effet inhibiteur *in vitro* des kisspeptines sur l'expression de LHβ

Lorsque nous avons réalisé les expériences *in vitro* des effets des kisspeptines sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguilles, nous n'avions pas encore identifié les séquences des *Kiss* d'anguille. Les résultats ont donc été obtenus en utilisant des peptides hétérologues.

En utilisant le Kp1(10), commun à l'humain et la lamproie marine, nous avons montré un effet inhibiteur, dépendant de la dose et du temps, sur l'expression de la *LHβ*. Cet effet s'est révélé spécifique pour la *LHβ,* car nous n'avons observé aucun changement dans l'expression de la *GPα*, la *FSHβ*, la *TSHβ* ou de la *GH*. Nous avons retrouvé ce même effet

inhibiteur en utilisant des peptides de différentes tailles (Kp1(13), Kp1(14), Kp1(15)), issus de différents types de *Kiss* (Kp1(10) et Kp2(10)) et provenant de différentes espèces (lamproie, humain, poisson zèbre) (Pasquier et al., 2011). Depuis notre identification des gènes *Kiss1* et *Kiss2* dans le génome de l'anguille, nous savons qu'aucun des kisspeptines hétérologues testés ne correspond à 100% avec les séquences des kisspeptines prédites chez l'anguille. Cependant, l'ensemble de ces peptides, qui représentent un large panel de séquences différentes, ont tous eu le même effet inhibiteur. Ceci renforce la robustesse de nos résultats qui mériteraient, toutefois, d'être confirmés par des traitements aux kisspeptines endogènes.

Chez les téléostéens, ce type d'expérience *in vitro* n'a été réalisé que chez le poisson rouge (Chang et al., 2012; Li et al., 2009; Yang et al., 2010). Cependant, les résultats obtenus ont mené à des conclusions contradictoires. En effet, sur les trois études publiées, deux d'entre elles ont décrit un effet stimulateur de kisspeptine sur la libération (Chang et al., 2012; Yang et al., 2010) et l'expression (Yang et al., 2010) de LH, alors que la troisième n'a observé aucun effet significatif sur la libération de LH (Li et al., 2009).

Nos résultats représentent donc un nouvel exemple d'effet direct des kisspeptines sur l'hypophyse. Ils constituent également la première mise en évidence d'un effet inhibiteur des kisspeptines sur l'axe gonadotrope.

Pour l'anguille, cela implique que le système kisspeptine pourrait représenter un nouvel obstacle à franchir, avant de pouvoir se reproduire. Néanmoins, les résultats de la maturation expérimentale des femelles argentées ont montré que les niveaux d'expression des deux récepteurs aux kisspeptines présents dans l'hypophyse, *Kissr-1* et *Kissr-2*, étaient plus faibles chez les anguilles traitées que chez les anguilles témoins. Ceci pourrait refléter la levée de l'inhibition exercée par les kisspeptines, grâce à la raréfaction de leurs récepteurs dans l'hypophyse, au moment de la maturation.

2.4. Dualité du rôle du système kisspeptine chez l'anguille

Les résultats de la maturation sexuelle ont montré une augmentation, en parallèle, des niveaux d'expression des gènes *mGnRH*, *Kiss2* et *Kissr-1* dans le cerveau d'anguille mature, par rapport à une anguille immature. Comme discuté au paragraphe 2.2 de ce chapitre. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle stimulateur dans l'activation des neurones à GnRH et la médiation des rétrocontrôles positifs stéroïdiens. A l'inverse, au niveau de l'hypophyse les résultats des tests *in vitro* des différents kisspeptines montrent un effet inhibiteur direct du système kisspeptine sur l'expression de *LHβ*. Les diminutions de *Kissr-1* et *Kissr-2*, observées lors de la maturation expérimentale, suggèrent que cet effet inhibiteur pourrait être levé au

cours de la maturation sexuelle. Tous ces résultats indiquent donc que le système kisspeptine pourrait agir sur l'axe gonadotrope, de manières différentes, à des niveaux différents et à des phases du cycle différentes, illustrant ainsi la complexité de ce système chez l'anguille (Figure 14).

Très récemment, une étude a mis en évidence un effet alternatif des kisspeptines, *Kiss1* et *Kiss2*, dans la fonction de reproduction, au cours du cycle de vie du bar rayé (Zmora et al., 2012). De plus, les résultats de cette étude montrent un effet inhibiteur de Kp2(12) sur l'expression de la *mGnRH* chez cette espèce (Zmora et al., 2012). Ces résultats confirment, chez une autre espèce, la possibilité d'un effet inhibiteur des kisspeptines, à un stade donné, dans un tissu donné, illustrant cette fois la complexité du système à l'échelle des téléostéens.

2.5. Rôle ancestral du système kisspeptine

Malgré la complexité du système kisspeptine, tant d'un point de vue fonctionnel qu'évolutif, un aspect de ce système serait resté, jusqu'à maintenant, commun à tous les vertébrés chez qui il a été étudié. En effet, ce système serait impliqué dans la fonction de reproduction de tous ces organismes (pour revue : (George and Seminara, 2012; Kanda and Oka, 2012; Simonneaux et al., 2012; Tena-Sempere et al., 2012). L'hypothèse, expliquant l'existence de ce rôle au travers de groupes aussi éloignés phylogénétiquement que les téléostéens et les euthériens, suppose qu'ancestralement ce système était déjà impliqué dans la fonction de reproduction, chez leur ancêtre commun. Malgré de nombreuses pertes de gènes, la plasticité des différents éléments du système aurait permis la conservation de ce rôle jusque chez les vertébrés actuels.

En considérant la dualité des effets du système kisspeptine suggérée par nos résultats, et par ceux obtenus chez le bar rayé (Zmora et al., 2012), il reste à savoir si ce système exerçait un contrôle positif ou négatif sur la fonction reproductive de l'ancêtre commun des vertébrés. A l'heure actuelle la question reste ouverte.

Cependant, l'étude du GnIH, un autre membre de la grande famille des peptides RFamide, pourrait permettre de mieux comprendre la versatilité des effets exercés par les peptides de cette famille. En effet, à l'origine, GnIH a été identifié comme un inhibiteur de la libération des gonadotropines chez la caille, d'où son appellation première. Par la suite, les homologues de ce peptide n'ont pas tardé à être découverts chez d'autres espèces de vertébrés. Chez les mammifères (primates et rongeurs principalement), ils exercent la même fonction que celle décrite chez les oiseaux (pour revue : Tsutsui et al., 2010). Chez un amphibien, le crapaud buffle (*Rana catesbeiana*), l'homologue du GnIH a été dénommé fGRP

pour « frog Growth hormone Releasing Peptide », en raison de son effet positif sur la libération de GH chez cette espèce (Koda et al., 2002; Ukena et al., 2003). Les trois peptides de poisson rouge, homologues du GnIH, sont capables de stimuler la libération de LH, FSH et GH, par des cultures de cellules hypophysaires de saumon (*Oncorhynchus nerka*) (Amano et al., 2006). Récemment, une séquence homologue des GnIH a été identifiée chez la myxine et elle a révélé un effet stimulateur sur l'expression de la sous-unité β de l'hormone gonadotrope (GTHβ) de cyclostome (Osugi et al., 2011).

Ces exemples des systèmes kisspeptine et GnIH montrent que les effets positifs ou négatifs ne constituent pas des critères d'homologie dans la grande famille des peptides RFamide. Cela renforce la nécessité, illustrée dans cette thèse, de baser sur des critères phylogénétiques et synténiques la classification et la nomenclature de ces familles de gènes.

3. Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons proposé, sur des bases phylogénétiques et synténiques, un remaniement de la classification des familles de *Kiss* et de *Kissr*. Nous avons également démontré, chez les vertébrés, l'origine unique des *Kiss*, d'une part, et des *Kissr*, d'autre part. Cela a permis de dégager des histoires évolutives complexes, ponctuées de nombreux événements de perte pour chacune de ces deux familles, conduisant à la conservation de *Kiss* et de *Kissr* différents selon les lignées de vertébrés. Les résultats dégagés au cours de cette thèse ont également apporté un éclairage nouveau sur la fonctionnalité du système kisspeptine, chez les vertébrés, grâce à la découverte de son effet inhibiteur sur l'expression de la *LHβ,* par les cellules hypophysaires d'anguille. Cet effet inhibiteur, original au niveau de l'hypophyse, pourrait être accompagné, lors de la maturation sexuelle, d'un effet stimulateur, plus classique, au niveau cérébral. Finalement, toutes ces observations ont contribué à la complexification de l'image du système kisspeptine chez les vertébrés.

4. Perspectives

Les travaux mis en œuvre au cours de cette thèse ont permis de mieux comprendre le système kisspeptine chez les vertébrés, cependant un certain nombre de questions reste en suspens.

Du point de vue physiologique, maintenant que nous connaissons les séquences endogènes des kisspeptines de l'anguille, il est possible de les faire synthétiser par nos collaborateurs de l'Université de Rouen, le Pr. Hubert Vaudry et le Dr. Jérôme Le Prince.

Nous pourrons les tester *in vitro* sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille, afin de valider les résultats obtenus par traitements aux kisspeptines hétérologues.

Puis, nous projetons de les tester sur des cultures primaires de neurones ou des explants cérébraux afin de valider nos hypothèses concernant leur rôle stimulateur sur la mGnRH chez l'anguille.

Des injections devront également être réalisées sur des individus à différents stades de maturité, afin d'évaluer l'effet *in vivo* des kisspeptines à l'échelle de l'organisme entier, en fonction du stade de vie.

Dans ces expériences de l'effet *in vitro* et *in vivo* des kisspeptines, seront suivis les niveaux d'expressions en ARNm de plusieurs gènes impliqués dans l'axe gonadotrope (*mGnRH*, tyrosine hydroxylase, *LHβ*, *FSHβ*, et les composants du système kisspeptine). Le dosage des protéines correspondantes devrait aussi être envisagé.

De plus, le suivi de l'expression des *Kiss* et des *Kissr*, au cours d'expériences d'injections de stéroïdes sexuels, permettrait de confirmer le rétrocontrôle des stéroïdes et déterminer quels stéroïdes régulent le système lors de la maturation sexuelle.

Une approche d'hybridation *in situ*, couplée à de l'immunohistochimie, nous permettrait d'identifier les noyaux cérébraux exprimant les différents composants du système kisspeptine, de déterminer si les neurones à GnRH expriment les *Kissr* et d'observer si certains de ces composants sont exprimés dans les mêmes neurones. Une même approche permettrait, également, d'identifier les types cellulaires exprimant les *Kiss* et les *Kissr*, dans les gonades et l'hypophyse d'anguille. De façon plus générale, ces expériences apporteraient de précieuses informations concernant les tissus producteurs de kisspeptines et les tissus cibles potentiels, ainsi que sur les couples anatomo-fonctionnels de Kiss/Kissr, chez l'anguille.

Une autre approche, permettant de caractériser des couples fonctionnels de Kiss/Kissr, chez l'anguille, consisterait à faire exprimer, par des lignées cellulaires, chacun des trois Kissr recombinants d'anguille, et d'étudier leurs propriétés de liaison vis à vis des différents kisspeptines d'anguille prédits et synthétisés.

Du point de vue évolutif, la comparaison avec l'étude des *PALM* (Hultqvist et al., 2012) a permis d'affiner, de manière indirecte, les liens phylogénétiques entre les quatre *Kissr*. Il serait intéressant d'arriver à les résoudre de manière directe. Pour cela, la caractérisation d'un nombre plus important de *Kissr*, et en particulier de *Kissr-3* et *Kissr-4*, serait nécessaire. Nous n'avons pas pu définir complètement les liens phylogénétiques entre les trois *Kiss*. Afin de progresser dans cette voie, il serait intéressant d'essayer d'identifier des

représentants du groupe *Kiss4* si toutefois il n'a pas complètement disparu chez les vertébrés actuels.

De façon plus générale, nous nous sommes concentrés sur l'histoire évolutive de ces deux familles au sein des vertébrés et nous avons montré qu'il existait au moins un gène *Kiss* et un gène *Kissr* chez l'ancêtre de cette lignée. La prochaine étape consistera donc à étudier ces gènes chez les non-vertébrés afin d'acquérir une vision plus large de leur évolution. L'existence de *Kissr* est déjà attestée chez des deutérostomiens non-vertébrés tels qu'un céphalocordé, l'amphioxus (*Branchiostoma floridae*), un hémicordé, *Saccoglossus kowalevskii*, et un échinoderme, l'oursin violet (*Strongylocentrotus purpuratus*). Cela confirme l'apparition des *Kissr* bien avant l'émergence des vertébrés. En revanche, aucun *Kiss* n'a été identifié chez ces deutérostomiens non-vertébrés. Il serait donc intéressant d'essayer de déterminer, parmi ces deutérostomiens, des séquences homologues de *Kiss* de vertébrés. De plus, la question du lien entre le système kisspeptine et la reproduction est d'autant plus intéressante que ces espèces possèdent des homologues des *GnRH* et de leurs récepteurs.

Pour remonter plus loin dans la classification des métazoaires, aucun *Kiss* ni *Kissr* n'a encore été identifié chez les protostomiens, alors qu'historiquement les peptides RFamide ont été découverts chez un mollusque. La recherche de gènes homologues des *Kiss* et des *Kissr* de vertébrés chez les protostomiens permettrait de mieux comprendre à quel moment de l'histoire des métazoaires, ce système est apparu.

Bibliographie

A

Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics 21, 2104-2105.

Abbasi, A.A., and Hanif, H. (2012). Phylogenetic history of paralogous gene quartets on human chromosomes 1, 2, 8 and 20 provides no evidence in favor of the vertebrate octoploidy hypothesis. Mol Phylogenet Evol 63, 922-927.

Adams, B.A., Tello, J.A., Erchegyi, J., Warby, C., Hong, D.J., Akinsanya, K.O., Mackie, G.O., Vale, W., Rivier, J.E., and Sherwood, N.M. (2003). Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, Ciona intestinalis. Endocrinology 144, 1907-1919.

Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., and Rosenfeld, H. (2005). Enhancing spawning in the grey mullet (Mugil cephalus) by removal of dopaminergic inhibition. Gen Comp Endocrinol 142, 212-221.

Akazome, Y., Kanda, S., Okubo, K., and Oka, Y. (2010). Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. J Fish Biol 76, 161-182.

Alvarez, E., Cahoreau, C., and Combarnous, Y. (2009). Comparative structure analyses of cystine knot-containing molecules with eight aminoacyl ring including glycoprotein hormones (GPH) alpha and beta subunits and GPH-related A2 (GPA2) and B5 (GPB5) molecules. Reprod Biol Endocrinol 7, 90.

Amano, M., Moriyama, S., Iigo, M., Kitamura, S., Amiya, N., Yamamori, K., Ukena, K., and Tsutsui, K. (2006). Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. J Endocrinol 188, 417-423.

Amare, A., Hummon, A.B., Southey, B.R., Zimmerman, T.A., Rodriguez-Zas, S.L., and Sweedler, J.V. (2006). Bridging neuropeptidomics and genomics with bioinformatics: Prediction of mammalian neuropeptide prohormone processing. J Proteome Res 5, 1162-1167.

Amores, A., Catchen, J., Ferrara, A., Fontenot, Q., and Postlethwait, J.H. (2011). Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. Genetics 188, 799-808.

Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., Westerfield, M., Ekker, M., and Postlethwait, J.H. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. Science 282, 1711-1714.

Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., and Guillemin, R. (1971). Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. Biochem Biophys Res Commun 44, 205-210.

Ansel, L., Bentsen, A.H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2011). Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GNRH release. Reproduction 142, 417-425.

Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A.H., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2010). Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. J Biol Rhythms 25, 81-91.

Arai, T., Otake, T., and Tsukamoto, K. (2000). Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels Anguilla rostrata and A. anguilla, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. Marine Biology 137, 39-45.

Aroua, S., Schmitz, M., Baloche, S., Vidal, B., Rousseau, K., and Dufour, S. (2005). Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. Neuroendocrinology 82, 221-232.

Aroua, S., Weltzien, F.A., Le Belle, N., and Dufour, S. (2007). Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids. Gen. Comp. Endocrinol. 153, 333-343.

B

Bechtold, D.A., and Luckman, S.M. (2007). The role of RFamide peptides in feeding. J Endocrinol 192, 3-15.

Beck, B.H., Fuller, S.A., Peatman, E., McEntire, M.E., Darwish, A., and Freeman, D.W. (2012). Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus Morone. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 162, 265-273.

Bianco, S.D., and Kaiser, U.B. (2009). The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Nat Rev Endocrinol 5, 569-576.

Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U., Graier, W., Kn╟╢fler, M., Andreae, F., Wagner, O., Quaranta, V., and Desoye, G. (2004). Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. J Cell Sci 117, 1319-1328.

Biran, J., Ben-Dor, S., and Levavi-Sivan, B. (2008). Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. Biol. Reprod. 79, 776-786.

Bowe, J.E., Foot, V.L., Amiel, S.A., Huang, G.C., Lamb, M., Lakey, J., Jones, P.M., and Persaud, S.J. (2012). GPR54 peptide agonists stimulate insulin secretion from murine, porcine and human islets. Islets 4.

Bowe, J.E., King, A.J., Kinsey-Jones, J.S., Foot, V.L., Li, X.F., O'Byrne, K.T., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2009). Kisspeptin stimulation of insulin secretion: mechanisms of action in mouse islets and rats. Diabetologia 52, 855-862.

Burger, L.L., Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C., and Marshall, J.C. (2004). Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. J Mol Endocrinol 33, 559-584.

C

Cao, G.L., Chu, M.X., Fang, L., Feng, T., Di, R., and Li, N. (2011). Analysis on DNA sequence of GPR54 gene and its association with litter size in goats. Mol Biol Rep 38, 3839-3848.

Castellano, J.M., Navarro, V., Fernçndez-Fernçndez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M., Vigo, E., Casanueva, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., and Tena-Sempere, M. (2005). Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. Endocrinology 146, 3917-3925.

Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Mikkelsen, J.D., and Tena-Sempere, M. (2010). Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. Brain Res 1364, 129-138.

Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sanchez-Criado, J.E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F., and Tena-Sempere, M. (2006). Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? Endocrinology 147, 4852-4862.

Castellano, J.M., Roa, J., Luque, R.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2009). KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. Peptides 30, 139-145.

Chang, J.P., Mar, A., Wlasichuk, M., and Wong, A.O. (2012). Kisspeptin-1 directly stimulates LH and GH secretion from goldfish pituitary cells in a Ca(2+)-dependent manner. Gen Comp Endocrinol 179, 38-46.

Chang, J.P., and Peter, R.E. (1983a). Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, Carassius auratus. Neuroendocrinology 36, 351-357.

Chang, J.P., and Peter, R.E. (1983b). Effects of pimozide and des Gly10,[D-Ala6]luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration, and ovulation in female goldfish, Carassius auratus. Gen Comp Endocrinol 52, 30-37.

Charlton, H. (2008). Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history. J Neuroendocrinol 20, 641-646.

Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-R├⌐go, J.C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., Beauvillain, J.C., and Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 15247-15252.

Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A.S., Colledge, W.H., and Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. J Neurosci 28, 8691-8697.

Clarkson, J., and Herbison, A. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 147, 5817-5825.

Clements, M.K., McDonald, T.P., Wang, R., Xie, G., O'Dowd, B.F., George, S.R., Austin, C.P., and Liu, Q. (2001). FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. Biochem Biophys Res Commun 284, 1189-1193.

Colombo, G., Grandi, G., and Rossi, R. (1984). Gonad differentiation and body growth in Anguilla anguilla L. Journan of Fish Biology 24, 215-228.

Colombo, G., and Grandidr, G. (2005). Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. Journal of Fish Biology 48, 493-512.

Combarnous, Y., Chopineau, M., and Martinat, N. (1997). Bases molÄculaires de la spÄcificitÄ des gonadotropines. In: Les Gonadotropines, eds. C. Y and V.-N. P, Paris: INRA Editions, 69-78.

Combarnous, Y., Galet, C., CrÄpieux, P., Chopineau, M., and Counis, R. (2001). Les gonadotropines: Structures, fonction, mÄcanismes d'action. In: La reproduction chez les mammifÅres et l'homme, eds. T. C and L. MC, Paris: INRA Editions, 108-121.

Copeland, P.A., and Thomas, P. (1989). Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (Micropogonias undulatus): evidence for lack of dopaminergic inhibition. Gen Comp Endocrinol 74, 474-483.

Cowan, M., Davie, A., and Migaud, H. (2012). Photoperiod effects on the expression of kisspeptin and gonadotropin genes in Atlantic cod, Gadus morhua, during first maturation. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 163, 82-94.

Curtis, A.E., Cooke, J.H., Baxter, J.E., Parkinson, J.R., Bataveljic, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Murphy, K.G. (2010). A kisspeptin-10 analog with greater in vivo bioactivity than kisspeptin-10. Am J Physiol Endocrinol Metab 298, E296-303.

D

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L., Dixon, J., Day, K., Leitch, H., Hendrick, A., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M., Aparicio, S., and Colledge, W. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 10714-10719.

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B., and Colledge, W.H. (2008). Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. Endocrinology 149, 3926-3932.

De Pinna, M.C.C. (1996). Teleostean monophyly. In: Interelationships of Fishes, eds. M.L.J. Stiassny, L.R. Parenti, and G.D. Johnson, New York: Academic press, 147-162.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J., Matsuda, F., Chaussain, J., 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.

Dehal, P., and Boore, J.L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. PLoS Biol 3, e314.

Dhillo, W., Chaudhri, O., Patterson, M., Thompson, E., Murphy, K., Badman, M., McGowan, B., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M., and Bloom, S. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. J Clin Endocrinol Metab 90, 6609-6615.

Dhillo, W., Chaudhri, O., Thompson, E., Murphy, K., Patterson, M., Ramachandran, R., Nijher, G., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., Ghatei, M., and Bloom, S. (2007a). Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. J Clin Endocrinol Metab 92, 3958-3966.

Dhillo, W., Murphy, K., and Bloom, S. (2007b). The neuroendocrine physiology of kisspeptin in the human. Rev Endocr Metab Disord 8, 41-46.

Dickey, J.T., and Swanson, P. (1998). Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). J Mol Endocrinol 21, 291-306.

Dos Santos, S., Mazan, S., Venkatesh, B., Cohen-Tannoudji, J., and QuÄrat, B. (2011). Emergence and evolution of the glycoprotein hormone and neurotrophin gene families in vertebrates. BMC Evol Biol 11, 332.

Dufour, S., Burzawa-Gerard, E., Le Belle, N., Sbaihi, M., and Vidal, B. (2003). Reproductive endocrinology of the European eel, Anguilla anguilla. In: Eel Biology, eds. K. Aida, K. Tsukamoto, and K. Yamauchi, Tokyo: Springer, 373-383.

Dufour, S., Delerue-Le Belle, N., and Fontaine, Y.A. (1983). Development of a heterologous radioimmunoassay for eel (Anguilla anguilla) gonadotropin. Gen Comp Endocrinol 49, 404-413.

Dufour, S., Le Belle, N., Baloche, S., and Fontaine, Y.A. (1989). Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, Anguilla anguilla. Fish Physiology and Biochemistry 7, 157-162.

Dufour, S., Lopez, E., Le Menn, F., Le Belle, N., Baloche, S., and Fontaine, Y.A. (1988). Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. Gen Comp Endocrinol 70, 20-30.

Dufour, S., Montero, M., Le Belle, N., Bassompierre, M., King, J.A., Millar, R.P., Peter, R.E., and Fontaine, Y.A. (1993). Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, Anguilla anguilla. Fish Physiology and Biochemistry 11, 99-106.

Dufour, S., Sebert, M.E., Weltzien, F.A., Rousseau, K., and Pasqualini, C. (2010). Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. J Fish Biol 76, 129-160.

Dufour, S., Weltzien, F.A., Sebert, M.E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., and Pasqualini, C. (2005). Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. Ann N Y Acad Sci 1040, 9-21.

Durif, C., Elie, P., Dufour, S., Marchelidon, J., and Vidal, B. (2000). Analyse des paramÅtres morphologiques et physiologiques lors de la prÄparation ê la migration de dÄvalaison chez l ╒anguille europÄenne (Anguilla anguilla) du lac de Grand-Lieu (Loire-Atlantique). Cybium 24, 63-74.

E

Eipper, B.A., Stoffers, D.A., and Mains, R.E. (1992). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. Annu Rev Neurosci 15, 57-85.

Escobar, S., Felip, A., Gueguen, M.M., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O., and Servili, A. (2012). Expression of kisspeptinsin the brain and pituitary of the european sea bass (Dicentrarchus labrax). J Comp Neurol.

Estrada, K., Clay, C., Pompolo, S., Smith, J., and Clarke, I. (2006). Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. J Neuroendocrinol 18, 806-809.

Ezzat Ahmed, A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T., Sawai, K., and Hashizume, T. (2009). Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. J Reprod Dev 55, 650-654.

F

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., and Gomez, A. (2009). Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. Mol Cell Endocrinol 312, 61-71.

Filby, A.L., van Aerle, R., Duitman, J., and Tyler, C.R. (2008). The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. Biol. Reprod. 78, 278-289.

Fontaine, M. (1936). Sur la maturation complÅte des organes gÄnitaux des anguilles mëles et l'Ämission spontanÄe de ses produits sexuels. CR Acad Sci Paris 202, 1312-1315.

Fontaine, M., Bertrand, E., Lopez, E., and Callamand, O. (1964). Sur la stimulation des organes gÄnitaux de l'anguille femelle (Anguilla anguilla L.) et l'Ämission spontanÄe des oeufs en aquarium. CR Acad Sci Paris 259, 2907-2910.

Forbes, S., Li, X.F., Kinsey-Jones, J., and O'Byrne, K. (2009). Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. Neurosci Lett 460, 143-147.

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., and Caraty, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. Neurosci Lett 401, 225-230.

Fukusumi, S., Fujii, R., and Hinuma, S. (2006). Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. Peptides 27, 1073-1086.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., and Gustafson, E.L. (2003b). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, 1357-1363.

G

Garcia-Galiano, D., van Ingen Schenau, D., Leon, S., Krajnc-Franken, M.A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Navarro, V.M., Gaytan, F., van Noort, P.I., Pinilla, L., Blomenrohr, M., and Tena-Sempere, M. (2011). Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. Endocrinology 153, 316-328.

Garcia-Galiano, D., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2012). Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. J Neuroendocrinol 24, 22-33.

Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, J.M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sanchez-Criado, J.E., Millar, R.P., Pellicer, A., Fraser, H.M., and Tena-Sempere, M. (2009). KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. Am J Physiol Endocrinol Metab 296, E520-531.

George, J.T., and Seminara, S.B. (2012). Kisspeptin and the hypothalamic control of reproduction: lessons from the human. Endocrinology 153, 5130-5136.

George, J.T., Veldhuis, J.D., Roseweir, A.K., Newton, C.L., Faccenda, E., Millar, R.P., and Anderson, R.A. (2011). Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. J Clin Endocrinol Metab 96, E1228-1236.

Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., and Chin, W.W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocr Rev 11, 177-199.

Gottsch, M., Cunningham, M., Smith, J., Popa, S., Acohido, B., Crowley, W., Seminara, S., Clifton, D., and Steiner, R. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 145, 4073-4077.

Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2006). Kisspepeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. Mol Cell Endocrinol 254-255, 91-96.

Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. Peptides 30, 4-9.

Greives, T.J., Humber, S.A., Goldstein, A.N., Scotti, M.A., Demas, G.E., and Kriegsfeld, L.J. (2008a). Photoperiod and testosterone interact to drive seasonal changes in kisspeptin expression in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). J Neuroendocrinol 20, 1339-1347.

Greives, T.J., Kriegsfeld, L.J., Bentley, G.E., Tsutsui, K., and Demas, G.E. (2008b). Recent advances in reproductive neuroendocrinology: a role for RFamide peptides in seasonal reproduction? Proc Biol Sci 275, 1943-1951.

Greives, T.J., Kriegsfeld, L.J., and Demas, G.E. (2008c). Exogenous kisspeptin does not alter photoperiod-induced gonadal regression in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). Gen Comp Endocrinol 156, 552-558.

Greives, T.J., Long, K.L., Burns, C.M., and Demas, G.E. (2011). Response to exogenous kisspeptin varies according to sex and reproductive condition in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). Gen Comp Endocrinol 170, 172-179.

Grone, B.P., Maruska, K.P., Korzan, W.J., and Fernald, R.D. (2010). Social status regulates kisspeptin receptor mRNA in the brain of Astatotilapia burtoni. Gen Comp Endocrinol 169, 98-107.

Gross, M.R. (1996). Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. Trends Ecol Evol 11, 92-98.

GutiÄrrez-Pascual, E., Leprince, J., Martinez-Fuentes, A.J., SÄgalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., Pinilla, L., Tonon, M.C., Malagon, M.M., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., and Castano, J.P. (2009). In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. Mol Pharmacol 76, 58-67.

GutiÄrrez-Pascual, E., Martinez-Fuentes, A., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, M., and Castano, J. (2007). Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. J Neuroendocrinol 19, 521-530.

H

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., and Herbison, A.E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J Neurosci 25, 11349-11356.

Hashizume, T., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Ezzat, A.A., Sawai, K., and Yamashita, T. (2010). Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. Anim Reprod Sci 118, 37-41.

Hauge-Evans, A.C., Richardson, C.C., Milne, H.M., Christie, M.R., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2006). A role for kisspeptin in islet function. Diabetologia 49, 2131-2135.

Henkel, C.V., Burgerhout, E., de Wijze, D.L., Dirks, R.P., Minegishi, Y., Jansen, H.J., Spaink, H.P., Dufour, S., Weltzien, F.A., Tsukamoto, K., and van den Thillart, G.E. (2012). Primitive duplicate Hox clusters in the European eel's genome. PLoS One 7, e32231.

Hiden, U., Bilban, M., KnÜfler, M., and Desoye, G. (2007). Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. Rev Endocr Metab Disord 8, 31-39.

Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., Sekiguchi, M., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H., and Fujino, M. (1998). A prolactin-releasing peptide in the brain. Nature 393, 272-276.

Ho, S., Kleis, S., McPherson, R., Heisermann, G., and Callard, I. (1982). Regulation of vitellogenesis in reptiles. In: Herpetologica, ed. C. G: The Herpetologists' league, Inc, 40-50.

Hori, A., Honda, S., Asada, M., Ohtaki, T., Oda, K., Watanabe, T., Shintani, Y., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Onda, H., Kurokawa, T., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001). Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. Biochem Biophys Res Commun 286, 958-963.

Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Kitada, C., Usuki, S., and Fujino, M. (2003). Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. J Clin Endocrinol Metab 88, 914-919.

Hultqvist, G., Ocampo Daza, D., Larhammar, D., and Kilimann, M.W. (2012). Evolution of the vertebrate paralemmin gene family: ancient origin of gene duplicates suggests distinct functions. PLoS One 7, e41850.

I

Inoue, N., Sasagawa, K., Ikai, K., Sasaki, Y., Tomikawa, J., Oishi, S., Fujii, N., Uenoyama, Y., Ohmori, Y., Yamamoto, N., Hondo, E., Maeda, K., and Tsukamura, H. (2011). Kisspeptin neurons mediate reflex ovulation in the musk shrew (Suncus murinus). Proc Natl Acad Sci U S A 108, 17527-17532.

Irwig, M., Fraley, G., Smith, J., Acohido, B., Popa, S., Cunningham, M., Gottsch, M., Clifton, D., and Steiner, R. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinology 80, 264-272.

Iwakoshi, E., Takuwa-Kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K., and Minakata, H. (2002). Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from Octopus vulgaris. Biochem Biophys Res Commun 291, 1187-1193.

J

Janneau, J.L., Maldonado-Estrada, J., Tachdjian, G., Miran, I., MottÄ, N., Saulnier, P., Sabourin, J.C., CotÄ, J.F., Simon, B., Frydman, R., Chaouat, G., and Bellet, D. (2002). Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. J Clin Endocrinol Metab 87, 5336-5339.

Jeng, S.R., Pasquier, J., Yueh, W.S., Chen, G.R., Lee, Y.H., Dufour, S., and Chang, C.F. (2012). Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (Anguilla japonica) reveals steroid dependent and independent mechanisms. Gen Comp Endocrinol 175, 163-172.

K

Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K., and Miyamoto, A. (2008). Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. J Endocrinol 196, 331-334.

Kadokawa, H., Suzuki, S., and Hashizume, T. (2007). Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. Anim Reprod Sci.

Kah, O., Chambolle, P., Thibault, J., and Geffard, M. (1984). Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. Neurosci Lett 48, 293-298.

Kah, O., Dulka, J.G., Dubourg, P., Thibault, J., and Peter, R.E. (1987). Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. Neuroendocrinology 45, 451-458.

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., and Lareyre, J.J. (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. Gen Comp Endocrinol 153, 346-364.

Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K., and Oka, Y. (2008). Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (oryzias latipes). Endocrinology 149, 2467-2476.

Kanda, S., Karigo, T., and Oka, Y. (2012). Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. J Neuroendocrinol.

Kanda, S., and Oka, Y. (2012). Evolutionary Insights into the Steroid Sensitive kiss1 and kiss2 Neurons in the Vertebrate Brain. Front Endocrinol (Lausanne) 3, 28.

Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., and

Kohara, Y. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Nature 447, 714-719.

Kettle, A.J., and Haines, K. (2006). How does the European eel (Anguilla anguilla) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean? Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques 63, 90-106.

Kim, D.K., Cho, E.B., Moon, M.J., Park, S., Hwang, J.I., Do Rego, J.L., Vaudry, H., and Seong, J.Y. (2012). Molecular Coevolution of Neuropeptides Gonadotropin-Releasing Hormone and Kisspeptin with their Cognate G Protein-Coupled Receptors. Front Neurosci 6, 3.

Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., and Maeda, K. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. Endocrinology 146, 4431-4436.

Kitahashi, T., Ogawa, S., and Parhar, I.S. (2009). Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. Endocrinology 150, 821-831.

Koda, A., Ukena, K., Teranishi, H., Ohta, S., Yamamoto, K., Kikuyama, S., and Tsutsui, K. (2002). A novel amphibian hypothalamic neuropeptide: isolation, localization, and biological activity. Endocrinology 143, 411-419.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., and Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J. Biol. Chem. 276, 34631-34636.

Kuraku, S. (2008). Insights into cyclostome phylogenomics: pre-2R or post-2R. Zoolog Sci 25, 960-968.
Kuraku, S., Meyer, A., and Kuratani, S. (2009). Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? Mol Biol Evol 26, 47-59.

L

Lapatto, R., Pallais, J., Zhang, D., Chan, Y., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W., Hoffman, G., and Seminara, S. (2007). Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/- mice. Endocrinology 148, 4927-4936.

Lapthorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., and Isaacs, N.W. (1994). Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature 369, 455-461.

Lecomte-Finiger, R. (1992). Growth history and age at recruitment of European glass eels (Anguilla anguilla) as revealed by otolith microstructure. Marine Biology 114, 205-210.

Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., and O'Dowd, B.F. (1999b). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. F.E.B.S. Lett. 446, 103-107.

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., and Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. J Natl Cancer Inst 88, 1731-1737.

Lee, J.H., and Welch, D.R. (1997a). Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. Int J Cancer 71, 1035-1044.

Lee, J.H., and Welch, D.R. (1997b). Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. Cancer Res 57, 2384-2387.

Lee, J.Y., Moon, J.S., Eu, Y.J., Lee, C.W., Yang, S.T., Lee, S.K., Jung, H.H., Kim, H.H., Rhim, H., Seong, J.Y., and Kim, J.I. (2009a). Molecular interaction between kisspeptin decapeptide analogs and a lipid membrane. Arch. Biochem. Biophys. 485, 109-114.

Lee, Y.R., Tsunekawa, K., Moon, M.J., Um, H.N., Hwang, J.I., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H.B., Seong, J.Y., and Tsutsui, K. (2009b). Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. Endocrinology 150, 2837-2846.

Lehman, M.N., Coolen, L.M., and Goodman, R.L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology 151, 3479-3489.

Lents, C.A., Heidorn, N.L., Barb, C.R., and Ford, J.J. (2008). Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. Reproduction 135, 879-887.

Li, Q., Roa, A., Clarke, I., and Smith, J. (2011). Seasonal variation in GnRH response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. In: 93rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Boston.

Li, S., Ren, J., Yang, G., Guo, Y., and Huang, L. (2008). Characterization of the porcine Kisspeptins receptor gene and evaluation as candidate for timing of puberty in sows. J Anim Breed Genet 125, 219-227.

Li, S., Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Huang, W., Lu, D., Zhu, P., Shi, Y., Cheng, C.H., Liu, X., and Lin, H. (2009). Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (Carassius auratus). J. Endocrinol. 201, 407-418.

Linard, B., Anglade, I., Corio, M., Navas, J.M., Pakdel, F., Saligaut, C., and Kah, O. (1996). Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. Neuroendocrinology 63, 156-165.

Lindemans, M., Janssen, T., Beets, I., Temmerman, L., Meelkop, E., and Schoofs, L. (2011). Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone signaling systems share a common evolutionary origin. Front Endocrinol (Lausanne) 2, 16.

Liu, X., Lee, K., and Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. Endocrinology 149, 4605-4614.

Luque, R.M., Kineman, R., and Tena-Sempere, M. (2007). Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. Endocrinology 148, 4601-4611.

Luque, R.M., Cordoba-Chacon, J., Gahete, M.D., Navarro, V.M., Tena-Sempere, M., Kineman, R.D., and Castano, J.P. (2011). Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms. Endocrinology 152, 957-966.

M

Maguire, J.J., Kirby, H.R., Mead, E.J., Kuc, R.E., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., and Davenport, A.P. (2011). Inotropic action of the puberty hormone kisspeptin in rat, mouse and human: cardiovascular distribution and characteristics of the kisspeptin receptor. PLoS One 6, e27601.

Martinez-Chavez, C.C., Minghetti, M., and Migaud, H. (2008). GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. Gen. Comp. Endocrinol. 156, 224-233.

Martini, A.C., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Navarro, V.M., Vigo, E., Vazquez, M.J., Davies, J.S., Thompson, N.M., Aguilar, E., Pinilla, L., Wells, T., Dieguez, C., and Tena-Sempere, M. (2006). Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. Endocrinology 147, 2374-2382.

Mason, A., Greives, T., Scotti, M., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E., Demas, G., and Kriegsfeld, L. (2007). Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. Horm Behav 52, 492-498.

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., and Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. Biochem Biophys Res Commun 320, 383-388.

Matsuo, H., Arimura, A., Nair, R.M., and Schally, A.V. (1971). Synthesis of the porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method. Biochem Biophys Res Commun 45, 822-827.

Matsuzaki, T., Iwasa, T., Kinouchi, R., Yoshida, S., Murakami, M., Gereltsetseg, G., Yamamoto, S., Kuwahara, A., Yasui, T., and Irahara, M. (2011). Fasting reduces the kiss1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats. Endocr J 58, 1003-1012.

Mayer, C., and Boehm, U. (2011). Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. Nat Neurosci 14, 704-710.

Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., and Davenport, A.P. (2007a). Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. Endocrinology 148, 140-147.

Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., and Davenport, A.P. (2007b). Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. Br J Pharmacol 151, 1143-1153.

Mechaly, A.S., Vinas, J., and Piferrer, F. (2009). Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (Solea senegalensis). Biol. Reprod. 80, 60-69.

Mechaly, A.S., Vinas, J., Murphy, C., Reith, M., and Piferrer, F. (2010). Gene structure of the Kiss1 receptor-2 (Kiss1r-2) in the Atlantic halibut: insights into the evolution and regulation of Kiss1r genes. Mol Cell Endocrinol 317, 78-89.

Mechaly, A.S., Vinas, J., and Piferrer, F. (2011). Gene structure analysis of kisspeptin-2 (Kiss2) in the Senegalese sole (Solea senegalensis): characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species. Mol Cell Endocrinol 339, 14-24.

Mechaly, A.S., Vinas, J., and Piferrer, F. (2012). Sex-specific changes in the expression of kisspeptin, kisspeptin receptor, gonadotropins and gonadotropin receptors in the Senegalese sole (Solea senegalensis) during a full reproductive cycle. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 162, 364-371.

Messager, S., Chatzidaki, E., Ma, D., Hendrick, A., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M., Colledge, W., Caraty, A., and Aparicio, S. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 1761-1766.

Meyer, A., and Van de Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). Bioessays 27, 937-945.

Migaud, H., Ismail, R., Cowan, M., and Davie, A. (2012). Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (Dicentrarchus labrax). Gen Comp Endocrinol.

Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2009). The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. Peptides 30, 26-33.

Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, J.G., Miya, M., Nishida, M., and Tsukamoto, K. (2005). Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus Anguilla based on the whole mitochondrial genome sequences. Mol Phylogenet Evol 34, 134-146.

Mitani, Y., Kanda, S., Akazome, Y., Zempo, B., and Oka, Y. (2010). Hypothalamic Kiss1 but not Kiss2 neurons are involved in estrogen feedback in medaka (Oryzias latipes). Endocrinology 151, 1751-1759.

Mohamed, J.S., Benninghoff, A.D., Holt, G.J., and Khan, I.A. (2007). Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. J Mol Endocrinol 38, 235-244.

Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., and Dufour, S. (1995). Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (Anguilla anguilla). Neuroendocrinology 61, 525-535.

Montero, M., Le Belle, N., Vidal, B., and Dufour, S. (1996). Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (Anguilla anguilla L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. Gen Comp Endocrinol 104, 103-115.

Moon, J.S., Lee, Y.R., Oh, D.Y., Hwang, J.I., Lee, J.Y., Kim, J.I., Vaudry, H., Kwon, H.B., and Seong, J.Y. (2009). Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to Xenopus kisspeptin. Peptides 30, 171-179.

Muccioli, G., Lorenzi, T., Lorenzi, M., Ghe, C., Arnoletti, E., Raso, G.M., Castellucci, M., Gualillo, O., and Meli, R. (2011). Beyond the metabolic role of ghrelin: a new player in the regulation of reproductive function. Peptides 32, 2514-2521.

Muffato, M., Louis, A., Poisnel, C.E., and Roest Crollius, H. (2010). Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. Bioinformatics 26, 1119-1121.

Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., and Harrison, D.C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. J. Biol. Chem. 276, 28969-28975.

N

Nakatani, Y., Takeda, H., Kohara, Y., and Morishita, S. (2007). Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. Genome Res 17, 1254-1265.

Navarro, V., Castellano, J., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M., Roa, J., Sanchez-Criado, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2004a). 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.

Navarro, V., Castellano, J., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M., Barreiro, M., Magni, P., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2005a). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. Endocrinology 146, 156-163.

Navarro, V., Castellano, J., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M., Casanueva, F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2005b). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. Endocrinology 146, 1689-1697.

Navarro, V., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., and Tena-Sempere, M. (2004b). Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. J Physiol 561, 379-386.

Niida, A., Wang, Z., Tomita, K., Oishi, S., Tamamura, H., Otaka, A., Navenot, J.M., Broach, J.R., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2006). Design and synthesis of downsized metastin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. Bioorg Med Chem Lett 16, 134-137.

Nikiforovich, G.V., Taylor, C.M., Marshall, G.R., and Baranski, T.J. (2010). Modeling the possible conformations of the extracellular loops in G-protein-coupled receptors. Proteins 78, 271-285.

Nocillado, J.N., Levavi-Sivan, B., Carrick, F., and Elizur, A. (2007). Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, Mugil cephalus. Gen. Comp. Endocrinol. 150, 278-287.

O

Ogawa, S., Ng, K.W., Ramadasan, P.N., Nathan, F.M., and Parhar, I.S. (2012). Habenular Kiss1 neurons modulate the serotonergic system in the brain of zebrafish. Endocrinology 153, 2398-2407.

Ogawa, S., and Parhar, I.S. (2012). Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts. Gen Comp Endocrinol.

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iinuma, N., and Hirose, K. (1997). Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, Anguilla japonica. Fish Physiology and Biochemistry 17, 163-169.

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature 411, 613-617.

Oka, Y. (2002). Physiology and release activity of GnRH neurons. Prog Brain Res 141, 259-281.

Onuma, T.A., and Duan, C. (2012). Duplicated Kiss1 receptor genes in zebrafish: distinct gene expression patterns, different ligand selectivity, and a novel nuclear isoform with transactivating activity. FASEB J 26, 2941-2950.

Osugi, T., Ukena, K., Sower, S.A., Kawauchi, H., and Tsutsui, K. (2006). Evolutionary origin and divergence of PQRFamide peptides and LPXRFamide peptides in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. FEBS J 273, 1731-1743.

Otake, T. (2003). Metamorphosis. In: Eel Biology, eds. A. K, T. K, and Y. K, Tokyo: Springer, 61-74.

P

Palstra, A.P., and van den Thillart, G.E. (2010). Swimming physiology of European silver eels (Anguilla anguilla L.): energetic costs and effects on sexual maturation and reproduction. Fish Physiol Biochem 36, 297-322.

Panidis, D., Rousso, D., Koliakos, G., Kourtis, A., Katsikis, I., Farmakiotis, D., Votsi, E., and Diamanti-Kandarakis, E. (2006). Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 85, 1778-1783.

Parhar, I.S. (2005). GnRH and gpcr: laser-captured single cell gene profiling. Fish Physiol Biochem 31, 153-156.

Parhar, I.S., Ogawa, S., and Sakuma, Y. (2004). Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. Endocrinology 145, 3613-3618.

Pasqualini, C., Weltzien, F.A., Vidal, B., Baloche, S., Rouget, C., Gilles, N., Servent, D., Vernier, P., and Dufour, S. (2009). Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tissue-specific transcription, and regulation by sex steroids. Endocrinology 150, 1377-1392.

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Jeng, S.-R., Morini, M., Dirks, R., van den Thillart, G., Tomkiewicz, J., Tostivint, H., Chang, C.-F., Rousseau, K., and Dufour, S. (2012). Multiple kisspeptin receptors in early osteichthyans provide new insights into the evolution of this receptor family. PLoS One, DOI: 10.1371/journal.pone.0048931

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Tostivint, H., Vaudry, H., Rousseau, K., and Dufour, S. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. Frontiers in neuroendocrinology (En rÄvision).

Pasquier, J., Lafont, A.G., Leprince, J., Vaudry, H., Rousseau, K., and Dufour, S. (2011). First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, Anguilla anguilla. Gen Comp Endocrinol 173, 216-225.

Patterson, M., Murphy, K., Thompson, E., Patel, S., Ghatei, M., and Bloom, S. (2006). Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. J Neuroendocrinol 18, 349-354.

Perry, S.J., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, J., Sharma, R., Walker, R.J., Wilson, S., and Burke, J.F. (1997). A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. FEBS Lett 409, 426-430.

Peter, R.E., and Paulencu, C.R. (1980). Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, Carassius auratus. Neuroendocrinology 31, 133-141.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8, 785-786.

Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z., and Moenter, S. (2007). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase GnRH neuron activity and its effects are modulated by estradiol. Endocrinology.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. Physiol Rev 92, 1235-1316.

Plant, T. (2006). The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. Eur J Endocrinol 155 Suppl 1, S11-16.

Plant, T., Ramaswamy, S., and Dipietro, M. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. Endocrinology 147, 1007-1013.

Power, J., and McCleave, J. (1983). Simulation of the North Atlantic ocean drift of Anguilla leptocephali. Fish Bull 81, 483-500.

Price, D.A., and Greenberg, M.J. (1977a). Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. Prep Biochem 7, 261-281.

Price, D.A., and Greenberg, M.J. (1977b). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science 197, 670-671.

Putnam, N.H., Butts, T., Ferrier, D.E., Furlong, R.F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.K., Benito-Gutierrez, E.L., Dubchak, I., Garcia-Fernandez, J., Gibson-Brown, J.J., Grigoriev, I.V., Horton, A.C., de Jong, P.J., Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kohara, Y., Kuroki, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Osoegawa, K., Pennacchio, L.A., Salamov, A.A., Satou, Y., Sauka-Spengler, T., Schmutz, J., Shin-I, T., Toyoda, A., Bronner-Fraser, M., Fujiyama, A., Holland, L.Z., Holland, P.W., Satoh, N., and Rokhsar, D.S. (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. Nature 453, 1064-1071.

Q

Quaynor, S., Hu, L., Leung, P., Feng, H., Mores, N., Krsmanovic, L., and Catt, K. (2007). Expression of a functional g protein-coupled receptor 54-kisspeptin autoregulatory system in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. Mol Endocrinol 21, 3062-3070.

R

Ravi, V., and Venkatesh, B. (2008). Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. Curr Opin Genet Dev 18, 544-550.

Revel, F., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J., and Simonneaux, V. (2006). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. Curr Biol 16, 1730-1735.

Richard, N., Corvaisier, S., Camacho, E., and Kottler, M.L. (2009). KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. Peptides 30, 123-129.

Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A., and Kottler, M. (2008). KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. J Neuroendocrinol 20, 381-393.

Roa, J., Navarro, V.M., and Tena-Sempere, M. (2011). Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. Biol Reprod 85, 650-660.

Roa, J., Vigo, E., Castellano, J., Navarro, V., Fernandez-Fernandez, R., Casanueva, F., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2006). Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. Endocrinology 147, 2864-2878.

Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L., and Rance, N.E. (2007). Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. J Clin Endocrinol Metab 92, 2744-2750.

Rousseau, K., Aroua, S., and Dufour, S. (2011). Eel secondary metamorphosis: silvering. In: Metamorphosis in Fish, eds. D. S, R. K, and K. BG, Jersey: Science Publishers.

S

Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Goto, Y., Jin, J., Sawai, K., and Hashizume, T. (2012). Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. Anim Sci J 83, 487-492.

Sawyer, I., Smillie, S.J., Bodkin, J.V., Fernandes, E., O'Byrne, K.T., and Brain, S.D. (2011). The vasoactive potential of kisspeptin-10 in the peripheral vasculature. PLoS One 6, e14671.

Sbaihi, M., Fouchereau-Peron, M., Meunier, F., Elie, P., Mayer, I., Burzawa-Gerard, E., Vidal, B., and Dufour, S. (2001). Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the Europe eel. Journal of Fish Biology 59, 302-318.

Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M., Debeljuk, L., and White, W.F. (1971). Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science 173, 1036-1038.

Schmidt, J. (1922). The breeding places of the eel. Phil Trans R Soc London 211, 179-208.

Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Le Belle, N., Elie, P., and Dufour, S. (2005). Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. Neuroendocrinology 81, 107-119.

Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J., and Bogerd, J. (2001). Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 129, 407-417.

Seidah, N.G. (2011). What lies ahead for the proprotein convertases? Ann N Y Acad Sci 1220, 149-161.

Selvaraj, S., Kitano, H., Amano, M., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., and Matsuyama, M. (2012). Increased expression of kisspeptin and GnRH forms in the brain of scombroid fish during final ovarian maturation and ovulation. Reprod Biol Endocrinol 10, 64.

Selvaraj, S., Kitano, H., Fujinaga, Y., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., and Matsuyama, M. (2010). Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (Scomber japonicus) during different gonadal stages. Gen Comp Endocrinol 169, 28-38.

Seminara, S.B., Dipietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, W.F., and Plant, T.M. (2006). Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications. Endocrinology 147, 2122-2126.

Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Aparicio, S.A., and Colledge, W.H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 349, 1614-1627.

Servili, A., Le Page, Y., Leprince, J., Caraty, A., Escobar, S., Parhar, I.S., Seong, J.Y., Vaudry, H., and Kah, O. (2011). Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. Endocrinology 152, 1527-1540.

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., and Plant, T.M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 2129-2134.

Shahjahan, M., Motohashi, E., Doi, H., and Ando, H. (2010). Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. Gen Comp Endocrinol 169, 48-57.

Shi, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, Q., Lu, D., Liu, M., Meng, Z., Cheng, C.H., Liu, X., and Lin, H. (2010a). Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function

during 17alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, Epinephelus coioides. Biol Reprod 83, 63-74.

Shimizu, Y., Tomikawa, J., Hirano, K., Nanikawa, Y., Akazome, Y., Kanda, S., Kazeto, Y., Okuzawa, K., Uenoyama, Y., Ohkura, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Gen, K., Oka, Y., and Yamamoto, N. (2012). Central distribution of kiss2 neurons and peri-pubertal changes in their expression in the brain of male and female red seabream Pagrus major. Gen Comp Endocrinol 175, 432-442.

Silveira, L.G., Noel, S.D., Silveira-Neto, A.P., Abreu, A.P., Brito, V.N., Santos, M.G., Bianco, S.D., Kuohung, W., Xu, S., Gryngarten, M., Escobar, M.E., Arnhold, I.J., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B., and Latronico, A.C. (2010). Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. J Clin Endocrinol Metab 95, 2276-2280.

Silvestre, R.A., Egido, E.M., Hernandez, R., and Marco, J. (2008). Kisspeptin-13 inhibits insulin secretion without affecting glucagon or somatostatin release: study in the perfused rat pancreas. J Endocrinol 196, 283-290.

Simonneaux, V., Bur, I., Ancel, C., Ansel, L., and Klosen, P. (2012). A kiss for daily and seasonal reproduction. Prog Brain Res 199, 423-437.

Smith, J.T., Acohido, B., Clifton, D., and Steiner, R. (2006). KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. J Neuroendocrinol 18, 298-303.

Smith, J.T. (2012). The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. Domest Anim Endocrinol 43, 75-84.

Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., and Clarke, I.J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. Endocrinology 148, 1150-1157.

Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J., and Lehman, M.N. (2008a). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. Endocrinology 149, 5770-5782.

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, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., and Clarke, I.J. (2011). Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. Endocrinology 152, 1001-1012.

Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, R.P., and Clarke, I.J. (2008b). Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. Endocrinology 149, 1951-1959.

Stamatakis, A., and Ott, M. (2008). Efficient computation of the phylogenetic likelihood function on multi-gene alignments and multi-core architectures. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 363, 3977-3984.

Stone, R. (2003). Ecology. Freshwater eels are slip-sliding away. Science 302, 221-222.

Sun, Y., Tian, Z., Zhao, H., Wong, S., and Chen, B. (2007). Characteristic of hypothalamic kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats. Neurosci Lett 420, 12-17.

Suzuki, S., Kadokawa, H., and Hashizume, T. (2008). Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. Anim Reprod Sci 103, 360-365.

SÄbert, M.E., AmÄrand, A., Vettier, A., Weltzien, F.A., Pasqualini, C., SÄbert, P., and Dufour, S. (2007). Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary-gonad axis in the European eel, Anguilla anguilla (L.). Gen Comp Endocrinol 153, 289-298.

SÄbert, M.E., Legros, C., Weltzien, F.A., Malpaux, B., Chemineau, P., and Dufour, S. (2008). Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. J. Neuroendocrinol. 20, 917-929.

SÄbert, P., Scaion, D., and Belhomme, M. (2009). High hydrostatic pressure improves the swimming efficiency of European migrating silver eel. Respir Physiol Neurobiol 165, 112-114.

T

Teles, M.G., Bianco, S.D., Brito, V.N., Trarbach, E.B., Kuohung, W., Xu, S., Seminara, S.B., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B., and Latronico, A.C. (2008). A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med 358, 709-715.

Tena-Sempere, M., Felip, A., Gomez, A., Zanuy, S., and Carrillo, M. (2012). Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. Gen Comp Endocrinol 175, 234-243.

Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Hattori, M., Nishimura, A., Ohtaki, T., and Shintani, Y. (2004). Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. Biochim Biophys Acta 1678, 102-110.

Thompson, E., Patterson, M., Murphy, K., Smith, K., Dhillo, W., Todd, J., Ghatei, M., and Bloom, S. (2004). Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. J Neuroendocrinol 16, 850-858.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic. Acids. Res. 22, 4673-4680.

Tomikawa, J., Homma, T., Tajima, S., Shibata, T., Inamoto, Y., Takase, K., Inoue, N., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Maeda, K., and Tsukamura, H. (2010). Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig. Biol Reprod 82, 313-319.

Tomita, K., Niida, A., Oishi, S., Ohno, H., Cluzeau, J., Navenot, J.M., Wang, Z.X., Peiper, S.C., and Fujii, N. (2006). Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists. Bioorg Med Chem 14, 7595-7603.

Topaloglu, A.K., Tello, J.A., Kotan, L.D., Ozbek, M.N., Yilmaz, M.B., Erdogan, S., Gurbuz, F., Temiz, F., Millar, R.P., and Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. N Engl J Med 366, 629-635.

Torricelli, M., Galleri, L., Voltolini, C., Biliotti, G., Florio, P., De Bonis, M., and Petraglia, F. (2008). Changes of placental Kiss-1 mRNA expression and maternal/cord kisspeptin levels at preterm delivery. Reprod Sci 15, 779-784.

Tostivint, H. (2011). Evolution of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene family in relation to vertebrate tetraploidizations. Gen Comp Endocrinol 170, 575-581.

Tovar, S., Vazquez, M., Navarro, V., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J., Vigo, E., Roa, J., Casanueva, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., and Tena-Sempere, M. (2006). Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. Endocrinology 147, 2696-2704.

Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Natale, G.S., Pauli, B., Wignall, J., Jackman, P., Doe, K., and Schueler, F.W. (2010). Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. Reprod Biol Endocrinol 8, 36.

Tsai, P.S., and Zhang, L. (2008). The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. Biol Reprod 79, 798-805.

Tsutsui, K., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., Osugi, T., Seong, J.Y., and Vaudry, H. (2010). Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. J Neuroendocrinol 22, 716-727.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., and Sharp, P.J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. Biochem Biophys Res Commun 275, 661-667.

Tsutsui, K., and Ukena, K. (2006). Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. Peptides 27, 1121-1129.

U

Ukena, K., Koda, A., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Iwakoshi-Ukena, E., Minakata, H., Kikuyama, S., and Tsutsui, K. (2003). Novel neuropeptides related to frog growth hormone-releasing peptide: isolation, sequence, and functional analysis. Endocrinology 144, 3879-3884.

Ukena, K., Vaudry, H., Leprince, J., and Tsutsui, K. (2011). Molecular evolution and functional characterization of the orexigenic peptide 26RFa and its receptor in vertebrates. Cell Tissue Res 343, 475-481.

Um, H.N., Han, J.M., Hwang, J.I., Hong, S.I., Vaudry, H., and Seong, J.Y. (2010). Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. Ann N Y Acad Sci 1200, 67-74.

V

van Aerle, R., Kille, P., Lange, A., and Tyler, C.R. (2008). Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. Peptides 29, 57-64.

Van de Peer, Y., Maere, S., and Meyer, A. (2010). 2R or not 2R is not the question anymore. Nat Rev Genet 11, 166.

van Ginneken, V., Dufour, S., Sbaihi, M., Balm, P., Noorlander, K., de Bakker, M., Doornbos, J., Palstra, A., Antonissen, E., Mayer, I., and van den Thillart, G. (2007). Does a 5500-km swim trial stimulate early sexual maturation in the European eel (Anguilla anguilla L.)? Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 147, 1095-1103.

Veenstra, J.A. (2010). Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of Lottia gigantea, with reference to other mollusks and insects. Gen Comp Endocrinol 167, 86-103.

Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, Y.H., Halpern, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C., Strausberg, R.L., and Brenner, S. (2007). Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (Callorhinchus milii) genome. PLoS Biol 5, e101.

Vidal, B., Pasqualini, C., Le Belle, N., Holland, M.C., Sbaihi, M., Vernier, P., Zohar, Y., and Dufour, S. (2004). Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. Biol Reprod 71, 1491-1500.

Vikman, J., and Ahren, B. (2009). Inhibitory effect of kisspeptins on insulin secretion from isolated mouse islets. Diabetes Obes Metab 11 Suppl 4, 197-201.

W

Wagner, G., Johnston, J., Clarke, I., Lincoln, G., and Hazlerigg, D. (2008). Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. Endocrinology 149, 32-39.

Walker, R.J., Papaioannou, S., and Holden-Dye, L. (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoa. Invert Neurosci 9, 111-153.

Weltzien, F.A., Pasqualini, C., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., and Dufour, S. (2005). Brain expression of tyrosine hydroxylase and its regulation by steroid hormones in the European eel quantified by real-time PCR. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1040, 518-520.

West, A., Vojta, P.J., Welch, D.R., and Weissman, B.E. (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). Genomics 54, 145-148.

Y

Yang, B., Jiang, Q., Chan, T., Ko, W.K., and Wong, A.O. (2010). Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. Gen Comp Endocrinol 165, 60-71.

Zhang, C., Roepke, T.A., Kelly, M.J., and Ronnekleiv, O.K. (2008a). Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. J Neurosci 28, 4423-4434.

Z

Zhang, L., Tello, J.A., Zhang, W., and Tsai, P.S. (2008b). Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, Aplysia californica. Gen Comp Endocrinol 156, 201-209.

Zmora, N., Stubblefield, J., Zulperi, Z., Biran, J., Levavi-Sivan, B., Munoz-Cueto, J.A., and Zohar, Y. (2012a). Differential and Gonad Stage-Dependent Roles of Kisspeptin1 and Kisspeptin2 in Reproduction in the Modern Teleosts, Morone Species. Biol Reprod 86, 177

Zohar, Y., Munoz-Cueto, J.A., Elizur, A., and Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen Comp Endocrinol 165, 438-455.