



HAL
open science

Implication du système circadien dans la fonction de reproduction chez la souris femelle

David Chassard

► **To cite this version:**

David Chassard. Implication du système circadien dans la fonction de reproduction chez la souris femelle. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT: 2015STRAJ060 . tel-01377209

HAL Id: tel-01377209

<https://theses.hal.science/tel-01377209>

Submitted on 6 Oct 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE : ED414
CNRS

THÈSE présentée par :
David CHASSARD

soutenue le : **15 octobre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Implication du système circadien dans la
fonction de reproduction chez la souris femelle**

THÈSE dirigée par :

Mme SIMONNEAUX Valérie DR, université de Strasbourg

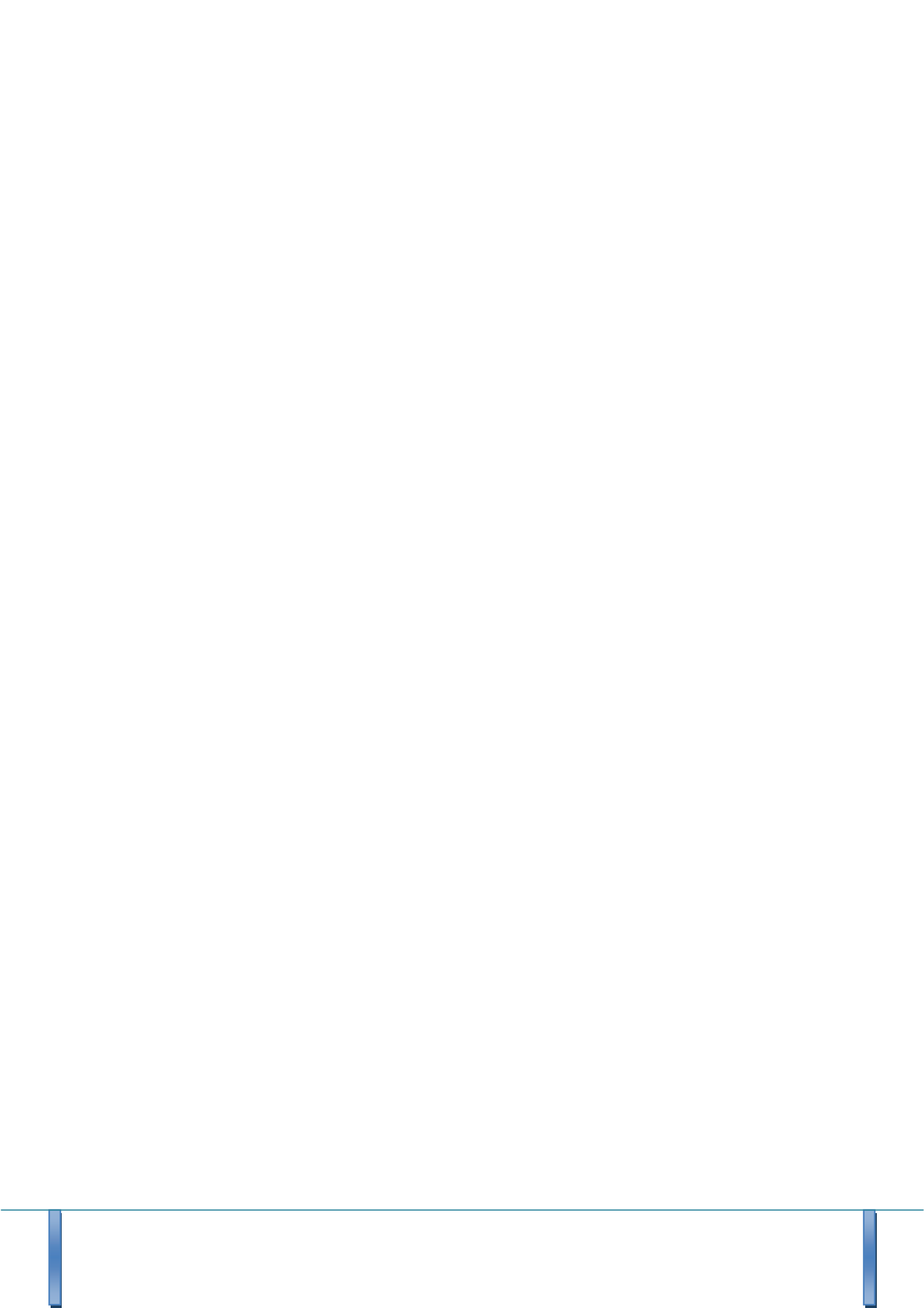
RAPPORTEURS :

Mr. BELTRAMO Massimiliano DR, INRA, Tours

Mr. BONNEFONT Xavier HDR, CNRS Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. DARBON Pascal HDR, université de Strasbourg



REMERCIEMENTS



Je voudrais remercier en premier lieu Valérie Simonneaux de m'avoir encadré. Merci pour ton optimisme. Tu as toujours su voir le bon côté des choses dans les moments difficiles. Et je peux dire que cette thèse a été difficile pour moi...

En deuxième lieu, je voudrais remercier Isabelle Bur-Pivert, pour m'avoir légué ce super projet. Merci pour les bons moments passés ensemble, j'en garderai de très bon souvenirs. Tu es celle qui m'a redonné la foi.

Merci à Jorge Mendoza, pour nos conversations scientifiques ou non. Merci pour tes conseils et ton aide dans l'exécution des différentes techniques.

Merci à Patrick Vuillez pour nos débats intéressants autour de cafés !

Merci à Marie-Paule Felder pour ta gentillesse, ton attitude toujours à l'écoute. Merci à Etienne Challet pour tes conseils ("Monsieur")

Merci à toute mon équipe pour l'aide que vous m'avez apportée dans la réalisation de mon projet. (Béatrice, Thibault, Sébastien, Marie-Pierre, François, Paul, Jo, Rajae, Matthew, VJ, Christina)

Merci à toute l'unité NBR pour vos questions et commentaires durant mes présentations orales.

Merci à toute l'équipe du Chronobiotron pour le soin prodigué à mes petites souris.

Je remercie également tous les amis que j'ai pu rencontrer durant cette thèse, avec qui j'ai passé de bons moments au labo ou en dehors. Aussi bien avec les Doctoneuros dans le froid qu'en vendant des Choconeuros pour le Téléthon, sans oublier les rencontres du vendredi soir: JBS, Mio, Vy, Christina, Jo, Rajae, Hanan, Caroline, Coco, Cathy, Didith, Ouafaa, Julien, Anaïs, Marion, Elise, Sébastien, Joseph, Antoine, Laetitia, Alex, Popo, LioneLeuh, Arnaud, Patoche et tous ceux que j'aurais pu oublier...

Malgré quelques moments chaotiques durant ma thèse, certaines personnes m'ont beaucoup soutenu et ont une place toute particulière dans mon cœur : Anaïs (on est frère et sœur de dyslexie), Annie (alias Mamie Tu), Patoche (et le Moki), Jordane (Alias J, t'es un chic type) et Emilio (ne casse plus de tasse).

Merci à Poukette, Papa et Mamie Tu d'avoir pris le temps de relire mon manuscrit.

Un ENORME merci à ma Poukette, ma future femme, qui m'a supporté durant ces derniers mois. Sans elle, je ne serais pas là. Merci pour toutes tes attentions et ton soutien.

Merci à ma Maman et mon Papa, qui m'ont toujours épaulé dans toutes les décisions que j'ai pu prendre. Qui croient en moi.



SOMMAIRE



Sommaire

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| Physiologie de la reproduction chez la femelle | 3 |
| Généralités | 3 |
| Les cycles ovariens: estrien / menstruel | 3 |
| <i>Caractéristiques des cycles ovariens.....</i> | <i>4</i> |
| <i>Terminologie des cycles ovariens.....</i> | <i>4</i> |
| <i>Durée des cycles.....</i> | <i>8</i> |
| <i>Les cycles au cours de la vie.....</i> | <i>8</i> |
| <i>Régulation neuro-endocrinienne des cycles ovariens.....</i> | <i>10</i> |
| <i>Pic de LH/Ovulation s'inscrivent dans une régulation temporelle/endocrinienne</i> | <i>12</i> |
| Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique | 13 |
| Neurones à GnRH | 13 |
| <i>Terminologie et historique.....</i> | <i>13</i> |
| <i>Localisation anatomique</i> | <i>13</i> |
| <i>Transcription et traduction.....</i> | <i>14</i> |
| <i>Récepteur GnRH-R</i> | <i>16</i> |
| <i>Efférences</i> | <i>18</i> |
| <i>Afférences des neurones à GnRH.....</i> | <i>18</i> |
| <i>Pulsatilité des neurones à GnRH.....</i> | <i>19</i> |
| <i>Pic pré-ovulatoire de GnRH.....</i> | <i>20</i> |
| Adénohypophyse - LH / FSH - | 22 |
| <i>Localisation anatomique</i> | <i>23</i> |
| <i>Transcription et traduction.....</i> | <i>23</i> |
| <i>Rôle des FSH et LH</i> | <i>26</i> |
| Les gonades femelles | 27 |
| <i>Anatomie de l'appareil génital femelle.....</i> | <i>27</i> |
| <i>Evènements cellulaires ovariens : la maturation folliculaire</i> | <i>28</i> |
| <i>Ovulation</i> | <i>30</i> |
| <i>La fonction lutéale</i> | <i>32</i> |
| <i>Les hormones sexuelles.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Régulation de la stéroïdogénèse sexuelle.....</i> | <i>36</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Rôle de l'œstrogènes dans la reproduction</i> | 37 |
| <i>Récepteur aux estrogènes</i> | 38 |
| <i>Rétrocontrôle des hormones sexuelles sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire</i> .. | 39 |
| Kisspeptine | 41 |
| <i>Découverte des Kisspeptines</i> | 41 |
| <i>Transcription et traduction</i> | 43 |
| <i>Récepteur kiss1R ou GPR54</i> | 44 |
| <i>Localisation de Kiss1 chez les rongeurs</i> | 45 |
| <i>Localisation de Kiss1R chez les rongeurs</i> | 47 |
| <i>Fonction des Kisspeptines : Invasion trophoblastique</i> | 48 |
| <i>Fonction des Kisspeptines : Mise en place de la puberté</i> | 48 |
| <i>Fonction des Kisspeptines: Activation des neurones à GnRH</i> | 49 |
| <i>Neurones à Kp de l'ARC : Intermédiaire du rétrocontrôle négatif des œstrogènes</i> | 50 |
| <i>Neurones à Kp de l'AVPV : intermédiaire du rétrocontrôle positif des œstrogènes</i> | 51 |
| <i>ARC versus AVPV</i> | 52 |
| <i>ARC contrôle la pulsativité des neurones à GnRH</i> | 52 |
| <i>AVPV contrôle la survenue du pic de LH de manière circadienne</i> | 54 |
| Système Circadien | 55 |
| Les rythmes biologiques | 55 |
| <i>Il était une fois les rythmes biologiques</i> | 55 |
| <i>Terminologie</i> | 58 |
| <i>Propriété d'une horloge circadienne</i> | 58 |
| Fonctionnement du système circadien | 61 |
| <i>Le mécanisme moléculaire à la base du système circadien : l'horloge moléculaire</i> | 61 |
| <i>Boucle positive : Bmal1 et Clock</i> | 61 |
| <i>Boucle négative : Per et Cry</i> | 62 |
| <i>Boucles secondaires</i> | 63 |
| <i>Régulation des boucles</i> | 64 |
| <i>Sortie de la boucle</i> | 64 |
| Organisation du système circadien multioscillant | 66 |
| Les noyaux suprachiasmatiques | 66 |
| <i>Localisation</i> | 66 |

| | |
|---|------------|
| <i>Structure</i> | 67 |
| <i>Fonctionnement circadien endogène de l'horloge principale : les découvertes historiques</i> | 68 |
| <i>Entraînement par la lumière</i> | 68 |
| <i>Les efférences des noyaux suprachiasmatiques</i> | 71 |
| <i>Distribution de la rythmicité</i> | 72 |
| Oscillateurs périphériques | 75 |
| <i>Le concept de système multi-oscillant</i> | 75 |
| <i>Concept du chef d'orchestre</i> | 77 |
| <i>Que se passe t-il quand on enlève le chef d'orchestre ?</i> | 78 |
| Le rôle du système circadien dans la fonction de reproduction chez la femelle | 79 |
| <i>Les noyaux suprachiasmatiques</i> | 79 |
| <i>Les neurones à GnRH</i> | 82 |
| <i>L'adénohypophyse</i> | 84 |
| <i>Les ovaires</i> | 84 |
| <i>Utérus et oviductes</i> | 85 |
| La fonction de reproduction : un système multi-oscillant | 86 |
| PROBLEMATIQUE | 87 |
| Les neurones à Kisspeptines de l'AVPV : partie intégrante du système circadien multi-oscillant contrôlant la temporalité du pic pré-ovulatoire de LH ? | 89 |
| METHODOLOGIE | 91 |
| L'hybridation in situ | 93 |
| <i>Principe de la technique</i> | 93 |
| Immunohistochimie | 94 |
| <i>Principe de la technique</i> | 94 |
| La bioluminescence | 95 |
| <i>Les souris PER2::LUCIFERASE</i> | 95 |
| <i>Analyse via Lumicycle Analysis</i> | 98 |
| RESULTATS | 101 |
| Résumé | 103 |
| CONCLUSION | 117 |
| DISCUSSION | 123 |
| PERSPECTIVES | 123 |

| | |
|---|------------|
| <i>Rythme journalier de Kisspeptine dans l'AVPV : libération ?</i> | 125 |
| <i>Action de la vasopressine sur le rythme de Kp</i> | 126 |
| <i>Action de la vasopressine sur l'horloge secondaire</i> | 127 |
| <i>Action des NSC sur l'horloge secondaire de l'AVPV</i> | 130 |
| <i>Rôle de l'horloge secondaire dans les neurones à Kisspeptine de l'AVPV sur la fonction de reproduction</i> | 131 |
| <i>Les espèces diurnes</i> | 132 |
| <i>Le travail posté et les troubles de la fertilité</i> | 134 |
| <i>Modélisation de travail posté chez des rongeurs</i> | 135 |
| BIBLIOGRAPHIE | 138 |

TABLE
DES MATIERES
DES FIGURES



| Figure | Titre | Page |
|---------------|---|-------------|
| 1 | <i>Analyse cytologique des frottis vaginaux de souris</i> | 6 |
| 2 | <i>Représentation schématique du cycle menstruel</i> | 7 |
| 3 | <i>Régulation de l'axe gonadotrope chez les rongeurs femelles</i> | 11 |
| 4 | <i>Distribution des neurones à GnRH chez le rat</i> | 14 |
| 5 | <i>Le décapeptide GnRH I</i> | 15 |
| 6 | <i>structure du gène de la GnRH chez les mammifères</i> | 16 |
| 7 | <i>structure du récepteur de la GnRH humain</i> | 17 |
| 8 | <i>Immunomarquage GnRH montrant les terminaisons nerveuses</i> | 18 |
| 9 | <i>Libération pulsatile de GnRH et LH chez un singe ovariectomisé</i> | 19 |
| 10 | <i>Pattern de décharge des neurones à GnRH</i> | 20 |
| 11 | <i>Pulsatilité GnRH/LH conditionnée par les taux d'E2. Corrélation directe entre pulses de GnRH et pulses de LH</i> | 21 |
| 12 | <i>Les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse stimulé par les neurones à GnRH</i> | 23 |
| 13 | <i>La fréquence des pulses de GnRH conditionne la transcription des sous unités LH β et FSH β</i> | 24 |
| 14 | <i>Cycle de sécrétion et synthèse de LH FSH au sein d'une cellule</i> | 25 |

| | | |
|-----------|--|--------------|
| | <i>gonadotrophe au cours du cycle estrien</i> | |
| 15 | <i>Appareil génital femelle</i> | 27 |
| 16 | <i>Coupe d'un ovaire et cycle ovarien</i> | 28 |
| 17 | <i>Développement folliculaire</i> | 29 |
| 18 | <i>Expulsion de l'ovocyte par le follicule mature</i> | 30 |
| 19 | <i>Schéma explicatif de l'expulsion de l'ovocyte par le follicule mature</i> | 31 |
| 20 | <i>Cycle stérane</i> | 33 |
| 21 | <i>Voie de synthèse des stéroïdes sexuels</i> | 35 |
| 22 | <i>Effets des hormones gonadotropes sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et de la thèque</i> | 37 |
| 23 | <i>Voies de signalisation de l'estradiol</i> | 38-39 |
| 24 | <i>Visualisation des organes reproductions chez des souris male et femelle Kiss1r -/-</i> | 42 |
| 25 | <i>Transcription et traduction issue du gène Kiss1</i> | 43 |
| 26 | <i>Signalisation du récepteur GPR54</i> | 44 |
| 27 | <i>Distribution de l'ARNm Kiss1 chez la souris</i> | 45 |
| 28 | <i>Différence sexe dépendant du nombre moyen de neurones à Kiss1 dans l'ARC et l'AVPV chez des souris males et femelles Gonadoectomisés(GDX)</i> | 46 |
| 29 | <i>Distribution de Kiss1R après hybridation in situ</i> | 47 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| | | |
| 30a | <i>Courbe dose réponse de Kisspeptine sur la sécrétion de LH et FSH.</i> | 49 |
| 30b | <i>Enregistrement de la réponse d'un neurone à GnRH suite à l'application de 100nM de Kp-10</i> | 50 |
| 31 | <i>Régulation des Kisspeptines chez la femelle en fonction des taux d'E2</i> | 51 |
| 32 | <i>Modèle des neurones KNDy de l'ARC contrôlant la pulsativité des neurones à GnRH</i> | 53 |
| 33 | <i>Modèle d'intégration des messages oestrogénique et temporel dans la survenue du pic de LH</i> | 54 |
| 34a | <i>Modélisation de l'expérience de Jean-Jacques Dortous de Mairan sur le Mimosa pudica placé en LD et en DD</i> | 55 |
| 34b | <i>Extrait des expériences de Jean-Jacques Dortous de Mairan</i> | 56 |
| 35 | <i>Représentation de l'activité locomotrice sous forme d'actogramme d'une souris placée en LD puis en DD</i> | 57 |
| 36 | <i>Modèle d'une horloge biologique</i> | 59 |
| 37 | <i>Expression des gènes horloges dans les noyaux suprachiasmatiques au cours du temps</i> | 62 |
| 38 | <i>Modèle de régulation transcriptionnelle/traductionnelle des gènes horloges</i> | 63 |
| 39 | <i>Coupe coronale de cerveau de souris</i> | 66 |
| 40 | <i>Représentation anatomo-chimique des noyaux suprachiasmatiques</i> | 67 |
| 41 | <i>Intégration de la lumière par la rétine et son intégration au niveau des</i> | 69 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| | <i>noyaux suprachiasmatiques</i> | |
| 42 | <i>Modèle de synchronisation interne des noyaux suprachiasmatiques</i> | 70 |
| 43 | <i>Efférences des noyaux suprachiasmatiques</i> | 72 |
| 44 | <i>Distribution des rythmes via les gènes de sorties de l'horloge: le cas de la vasopressine</i> | 73 |
| 45 | <i>Synchronisation des fonctions biologiques sur 24h par les noyaux suprachiasmatiques</i> | 74 |
| 46 | <i>Présence d'oscillations circadiennes de différents type cellulaires</i> | 76 |
| 47 | <i>Synchronisation des différentes horloges périphériques par les noyaux suprachiasmatiques</i> | 77 |
| 48 | <i>Désynchronisation des horloges périphériques en absence fonctionnelle des noyaux suprachiasmatiques</i> | 78 |
| 49 | <i>Cycle estrien chez des souris WT et Cry -/-</i> | 80 |
| 50 | <i>Profil plasmatique de LH chez des souris OVX+E2</i> | 80 |
| 51 | <i>Appositions AVPerigiques des NSC sur les neurones à Kp de l'AVPV</i> | 81 |
| 52 | <i>Circadien de l'expression de l'ARNm de GPR54, et de la libération de GnRH</i> | 83 |
| 53 | <i>Fonction de reproduction, un système multi-oscillant</i> | 87 |
| 54 | <i>Représentation schématique du contrôle de la temporalité du pic de LH.</i> | 89 |
| 55 | <i>Principe de l'hybridation <i>in situ</i> de l'ARNm Kiss1 non radioactif</i> | 93 |
| 56 | <i>Principe d'une réaction immunohistochimique indirecte</i> | 94 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 57 | <i>Principe de la bioluminescence avec les souris PER2::LUCIFERASE</i> | 95 |
| 58 | <i>Le Lumicycle</i> | 96 |
| 59 | <i>Les paramètres d'une oscillation</i> | 97 |
| 60 | Représentation d'une avance et retard de phase | 98 |
| 61 | <i>Fenêtre d'analyse via le logiciel Lumicycle Analysis</i> | 99 |
| 62 | Un système multi-oscillant pilotant la survenue du pic de LH | 121 |
| 63 | <i>Modélisation de l'expérience d'injection ICV d'agoniste/antagoniste vasopressinergique et sa conséquence sur l'expression de Kisspeptine</i> | 127 |
| 64 | <i>Modélisation de l'expérience d'injection ICV d'agoniste vasopressinergique et sa conséquence sur l'expression de la protéine horloge PER1 dans les neurones à Kp.</i> | 128 |
| 65 | <i>Modélisation de l'expérience concernant l'effet de la vasopressine sur les oscillations circadiennes de PER2 dans l'aire antéroventrale périventriculaire</i> | 128 |
| 66 | <i>Modélisation d'un système de flux continu pour le Lumicycle</i> | 129 |
| 67 | <i>Modélisation de l'expérience concernant l'effet des noyaux suprachiasmatiques sur les oscillations circadiennes de PER2 dans l'aire antéroventrale périventriculaire</i> | 130 |
| 68 | <i>Modélisation de l'invalidation fonctionnelle de l'oscillateur périphérique présent dans les neurones à Kisspeptine de l'aire antéroventrale périventriculaire</i> | 131 |
| 69 | <i>Arvicanthis Ansoergei</i> | 132 |
| 70 | <i>Modélisation du travail posté pour les rongeurs</i> | 135 |

Table des matières des tableaux

| Tableau | Titre | Page |
|----------------|--|-------------|
| 1 | <i>Quatre phases du cycle estrien chez la souris</i> | 5 |
| 2 | <i>Caractéristiques chronologiques des cycles sexuels de plusieurs mammifères</i> | 8 |
| 3 | <i>Mise en place de la puberté et type de cycle ovarien chez plusieurs espèces</i> | 9 |
| 4 | <i>Actions de la GnRH en dehors de la pituitaire</i> | 17 |
| 5 | Les cellules hypophysaires | 22 |
| 6 | <i>Les différents rythmes biologiques</i> | 58 |
| 7 | Les paramètres mesurable pour les oscillations circadiennes des gènes horloge | 97 |

ABBREVIATIONS



| | |
|------------------|---|
| AA | Acide aminé |
| ACTH | Adrénocorticotrophine |
| AMPC | Adénosine monophosphate cyclique |
| ARC | Noyau Arqué |
| AVPV | Aire antéroventrale périventriculaire |
| bHIH | Basic helix-loop-helix |
| BMAL1 | Brain and Muscle ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)-like |
| CaMK | Calcium/calmodulin-protein Kinases |
| c-Fos | Facteur de transcription précoce |
| CLOCK | Circadian Locomotor Output Cycles Kaput |
| CRE | cAMP Response Element |
| CREB | CRE Binding Protein |
| CRH | Corticolibérine |
| Cry | Cryptochrome |
| CT | Circadian Time |
| DAG | Diacylglycérol |
| DBP | D element-binding protein |
| DD | Dark/Dark (obscurité constante) |
| DMH | Hypothalamus dorsomédial |
| E2 | Œstrogène |
| ER | Récepteur à l'œstrogène |
| ERE | Estrogen response element |
| FSH | Hormone stimulant la folliculogénèse |
| GABA | Acide γ -aminobutyrique |
| GH/GF | Growth Hormone |
| GnRH | Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaire |
| GnRH-R | Récepteur au GnRH |
| GRP | Gastrin-releasing peptide |
| HHG | Axe hypothalamo-hypophysaire gonadique |
| ICV | Intra-cérébroventriculaire |
| IP3 | Inositol triphosphate |
| Kiss1-R GPR54 | Récepteur de kisspeptine |
| KNDY | Kisspeptine / Neurokinine B / Dynorphine |
| KO | Knock out |
| Kp | Kisspeptine |
| LCR | Liquide Céphalo-Rachidien |
| LD | alternance Lumière/Obscurité |
| LDL | Low Density Lipoprotéine |
| LH | Hormone Lutéinisante |
| NSC | Noyaux Suprachiasmatiques |
| OC | Chiasma Optique |
| OVL | Organe Vasculaire de la Lame Terminale |
| OVX | Ovariectomisée |
| PACAP | Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide |
| PAS | Per Arnt Sim |
| Per | Period |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate |
| PKC | Protéine Kinase C |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| PLC | Phospholipase C |
| POA | Aire préoptique |
| PRL | Prolactine |
| PVN | Noyaux Paraventriculaires |
| RCPG | Récepteur Couplé à une Protéine G |
| RFamides | Arg-Phe-amides |
| TRH | Thyréolibérine |
| TSH | Thyréostimuline |
| VIP | Peptide Vasoactif Intestinal |
| WT | Wild Type |
| ZT | Zeitgeber Time |



INTRODUCTION

Physiologie de la reproduction chez la femelle

Généralités

La reproduction se définit par l'ensemble des processus par lesquels les différentes espèces se perpétuent, en générant la naissance de nouveaux êtres vivants. Comme la nutrition et la croissance, c'est une activité fondamentale partagée par toutes les espèces vivantes. Tous les êtres vivants doivent posséder un système de reproduction efficace, sans quoi ils sont amenés à leur extinction. Ainsi, la reproduction est la pierre angulaire de la perpétuation des espèces dans le temps.

La reproduction dite "sexuée" faisant référence à la rencontre d'individus de types sexuels différents, est assurée par la fécondation, exprimée par la fusion des gamètes mâle et femelle. Cette dernière donne lieu à la génération d'une cellule œuf, ou appelé zygote. Chez les souris, les gamètes mâle et femelle correspondent respectivement aux spermatozoïdes et ovocytes. L'activité reproductrice chez les mammifères femelles est un phénomène cyclique, qui aboutit à l'ovulation. Si il n'y a pas de fécondation le cycle recommence.

Les cycles ovariens: estrien / menstruel

Chez la plupart des mammifères, l'ovulation est spontanée et cyclique c'est à dire qu'elle a lieu en l'absence de mâles à des intervalles de temps réguliers, caractéristiques de l'espèce.

Il existe deux types de cycles:

- le cycle estrien: caractérisé par l'apparition d'un comportement d'acceptation du mâle, appelé également comportement d'oestrus présent par exemple chez la souris.
- le cycle menstruel: caractérisé par l'apparition périodique d'un saignement utérin appelée menstruation présent par exemple chez la Femme.

Les débuts de ces deux cycles sont définis respectivement par l'apparition de l'oestrus et de la menstruation. L'ovulation apparaît en début du cycle oestrien, alors qu'elle sera présente au milieu du cycle menstruel.

Par opposition aux espèces à ovulation spontanée, il existe des mammifères par exemple chez les lagomorphes (comme le lièvre et le lapin), où l'ovulation est provoquée par des stimuli tactiles lors de l'accouplement (1). Chez ces espèces, seules les variations de concentrations plasmatiques en stéroïdes ovariens traduisent celles de l'activité ovarienne et permettent d'identifier les cycles de croissance folliculaire.

Caractéristiques des cycles ovariens

En 1900, Heape est la première personne à avoir employé le terme "Oestrus" (en grec oistros), pour désigner la période d'acceptation du mâle. Il a décrit les différentes phases du cycle pendant la période d'activité sexuelle en utilisant le suffixe oestrus et les préfixes - di - pro - met.

Terminologie des cycles ovariens

Le cycle estrien se caractérise par la succession de 4 stades:

- *Diestrus*: période durant laquelle se fait le recrutement des follicules et la croissance de ces derniers.
- *Proestrus*: période qui précède l'oestrus, correspondant à la croissance folliculaire terminale.
- *Oestrus*: période d'acceptation du mâle, de l'accouplement et de l'ovulation.
- *Metestrus*: période durant laquelle se forment les corps jaunes à partir des follicules qui ont ovulés. En l'absence de fécondation, les corps jaunes régressent progressivement.

Ces stades du cycle estrien possèdent chacun des particularités anatomiques visualisables de façon macro et microscopique permettant de les distinguer les uns des autres . Elles sont particulièrement bien établies chez la souris([voir Tableau 1 + figure 1](#)).

| Phases | Durée en heures | Vulve | Vagin | Frottis vaginal | Modifications de l'utérus | Modifications des ovaires et des oviductes |
|------------------|-----------------|---|-------|--|--|---|
| Oestrus | 12 à 14 | Œdème de la vulve, dilatée de couleur plus claire | | Cellules cornées en amas | Gonflement important Activité glandulaire élevée | Follicules > 550µm Ovulation Oviducte dilaté |
| Métestrus | 24 à 48 | Oedème de la vulve, sèche | | Cellules cornées et leucocytes | Gonflement Activité glandulaire modérée | Corps jaune Ovules dans l'oviducte puis l'utérus |
| Diestrus | 36 à 72 | Vulve fermée de couleur pâle, humide | | Prédominance de leucocytes | Taille minimum Activité glandulaire absente | Croissance rapide de follicules |
| Proestrus | 24 à 36 | Vulve de couleur rosée à rouge, humide et dilatée | | Cellules épithéliales nucléées et leucocytes | Gonflement, Hyperthermie Activité glandulaire modérée | Follicules > 380µm |

Tableau 1: Les quatre phases du cycle estrien chez la souris et leurs caractéristiques anatomiques.(2-8)

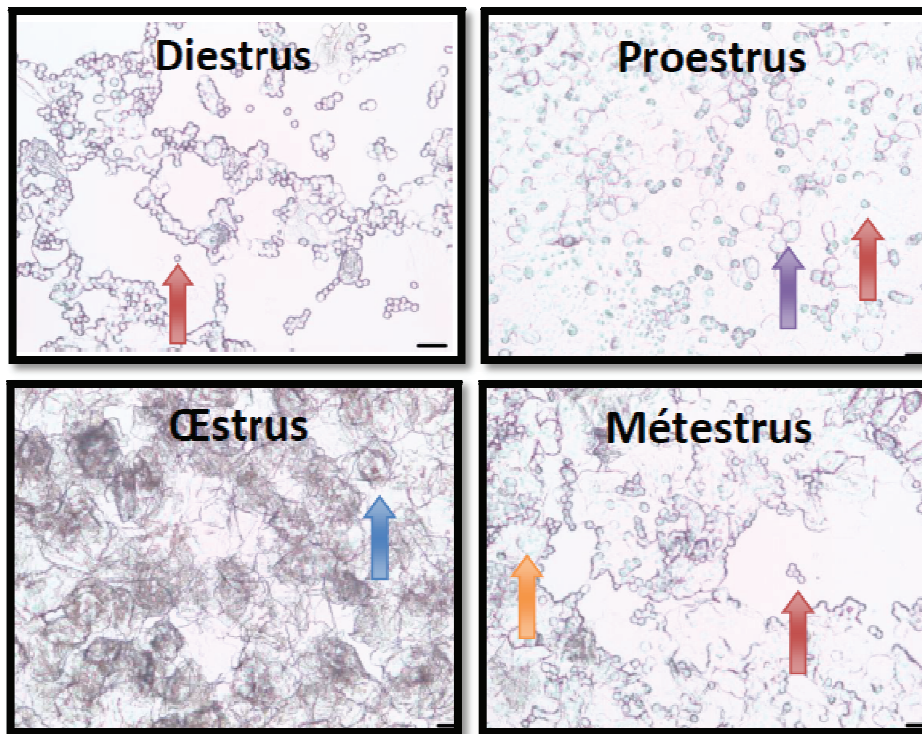


Figure 1: *Analyse cytologique des frottis vaginaux de souris* aux quatre stades du cycles estrien. Diestrus: prédominance de petites cellules rondes leucocytaires (➡). Proestrus: présence en proportion 50/50 de cellules leucocytaires et de grandes cellules rondes épithéliales (➡). Oestrus: présence uniquement de cellules épithéliales anucléées (➡). Métestrus: présence en proportion 50/50 de cellules leucocytaires et de cellules épithéliales nucléées (➡). Echelle : Barre = 150µm. (Chassard, Non publié)

Il existe également une deuxième terminologie, qui insiste sur l'existence de deux phases (Figure 2):

- phase folliculaire: période se commençant par la phase terminale de la croissance folliculaire et se terminant par l'ovulation.
- phase lutéale: qui débute juste après l'ovulation, et s'achève par la régression du corps jaune.

Ainsi la phase folliculaire correspond aux stades Proestrus/Oestrus, et la phase lutéale aux stades Métestrus/Diestrus.

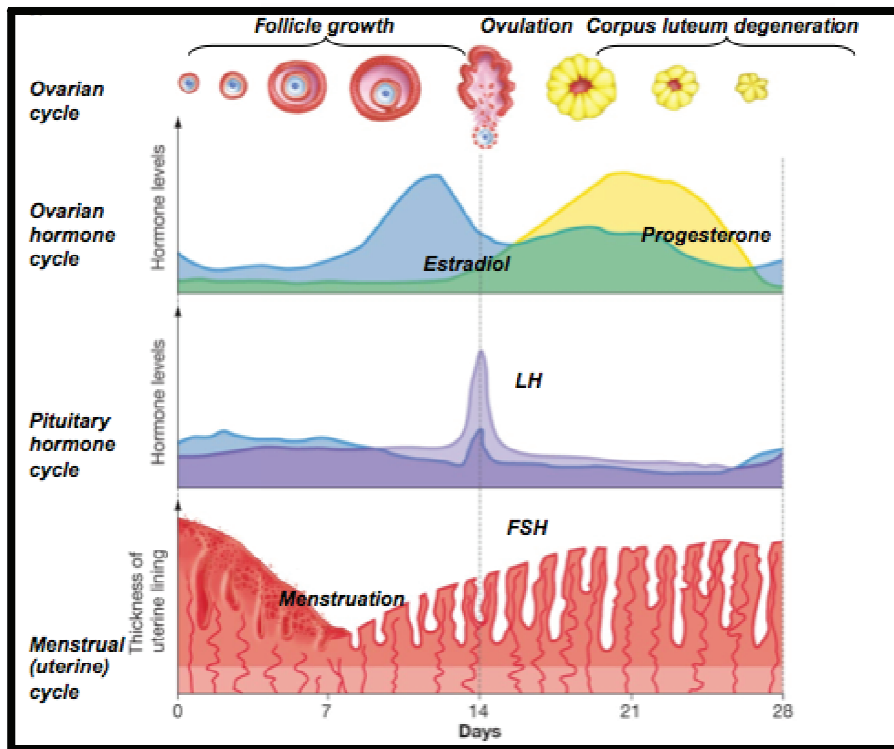


Figure 2: *Représentation schématique du cycle menstruel chez la femme avec la phase folliculaire et la phase lutéale. Le cycle menstruel s'étend sur environ 28 jours, et débute par les menstruations, qui n'est autre qu'un saignement au niveau de la muqueuse utérine. La phase folliculaire correspond à la phase de croissance et maturation des follicules, elle se termine par l'ovulation ayant lieu en milieu de cycle (14ème jour). La phase lutéale débute juste après l'ovulation, commençant par la mise en place du corps jaune qui régressera s'il y a absence de fécondation. Durant ce cycle menstruel, on observe des variations cycliques de différentes hormones sexuelles ovariennes comme la progestérone ou encore l'estradiol. On observe également des variations de l'hormone lutéinisante (LH) qui sous forme de pic engendre l'ovulation, ainsi que de l'hormone stimulant la folliculogenèse (FSH). (Adapté de Silverthorn Human Physiology)*

Durée des cycles

Les cycles peuvent prendre plusieurs profils chronologiques. La durée des cycles dépend en grande partie de la phase folliculaire qui est sujette à des variabilités de durée inter-espèce et interindividuelle. Chez la femme, la durée de la phase lutéale est identique à la phase folliculaire, autrement dit, chaque phase dure 14 jours. Par opposition, chez la plupart des autres espèces à l'exception de certains rongeurs, la durée de la phase lutéale est constante et supérieure à la phase folliculaire (Tableau 2).

| Espèce | Durée du cycle (jours) | Durée de la phase folliculaire (jours) | Durée de la phase lutéale (jours) |
|--------------|------------------------|--|-----------------------------------|
| Vache | 21 (18-24) | 4 (2-5) | 17 (15-19) |
| Brebis | 17 (15-19) | 2 (2-3) | 15 (14 -16) |
| Jument | 21 (16-30) | 7 (4-15) | 14 (12-15) |
| Truie | 21 | 6 | 14 |
| Ratte/Souris | 4-5 | 3 | 1-2 |
| Femme | 28 (24-35) | 14 (12-18) | 14 (12-17) |

Tableau 2 : *Caractéristiques chronologiques des cycles sexuels de plusieurs mammifères.*(9)

Les cycles au cours de la vie

Les cycles ovariens débutent au moment de la puberté. Le [tableau 3](#) illustre l'âge moyen des animaux à la puberté. La mise en place de la maturité sexuelle est fortement conditionnée par différents facteurs nutritionnels et environnementaux. Chez les espèces dites "saisonnnières", elle dépend du moment de la naissance des descendants.

| Espèce | Age de la puberté | Saison sexuelle | Type de cycle |
|---------|-------------------|-----------------|--|
| Vache | 6 - 18 mois | Continue | Polyestrus |
| Brebis | 4 - 12 mois | Automne-hiver | Polyestrus saisonnier : plusieurs oestrus par saison |
| Chèvre | 4 - 8 mois | Automne-hiver | Polyestrus saisonnier |
| Truie | 5 - 10 mois | Continue | Polyestrus |
| Jument | 12 - 20 mois | Mars-Août | Polyestrus saisonnier |
| Macaque | 26 - 27 mois | | Menstruel |
| Souris | 4 - 6 semaines | | Polyestrus |

Tableau 3: *Mise en place de la puberté et type de cycle ovarien chez plusieurs espèces.* (10)

A l'exception de certains primates et de la femme, les cycles ovariens peuvent se manifester pendant toute la vie. La baisse de fécondité résulte le plus souvent du vieillissement utérin. On peut observer chez certaines souches de rates un dérèglement des cycles ovariens dû à un vieillissement des ovaires. Chez la femme et certains primates, l'arrêt des cycles ovariens a lieu à la ménopause.

Chez certains mammifères, l'activité ovarienne peut suivre des interruptions temporaires qualifiées d'anoestrus saisonnier (Tableau 3). Ainsi la brebis qui est un modèle pour l'étude de la régulation de la saisonnalité de la reproduction, manifeste au cours de l'année une alternance entre période de cycles ovariens de 17 jours qu'on appellera saison sexuelle, et une saison d'anoestrus encore appelée anoestrus saisonnier. Cette dernière illustre une absence d'ovulation et de comportement d'oestrus.

Régulation neuro-endocrinienne des cycles ovariens

Chez les mammifères, la fonction de reproduction est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG ou axe gonadotrope) qui comprend 3 niveaux (**Figure 3**) : les neurones à GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) de l'aire pré-optique (POA), l'adénohypophyse et les gonades.

Chez les femelles de mammifère, la libération de GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) dans le système vasculaire porte hypothalamo-hypophysaire stimule la synthèse et la libération de l'hormone lutéinisante (LH) et de la FSH par l'adénohypophyse (11). Ces deux gonadotrophines agissent sur les ovaires pour contrôler la croissance et la maturation folliculaire. En retour, les follicules en maturation sécrètent progressivement deux hormones gonadiques : l'œstrogène (E2) et la progestérone. Ces stéroïdes sexuels exercent sur l'axe HHG un rétrocontrôle qui est à l'origine des variations cycliques de LH et FSH à la base des cycles estriens. En début de cycle (diestrus, proestrus), les taux de LH et FSH augmentent progressivement permettant la maturation folliculaire. Leur libération est alors soumise à un rétrocontrôle négatif exercé par les E2 (12). En fin d'après-midi du proestrus, l'augmentation massive d'E2 provoque une régulation positive de l'axe gonadotrope générant un pic de GnRH et un pic de LH (12).

Ce pic de LH appelé pic pré-ovulatoire est responsable du déclenchement de l'ovulation le lendemain du proestrus. Cette étape est la phase clé de la reproduction pendant laquelle les ovocytes sont expulsés. La particularité du pic pré-ovulatoire est son décours temporel. Par exemple chez les rongeurs, le pic est transitoire et a lieu systématiquement à la fin de la période de repos (transition jour/nuit) le jour du proestrus (13). C'est à dire en fin de jour, chez les rongeurs nocturnes, et en fin de nuit/début du jour chez la femme.

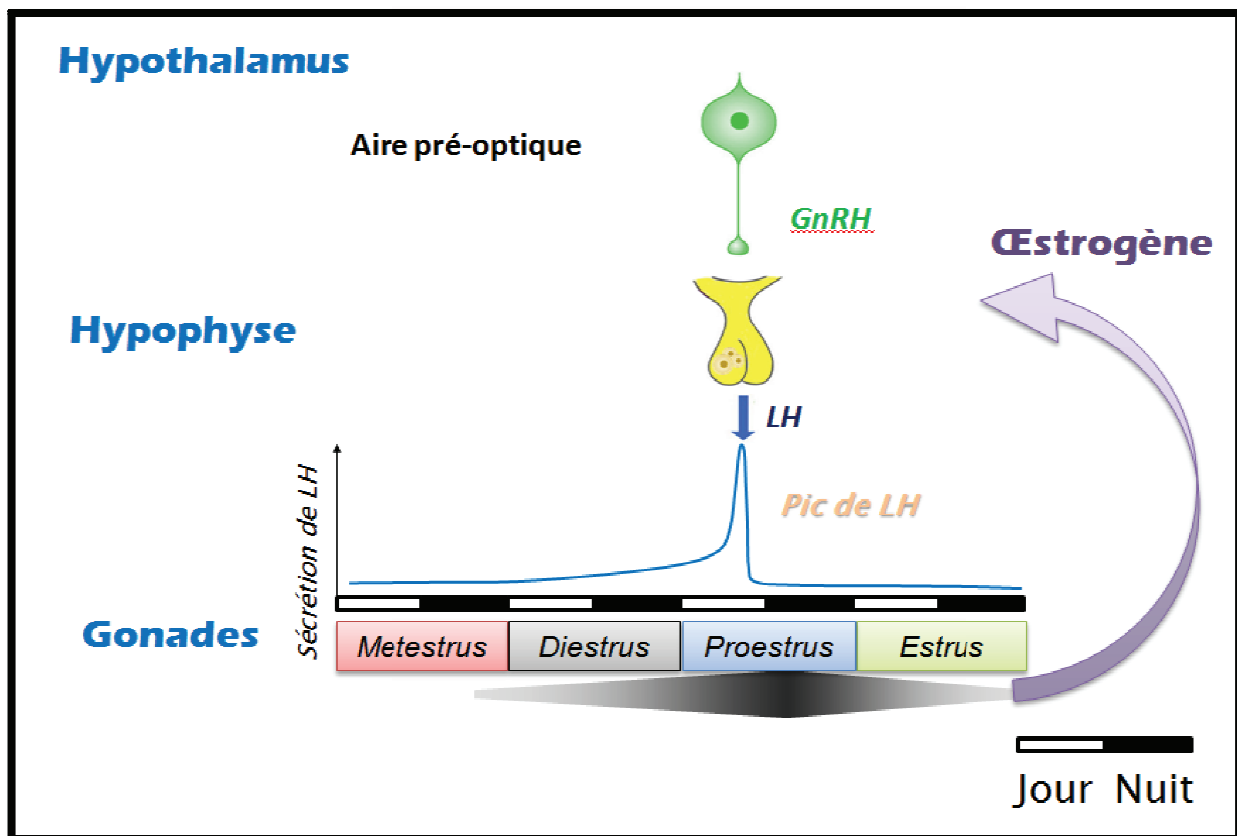


Figure 3: Régulation de l'axe gonadotrope chez les rongeurs femelles. Les neurones à GnRH (Hormone libérant les gonadotrophines) localisés dans l'aire pré-optique (POA) projettent dans l'éminence médiane, stimulant la synthèse et la libération de LH et de FSH par l'adénohypophyse. La LH (Hormone lutéinisante) et la FSH (Hormone stimulant la folliculogénèse) régulent la croissance et la maturation folliculaire. En retour, les follicules sécrètent progressivement des œstrogènes qui rétroagissent sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. En début de cycle, les faibles concentrations plasmatiques d'E2 induisent un rétrocontrôle négatif sur l'adénohypophyse et sur les neurones à GnRH. En proestrus, les fortes concentrations plasmatiques d'œstrogène induisent un rétrocontrôle positif sur l'adénohypophyse et les neurones à GnRH. (Chassard, non publié).

Pic de LH/Ovulation s'inscrivent dans une régulation temporelle/endocrinienne

L'activité de reproduction se caractérise donc par des variations hormonales : œstrogène, LH, FSH, progestérone, qui conditionnent la cyclicité du développement ovarien et de l'ovulation. Le pic de LH qui déclenche l'expulsion des ovocytes des follicules matures, c'est à dire l'ovulation, s'inscrit dans une modalité temporelle bien précise. D'une part, le pic de LH s'inscrit dans une modalité infradienne (infradies = période supérieure à 24h), par le fait qu'il apparait tous les 4-5 jours. D'autre part, il fait partie d'une mécanistique temporelle dite circadienne (circadies = période autour d'un jour), en étant toujours déclenché en fin de période de repos le jour du proestrus (13).

Ainsi le pic de LH, déclenchant l'ovulation, s'inscrit dans un cycle régulé et résulte de la convergence de deux messages : un message temporel, permettant son déclenchement en fin de période de repos le jour du proestrus, et un message oestrogénique, provenant des gonades, reflétant le statut mature des follicules ovariens. Cette régulation oestrogénique est prise en charge par l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, tandis que la régulation temporelle est supportée par le système circadien que nous développerons par la suite. Je présenterai donc en première partie, l'axe hypothalamo-hypophysaire, puis le fonctionnement du système circadien.

Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Neurones à GnRH

Terminologie et historique

Au cours du XIX siècle, Aureliano Maestre de San Juan, un médecin histologiste physicien et anatomiste fit la description d'un homme atteint d'hypogonadisme ainsi que d'une agénésie des nerfs olfactifs. C'est un siècle plus tard que Franz Joseph Kallman décrivit un syndrome d'hypogonadisme et anosmie. Cette pathologie mit en lumière l'existence d'un lien étroit entre le contrôle de la fonction de reproduction et le système olfactif. Ceci s'explique par la migration des neurones à GnRH depuis les placodes olfactives au cours du développement embryonnaire.

En 1971, le groupe de R. Guillemin (14) et A. Schally (15) détermine la séquence de la GnRH des mammifères. Cette neuro-hormone était initialement appelée LRF, puis LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Factor/Hormone) pour ses capacités à stimuler la libération de LH. Elle fut renommée plus tard en GnRH ou encore gonadolibérine pour son activité stimulatrice sur la sécrétion de FSH. La GnRH est ainsi déterminante pour la sécrétion de LH et de FSH, contrôlant le cycle estrien.

Localisation anatomique

Les neurones à GnRH (environ 1000 chez les mammifères supérieurs) se localisent à travers l'aire préoptique (POA), la bande diagonale de Broca ainsi que l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) (16,17)(Figure 4)

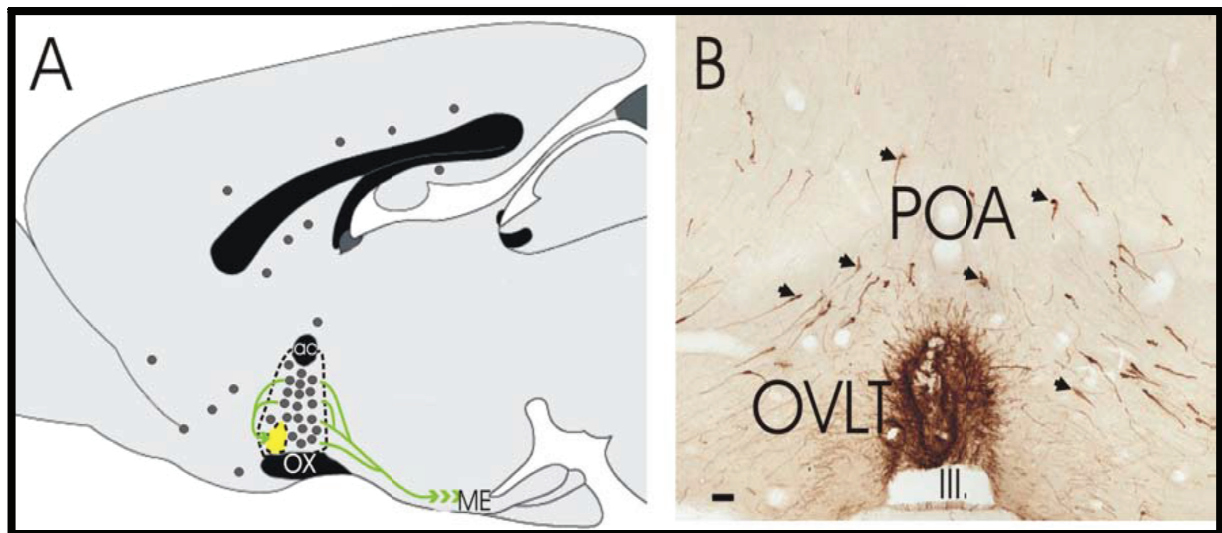


Figure 4: Distribution des neurones à GnRH chez le rat. **A** schéma d'une coupe sagittale. Les points gris correspondent aux corps cellulaires exprimant du GnRH. Les neurones à GnRH hypophysotrope se localisent dans le POA et projettent vers l'OVLT (en jaune) et l'éminence médiane. **B** Coupe coronale d'un cerveau de rat à travers la région POA-OVLT. Immunomarquage de GnRH permettant la visualisation des corps cellulaires (flèches) ainsi que des prolongements axonaux. Echelle : barre = 50µm, III = troisième ventricule. ac: commissure antérieure, ox: chiasma optique. ME: éminence médiane, OVLT: organe vasculaire de la lame terminale, POA: aire préoptique.

Transcription et traduction

La plupart des vertébrés étudiés possèdent au moins deux formes de GnRH. La forme hypothalamique, GnRH I, se présente sous la forme d'un décapeptide (figure 5). Elle diffère de la deuxième forme GnRH II (18), par le remplacement de trois résidus en position 5, 7 et 8. Cette hormone forme une structure en épingle à cheveux dont l'apex se positionne au niveau de l'acide aminé (AA) Glycine (Gly), autrement dit en position 6. Les extrémités N et C terminales participent à la liaison et à l'activation du récepteur GHRH (19).

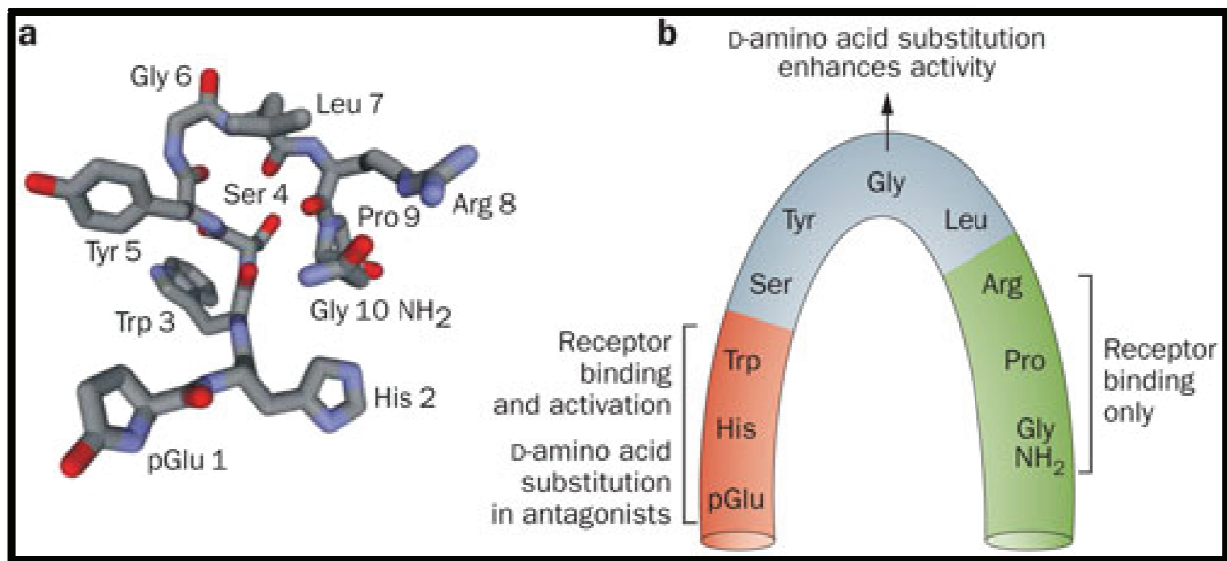


Figure 5: Le décapeptide GnRH I. Cette neuro-hormone se présente sous forme d'une épingle à cheveux dont le sommet se positionne en Gly 6. Les deux extrémités N et C terminales jouent un rôle dans la liaison au récepteur et son activation. (20)

Le gène codant la GnRH s'organise sous forme de 4 exons et 3 introns (Figure 6). La traduction de l'ARNm génère un précurseur appelé pré-pro-GnRH. Il est organisé selon la séquence suivante: un peptide signal, le décapeptide GnRH, un site de clivage, une peptide GAP (GnRH-Associated Peptide). Après maturation post-traductionnelle, la GnRH et le peptide GAP sont stockés dans les vésicules de sécrétion au niveau des terminaisons nerveuses (21). Le rôle exact de la GAP reste encore à élucider. Pourtant, ce peptide semble avoir une fonction primordiale dans la production de GnRH mature. En effet, chez des souris hypogonadiques hypogonadotropes, qui présentent des problèmes de fertilité, il a été montré une déficience dans la production de GAP suite à la délétion des exons III et IV codant pour cette dernière (22).

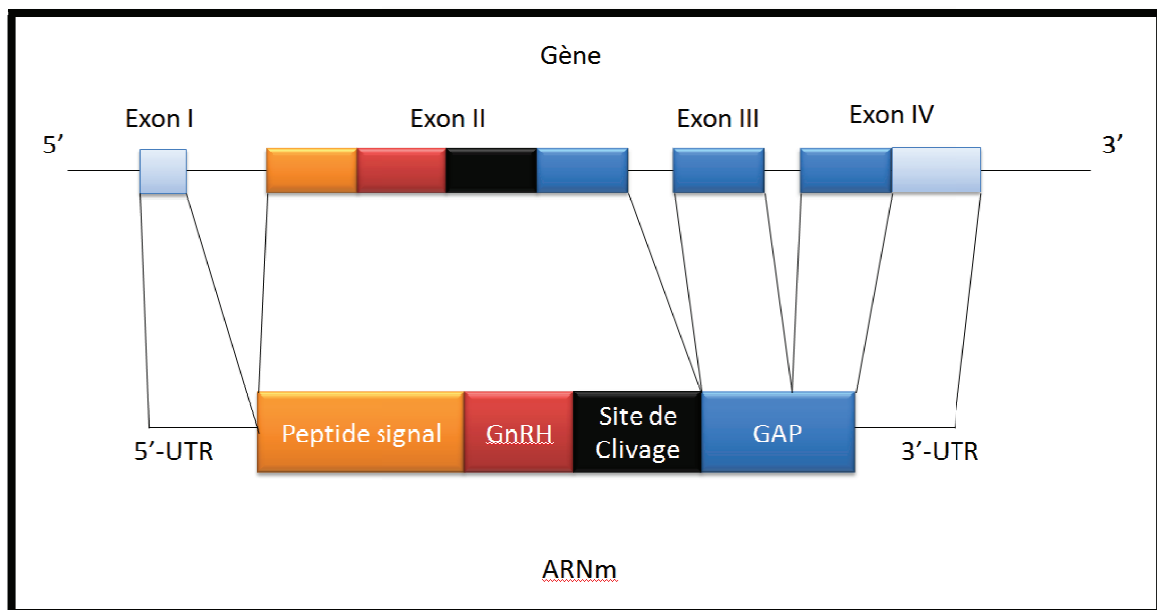


Figure 6: Structure du gène de la GnRH chez les mammifères. Le gène est constitué de 4 exons. L'ARNm code pour la pré-pro-GnRH comprenant un peptide signal, le decapeptide GnRH, et un site de clivage et le GAP (GnRH Associated Peptide). adapté de <https://www.glowm.com/resources/glowm/cd/pages/v5/v5c071.html>

Récepteur GnRH-R

Le récepteur à la GnRH (GnRH-R) fait partie intégrante de la sous famille des rhodopsines. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Figure 7). Ils se retrouvent de manière physiologique ou pathologique dans plusieurs structures : l'hypophyse, les ovaires, l'utérus, la prostate, la poitrine, et également dans d'autres tissus indépendants de la fonction de reproduction. L'activation de ce récepteur entraîne une régulation de divers effets biologiques (tableau 4). Les récepteurs présents au niveau des cellules gonadotropes sont couplés aux protéines Gq/G11 (23,24). Leur activation entraîne la stimulation de la phospholipase C qui catalyse la réaction du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et diacyl glycérol (DAG). L'IP3 induira une mobilisation calcique intracellulaire issu du réticulum endoplasmique, tandis que le DAG mobilisera

l'activation de protéines kinases telle que la protéine kinase C (PKC). Ces phénomènes induiront une libération de gonadotropines (25). De plus, on pourra citer l'action de la GnRH sur la transcription des gènes codant les sous-unités α et β des gonadotropines (25).

| Site d'action | Action putative | Référence |
|-----------------------------|--|--------------|
| Placenta | Modulation de la libération de hCG | (26) |
| Cellule T | Prolifération, adhésion, chemotaxis augmentés | (27) (28) |
| Neurones olfactifs | Croissance axonale, migration, remodelage du cytosquelette augmentés | (29) |
| Cellule Melanoma | Prolifération, invasion et chemotaxis diminués | (30) |
| Cellule pariétale gastrique | Diminution des sécrétions d'acide gastrique | (31) |

Tableau 4: Actions de la GnRH en dehors de la pituitaire.

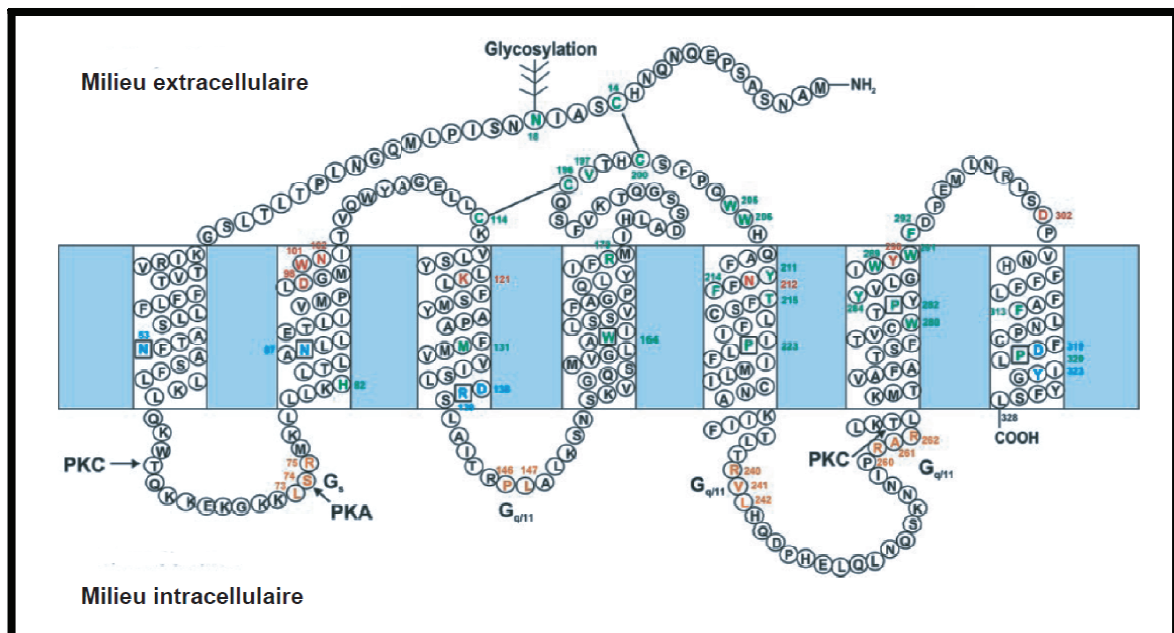


Figure 7: Structure du récepteur de la GnRH humaine. Ce récepteur est couplé aux protéines G de type Gq (les acides aminés en orange permettent le couplage à cette protéine G). La poche

de liaison est représentée par les AA en vert, la liaison du ligand par les AA en rouge, et l'activation du récepteur par les AA en bleu. A noter, que ce RCPG est le seul de sa famille à ne pas posséder de queue C-terminale.(19)

Efférences

Les axones des neurones à GnRH suivent le tractus septo-preoptico-infundibulaire qui émergent des neurones localisés dans le septum médial et le POA. La majorité des fibres vont parcourir un trajet en direction de deux organes circumventriculaires : l'OVL et l'éminence médiane (ME) (16,32) **Figure 8**. Les axones des neurones à GnRH présents dans l'éminence médiane vont libérer la gonadolibérine dans les capillaires du système porte qui stimulera les cellules gonadotropiques présent dans l'adénohypophyse (16). Néanmoins, il existe des projections en direction du bulbes olfactifs, qui seraient impliquées dans la transmission et la modulation des stimuli olfactifs, dont on sait qu'ils sont très étroitement liés au comportement et la fonction de reproduction (17,33).

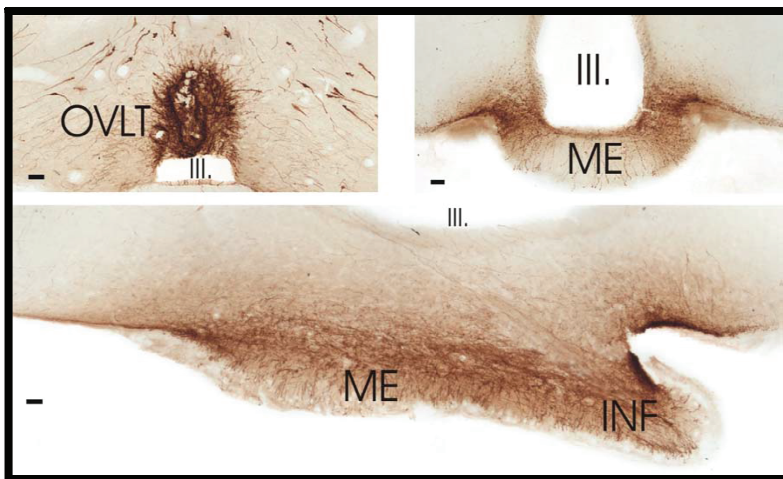


Figure 8: *Immunomarcage GnRH montrant les terminaisons nerveuses.* A coupe coronale illustrant les axones au niveau de l'OVL. B coupe coronale illustrant la région de l'éminence médiane. C Coupe sagittale montrant les

axones au niveau de l'éminence médiane. Barre d'échelle = 50µm.

Afférences des neurones à GnRH

Plusieurs afférences peptidergiques et monoaminergiques ont été identifiées au cours des années (34). Ces projections proviennent essentiellement du noyau arquée (ARC) contenant

de la dopamine, β -endorphine, Neuropeptide Y, Kisspeptine (Kp), Neurokinine B, de l'hypothalamus ventromédian (somatostatine) et ou encore de l'aire préoptique (GABA). On pourra également cité la présence de RFRP. Une afférence particulièrement importante venant de l'Aire antéroventrale périventriculaire (AVPV) contenant les Kp stimule massivement les neurones à GnRH provoquant la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH/LH (35).

Pulsatilité des neurones à GnRH

Dans le système endocrinien, on retrouve le plus souvent des sécrétions hormonales dites pulsatiles avec une composante rythmique qui peut varier selon la fonction physiologique. On pourra ainsi citer la sécrétion de GH (hormone de croissance) (36), ACTH (hormone corticotrope) (37), TSH (hormone stimulant la thyroïde) (38), PRL (prolactine) (21), LH (39), et FSH qui sont toutes pulsatiles.

La pulsatilité des neurones à GnRH a été mise en évidence dans le système porte hypothalamo-hypophysaire chez le rat (40), chez la brebis (41,42), dans le liquide extracellulaire présent dans l'éminence médiane chez le rat (42), ou encore dans le LCR (singe (43), brebis (44)). Une relation étroite existe entre la pulsatilité de GnRH et la

sécrétion d'hormones gonadotropes (LH et FSH) (Figure 9). Les pulses sont très brefs (de l'ordre de quelques minutes), séparés par la suite, de périodes où les niveaux sont indétectables (45). La fréquence et l'amplitude des pulses sont dépendantes des stéroïdes sexuels.

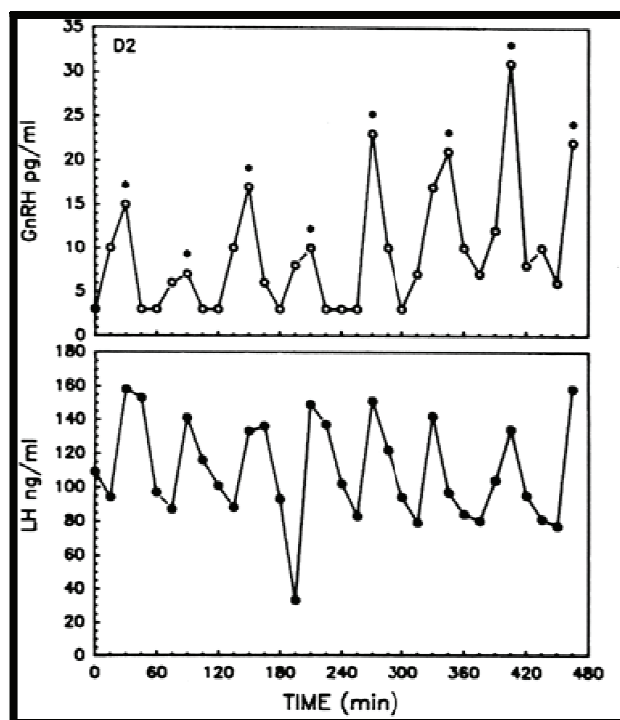


Figure 9: Libération pulsatile de GnRH et LH chez un singe ovariectomisé . Corrélation directe entre les pulses de GnRH et ceux de LH. (46)

Autrement dit, l'activité pulsatoire des neurones à GnRH varie au cours du cycle estrien. La fréquence et l'amplitude des pulses seront modulées par les E2 (Figure 10) déclenchant *in fine* la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH/LH (Figure 11).

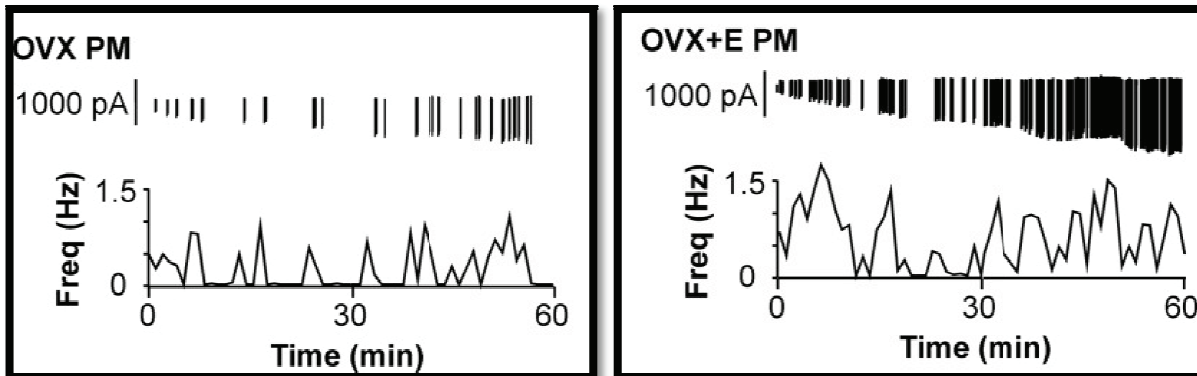


Figure 10: Pattern de décharge des neurones à GnRH enregistré en extracellulaire provenant de souris ovariectomisées (OVX) ou OVX avec un implant d'estrogène (E) mimant le proestrus. (13)

Pic pré-ovulatoire de GnRH

En 1976, le groupe de Sarkar décrit pour la première fois un pic de GnRH au moment du pic pré-ovulatoire de LH chez la ratte (40). Ce pic survient dans la phase folliculaire tardive, quand les niveaux d'E2 augmentent. Cette hormone sexuelle constitue ainsi le signal ovarien primordial permettant le déclenchement du pré-ovulatoire de GnRH/LH.

Durant la phase folliculaire (proestrus/estrus), le profil de sécrétion de GnRH varie et peut être subdivisé en deux phases (47-49). La première phase se révèle par une diminution de la fréquence des pulses de GnRH. La seconde phase se traduit par une augmentation majeure de la fréquence des pulses jusqu'à obtenir une sécrétion continue masquant ainsi le caractère pulsatile de la libération de GnRH. Cette libération continue et massive constitue le pic pré-ovulatoire de GnRH Figure 11 (45). La survenue de ce dernier est conditionnée majoritairement par les taux d'E2 circulants, qui influencent le mode sécrétoire des neurones à GnRH.

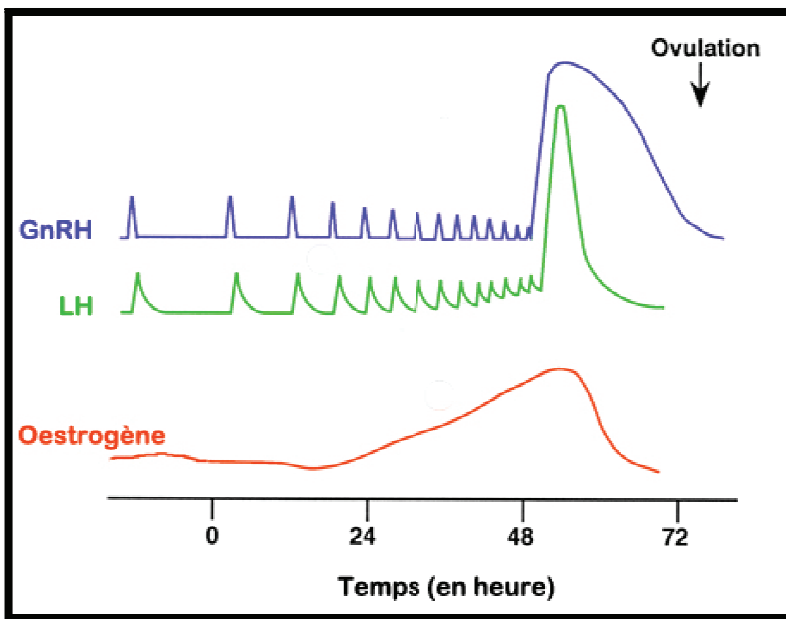


Figure 11: Pulsatilité GnRH/LH conditionnée par les taux d'œstrogènes. Corrélation directe entre pulses de GnRH et pulses de LH. Quand les taux d'œstrogènes sont élevés, un pic pré-ovulatoire de GnRH survient entraînant le déclenchement pic de LH responsable de l'ovulation. (50)

Les neurones à GnRH présentent donc une activité pulsatoire modulée par les taux circulants d'E2. En proestrus, quand les taux d'E2 sont élevés, la fréquence des pulses va augmenter permettant la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH. La libération massive de GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire stimulera les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse via les récepteurs GnRH-R induisant la survenue du pic pré-ovulatoire de LH.

Adénohypophyse - LH / FSH -

L'anté-hypophyse, ou adénohypophyse ou encore appelé hypophyse antérieure est le lobe antérieur de l'hypophyse et fait partie intégrante de l'appareil endocrinien. L'hypophyse est une glande composée de deux lobes : un lobe antérieur glandulaire et un lobe postérieur nerveux. La partie glandulaire est composée de trois parties : la pars distalis, pars tuberalis et la pars intermedia. Les cellules présentes dans la pars distalis sécrètent plusieurs hormones ayant des actions variées: [Tableau 5](#).

| Cellules | Hormones | Action principale |
|----------------------|--|--|
| Corticotropes | ACTH hormone adrénocorticotrope | Sécrétion de glucocorticoïdes |
| Lactotropes | PRL Prolactine | Lactation, sécrétion œstrogènes, progestérone |
| Somatotropes | GH Hormone de croissance | Métabolisme des lipides et hydrates de carbone |
| Thyréotropes | TSH Hormone stimulant la thyroïde | Sécrétion d'hormones thyroïdiennes |
| Gonadotropes | FSH Hormone stimulant la folliculogénèse | Croissance follicule |
| | LH Hormone lutéinisante | Ovulation |

Tableau 5: Les cellules hypophysaires. (51)

Dans le cas présent, nous nous intéresserons à la production des deux gonadotropines : la LH et la FSH qui sont synthétisées et libérées par les cellules gonadotropes. Ces cellules sont directement stimulées par la GnRH, *via* la libération du décapeptide dans le système porte hypothalamo-hypophysaire.

Localisation anatomique

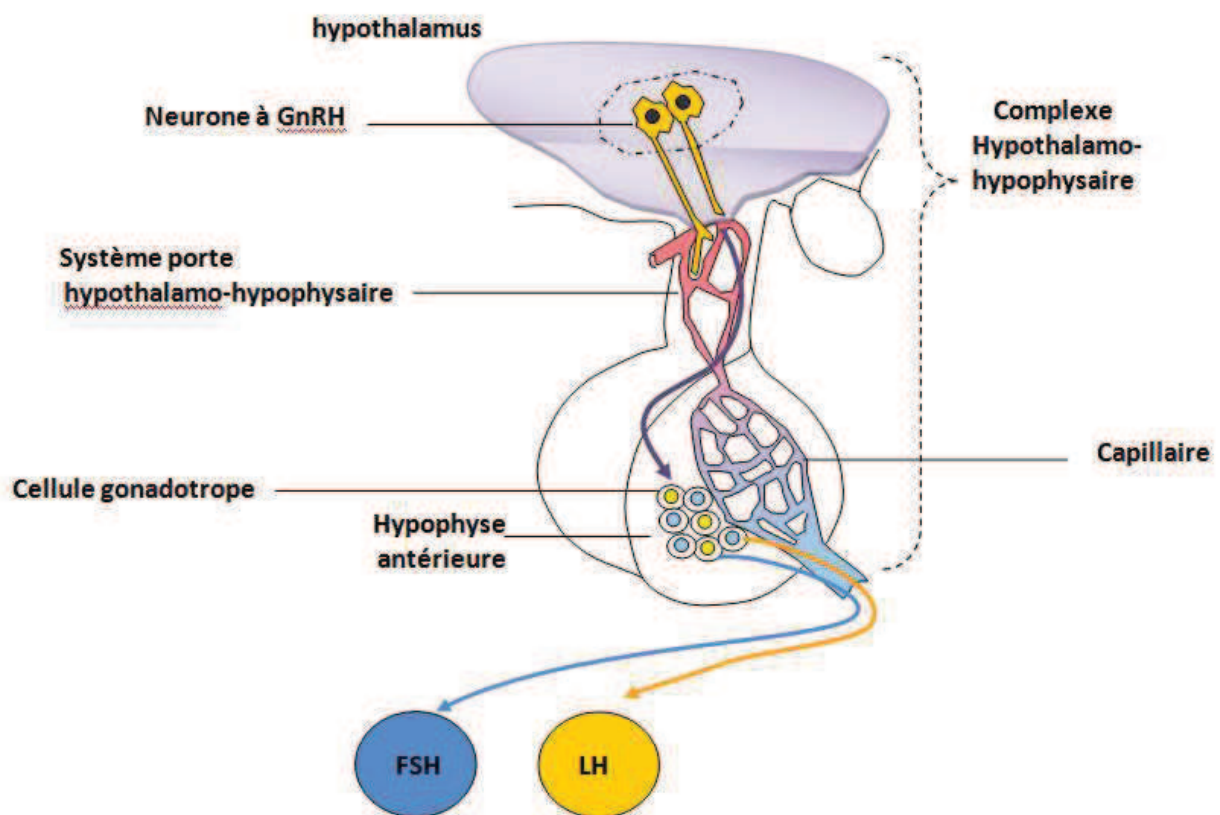


Figure 12 : Les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse stimulées par les neurones à GnRH. Les neurones à GnRH présents au niveau de l'hypothalamus sécrètent le décapeptide au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire. Les cellules gonadotropes seront stimulées, permettant la sécrétion de FSH et de LH. Adapté de <http://svt.acdijon.fr/schemassvt>

Transcription et traduction

Les gonadotropines sont constituées de 2 chaînes polypeptidiques: les sous-unités α et β (52). Toutes les espèces conservent une sous-unité α identique pour chaque hormone glycoprotéique hypophysaire. Cette sous-unité est produite par un seul gène. A l'opposé, la sous-unité β est spécifique de chaque hormone (52). Ainsi elles sont codées par des gènes distincts. Les sous-unités prises séparément n'ont pas d'activité biologique propre. Il faudra

l'association de ces deux sous-unités pour permettre des changements de conformation du dimère permettant l'acquisition d'une fonction biologique. La LH et la FSH possèdent donc une sous-unité α et respectivement une sous-unité appelée LH β , FSH β . Ces sous-unités leur confèrent l'action spécifique des gonadotropines (53).

La sécrétion de FSH et de LH, ainsi que la transcription des sous unités gonadotropines sont dépendantes de la fréquence des pulses de GnRH (54-56). Une diminution de la fréquence entraîne principalement la transcription de FSH β , tandis qu'une augmentation de la fréquence des pulses de GnRH active la transcription de LH β (Figure 13). Quant à la transcription de la sous-unité α elle est principalement exprimée en excès (57,58). La pulsatilité de la sécrétion de GnRH est indispensable pour la transcription et sécrétion de la FSH et LH. En effet une exposition continue de GnRH induit une régulation négative de la synthèse d'ARNm, ainsi qu'une diminution de la sécrétion des gonadotropines. (55,59-62).

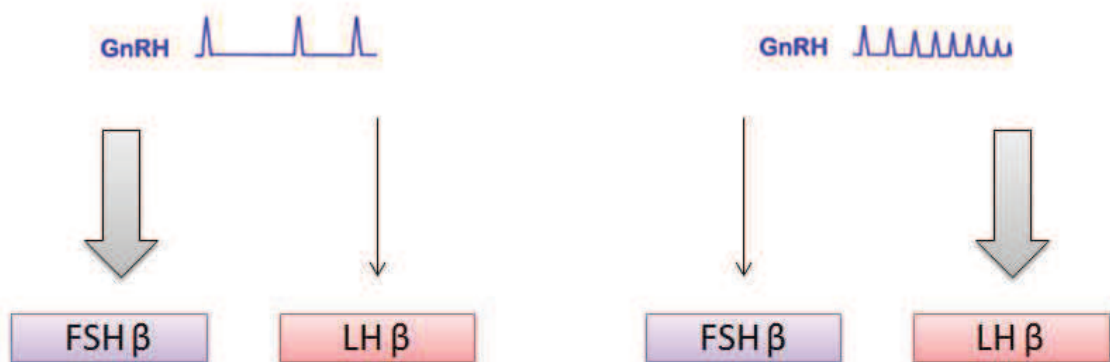


Figure 13: La fréquence des pulses de GnRH conditionne la transcription des sous unités LH β et FSH β . Une faible fréquence de GnRH entraîne la transcription de FSH bêta, alors qu'une fréquence élevée de GnRH induit la transcription de LH bêta. (63)

La sécrétion de LH et FSH contrôlée par les neurones à GnRH va être soumise à des changements au cours du cycle estrien (Figure 14).

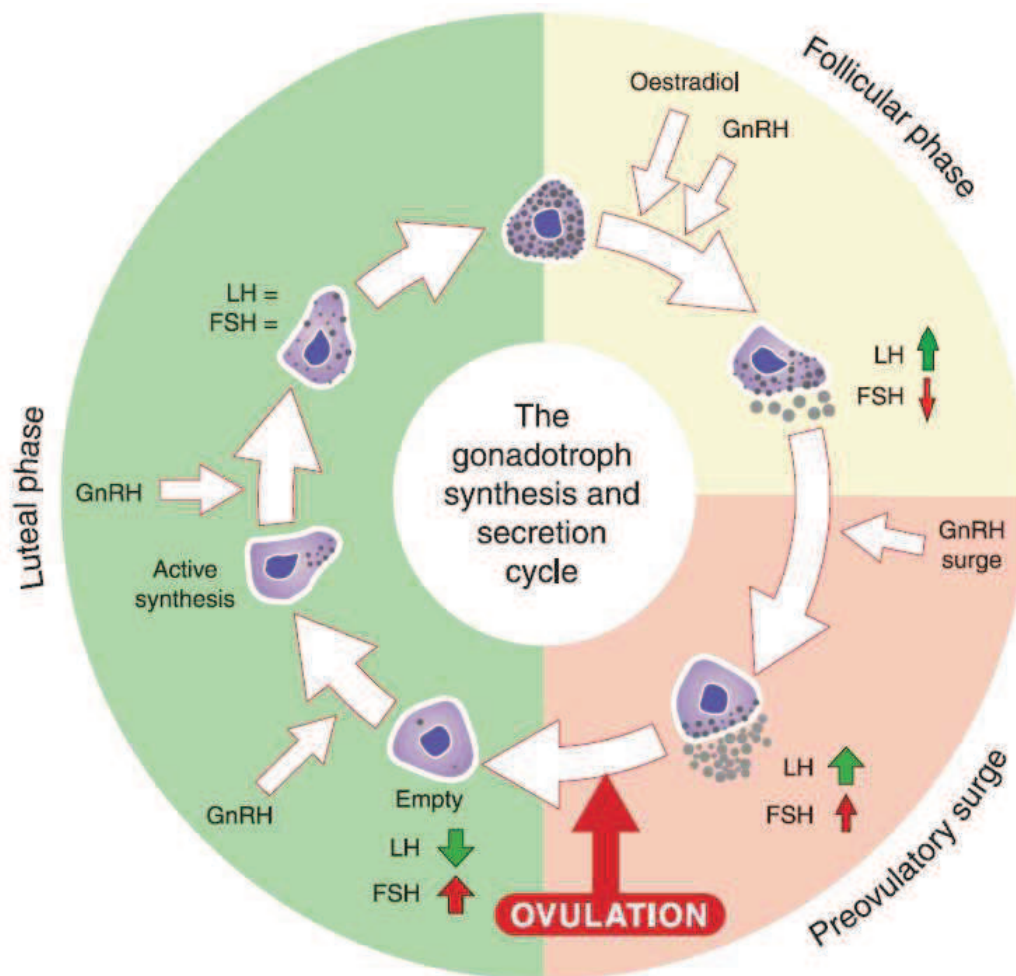


Figure 14: Cycle de sécrétion et synthèse de LH et FSH au sein d'une cellule gonadotrope au cours du cycle estrien. Après le pic pré-ovulatoire de LH, les cellules gonadotropes sont dépourvues de granules de LH, et ainsi ne peuvent plus libérer l'hormone. Une synthèse au niveau des cellules gonadotropes va avoir lieu permettant de remplir les stocks. A la fin de la phase lutéale, l'augmentation de la fréquence des pulses de GnRH stimule la libération de LH, et inhibe celle de FSH. Au moment du pic de GnRH, toutes les cellules gonadotropiques libèrent leurs contenus en LH au niveau du capillaire. La FSH est libérée par une voie constitutive alors que celle de LH est stimulée par la GnRH. (64)

Rôle des FSH et LH

Les récepteurs à la FSH et la LH sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (52). La FSH, hormone stimulant la folliculogénèse, va comme son nom l'indique permettre la mise en place de la maturation folliculaire. La FSH induit le recrutement des follicules mais nécessite tout de même un niveau basal de LH (52). La LH, hormone lutéinisante, va induire l'ovulation quand elle est sécrétée sous forme d'un pulse continu élevé, appelé pic pré-ovulatoire de LH (52). Ceci aura pour conséquence l'expulsion de l'ovocyte du follicule mature, et la mise en place du corps jaune. L'action de ce dernier sera d'assurer la sécrétion de progestérone indispensable pour la mise en place des processus nécessaires à la gestation. Cela marquera le début de la phase lutéale.

L'adénohypophyse secrète deux gonadotrophines (LH et FSH) en réponse à la libération de GnRH. Lorsque la fréquence des pulses des neurones à GnRH est faible, les cellules gonadotropes sécrètent préférentiellement de la FSH. A l'inverse, une fréquence élevée des pulses de GnRH entraîne une augmentation de la libération de LH. Lorsque le pic de pré-ovulatoire de GnRH est déclenché, il introduit un pic de sécrétion de LH qui sera à l'origine de l'ovulation.

Les gonades femelles

Anatomie de l'appareil génital femelle

Il comprend plusieurs parties (65) (Figure 15):

- **Deux ovaires** assurant les fonctions germinales, à savoir la production d'ovocytes, et endocrines comme la sécrétion d'E2 et de progestérone.
- **Deux trompes utérines** qui constituent la partie initiale des voies génitales. Elles se présentent sous formes d'organes tubulaires longs, faisant le lien entre l'utérus et les ovaires. Un oviducte intègre le pavillon, appelé également infundibulum (structure coiffant l'ovaire, permettant de récolter les ovocytes lors de l'ovulation), l'ampoule (site de la fécondation), l'isthme (partie permettant le transfert des ovocytes vers l'utérus).
- **Un utérus**: site de la gestation.
- **Le col utérin ou cervix**: isole en permanence la cavité utérine de la cavité vaginale
- **Un vagin**: cavité permettant de recevoir l'organe copulateur mâle.

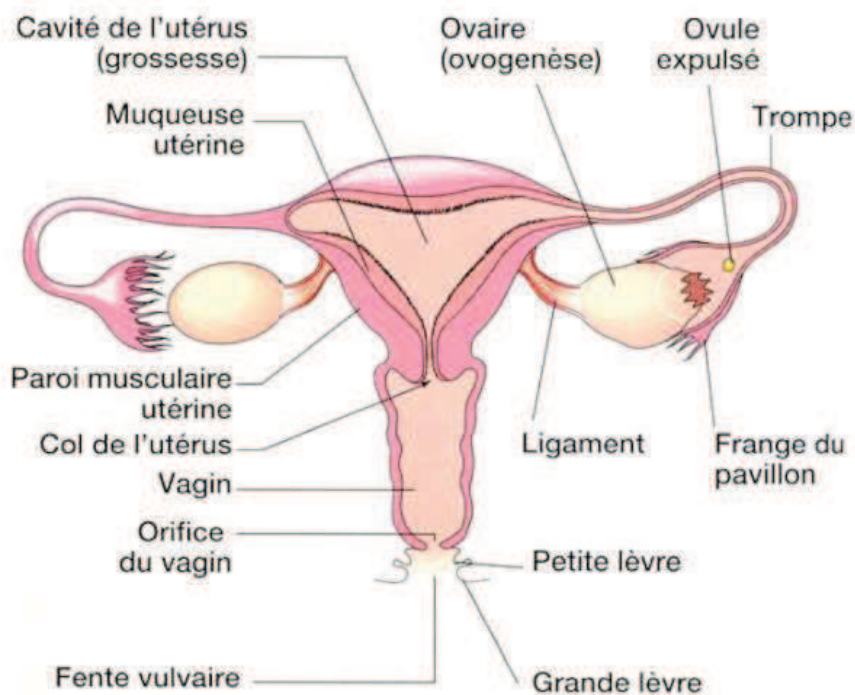


Figure15 : **Appareil génital femelle** (chez la femme) www.app-asap.overblog.com

Evènements cellulaires ovariens : la maturation folliculaire

Les ovaires présents au nombre de deux sont de forme et de dimension variables en fonction des espèces. Chez les rongeurs (cobaye, hamster, rat ou souris (66)), les ovaires de petites tailles ovoïdes, rosés ou jaunâtres sont situés à la face postérieure des reins. Ils sont le plus souvent entourés d'un tissu adipeux plus ou moins important. Chez la plupart des espèces l'ovulation peut se faire sur toute la surface de l'ovaire.

L'ovaire se décompose en deux parties distinctes (65):

- une médulla centrale: site de pénétration vasculaire et nerveuse.
- un cortex périphérique: site de l'activité folliculaire.

Le gamète femelle appelé ovocyte se trouve au sein d'un follicule ovarien qui va évoluer au cours du temps. Le follicule en croissance passe par différents stades morphologiques (Figure 16 et 17).

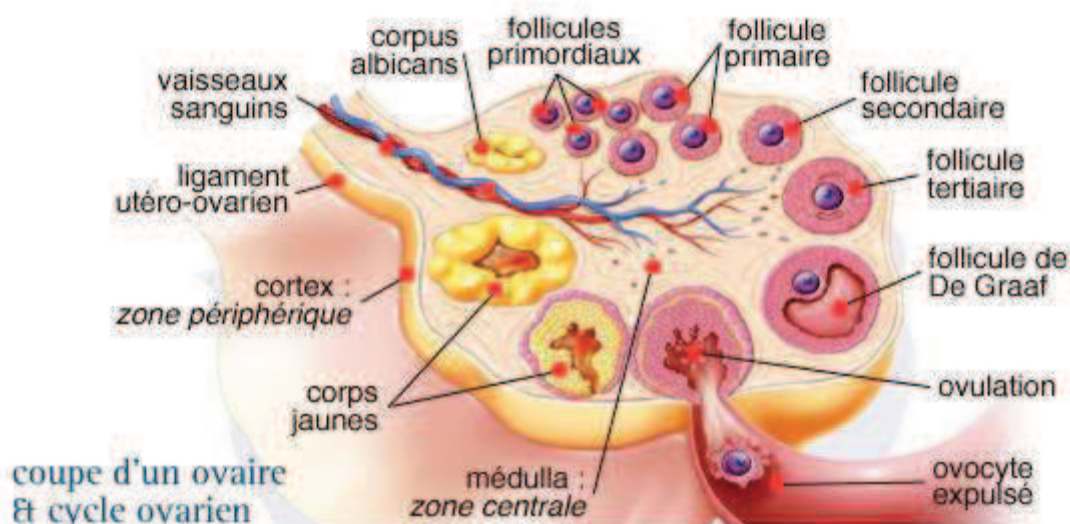


Figure 16: Coupe d'un ovaire et cycle ovarien.

https://mamansurvolt.files.wordpress.com/2015/05/65_popup_cycle-ovarien-1876608.jpg

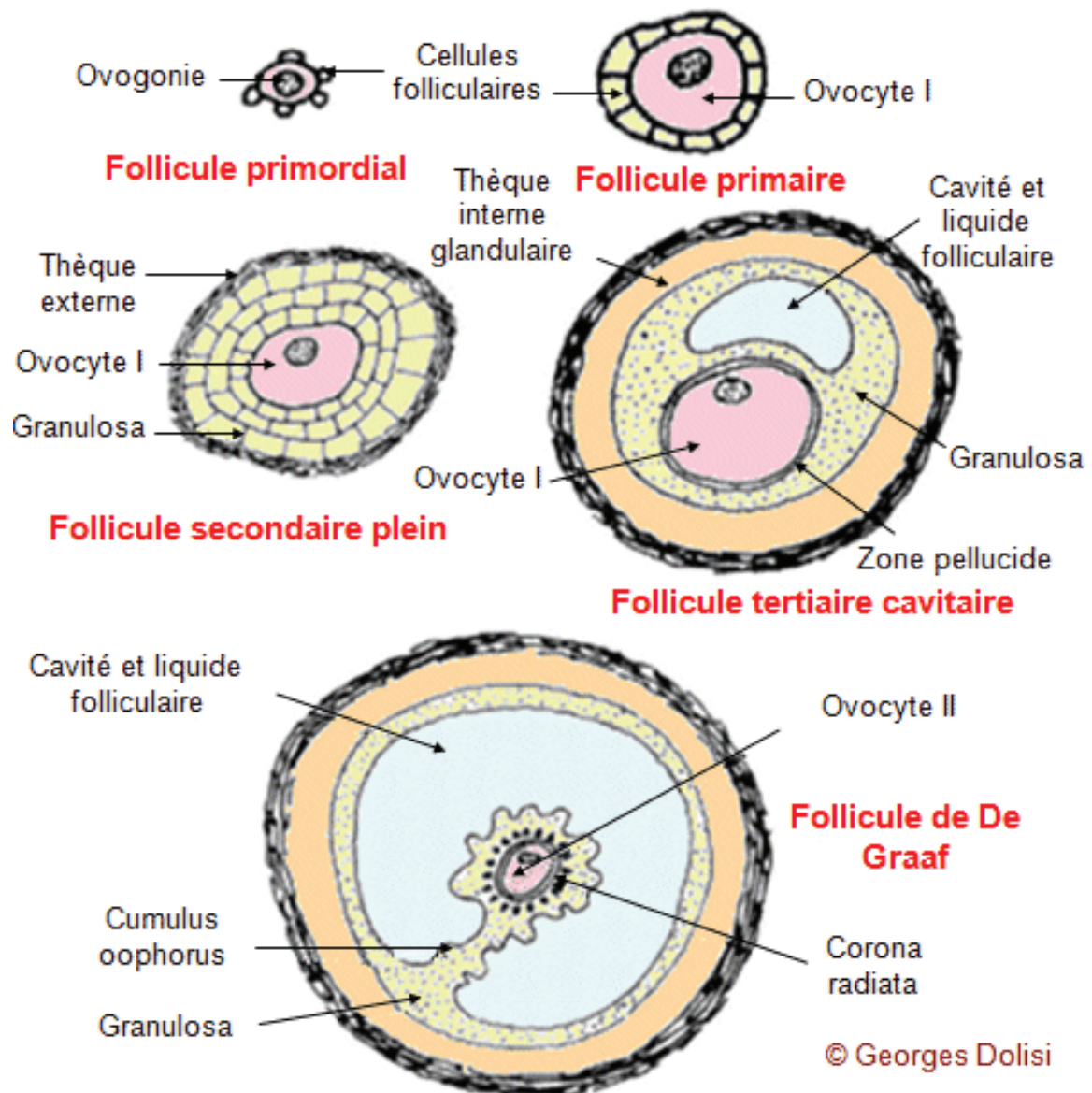


Figure 17: Développement folliculaire.

http://www.bio-top.net/Schemas/Follicules_ovaire2.gif

D'une part, la taille de l'ovocyte va augmenter. D'autre part, les cellules somatiques entourant l'ovocyte vont rentrer en prolifération, constituant ce qu'on appelle la granulosa.

Au départ, le follicule appelé follicule primordial est constitué de l'ovogonie et d'une fine couche cellulaire : la granulosa. Le follicule primordial va par la suite se transformer en follicule primaire : la granulosa se creuse d'une cavité appelée antrum. C'est dans cette

cavité que les sécrétions des cellules folliculaires vont s'accumuler. Le follicule va prendre le nom de follicule antral ou tertiaire. Les cellules péri-folliculaires du stroma ovarien se différencient pour constituer les thèques folliculaires : la thèque interne de nature épithélioïde et la thèque externe de nature conjonctivo-musculaire. Au cours des stades terminaux du développement folliculaire, la thèque se vascularise progressivement, le volume de l'antrum augmente par accumulation des sécrétions provenant de la granulosa des deux thèques. La granulosa perd sa capacité de prolifération. L'ovocyte est repoussé vers un des pôles de l'antrum, entouré de la zone pellucide (65).

La dernière étape de la maturation folliculaire est constituée du follicule pré-ovulatoire, encore appelé follicule de De Graaf. Il est caractérisé par la présence d'une thèque externe, d'une thèque interne séparée de la granulosa par la lame basale, d'un ovocyte enfermé dans les cellules de la granulosa présent dans l'antrum, dénommé cumulus oophorus (65).

Ovulation

L'ovulation désigne la libération d'un ou plusieurs ovocytes fécondables suivant la rupture d'un ou des follicules de De Graaf (Figure 18).

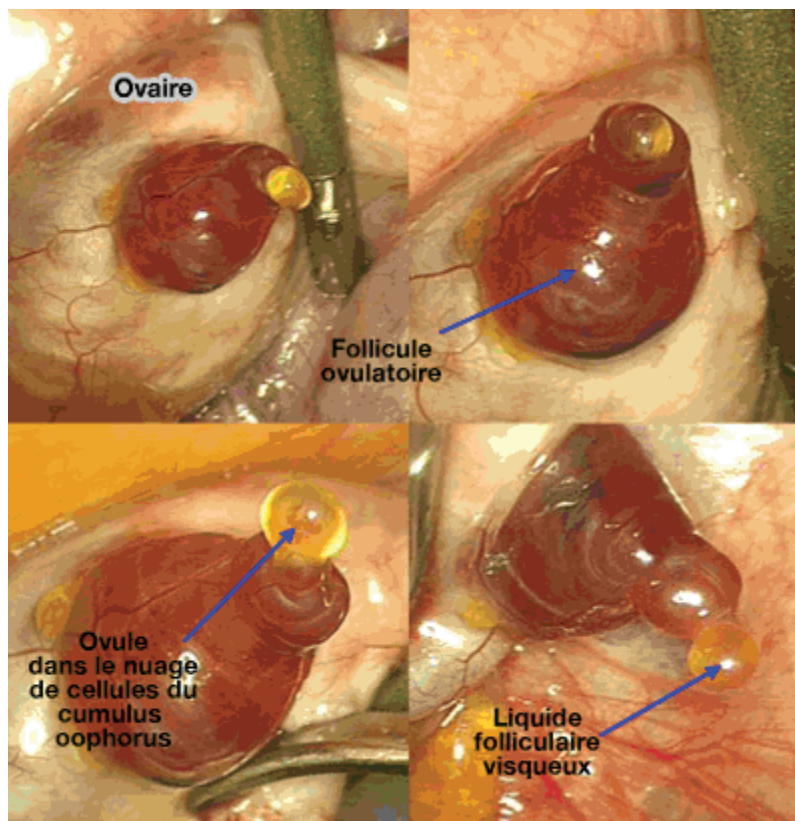


Figure 18: Expulsion de l'ovocyte par le follicule mature.

<http://www.vetopsy.fr/reproduction/femelle/images/ovulation.gif>

L'ovulation est le fruit d'une succession d'évènements (67,68):

- Augmentation du flux sanguin
- Augmentation du volume de l'antrum: conséquence d'un appel d'eau par l'acide hyaluronique sécrété par les cellules du cumulus sous l'action de la LH/FSH.
- Dissociation de faisceaux de fibres de collagène de la thèque interne au niveau de l'apex du follicule.
- Détachement des cellules de la granulosa de la lame basale. Les cellules qui assurent la jonction entre la granulosa et l'ovocyte restent plus ou moins longtemps attachées à l'ovocyte et forment la corona radiata.
- Rupture de la lame basale.
- Mort des cellules épithéliales ovariennes au niveau de l'apex.
- Rupture du follicule (Figure 19).
- Contraction du follicule par dépression hydrostatique.
- Expulsion de l'ovocyte.

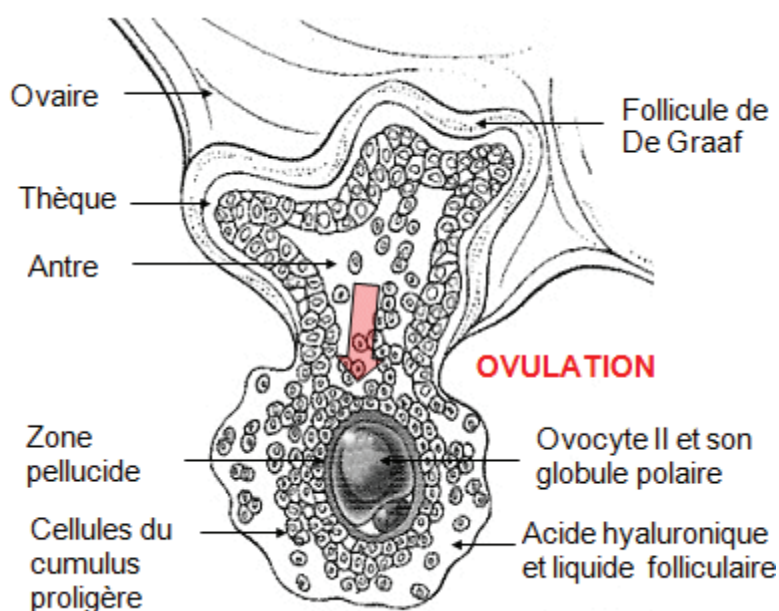


Figure 19: Expulsion de l'ovocyte par le follicule mature.

<http://www.biotope.net/Schemas/ovulation1.gif>

Toutes ces étapes sont également accompagnées de sécrétions de prostaglandines de type $PGF_2\alpha$ par la thèque et la granulosa (67,68). Ces prostaglandines permettent la mise en place de réactions inflammatoires impliquées dans l'ovulation. La décharge ovulante de LH/FSH induit à la fois la rupture du follicule par une augmentation massive d'AMPc

(adénosine monophosphate cyclique) provoquant une réaction inflammatoire localisée, l'ovulation et la maturation ovocytaire en corps jaune (67,68) .

La fonction lutéale

Le corps jaune est un composant endocrinien transitoire formé à partir des cellules folliculaires qui ont expulsé l'ovocyte. Le corps jaune se place dans un cycle, appelé cycle lutéal. Il dépend de la succession de plusieurs étapes : sa formation, sa croissance et sa régression. Ces phases sont exprimées durant le métrus et le diétrus. Le corps jaune a pour vocation principale la formation de progestérone : hormone pro-gestative qui permet la mise en place de la gestation (66).

Les hormones sexuelles

Durant le cycle estrien, les ovaires vont sécréter de manière cyclique différentes hormones dont les stéroïdes sexuels : on pourra citer les E2 et la progestérone ainsi que la testostérone (mais en très faible quantité).

Ces hormones font partie des hormones dites stéroïdiennes, elles constituent une famille de molécules apolaires dérivées du cholestérol. Toutes les hormones stéroïdiennes se construisent selon le schéma suivant (66):

- 3 cycles de 6 atomes de carbones A, B, C
- un cycle de 5 carbones D

formant un ensemble à 17 carbones dont les valences libres sont comblées par des hydrogènes. Cette forme de base appelée noyau stérane ou cyclopentanoperhydrophenantrène n'existe pas à l'état naturel (Figure 20).

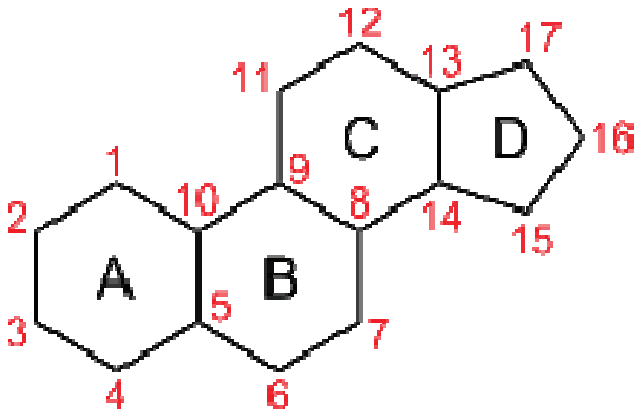


Figure 20: Cycle stérane. (wikipédia)

A l'origine des hormones sexuelles, on retrouve le cholestérol synthétisé *in situ* à partir de l'acétate ou d'origine plasmatique transporté par des lipoprotéines de type LDL (Low density Lipoprotein). Les cellules stéroïdogènes ont la capacité d'effectuer la biosynthèse de cholestérol via l'acétyl-coenzyme A. Cependant cette synthèse est limitée et les besoins des cellules en cholestérol sont approvisionnés principalement par les lipoprotéines. Le cholestérol est soit estérifié à des acides gras via l'acyl cholestérol acyl transférase puis stockés dans des liposomes, soit transporté au niveau de la membrane interne des mitochondries où aura lieu les premières étapes de la stéroïdogénèse (Figure 21).

Cholestérol en prégnénone (66)

La première étape permet la transformation du cholestérol en prégnénone. Cette étape se fait dans la mitochondrie. Elle fait intervenir un complexe enzymatique comportant la P450_{sc}. Ce cytochrome introduit un groupement OH sur la chaîne latérale du cholestérol, permettant de rompre cette dernière via l'interaction d'une desmolase.

Prégnénone en progestérone(66)

La prégnénone donne la progestérone par une deshydrogénation et l'isomérisation de la double liaison du cycle B vers le cycle A assurée par l'enzyme 3 β hydroxystéroïde deshydrogénase.

Prégnénone en androgènes (66)

La biosynthèse des androgènes est assurée par un cytochrome: P450-17 α (17 α -hydroxylase) permettant une hydroxylation en C17. Cela engendre la formation de 17 α -hydroxyprégnénone.

L'androgène déhydroépiandrostérone (DHA) est obtenu à partir de la 17 α -hydroxyprégnénone par oxydation. Cette dernière pourra alors donner de l'androstènedione par une étape d'oxydation et isomérisation. L'androstènedione est convertie en testostérone par l'action d'une enzyme: la 17 β HSD (17 β -hydroxystéroïde deshydrogénase).

Androgène en œstrogènes (66)

L'aromatisation des androgènes en œstrogènes est assurée par un cytochrome: la p450aromatase.

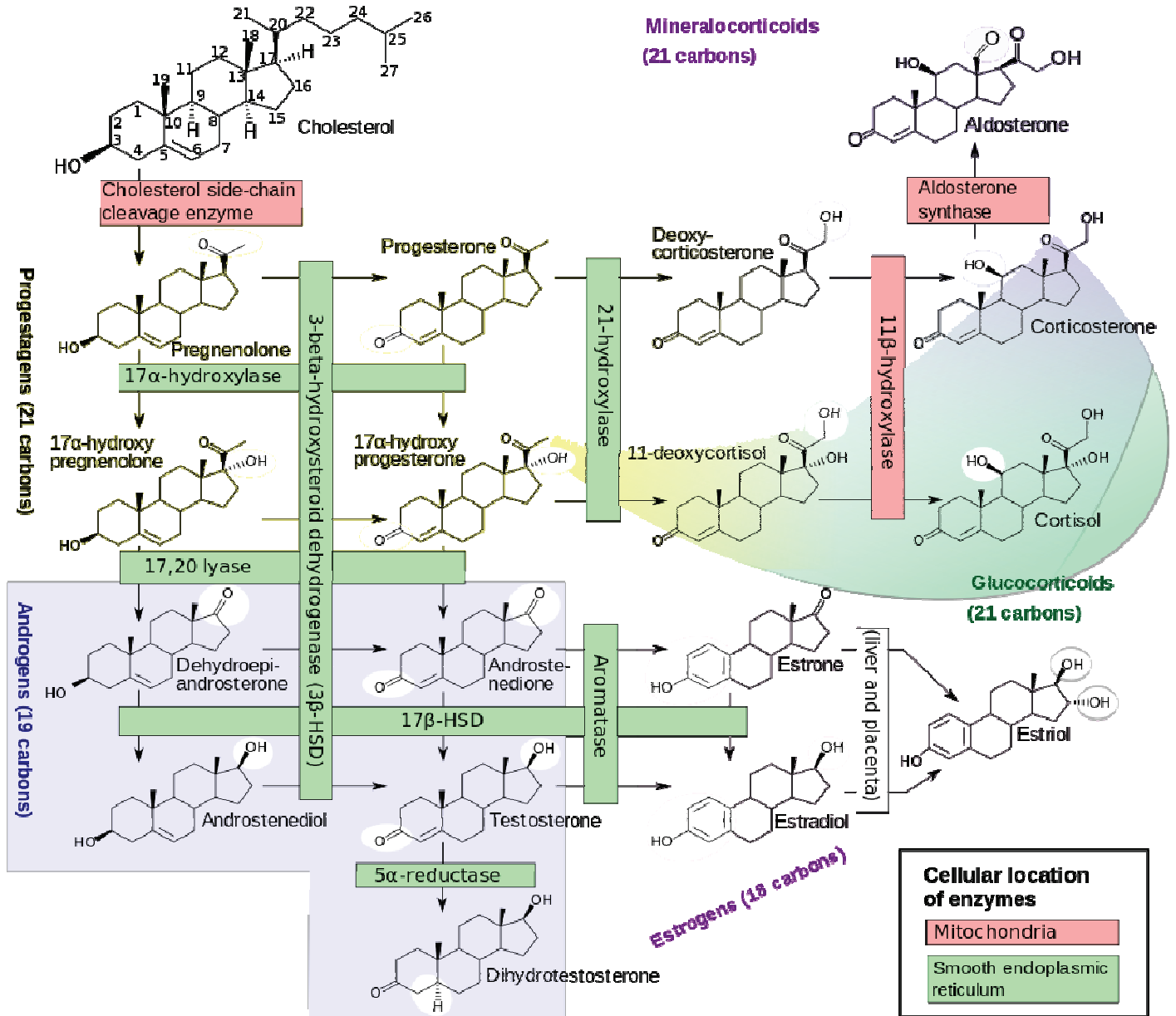


Figure 21: Voie de synthèse des stéroïdes sexuels. (wikipedia)

Régulation de la stéroïdogénèse sexuelle

La stéroïdogénèse sexuelle est principalement assurée par les follicules de l'ovaire. Son activité est soumise à des variations cycliques dépendant de ses stades d'évolution et de sa différenciation. Deux types de cellules sont impliqués dans le système de stéroïdogénèse (66):

- les cellules de la thèque
- les cellules de la granulosa

Elles vont exprimer des profils stéroïdogéniques différents conditionnés par la nature des récepteurs membranaires présents, par l'activité enzymatique, par la compartimentation cellulaire induisant une restriction vasculaire de la thèque.

L'activité de stéroïdogénèse est soumise au contrôle des sécrétions hypophysaires: la FSH et la LH. L'action de la FSH est restreinte aux cellules de la granulosa, tandis que la LH exerce son action sur les deux types cellulaires. Ceci étant expliqué par le profil d'expression des récepteurs aux gonadotrophines (67,68) (Figure 22).

Les cellules de la granulosa présentent le récepteur à la FSH à tous les stades de développement folliculaire, alors que celui de la LH est présent uniquement au cours des derniers stades de maturation folliculaire. Les cellules de la thèque ne possèdent pas de récepteur à la FSH, seulement ceux à la LH et ceci dès le début du développement folliculaire. La réponse des follicules aux gonadotrophines dépend principalement de l'équipement enzymatique cellulaire. La réponse de la granulosa à la FSH durant le stade préantral du développement folliculaire sera la mise en place d'une augmentation de l'activité du complexe enzymatique aromatasase. La sécrétion d'E2 va dépendre en premier lieu de l'apport exogène d'androgènes par les cellules de la thèque. La FSH aura également une action sur la capacité des cellules de la granulosa à produire de la progestérone via les complexes enzymatiques P450_{ssc} et 3 β HSD. La compartimentation citée précédemment empêche une bonne vascularisation de la granulosa qui limite alors la production de progestérone, nécessitant l'apport de cholestérol transporté par les LDL. Durant le développement folliculaire, les cellules de la granulosa vont acquérir le récepteur de la LH,

induit par l'action de la FSH. Les cellules de la thèque vont être le site de production des androgènes stimulé par l'action de la LH (67,68).

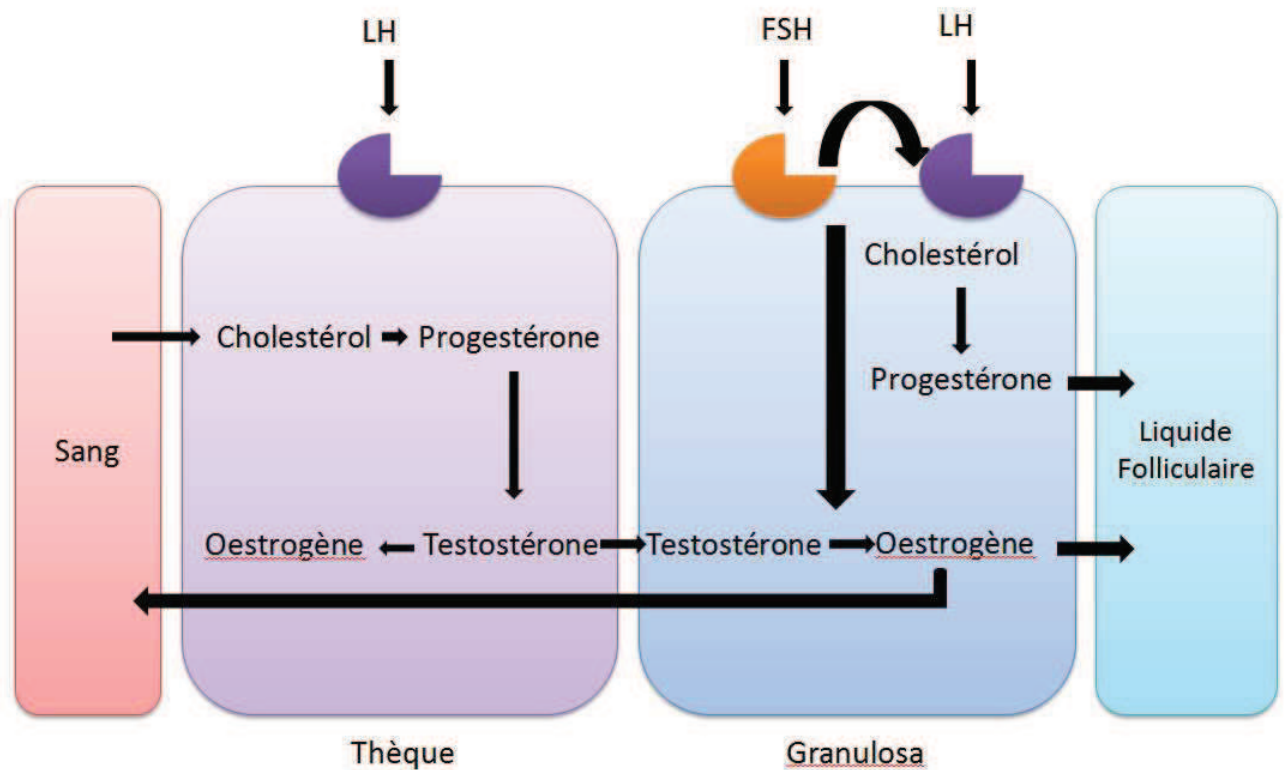


Figure 22: Effets des hormones gonadotropes sur la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa et de la thèque. adapté de Physiologie de la reproduction des mammifère, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.

Rôle de l'œstrogènes dans la reproduction

Les fonctions des E2 sont multiples, elles permettent (66):

- la croissance folliculaire.
- le maintien des caractères sexuels secondaires féminins.
- le maintien de la trophicité vulvaire et vaginale.
- la dilatation du col de l'utérus pour permettre un meilleur passage des spermatozoïdes.
- la stimulation de la glaire cervicale, permettant une meilleure mobilité pour les spermatozoïdes à travers l'utérus.
- l'activation de l'ovogenèse et l'ovulation en stimulant la synthèse des récepteurs à la FSH et LH.

- la stimulation de la croissance cellulaire myométriale, la croissance de l'utérus, la croissance mammaire au cours de la grossesse.

Récepteur aux estrogènes

Le récepteur aux E2 (ER) fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces récepteurs fonctionnent par liaison de l'hormone, fixation du récepteur à une séquence d'ADN spécifique qu'on appelle élément de réponse aux hormones (ERE) présent en amont du promoteur. L'activation des ER entraîne l'activation de gènes responsables de la croissance, de la différenciation cellulaire ainsi que des fonctions de la reproduction. Il existe 3 formes de ER: ER α , ER β et ER γ . Les deux premiers sont retrouvés chez toutes les espèces alors que ER γ n'a été visualisé que chez certaines espèces de poissons (69-71). Il existe également un récepteur membranaire appelé GPR30, permettant des réponses cellulaires plus rapide que les récepteurs nucléaires (72). Il existe plusieurs voies de signalisation cellulaire de l'œstradiol et de son récepteur (Figure 23).

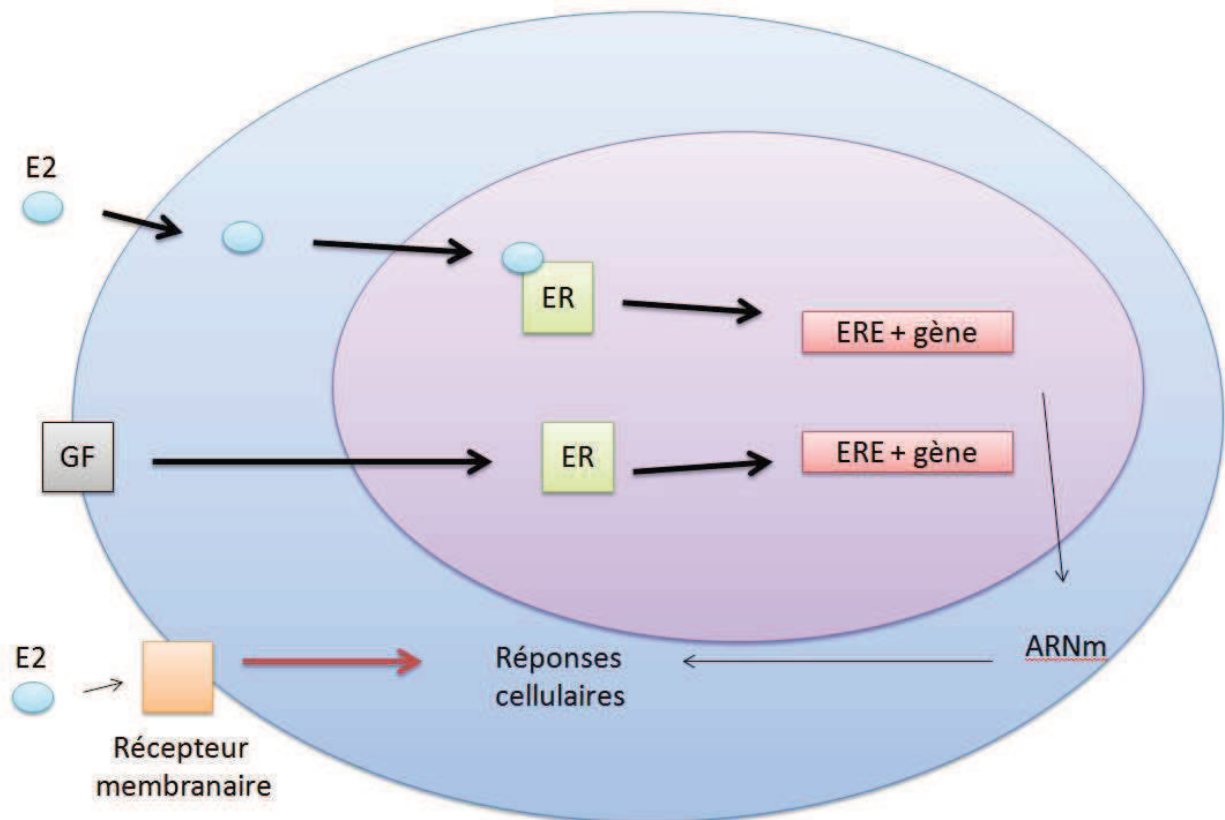


Figure 23: Voies de signalisation des œstrogènes. Il existe plusieurs voies génomiques ou non génomiques. Dans la voie classique génomique, l'E2 se fixe à son récepteur ER, induisant la transcription de gènes pour la réponse cellulaire. Une deuxième voie génomique ligand-indépendant existe, elle fait intervenir des facteurs de croissance (GF), qui provoque la phosphorylation du récepteur permettant sa fixation au site de régulation génomique. Enfin, une voie non génomique fait intervenir des récepteurs membranaires. La fixation du ligand sur ces récepteurs entraîne une réponse cellulaire comme par exemple, une mobilisation calcique. adapté de <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00470517>

Rétrocontrôle des hormones sexuelles sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

Durant la plus grande partie du cycle estrien, les E2 vont exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité des neurones à GnRH, permettant de maintenir des concentrations faibles en LH et FSH. Cependant, l'élévation progressive d'E2, atteignant un certain seuil, va permettre la mise en place d'un rétrocontrôle positif stimulant la sécrétion massive de LH. Ce rétrocontrôle positif est à l'origine de la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH/LH. S'il n'y a pas de fécondation de l'ovocyte, le corps jaune se met à dégénérer, et produit des E2 ainsi que de la progestérone qui aura pour effet l'application du rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH et FSH.

L'effet du rétrocontrôle positif et négatif des stéroïdes sexuels est médié par les neurones à GnRH, cependant ces neurones expriment peu de les récepteurs à ces stéroïdes (73-75). Ceci indiquant qu'il existe au moins un intermédiaire transmettant les effets de ces rétrocontrôles.

Le cycle ovarien est caractérisé par la croissance folliculaire, l'ovulation, et la formation du corps jaune. Ce cycle va moduler la sécrétion de stéroïdes sexuels qui auront une action de rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Ceci en modulant l'activité des neurones à GnRH. Durant la majorité du cycle, les E2 auront un effet de rétrocontrôle négatif, alors que durant le proestrus, les concentrations élevés d'E2 auront un effet stimulant sur les neurones à GnRH. Cela permet la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH/LH à l'origine de

l'ovulation. Cependant l'effet des E2 ne se fait pas directement sur les neurones à GnRH mais par l'intermédiaire de populations neuronales exprimant le Kp.

Kisspeptine

Découverte des Kisspeptines

Les éléments caractérisant le système *Kiss1* ont été identifiés en 2001, alors que son rôle dans la reproduction n'a été découvert qu'à la fin de l'année 2003. En 2001, le kisspeptine (Kp) était connu sous le nom de métastin, pour ses propriétés anti-métastatiques. En effet, plusieurs études ont pu mettre en relation l'action de la métastin avec différents cancers. Une diminution de ce peptide était observée dans plusieurs types de cancers (76). L'élévation de son expression permettait une amélioration voir une guérison de certains cancers comme les mélanomes de la peau. Ces effets thérapeutiques sont principalement dus à l'action de la métastin sur le remodelage tissulaire par l'intermédiaire de métalloprotéases, sur l'activité chimotactique du récepteur CXCR4 (77) (responsable de la migration cellulaire cancéreuse, à l'origine de formation métastatique).

Ce n'est qu'en 2003, que deux études indépendantes ont démontré l'action de ce peptide dans la fonction de reproduction a été découverte. Une première étude a montré que des patients souffrant de forme d'hypogonadisme idiopathique familial présentaient des mutations sur le récepteur GPR54, récepteur des Kp (78). En parallèle, une étude cherchant à phénotyper des souris avec une mutation fonctionnelle de GPR54 (récepteur aux Kp, appelé également Kiss1R) a montré un hypogonadisme similaires aux patients affectés (79) (Figure 24); à savoir une immaturité sexuelle, des déficiences fonctionnelles soutenues par les gonades (80-82). Ainsi les observations de deux équipes (de Roux (78) et Seminara (79)) ont permis de mettre en avant le rôle indispensable du récepteur GPR54 et de son ligand. La caractérisation neuroendocrine chez l'Homme a permis de montrer que la mutation/délétion du gène *GPR54* engendrait des symptômes d'hypogonadismes, mais les patients conservaient leur sensibilité à l'apport exogène de GnRH, montrant ainsi une préservation fonctionnelle de la glande pituitaire (78). De plus, l'étude chez des modèles murins (*GPR54*-null) démontre une conservation de l'intégrité des neurones à GnRH (79). Ainsi l'absence de déficience au niveau de la migration des neurones à GnRH lors de l'embryogenèse et de la synthèse de GnRH de la pituitaire chez des individus présentant un

système *Kiss1*/GPR54 altéré tend à montrer le rôle primordial de ce système dans la régulation des neurones à GnRH. L'absence d'un signal Kpergique ou de son intégration entraîne une suppression de la sécrétion de GnRH.

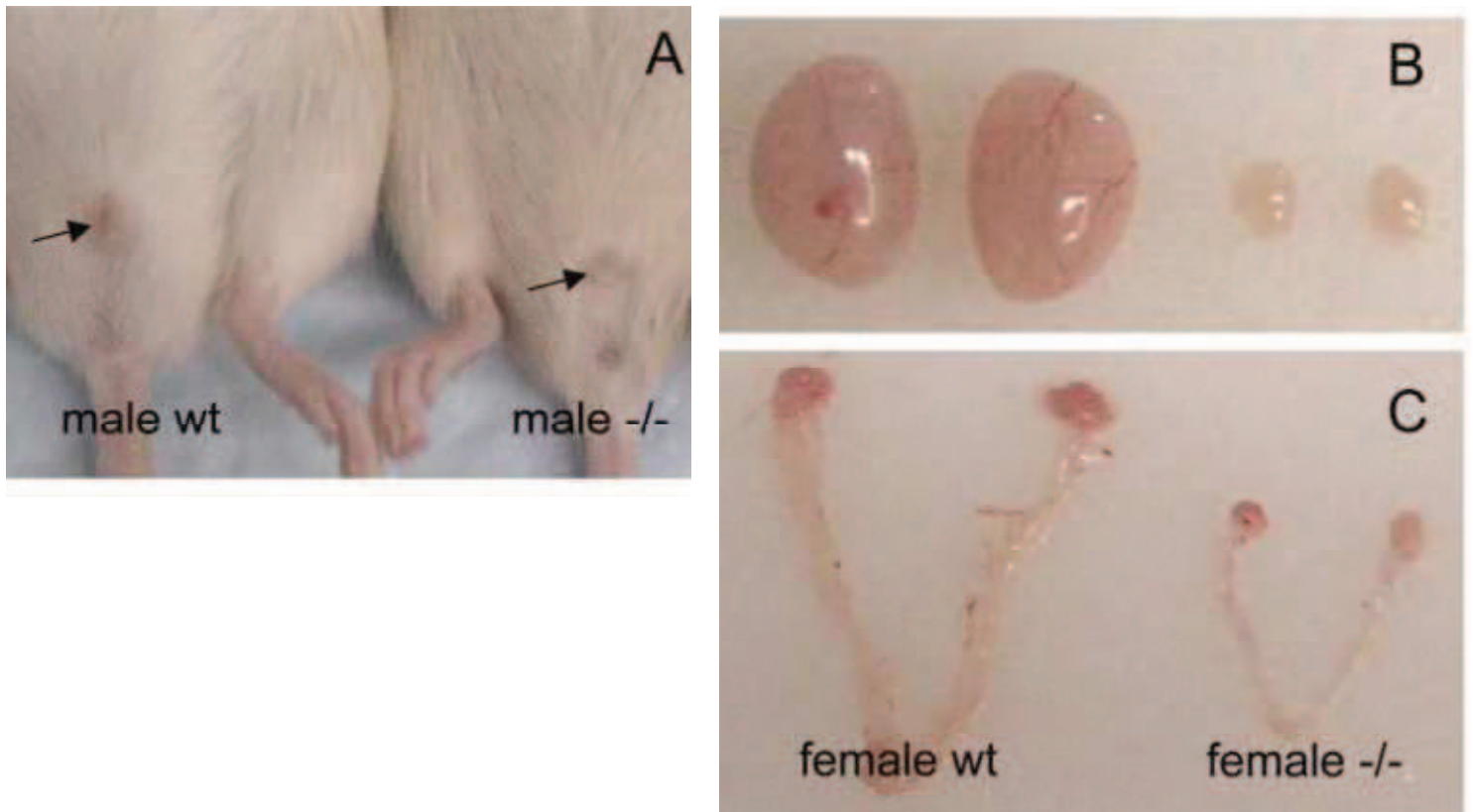


Figure 24: Visualisation des organes de reproduction chez des souris mâle et femelle intacte ou *Kiss1r* ^{-/-} A: vue externe de mâle WT et *Kiss1r* ^{-/-} montrant une diminution de la taille de l'organe copulateur. B; Réduction de la taille des testicules à droite chez des souris mâles *Kiss1r* ^{-/-}. C: Diminution de la taille du système génital femelle chez des souris femelle *Kiss1r* ^{-/-}. (80)

Transcription et traduction

Les Kp font partie de la famille des RFamides caractérisée par la présence d'un motif Arg-Phe-NH₂. Différentes Kp sont générées par des clivages protéolytiques d'un précurseur appelé prépro-Kp, encodé par le gène *Kiss1* (83-85). Le précurseur humain contient 145 acides aminés (AA) possédant une séquence signal de 19AA, et une région centrale de 54AA (Kp-54). La protéolyse du prépro-Kp par l'intermédiaire de différents sites de clivages, présent au nombre de 3, génère la production du peptide Kp54 arborant la séquence RFamide. Plusieurs fragments du précurseur de Kp ont été identifiés : Kp14, Kp13 et Kp10, qui partage en commun avec Kp54 les 10 AA en position C terminale (83,86) (Figure 25). Chez le rat et la souris, le produit protéolytique majeur est composé de 52AA, et la signature RFamide est remplacée par un motif Arg-Tyr-NH₂. A ce jour, la génération endogène des différents fragments Kp14, Kp13, Kp10 reste controversée. La production pourrait provenir directement d'un clivage protéolytique du précurseur, ou être le fruit d'une dégradation non spécifique du produit majeur Kp54. De plus, il n'est pas encore défini quelle est la forme prédominante présente dans les différents tissus. Cependant, il est admis que le plus petit fragment actif est Kp10.

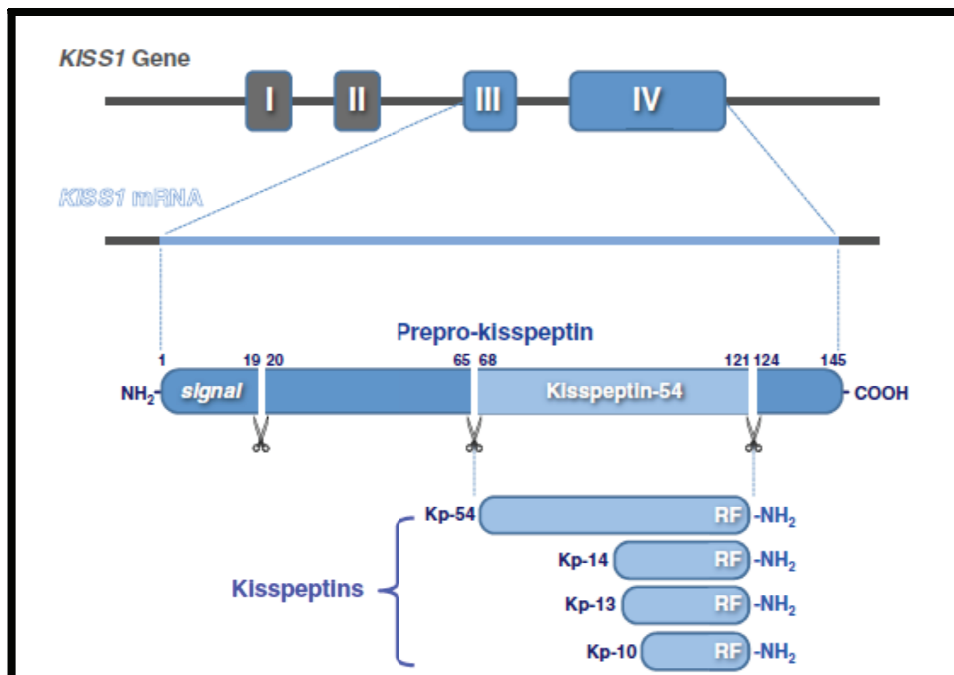


Figure 25:
Transcription et traduction issue du gène *Kiss1* (87). Il est constitué de 4 exons ainsi que de 3 sites de clivage.

Récepteur kiss1R ou GPR54

La signalisation intracellulaire déclenchée par l'activation de GPR54 a initialement été étudiée sur des modèles cellulaires (CHO-K1, HEK203 ou encore B16-BL6) qui exprimaient le récepteur GPR54 humain ou du rat (83-85).

Le récepteur GPR54 ou Kiss1R possède 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine Gq/11 (Figure 26). Son activation résulte en une mobilisation calcique (Ca^{2+}) intracellulaire. Cette dernière est provoquée par l'activation d'une phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP_2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3). Ce dernier pourra alors se lier à des canaux calciques présents au niveau du réticulum endoplasmique libérant du Ca^{2+} dans le cytoplasme. L'activation de GPR54 induit également la formation de diacylglycérol (DAG) qui active la PKC. Cette kinase provoque la phosphorylation de MAP kinases jouant un rôle dans des fonctions de prolifération et migration cellulaire.

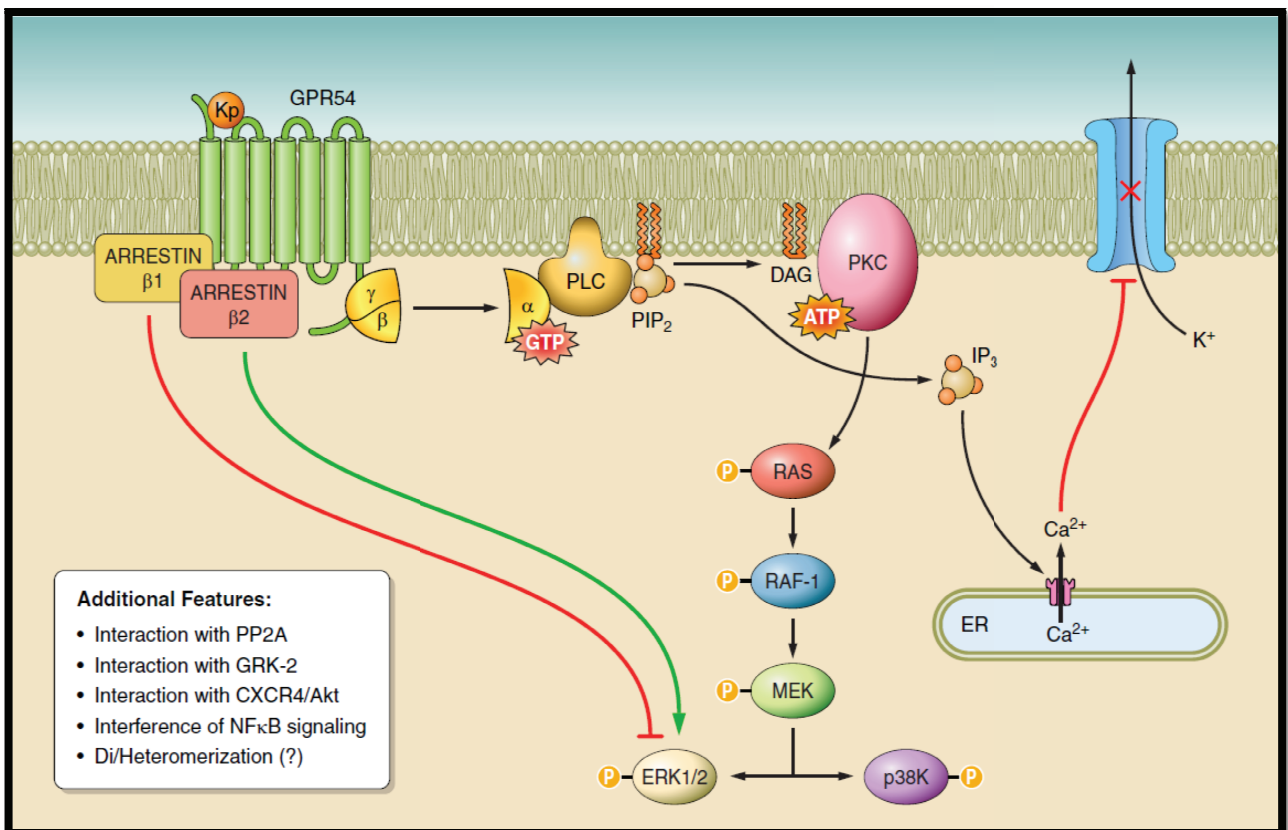


Figure 26: Voie intracellulaire de transduction du récepteur couplé à la protéine G de Kiss1R. (87)

Localisation de *Kiss1* chez les rongeurs

Le gène *Kiss1* sont hautement exprimés au niveau du placenta, le thymus, les testicules ainsi que dans les ovaires. De faibles niveaux d'ARNm *Kiss1* sont également détectés au niveau du foie, du pancréas, du petit intestin, du colon, et la rate (85).

Dans le cerveau, le gène *Kiss1* est exprimé dans un nombre restreint de régions (Figure 27). Chez les rongeurs, l'ARNm *Kiss1* est trouvé principalement au niveau de l'ARC, et de l'AVPV (35,88-91). On peut également trouver des neurones *Kiss1* positifs dans les noyaux périventriculaires, le noyau pré-optique antéro-dorsal, et dans l'amygdale médiale (35).

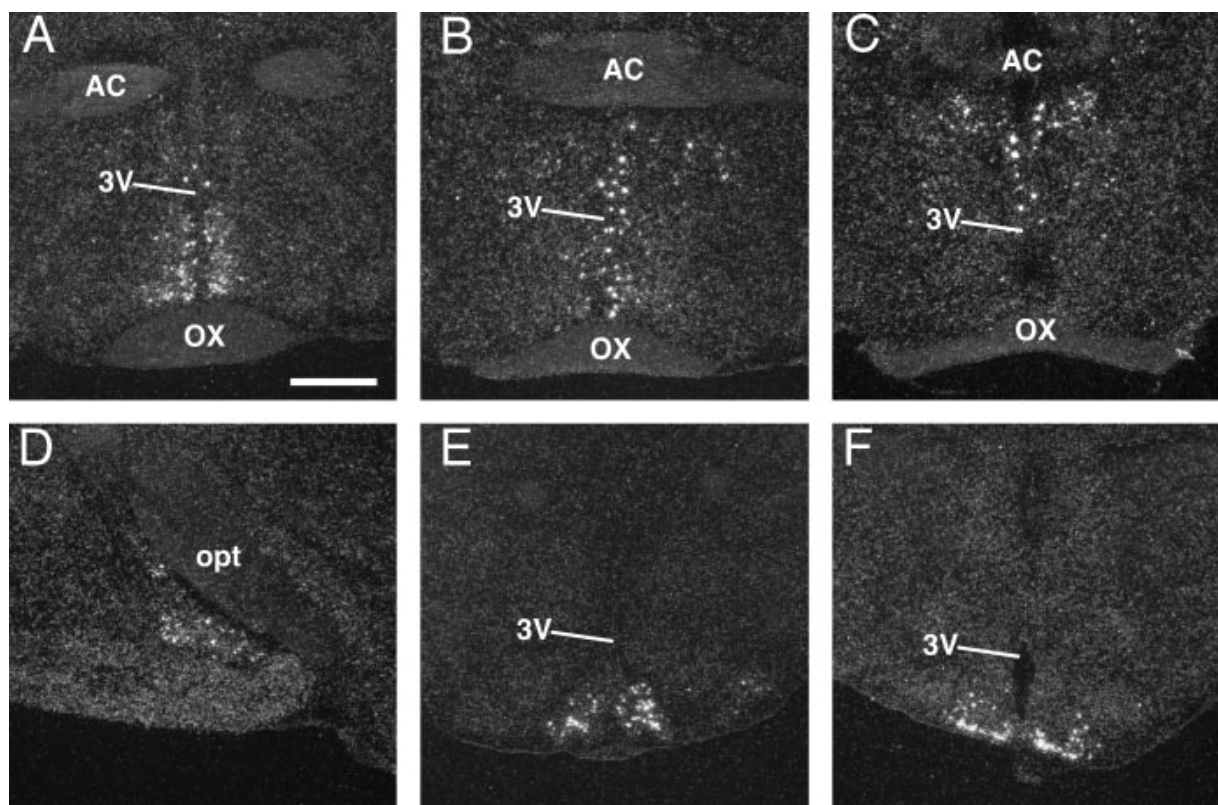


Figure 27: *Distribution de l'ARNm Kiss1 chez la souris.* On retrouve des neurones exprimant *Kiss1* au niveau de l'AVPV (A), des noyaux périventriculaires (B), du noyau pré-optique antéro-dorsal (C), de l'amygdale médiale (D), et du noyau arqué (E et F). AC = commissure antérieure, OX = chiasma optique(35)

Dans le cas des neurones à *Kiss1* présents au niveau de l'AVPV, ils sont sexuellement dimorphiques (92,93). Le nombre de neurones à *Kiss1* est plus grand chez les femelles comparativement aux mâles (*Figure 28*). Cette différenciation sexuelle est à l'origine de la modulation spécifique des neurones à GnRH. Cette mutation est nécessaire pour la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH/LH conditionné par l'effet de rétrocontrôle positif des E2 chez les souris femelles (94).

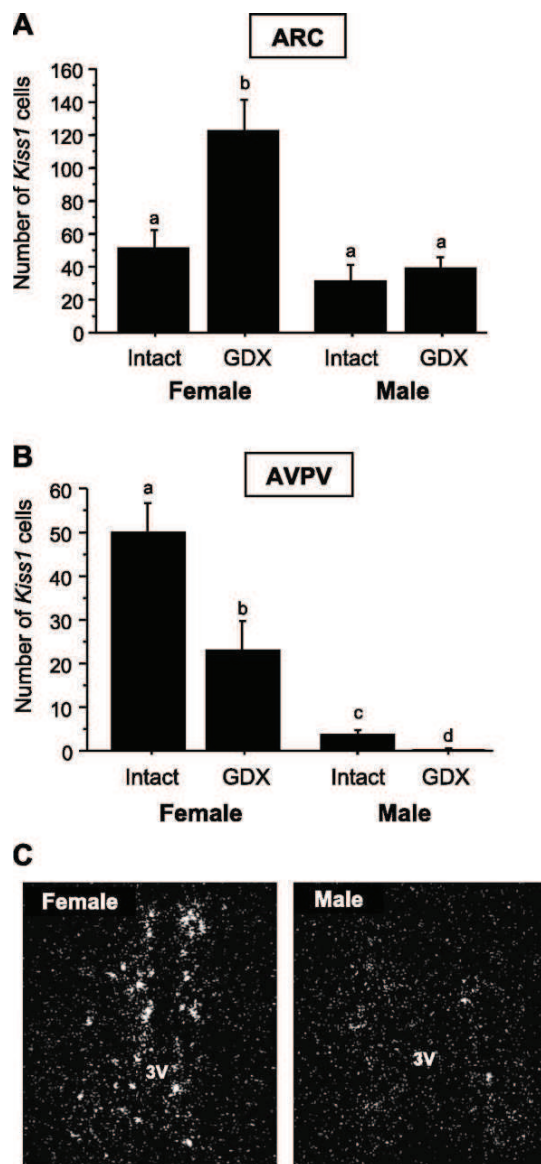


Figure 28: Différence sexe dépendante du nombre moyen de neurones à Kiss1 dans l'ARC et l'AVPV chez des souris mâles et femelles intactes ou gonadoectomisées (GDX). A: nombre de cellules Kiss1 positives au niveau de l'ARC. B: nombre de cellules Kiss1 positives au niveau de l'AVPV. C: photomicrographie des neurones à Kiss1 dans l'AVPV chez une femelle et un mâle. (95)

Localisation de Kiss1R chez les rongeurs

Chez les rongeurs, on peut observer des niveaux élevés d'expression de Kiss1R dans l'hypothalamus et le noyau amygdaloïde (Figure 29). Il est exprimé majoritairement au niveau de la zona incerta, l'aire tegmentale ventrale, le gyrus denté, l'ARC, le DMH (hypothalamus dorso-médian), le cortex olfactif, le noyau habénulaire latéral, l'aire hypothalamique latérale, le locus coeruleus, amygdale corticale et médiale. Il est également exprimé dans le colliculus supérieur, l'aire préoptique médiale, l'aire antérieure hypothalamique, l'aire postérieure hypothalamique, la substance grise périaqueducale, le noyau thalamique parafasciculaire, le noyau parabrachial, et nucleus pré-mamillaire (80,83-85,96).

En périphérie, on retrouvera le Kiss1r au niveau du pancréas, du placenta et l'ovaire. De plus bas niveaux seront présents dans la rate, le petit intestin, les glandes surrénales, les nœuds lymphatiques (83,85).

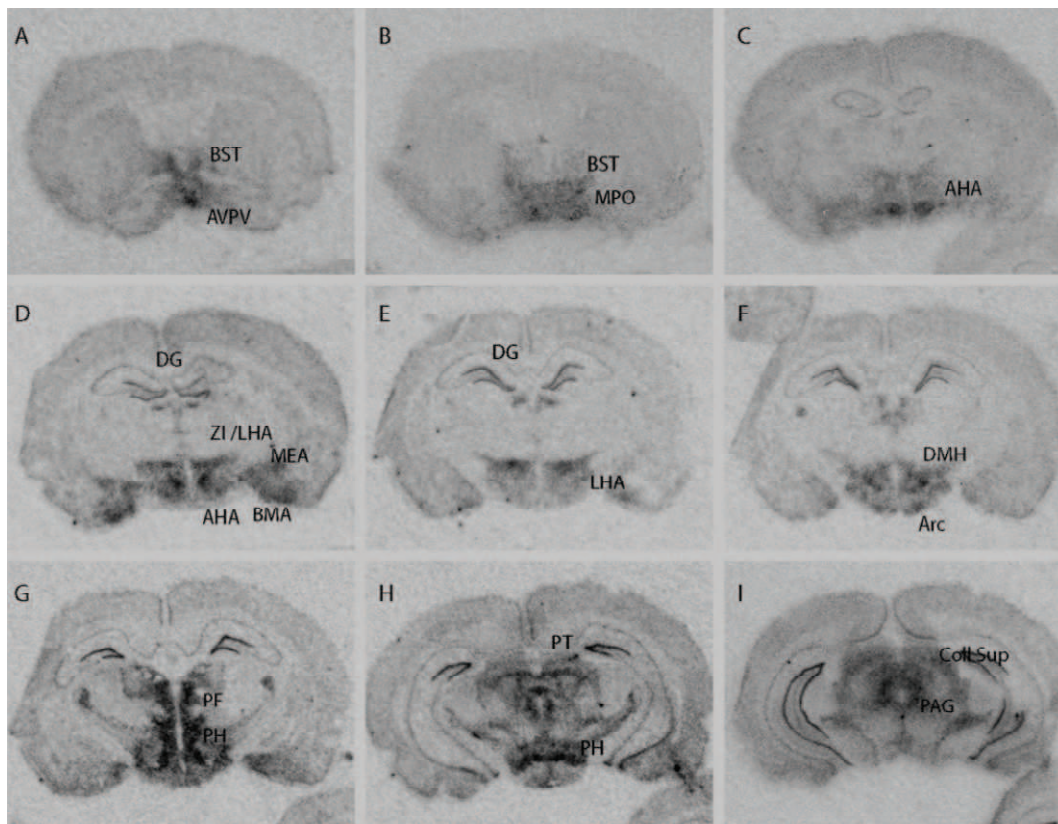


Figure 29: *Distribution de Kiss1R après hybridation in situ.* BST = lit du noyau de la strie terminale. AVPV= aire antéro-ventrale périventriculaire. AHA = aire hypothalamique

antérieure. MPO = noyau préoptique médian. LHA = aire hypothalamique latérale. MEA = amygdale médiale. DMH = Hypothalamus dorsomédian. ARC = noyau arquée. PH = Hypothalamus postérieur. PAG = periaqueducal gris. Mikkelsen et al. non publié.

Fonction des Kisspeptines : Invasion trophoblastique

On retrouve chez les femmes enceintes, une augmentation drastique de la quantité de Kp placentaire, particulièrement durant le premier trimestre (97). Ce peptide jouerait un rôle important dans la régulation de l'invasion trophoblastique dans la paroi utérine. Ce processus est essentiel pour le développement fœtal, et se rapproche étroitement du mécanisme d'invasion de cellule cancéreuse. En effet, *Kiss1* et son récepteur sont exprimés de manière élevée dans le placenta, et ceci dès les premiers stades précoces du développement placentaire (98,99). Des problèmes au niveau du complexe *Kiss1/Kiss1R* entraîneraient des complications liées à la grossesse, et seraient responsables de ce qu'on appelle les pré-éclampsies (100,101). Ce sont des anomalies de vascularisation du placenta entraînant une hypertension artérielle et une hypoxie chez le fœtus.

Fonction des Kisspeptines : Mise en place de la puberté

Les Kp sont importants pour la mise en place de la puberté. L'inactivation du gène *Kiss1R* prévient le développement de la puberté (79,80). L'administration répétée de Kp chez des femelles juvéniles permet d'avancer la période d'ouverture vaginale (signe de la mise en place de la puberté) (102). La puberté va être mise en place par:

1. Une augmentation du nombre de neurones exprimant Kp (102)
2. Une augmentation du nombre d'appositions Kpergiques sur les neurones à GnRH (92)
3. Une augmentation de la sensibilité des neurones à GnRH à la Kp (103)

Fonction des Kisspeptines: Activation des neurones à GnRH

Les Kp sont connues à ce jour comme le neuropeptide le plus puissant en terme d'activation des neurones à GnRH. En effet, l'application de faible dose de l'ordre du fmole augmente considérablement les niveaux de LH et de testostérone, via la dépolarisation des neurones à GnRH (Figure 30a et 30b) (35). Chez les rongeurs, 80% des neurones à GnRH expriment le gène précoce c-fos, marqueur d'activation cellulaire après l'administration centrale de Kp via l'activation préliminaire du récepteur GPR54r (103-105). Les Kp induisent une dépolarisation de plus de 90% des neurones à GnRH (103). On peut observer par immunoréactivité que des appositions Kpergiques sont présentes au niveau du corps cellulaire des neurones à GnRH mais également au niveau de leurs terminaisons nerveuses situées dans l'éminence médiane (106,107).

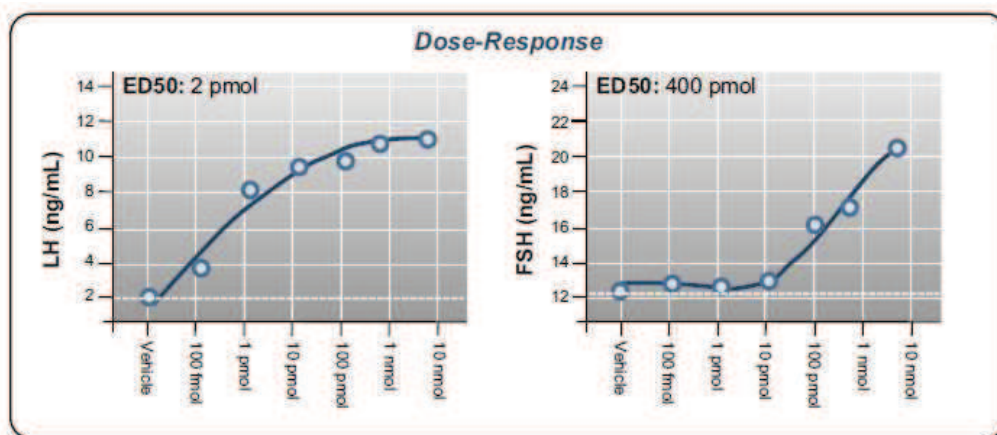


Figure 30a: *Courbe dose réponse de Kisspeptine sur la sécrétion de LH et FSH chez le rat male. Injection ICV de Kp-10 à différentes concentrations du peptide chez des rats adultes.* (87)

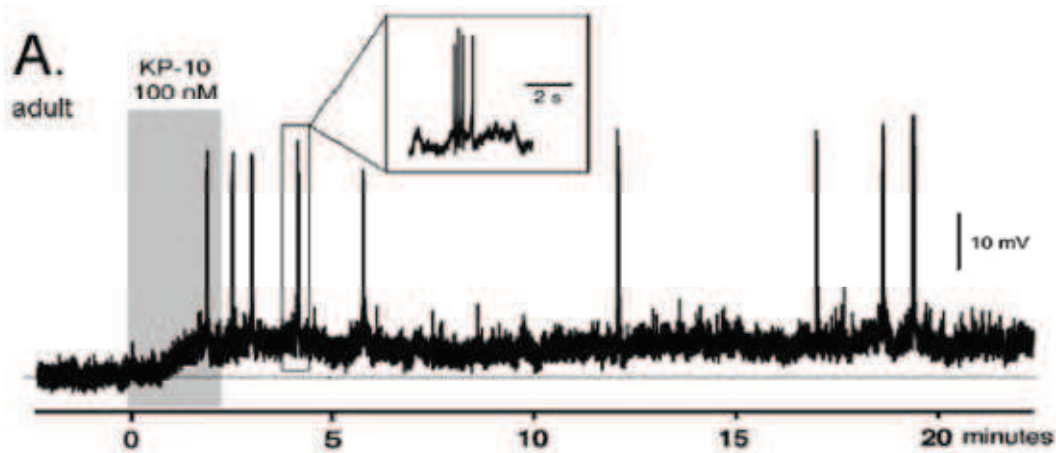


Figure 30b: Enregistrement de la réponse d'un neurone à GnRH suite à l'application de 100nM de Kp-10 chez une souris adulte male. Les neurones à GnRH sont dépolarisés et couplés à des bursts de potentiel d'action et ceci plusieurs minutes encore, après l'application du peptide. (103)

Neurones à Kp de l'ARC : Intermédiaire du rétrocontrôle négatif des œstrogènes

Il est actuellement établi que les stéroïdes sexuels exercent un rétrocontrôle positif et négatif sur les neurones à GnRH. Cependant, ces derniers possèdent peu de récepteurs aux E2 ou à la progestérone (74,75). L'action des stéroïdes sexuels nécessite donc la présence d'un intermédiaire. Les Kp étant un stimulateur puissant des neurones à GnRH et présentant les récepteurs ER α , ils sont devenus un candidat potentiel pour médier l'effet feedback des E2 durant le cycle estrien sur l'activité de l'axe HHG. Plusieurs études ont pu mettre en évidence l'action des E2 sur l'expression de *Kiss1*. Par RT-PCR, il a été montré que l'expression de l'ARNm de *Kiss1* était inhibée par l'estradiol dans des fragments de tissus hypothalamiques (108). Au contraire, chez des femelles ovariectomisées, qui ne sécrètent plus d'E2, l'expression d'ARNm de *Kiss1* est plus élevée dans ces tissus (88,89,104). Le noyau arqué exprime le *Kiss1*, dont l'expression est inhibée par les E2 via les récepteurs aux E2 (89).

Neurones à Kp de l'AVPV : intermédiaire du rétrocontrôle positif des œstrogènes

L'AVPV est sexuellement dimorphique avec une quantité plus importante de neurones à Kp chez les femelles comparativement aux mâles alors que dans l'ARC le nombre est identique (92). Une ovariectomie réduit l'expression de *Kiss1* dans l'AVPV. Au contraire, un traitement aux E2 augmente l'expression du peptide (88,89) (Figure 31). Ces études permettent de démontrer l'importance cruciale des neurones à Kp de l'AVPV dans le rétrocontrôle positif des E2. Cette structure est particulièrement importante pour la reproduction chez la femelle. En effet, lors de l'augmentation progressive des concentrations circulantes d'E2 qui mettra en place le rétrocontrôle positif, ce sont ces neurones qui seront responsables de la mise en place du pic pré-ovulatoire de GnRH/LH. Les neurones à Kp de l'AVPV expriment le récepteur ER α par lequel se fait le rétrocontrôle positif (88,89).

L'administration d'un antisérum Kp ou d'un antagoniste bloque la survenue du pic pré-ovulatoire de LH (106,109). De plus, l'expression de *Kiss1* dans l'AVPV augmente durant le proestrus, avec une activation de cFos au moment du pic pré-ovulatoire de LH (110,111). On pourra également citer l'absence de pic de LH chez des souris KO *Kiss1* avec un traitement oestrogénique (112).

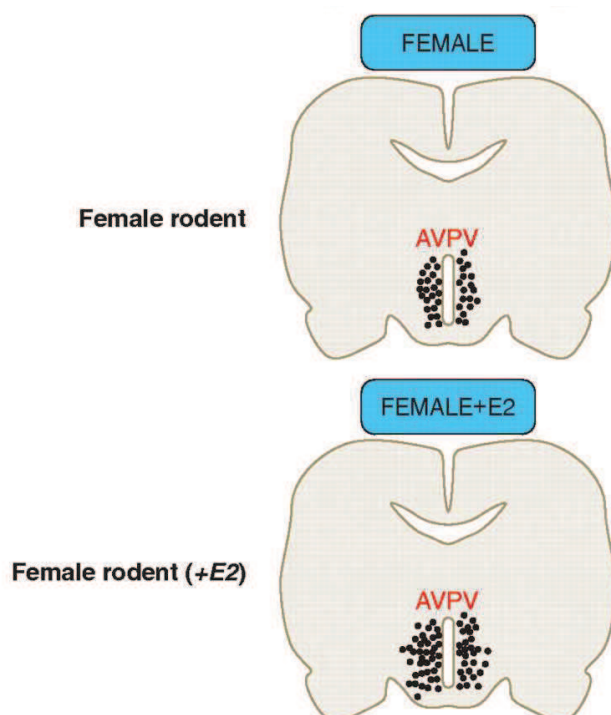


Figure 31: Régulation des Kisspeptines chez la femelle en fonction des taux d'œstrogènes (E2). Les E2 augmentent le nombre de neurones Kp-positifs (87)

ARC versus AVPV

Pour expliquer les différentes actions des E2 sur l'expression de *Kiss1* dans ces deux régions, il a été suggéré que l'E2 avait une signalisation intracellulaire dite classique dans l'AVPV, alors qu'elle présenterait une voie de signalisation dite non classique dans l'ARC (113). Ceci suggère donc un rôle différent des deux régions dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH. De plus, ces deux structures agissent sur différentes parties des neurones à GnRH. Les neurones à Kp de l'AVPV contacteraient majoritairement le corps cellulaire des neurones à GnRH, tandis que ceux de l'ARC feraient apposition sur les terminaisons nerveuses dans l'éminence médiane (114-116). L'AVPV apparaît comme indispensable dans le déclenchement du pic de LH alors que l'ARC piloterait la pulsativité des neurones à GnRH.

ARC contrôle la pulsativité des neurones à GnRH

On sait à ce jour, que la pulsativité de sécrétion Kpergique coïncide avec les pulses de GnRH. L'activité électrique rythmique et en burst dans l'ARC coïncide également avec les pulses de LH. Un modèle de contrôle de la pulsativité des neurones à GnRH a été proposé (117).

Ce modèle consiste en une intégration différentielle par les neurones à Kp de l'ARC de la neurokinine B, et la dynorphine (113,118-121). Ces neurones sont nommés à ce jour, les neurones KNDys. La neurokinine B stimule l'activité en burst de l'ARC en corrélation avec les pulses de GnRH/LH par les récepteurs NKB (NK3) (122), tandis que la dynorphine inhibe spontanément ces bursts via des récepteurs opioïdes de type Kappa (121). Ainsi la NKB agirait comme un accélérateur tandis que la dynorphine jouerait un rôle de frein (Figure 32).

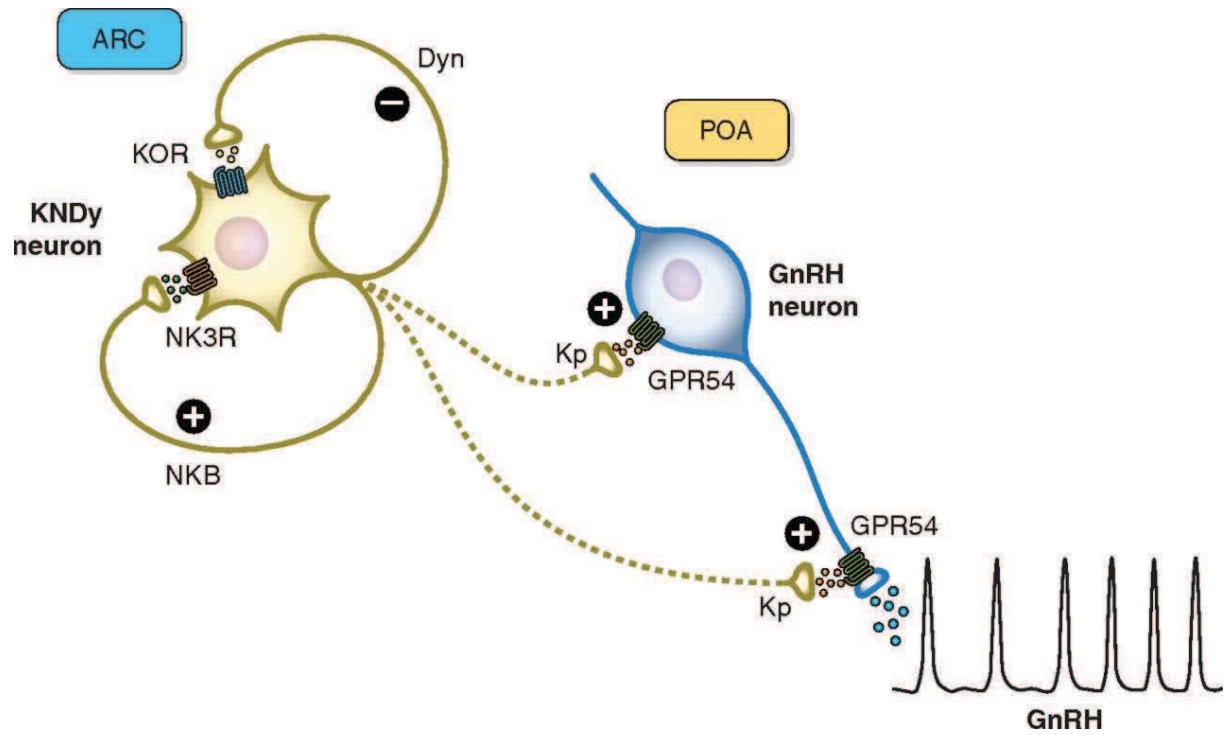


Figure 32: Modèle des neurones KNDy de l'ARC contrôlant la pulsativité des neurones à GnRH. (87). La neurokinine B (NKB) va stimuler l'activité en burst de l'ARC permettant la sécrétion de GnRH. La dynorphine (Dyn) va inhiber l'activité de l'ARC.

AVPV contrôle la survenue du pic de LH de manière circadienne

On sait actuellement que le pic pré-ovulatoire de LH est connu pour avoir une composante circadienne médiée par les noyaux suprachiasmatiques (NSC) (qu'on développera par la suite). Chez des souris OVX+E2, un pic de LH survient tous les jours. Les neurones à Kp de l'AVPV dévoile un pattern circadien de l'expression de *Kiss1* (88) ainsi que de c-Fos, ceci en concordance avec la sécrétion journalière de LH. De ce fait, l'activation journalière des neurones *Kiss1* de l'AVPV dépendrait des E2, suggérant ainsi que la survenue du pic de LH serait la résultante de l'intégration de deux messages: un message oestrogénique et un message circadien (Figure 33).

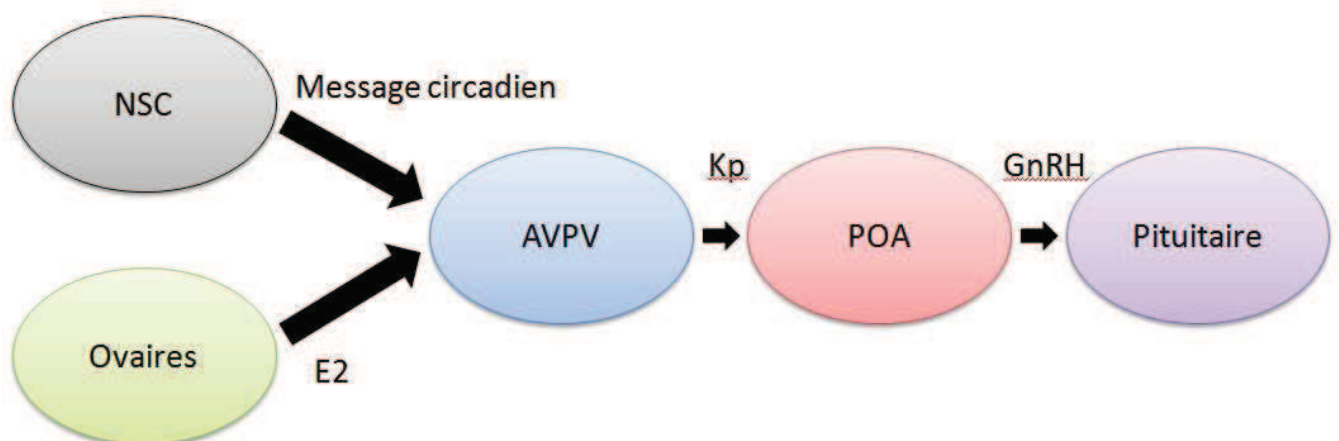


Figure 33: *Modèle d'intégration des messages oestrogéniques et temporels dans la survenue du pic de LH.* (Chassard, non publié)

En conclusion, les Kp sont des neuropeptides, activateurs puissants des neurones à GnRH. Ils sont présents dans deux régions distinctes, l'AVPV et l'ARC dont la régulation par les E2 est différente. L'ARC agit comme contrôleur de la pulsativité des neurones à GnRH, tandis que l'AVPV joue un rôle crucial dans la survenue du pic de LH. Ce pic de LH serait la résultante de la convergence de deux messages, un message oestrogénique provenant des gonades, et un message circadien dont on ne connaît pas encore la nature exacte.

Systeme Circadien

Les rythmes biologiques

Il était une fois les rythmes biologiques

La terre décrivant une rotation autour de son axe génère des variations physiques de l'environnement dans lequel évoluent les êtres vivants : intensité lumineuse, humidité ou encore température. Depuis longtemps, l'étude des processus rythmiques a conduit à de nombreuses observations : battements du cœur, cycles veille/sommeil, sécrétions hormonales... sont reliés directement au changement environnemental sur 24h. En 1729, Jean-Jacques Dortous de Mairan publie des observations qui vont révolutionner notre vision des rythmes biologiques (123) (Figure 34a et 34b). Il a observé le mouvement des feuilles d'une plante appelée *Mimosa pudica* durant plusieurs jours. Il a ainsi observé un rythme dans leurs mouvements avec une période de 24h lorsque la plante était placée en conditions d'alternance jour/nuit (LD = Light/Dark). Chose surprenante, cette même plante placée en condition d'obscurité constante DD (Dark/Dark), présentait également un rythme journalier (Figure 34a). Cette expérience démontre le caractère endogène des rythmes journaliers alors appelé rythmes circadiens.

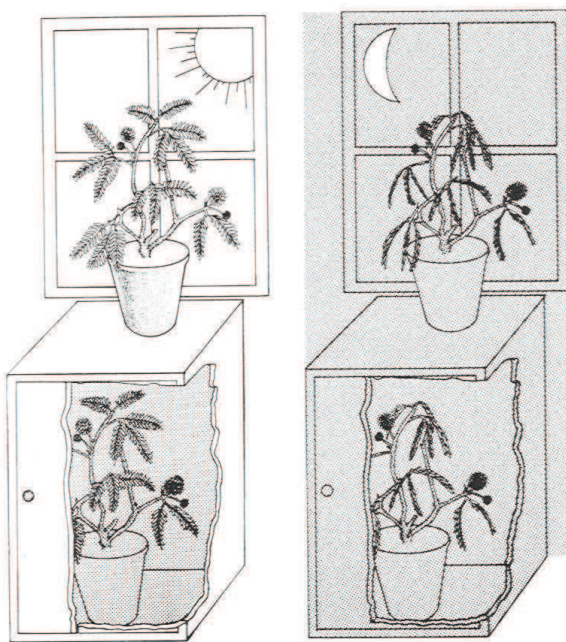


Figure 34a: Modélisation de l'expérience de Jean-Jacques Dortous de Mairan sur le *Mimosa pudica* placé en LD (coté fenêtre) et en DD (dans la boîte).

<http://student.ulb.ac.be/~dgonze/CLOCK S/history.html>

OBSERVATION BOTANIQUE.

ON sçait que la Sensitive est *heliotrope*, c'est-à-dire que les rameaux & les feuilles se dirigent toujours vers le côté d'où vient la plus grande lumière, & l'on sçait de plus qu'à cette propriété qui lui est commune avec d'autres Plantes, elle en joint une qui lui est plus particulière, elle est Sensitive à l'égard du Soleil ou du jour, les feuilles & leurs pédicules se replient & se contractent vers le coucher du Soleil, de la même manière dont cela se fait quand on touche la Plante, ou qu'on l'agite. Mais M. de Mairan a observé qu'il n'est point nécessaire pour ce phénomène qu'elle soit au Soleil ou au grand air, il est seulement un peu moins marqué lorsqu'on la tient toujours enfermée dans un lieu obscur, elle s'épanouit encore très-sensiblement pendant le jour, & se replie ou se resserre régulièrement le soir pour toute la nuit. L'expérience a été faite sur la fin de l'Été, & bien répétée. La Sensitive sent donc le Soleil sans le voir en aucune manière; & cela paroît avoir rapport à cette malheureuse délicatesse d'un grand nombre de Malades, qui s'aperçoivent dans leurs Lits de la différence du jour & de la nuit.

Il seroit curieux d'éprouver si d'autres Plantes, dont les feuilles ou les fleurs s'ouvrent le jour, & se ferment la nuit, conserveroient comme la Sensitive cette propriété dans des lieux obscurs; si on pourroit faire par art, par des fourneaux plus ou moins chauds, un jour & une nuit qu'elles sentissent; si on pourroit renverser par là l'ordre des phénomènes du vrai jour & de la vraie nuit, &c. Mais les occupations ordinaires de M. Mairan ne lui ont pas permis de pousser les expériences jusque-là, & il se contente d'une simple invitation aux Botanistes & aux Phisiciens, qui pourront eux-mêmes avoir d'autres choses à suivre. La marche de la véritable Phisique, qui est l'Expérimentale, ne peut être que fort lente.

F II

Figure 34b: Extrait des expériences de Jean-Jacques Dortous de Mairan.

<http://student.ulb.ac.be/~dgonze/CLOCKS/history.html>

C'est à partir du XXème siècle que la mise en évidence de la présence de rythmes circadiens chez des espèces animales se concrétise. En 1939, Johnson met en lumière les rythmes circadiens d'activités locomotrices de la souris en suivant les mouvements de ces mammifères selon différentes conditions d'exposition à la lumière (124). Quand elles sont placées en environnement lumineux cyclique (LD), l'activité locomotrice est prédominante durant la nuit, les définissant ainsi comme des espèces nocturnes. Lorsqu'elles sont placées en condition constante d'obscurité (DD) appelé condition de "libre cours", elles conservent un rythme d'activité avec une période proche de 24h, même sans la présence de facteurs externes leur donnant un indice temporel, (Figure 35). On qualifiera alors dans ces conditions, l'expression d'un rythme circadien endogène. Dans le cas de la souris, la période circadienne est légèrement inférieure à 24h. Elles possèdent ainsi un système endogène

M. Marchant a lu la Description De l'*Althoea* Diosc. & Plin. C. B. Pin. 315. Guimare, avec la Critique des Auteurs Botanistes sur cette Plante.

De la *Mitella Americana*, *florum foliis fimbriatis*. Inst. Raii Herb. 242.

Et de la *Sanicula*, seu *Cortusa Americana*, *altera*, *flore minuto*, *fimbriato*. Hort. Reg. Par.



donneur du temps appelé système circadien endogène. Dans les conditions LD, ce système circadien subit une remise à l'heure chaque jour par les variations

journalière de la lumière, afin de synchroniser l'activité locomotrice avec le milieu environnant.

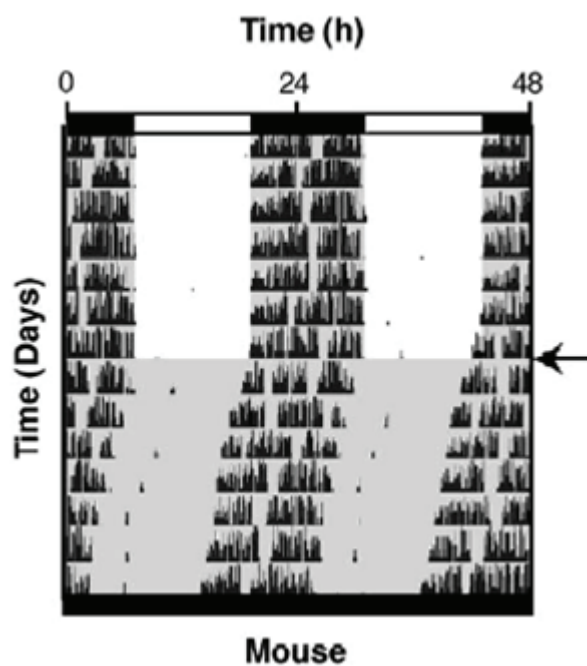


Figure 35: *Représentation de l'activité locomotrice sous forme d'actogramme d'une souris placée en LD puis en DD (flèche). La souris placée en DD exprime une activité locomotrice avec un rythme circadien endogène ayant une période inférieure à 24h.* (d'après Dardente H, et al., 2004)

Et chez l'Homme ? C'est également au XXème siècle que les travaux de J.Aschoff sur des mesures de la température corporelle et des mesures urinaires, ont démontré la présence de rythmes journaliers chez l'Homme (125). Et ceci, même en condition constante environnementale, l'Homme continue de présenter un fonctionnement rythmique avec une période d'environ 25,9 h.

Ainsi, depuis plusieurs siècles, les différents travaux ont permis la mise en évidence d'horloges circadiennes dans la grande majorité du monde animal, végétal ainsi que chez des êtres unicellulaires tel que la levure ou la bactérie.

Terminologie

Le terme circadien a été introduit lors de l'année 1957 par Franz Halberg. Il provient de deux termes latins : "*circa*" autour et "*dies*" jours (126). Il définit la présence d'un rythme biologique proche de 24h généré de manière endogène comme la variation de la température corporelle ou encore la sécrétion de différentes hormones (cortisol, mélatonine...). La propriété endogène du rythme circadien implique que ce dernier soit maintenu même lorsque les paramètres environnementaux restent inchangés. Le déroulement temporel lié au rythme de l'horloge circadienne endogène en temps astronomique est décompté en CT pour "Circadian time" appelé donneur de temps (exemple: CT0 étant défini comme le début du jour subjectif). Il existe plusieurs types de rythmes en fonction de leurs périodes (Tableau 6).

| Rythme | Temporalité | Exemple |
|------------|--|--|
| Circadien | Rythme dont la période est d'environ 24h | Rythmes hormonaux (cortisol, mélatonine) |
| Ultradien | Fréquence supérieure au rythme circadien | Pulsatilité des neurones à GnRH |
| Infradien | Fréquence inférieure au rythme circadien | Menstruation/gestation |
| Circannuel | Cycle à l'échelle d'une année | Reproduction chez les espèces saisonnières |

Tableau 6: Les différents rythmes biologiques en fonction de la durée de leur période.

Propriété d'une horloge circadienne

Les rythmes biologiques circadiens sont sous le contrôle d'horloges circadiennes dont la propriété fonctionnelle est de générer des oscillations mécanistiques de manière auto-entretenu et selon une périodicité d'environ 24h (127). Ces horloges peuvent être entraînées par des facteurs externes permettant de les remettre à l'heure. Cette action est

nécessaire pour que les horloges endogènes soient constamment synchronisées avec les changements environnementaux. Ces facteurs externes sont appelés donneurs de temps ou Zeitgeber (128), on pourra citer la lumière qui est le plus important, ainsi que la température, la prise alimentaire, et même l'interaction sociale. Ainsi les horloges possèdent des voies d'entrées pour l'intégration de messages externes facilitant leur synchronisation au avec les variations environnementales. Le rôle des horloges est d'envoyer des messages temporels à l'organisme par l'intermédiaire de voies de sorties (127)(Figure 36).

Dans le domaine scientifique, on parle également d'oscillateur périphérique. Pour différencier une horloge d'un oscillateur, il faut regarder les propriétés citées précédemment. Si la structure présente les 3 paramètres en même temps: auto-entretenu, voie d'entrée, voie de sortie, c'est une horloge. Dans le cas contraire c'est un oscillateur. Cette définition est soumise à plusieurs débats dans la communauté scientifique.

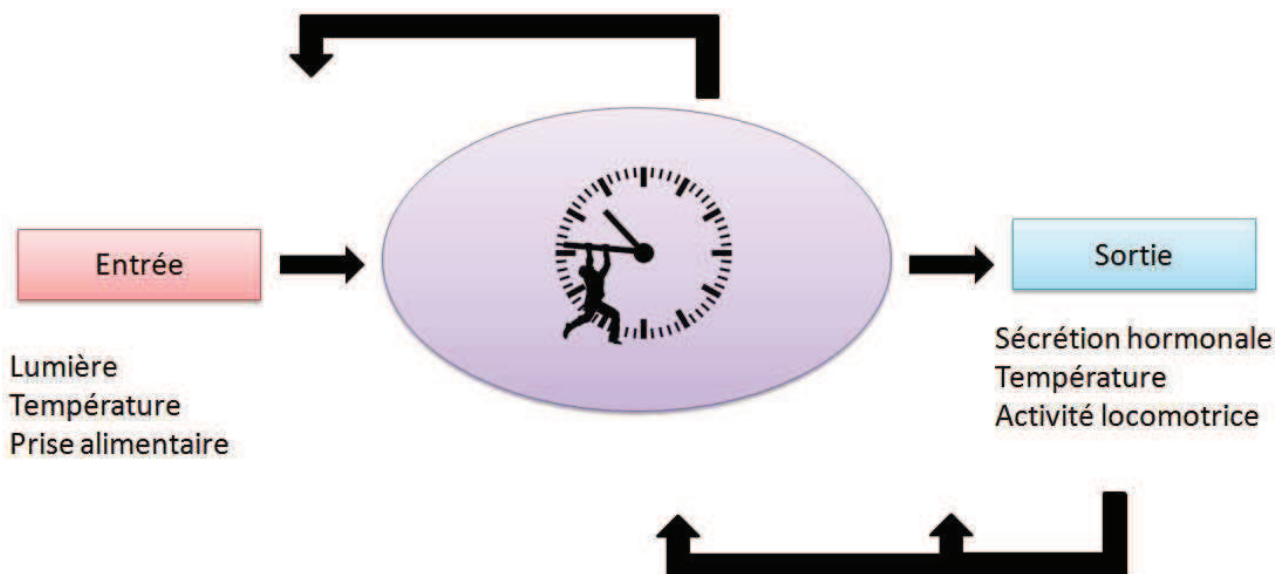


Figure 36: Modèle d'une horloge biologique. Une horloge exprime des oscillations circadiennes, qui sont synchronisées par des voies d'entrées, et qui transmettent un message temporel par des voies de sorties. Les sorties peuvent agir sur elles-mêmes, ou sur l'horloge. L'intégration des messages entrants peuvent être modulés par l'horloge. (chassard, non publié)

Ces horloges circadiennes donnent aux individus un avantage adaptatif. Elles donnent accès à une lecture du temps, qui régulent différentes fonctions biologiques. Ceci dans l'objectif que l'individu se synchronise avec son environnement. La perturbation de ces horloges entraîne le plus souvent des pathologies plus ou moins graves. Dans le cas de l'espèce humaine, le dysfonctionnement biologique de ces horloges entraîne un éventail de pathologies (troubles du sommeil, anxiété, diabète, cancer, et ce qui nous intéresse ici des problèmes de fertilités)(129).

Ainsi, la plupart des organismes possèdent un système endogène permettant de "lire le temps". Ils présentent un système circadien fonctionnant sur environ 24h. Ce dernier apporte une valeur adaptative à l'individu en favorisant sa synchronisation à son environnement.

Fonctionnement du système circadien

Le système circadien repose principalement sur un mécanisme génétique complexe endogène faisant intervenir des protéines dites "horloges" issues de la transcription/traduction de gènes "horloges".

Le mécanisme moléculaire à la base du système circadien : l'horloge moléculaire

Le modèle actuel expliquant le fonctionnement d'une horloge circadienne fait intervenir des boucles d'autorégulations transcriptionnelles sur 24h. Des éléments de cette boucle régulent de manière rythmique l'expression de gènes appelés gènes contrôlés par l'horloge, ou gènes de sortie de l'horloge (CCG: clock controlled genes) (130). Ces derniers constituent la voie de sortie de l'horloge circadienne.

Boucle positive : Bmal1 et Clock

CLOCK (Circadian locomotor output kaput) et BMAL1 (Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like) sont deux facteurs de transcriptions s'hétérodimérisant via leur domaine PAS: Period-ARNT-Sim. Ils activent la transcription des gènes *period* (*Per*) et *cryptochrome* (*Cry*) en se liant à l'ADN via leur domaine bHLH-PAS: (basic-Helix-Loop-Helix) au niveau d'une séquence appelée E-Box (5'-CACGTG-3') (131,132). Cette séquence n'est autre qu'un site régulateur de la transcription génique. CLOCK et BMAL1 vont également stimuler l'expression de gènes de sortie de l'horloge qui comprennent la séquence E-Box.

Boucle négative : Per et Cry

Les protéines PER et CRY présentes dans le cytoplasme s'hétérodimérisent via leur domaine PAS, et migrent dans le noyau pour inhiber l'activité transcriptionnelle du dimère CLOCK/BMAL1 (133,134). Cela aura pour conséquence une inhibition progressive de leur propre transcription. Par conséquent, une concentration élevée du dimère PER/CRY entraînera une inhibition du complexe BMAL1/CLOCK, tandis qu'une concentration faible du dimère permettra à la boucle positive de reprendre sa fonction transcriptionnelle (Figure 37 et 38). Des processus de phosphorylations de PER par des caséines kinases régulent l'entrée dans le noyau du dimère PER/CRY.

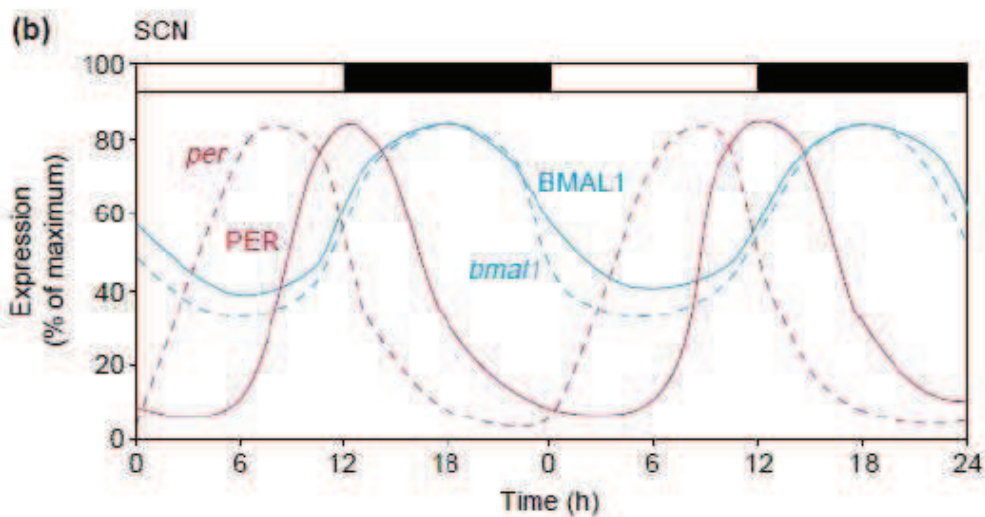
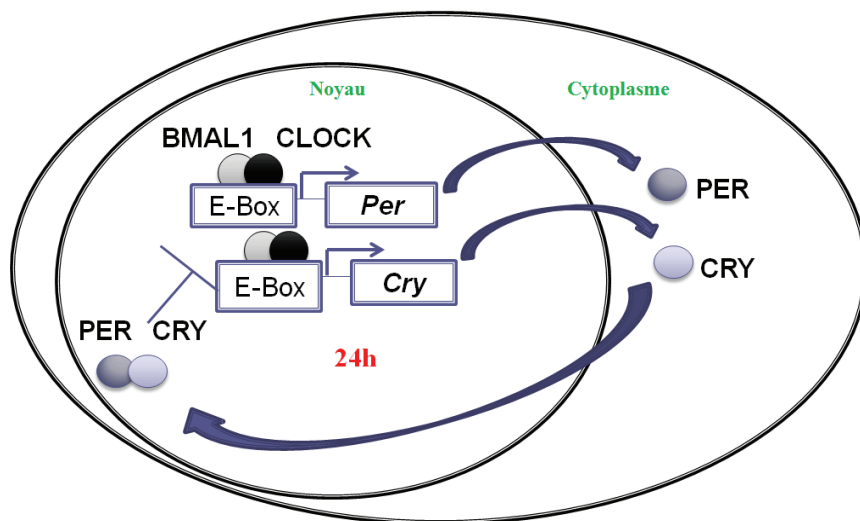


Figure 37: Expression des gènes et protéines horloges PER et BMAL1 dans les noyaux suprachiasmatiques au cours du temps. (135)



*Figure 38: modèle de régulation transcriptionnelle/ traductionnelle des gènes horloges. (chassard non publié). Les facteurs de transcriptions CLOCK/BMAL1 vont stimuler la transcription des gènes *Per* et *Cry*. Les protéines PER et CRY vont se lier et inhiber l'activité transcriptionnelle de BMAL1/CLOCK.*

Boucles secondaires

En plus de ces deux boucles principales de rétrocontrôle transcriptionnel se rajoutent des boucles dites secondaires. Ces dernières ont pour rôle la régulation transcriptionnelle des gènes de la boucle principale. Ainsi, le gène *Rev-erba* (reverse viral erythroblastis oncogene product) dont la transcription est stimulée par le dimère CLOCK/BMAL1 va exercer une inhibition transcriptionnelle de *Bmal1* (136,137). Au contraire, le gène *Rora* (retinoic acid related orphan receptor), exprimé de manière cyclique, stimule la transcription de *Bmal1*(138).

Des régulations post-traductionnelles des protéines horloges de la boucle principale existent comme la phosphorylation, la SUMOylation ou encore l'ubiquitination. Ces régulations jouent un rôle dans le trafic cellulaire, la dégradation et la fonctionnalité protéique des protéines horloges (129). Elles sont indispensables pour la régulation moléculaire circadienne de ces boucles.

Régulation des boucles

Le fonctionnement des boucles transcriptionnelles du système circadien peut-être régulé par des voies d'entrées. Cette fonction permet d'ajuster la période endogène de l'horloge endogène à celle de 24h de l'environnement.

La synchronisation a lieu essentiellement au niveau de *Per1* et *Per2*. Ainsi, un créneau de lumière appliqué durant la période d'obscurité augmente l'expression de *Per1* dans un délai inférieur à 2h, puis celle de *Per2* dans un délai un peu plus long (139,140). Cette induction d'expression génique qui est due à une phosphorylation du facteur de transcription CREB (Cre Binding Protein) et qui agit sur les séquences CRE (cAMP response element) présentes au niveau des promoteurs des gènes *Per* (141-143)(que nous développerons par la suite).

Une deuxième voie d'entrée peut-être intégré par les gènes *Rev-erb* et *Ror*. L'expression de *Rev-erb* est sous l'influence des glucocorticoïdes. L'interaction des facteurs *Rev-erb* et *Ror* avec leur ligand implique des remodelages de la chromatine permettant ainsi une régulation de l'expression génique des protéines horloges.

Sortie de la boucle

Le but de ces boucles transcriptionnelles est de donner une valeur temporelle à toutes les cellules. Cette transmission se fait par l'intermédiaire du contrôle transcriptionnel de gènes dit de sortie de l'horloge. Ces gènes présentent la particularité de posséder une séquence E-Box dans leur région promotrice. L'arginine vasopressine (AVP) ou hormone anti-diurétique est un bon exemple de gène de sortie de l'horloge (144). C'est une hormone connue pour interagir avec le système de régulation hydrique, permettant la recapture d'eau via les aquaporines. Mais elle est aussi considérée comme un neuropeptide libéré de manière circadienne par l'horloge interne pour moduler le taux de décharge de neurones voisins, ainsi que ceux d'autres régions hypothalamiques et extra-hypothalamiques.

On pourra également citer le gène *DBP* (*D element binding protein*), qui est la cible directe de l'horloge, capable de transmettre une rythmicité à d'autres gènes (145). En effet, la protéine DBP est un facteur de transcription se fixant sur des séquences D-Box.

Ainsi, le mécanisme moléculaire d'une horloge circadienne se constitue d'une boucle transcriptionnelle à composante positive (BMAL1/CLOCK) et d'une autre à composante négative (PER/CRY). La durée de ces deux boucles est d'environ 24h régulée par des boucles secondaires. L'horloge moléculaire permet une transcription de gènes de sortie de l'horloge avec une cinétique circadienne, donnant des indications temporelles aux cellules cibles.

Organisation du système circadien multioscillant

Chez les mammifères, l'horloge moléculaire est présente dans de nombreuses cellules, tissus et organes. Plusieurs oscillateurs constituent ainsi un système circadien multi-oscillant. Il existe généralement des horloges principales (appelé masterclock). Chez les mammifères, l'horloge principale est située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC).

Les noyaux suprachiasmatiques

Localisation

Les NSC sont localisés au niveau de la partie antérieure de l'hypothalamus de chaque côté du troisième ventricule au-dessus du chiasma optique (Figure 39). Chaque noyau contient de 8 000 à 10 000 neurones dont la plupart sont Gabaergiques (146-148).

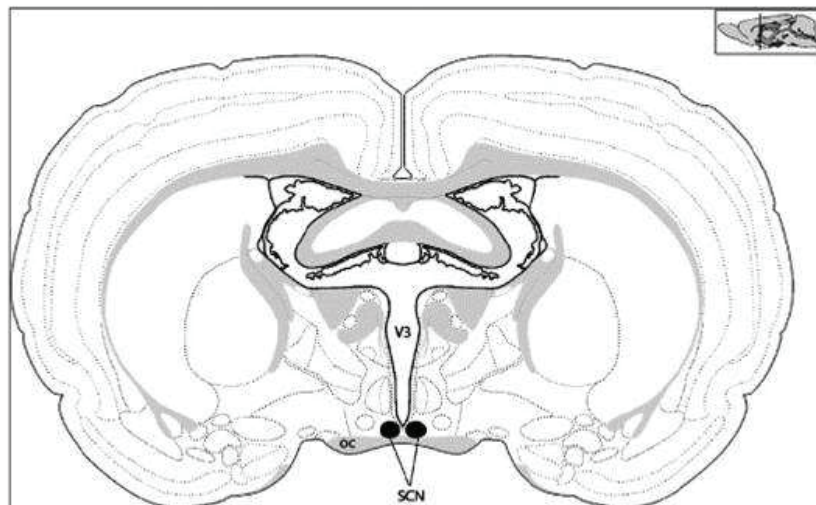


Figure 39: Coupe coronale de cerveau de souris. Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) se trouvent au dessus du chiasma optique (OC) (149)

Structure

Les NSC sont constitués d'une partie ventrolatérale appelée cœur et une partie dorsomédiale appelée coquille (146,148) (Figure 40). Cette dernière exprime l'AVP de manière circadienne tandis que les neurones de la partie ventrolatérale expriment majoritairement le peptide intestinal vasoactif (VIP). Les NSC sécrètent également une variété d'autres neuropeptides: somatostatine, cholecystokinine, substance P, galanine, neurotensine, calretinine (146).

Chaque neurone pris individuellement suit un rythme circadien dans son activité électrique, et ce même après plusieurs semaines de culture (150). Ceci montre que chaque neurone contient la machinerie moléculaire indispensable pour la génération d'oscillations circadiennes.

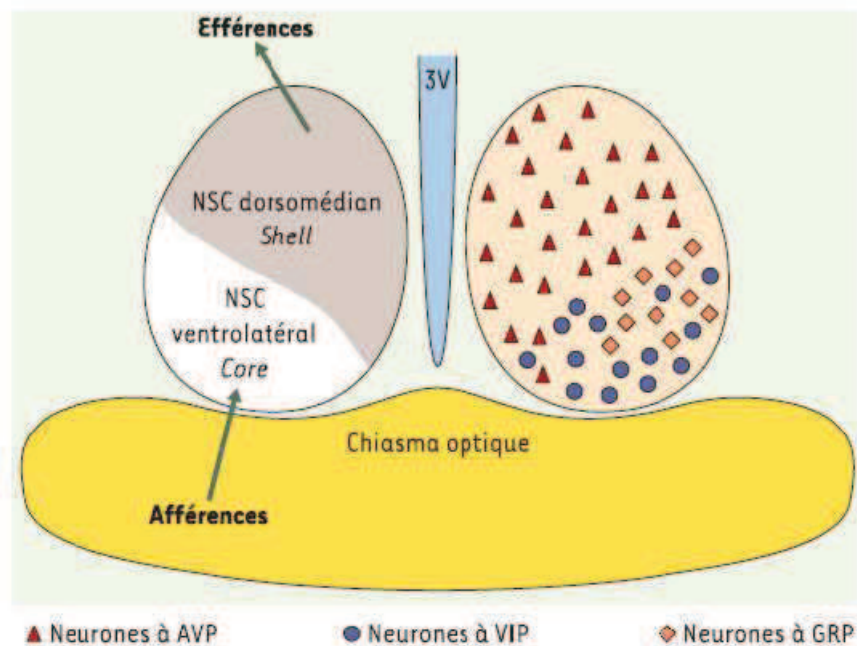


Figure 40: Représentation anatomo-chimique des noyaux supra-chiasmatiques (NSC). 3V = 3^e ventricule. La partie ventrolatérale est appelée cœur. Elle reçoit les afférences et exprime le VIP et le GRP (Gastrin releasing peptide), elle envoie également des efférences VIPergiques tandis que la partie dorsomédiane appelée coquille, exprime l'AVP et envoie des efférences. (151)

Fonctionnement circadien endogène de l'horloge principale : les découvertes historiques

C'est en 1972, que furent dévoilés les premiers indices sur la localisation de l'horloge principale. Des expériences lésionnelles furent à l'origine des premières pistes (152,153), mais ce furent des isollements *in vitro*, puis des transplantations qui conclurent de la localisation de l'horloge (154).

En 1982, l'activité électrique des NSC fut enregistrée *in vitro* et permit de mettre en évidence des patterns circadiens de décharge (155,156). Cela mis en lumière que la majorité des cellules présentes au niveau des NSC possèdent des oscillateurs autonomes mais également couplés. En effet, la culture de ces cellules de manière dissociée présente des périodes de leurs rythmes de décharge plus dispersées comparativement à la culture de l'explant (157,158). Ce couplage se fait principalement par des jonctions communicantes. Les principaux acteurs du couplage sont des neuropeptides : VIP, AVP, GRP, et le neurotransmetteur GABA (159).

En 1999, des études proposèrent l'existence d'une fonctionnalité différentielle des NSC en fonction de la sous-région (160). La coquille exprimerait une horloge robuste dont le rôle est de battre la mesure pour tout l'organisme. Tandis que le cœur serait le lieu d'une horloge sensible aux informations synchronisantes, et qui transmettrait par la suite ces dernières à la coquille .

Entraînement par la lumière

L'entraînement du système circadien par la lumière nécessite un système de détection. Ce système se décompose en un système dit visuel constitué de photorécepteurs (type cônes et bâtonnets) ainsi que d'un système non-visuel impliquant des cellules ganglionnaires à mélanopsines. Ces dernières vont envoyer des projections en direction du cœur des NSC. La transmission de l'information photonique se fait directement par le tractus rétino-hypothalamique, par l'intermédiaire du glutamate et du PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide). La voie de transduction fait intervenir des mobilisations calciques et

l'activation de kinases (CaMK; calcium/calmodulin-protein kinase). Les kinases vont alors avoir un rôle de phosphorylation de facteur de transcription CREB permettant l'expression de gènes possédant une séquence CRE dont des gènes horloges (PER) (Figure 41). L'expression des gènes *Per* est inductible par la lumière. Ils seront donc acteurs des décalages de phases observés en réponse aux diverses stimulations lumineuses et qui permettent la synchronisation de l'horloge principale avec le cycle lumière/obscurité. (161)

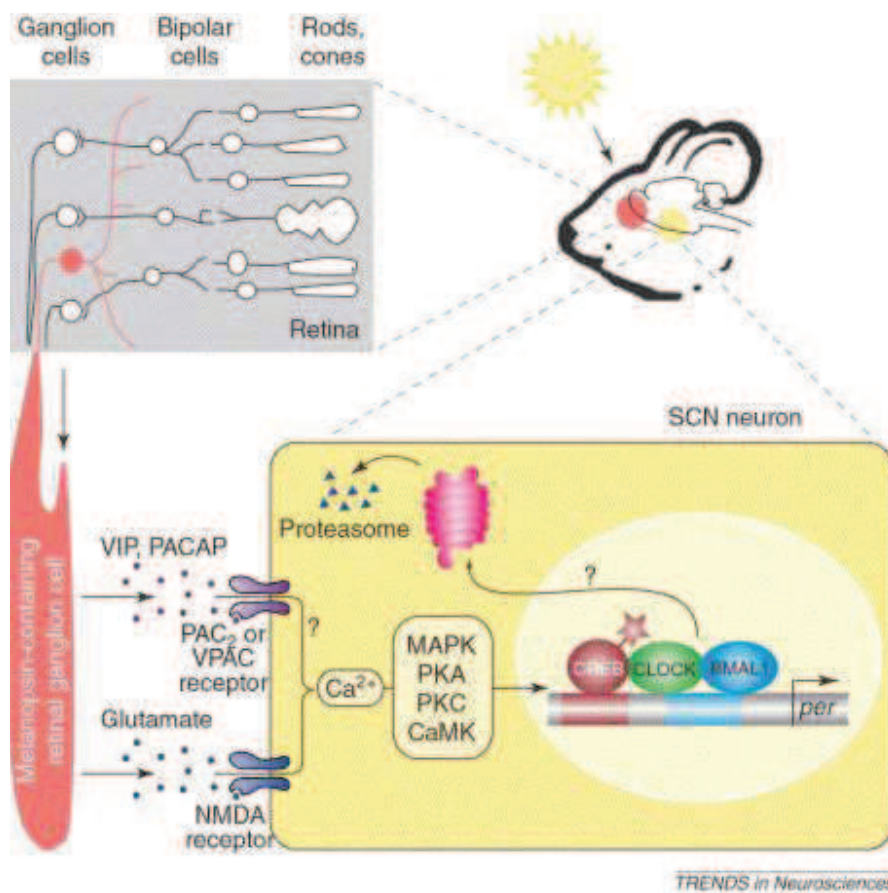


Figure 41: Intégration de la lumière par la rétine et son intégration au niveau des noyaux suprachiasmatiques. La lumière est captée par des cellules ganglionnaires à mélanopsines. Ces dernières vont stimuler via une libération de glutamate et de VIP la transcription du gène *PER*. (135)

Il existe également une autre voie, dite indirecte, qui fait intervenir les feuillets intergénéralés latéraux communiquant vers les NSC via le tractus géniculohypothalamique

(162). La lumière entrainera également le déclenchement d'une libération de grains de sécrétions contenant du GABA se colocalisant avec du VIP ou du GRP. Le VIP pourra alors se lier au niveau post-synaptique via des récepteurs VPAC2 présents sur les neurones de la coquille. Cela aura pour conséquence une dépolarisation membranaire entraînant une augmentation de cAMP, permettant, in fine, l'induction de la transcription de Per/Cry. Ceci aura pour conséquence une synchronisation interne globale des NSC au cycle jour/nuit (Figure 42). (163)

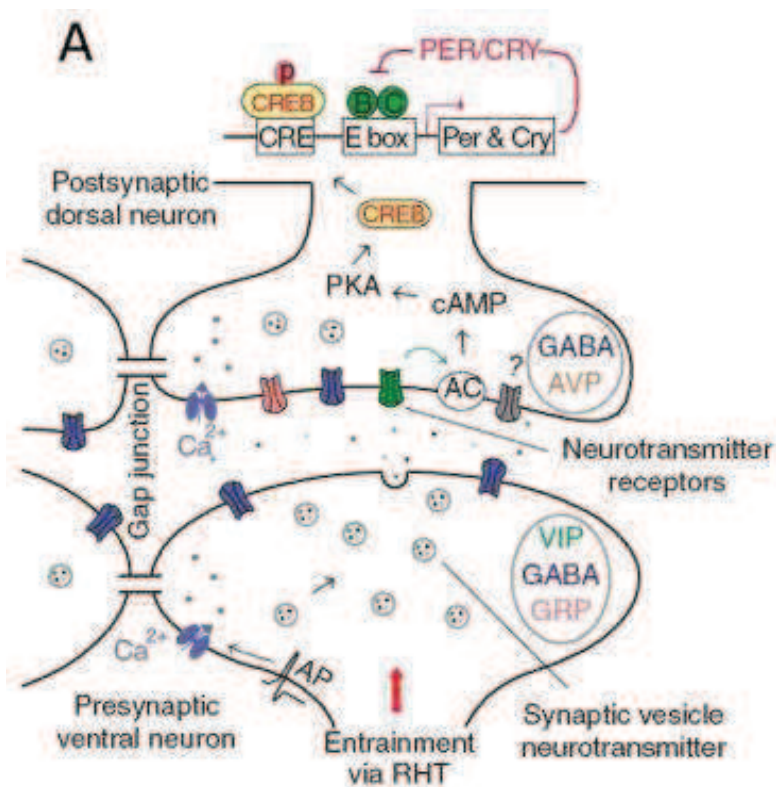


Figure 42: Modèle de synchronisation interne des noyaux suprachiasmatiques. L'entraînement de la partie ventrale des noyaux suprachiasmatiques par la lumière, va permettre la libération de VIP, GABA, et GRP. Ces neuropeptides vont agir au niveau de la partie dorsale, synchronisant la partie cœur à la partie coquille. De plus, l'activation des récepteurs de ces neuropeptides entraîne une mobilisation de cAMP, qui pourra circuler d'une cellule à l'autre par des jonctions GAP, facilitant ainsi la synchronisation intra-régionale. (163)

Les efférences des noyaux suprachiasmatiques

Après la transmission du message synchronisant photonique du cœur vers la coquille, les NSC synchronisent les différentes fonctions biologiques avec l'environnement et entre elles, en interagissant avec diverses structures cérébrales, tissus et organes de l'organisme par l'intermédiaire de neuropeptides ou d'hormones. Ceci se faisant principalement via la coquille.

Trois régions principales hypothalamiques ont été identifiées comme les cibles majeures des NSC (164,165):

- **Neurones du système autonome** : localisés au niveau du PVN (noyaux hypothalamiques paraventriculaire), connectant l'hypothalamus au système sympathique et parasympathique. Les NSC permettent ainsi de piloter des tissus périphériques et la fonctionnalité des organes. Elle agit également sur la glande pinéale, site de production de la mélatonine, qui est impliquée dans la fonction de reproduction saisonnière.
- **Neurones endocrines** : contenant les neurones à GnRH, CRH (corticolibérine), TRH (thyroéolibérine), contrôlant ainsi des fonctions neuroendocrines comme le cycle estrien.
- **Neurones intermédiaires** : localisés au niveau du DMH (hypothalamus dorsomédian), SPV (noyaux hypothalamiques sub-paraventriculaires) qui intègrent les informations circadiennes, les traitant et les diffusant à des neurones endocrines ou du système autonome.

Ces efférences (Figure 43) sont essentielles pour transmettre les informations temporelles et synchroniser la plupart des fonctions biologiques, comme le cycle estrien, les rythmes de cortisol, de température, l'activité locomotrice... (166,167)

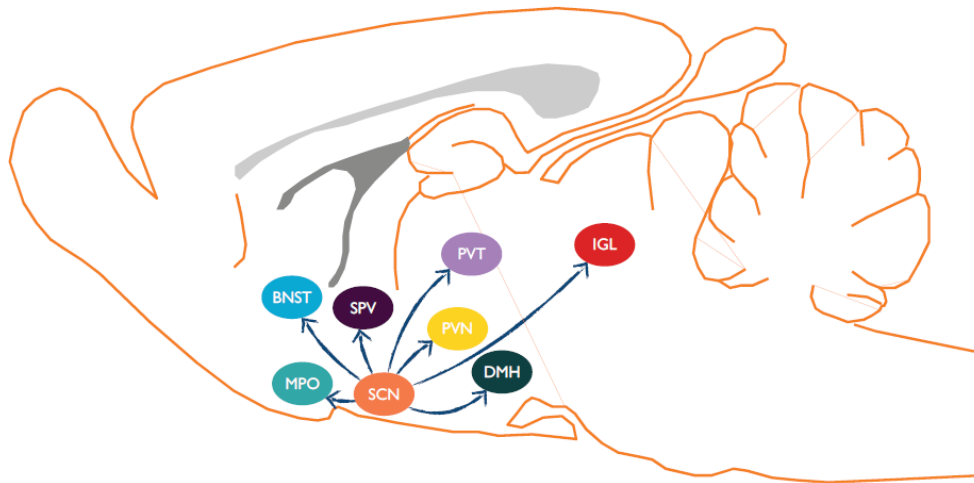


Figure 43: Principales efférences des noyaux suprachiasmatiques: aire préoptique médian (MPO), noyaux hypothalamiques paraventriculaire (PVN), noyaux hypothalamiques sub-paraventriculaires (SPV), hypothalamus dorsomédian (DMH), noyaux thalamiques paraventriculaires (PVT), feuilletts intergénéculés (IGL), noyaux du lit de la strie terminale (BNST)

Distribution de la rythmicité

La transmission de la rythmicité se fait essentiellement par l'intermédiaire de l'AVP (165). Son gène possède des séquences E-Box permettant la fixation des facteurs de transcription CLOCK/BMAL1. Ainsi son expression est sous la dépendance d'une horloge moléculaire. Son expression est circadienne (Figure 44). De ce fait, la libération de l'AVP est régulée par la rythmicité de l'horloge principale. Ceci permet la transmission du message temporel à d'autres structures selon une rythmicité circadienne. (168).

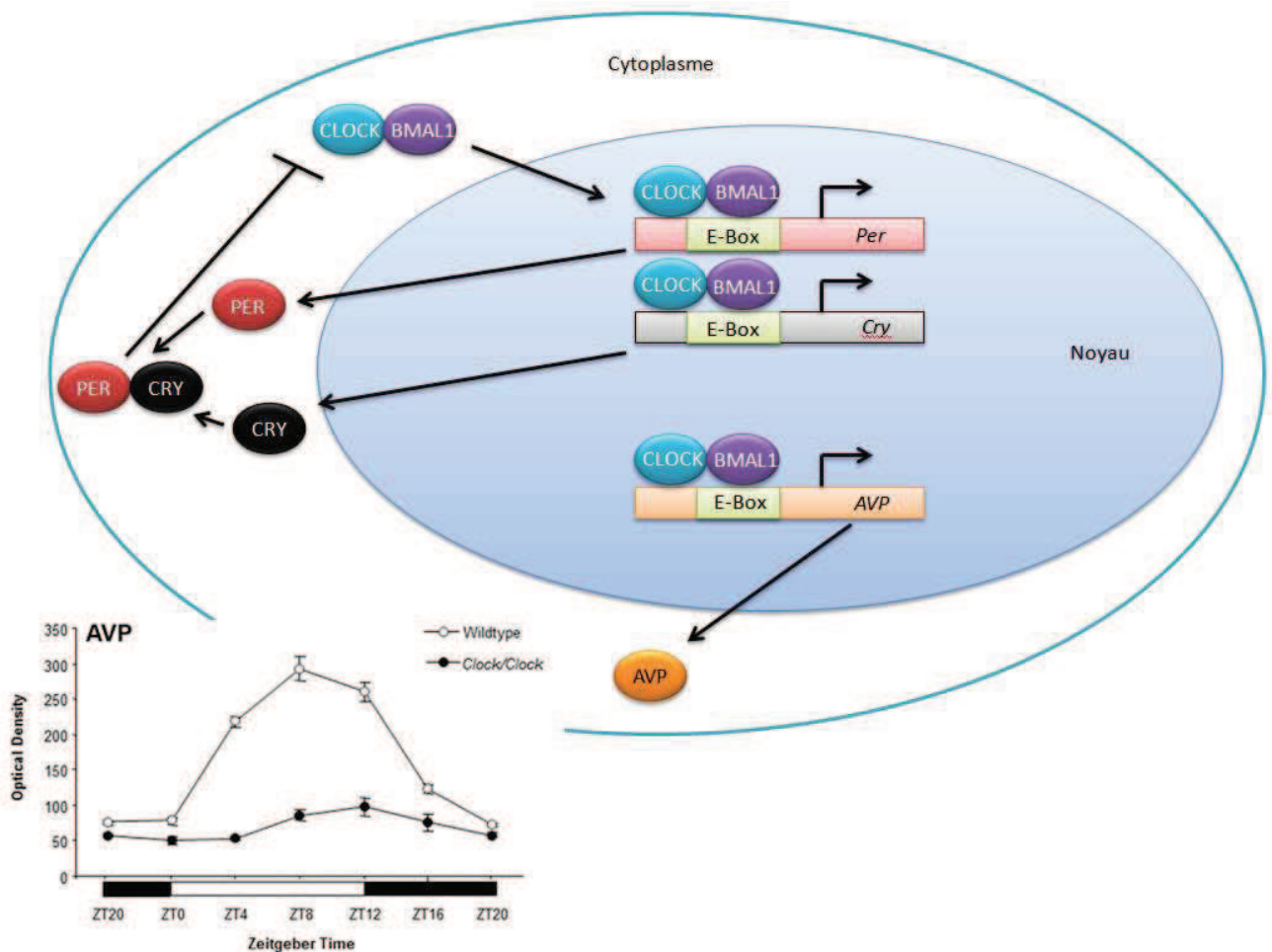


Figure 44: Distribution des rythmes via les gènes de sorties de l'horloge : le cas de la vasopressine. (168). Les facteurs de transcriptions CLOCK/BMAL1 stimule l'expression des gènes *Per* et *Cry*, et du gène de sortie de l'horloge l'arginine vasopressine (AVP). Les protéines PER/CRY vont inhiber l'activité transcriptionnelle de BMAL1/CLOCK. Cela engendre une diminution de l'expression de *Per*/*Cry* et de l'Arginine vasopressine. Chez une souris mutante CLOCK/CLOCK, il n'y a plus de rythme d'expression de la vasopressine.

Au total, les NSC se présentent comme une structure complexe subdivisée en plusieurs populations neuronales. Une partie dite cœur exprimant majoritairement le VIP recevant la plupart des afférences et jouant le rôle de senseur des facteurs environnementaux. Une partie dite coquille synchronisée avec l'environnement par l'intermédiaire du cœur, qui est le lieu des efférences principales de nature AVPerigiques jouant un rôle important comme donneur de temps aux autres structures.

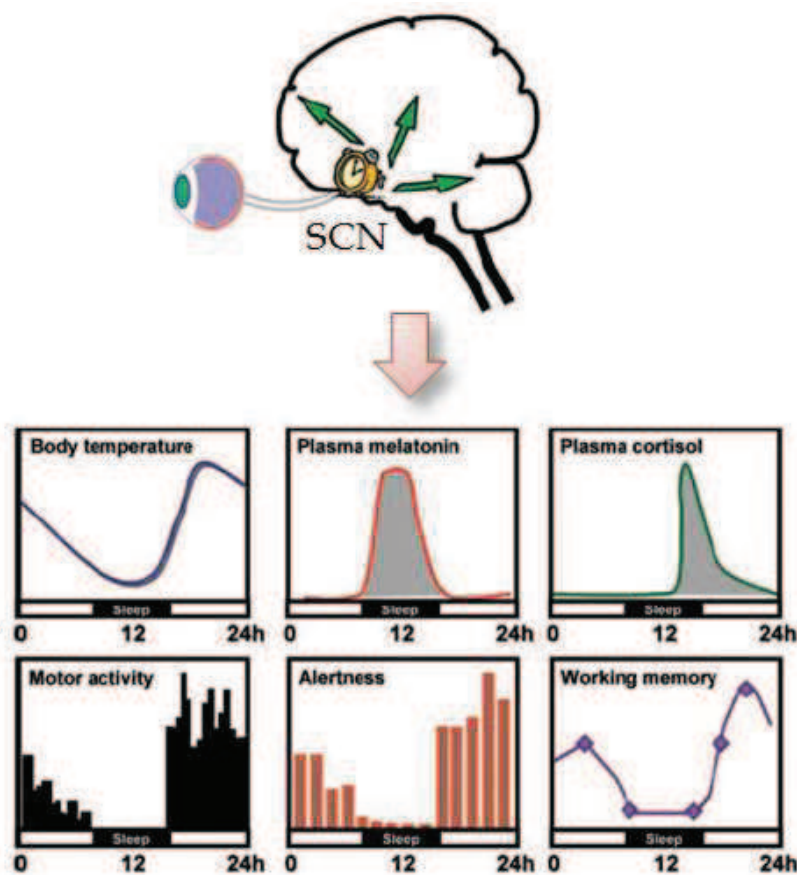


Figure 45: Synchronisation des fonctions biologiques sur 24h par les noyaux suprachiasmatiques. Les différentes fonctions biologiques sont synchronisées pour être en phase: le niveau de vigilance, et la mémoire de travail seront plus importantes lorsque l'animal est actif. (Figure d'Etienne Challet)

Les NSC, siège de l'horloge principale, permettent la synchronisation des différentes fonctions biologiques sur 24h (Figure 45), en accord avec son environnement par

l'intermédiaire de neurones du système autonome, de neurones endocrines, ou encore de neurones intermédiaires.

Oscillateurs périphériques

Le système circadien ne se résume pas uniquement à la présence d'une horloge interne. Il est beaucoup plus complexe que cela. En effet, depuis plusieurs années, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un système multi-oscillant circadien pour le contrôle des différentes fonctions biologiques sur 24h.

Le concept de système multi-oscillant

En 1960, Pittendrigh développe le concept du système multi-oscillant (169). Il propose l'existence de multiples oscillateurs qui seraient sous l'influence d'une horloge principale pacemaker. Si l'on se penche sur le système nerveux central, on se rend compte de l'existence de plusieurs horloges comme la rétine ou encore les bulbes olfactifs (170). En fait, on va pouvoir retrouver dans la plupart des tissus ou organes la présence d'horloges, ou du moins d'oscillateurs, ayant pour rôle la régulation de leurs rythmes intrinsèques (Figure 46). Ces rythmes sont le plus souvent nécessaires pour une sensibilité circadienne aux Zeitgebers (171). Par exemple, on peut voir que l'horloge du foie contrôle le métabolisme glucidique de manière circadienne (172). Par ailleurs, elle est entraînée directement par la prise alimentaire (considérée comme un Zeitgeber) (Figure 46). Un grand nombre d'horloges secondaires comme le foie ou encore les poumons ont la capacité de fonctionner en autonomie, en absence complète des NSC, avec leur propre période, leur propre phase. Elles sont synchronisables par des afférences et elles contrôlent des fonctions biologiques. Ces horloges secondaires ont une autonomie moins importante que celles des NSC et sont sous la dépendance de l'horloge principale (173). Ce système multi-oscillant sur le plan fonctionnel peut être mis en analogie avec un orchestre symphonique.

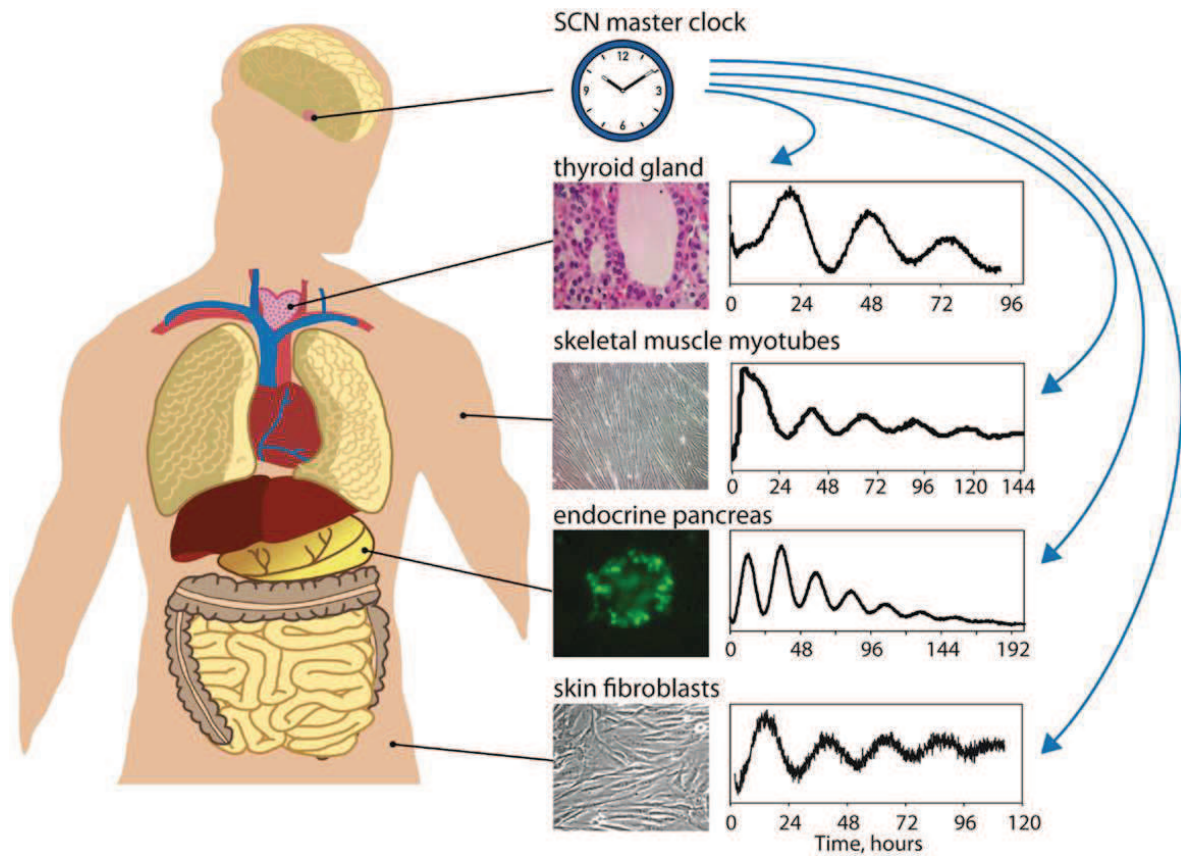


Figure 46: Présence d'horloges circadiennes dans différents organes et types cellulaires. Représentation d'oscillations circadiennes de différents organes et types cellulaires. (174)

Concept du chef d'orchestre



La grande vadrouille

Prenons l'exemple d'un concert d'orchestre philharmonique. Au début de la prestation, les musiciens accordent chacun leurs instruments (horloge périphérique). Si l'on écoute attentivement les préparatifs, on pourra percevoir une belle mélodie jouée sur notre droite par un trompettiste (poumon) à son propre rythme. En portant notre ouïe sur la gauche, on entendra également des percussions (cœur) avec une bonne rythmicité. Cependant, l'écoute de tous ces musiciens en même temps fait survenir une cacophonie déroutante pour nos oreilles.

C'est à ce moment que le chef d'orchestre (NSC) entre en scène, se met en place sur son pupitre, et commence à guider tous les musiciens. Il va alors donner le tempo, le rythme aux multiples musiciens présents dans l'assemblée via sa gestuelle (transmission neuropeptidergique, ou hormonale), permettant de synchroniser les individus (horloge périphérique) de l'orchestre (l'organisme) à la partition jouée (Figure 47).

(A) Normal Central/Peripheral Rhythms

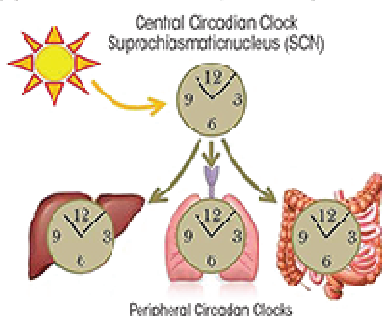


Figure 47: Synchronisation des différentes horloges secondaires par les noyaux suprachiasmatiques.

L'horloge principale permet de mettre en phase toutes les horloges secondaires. (175)

Que se passe t-il quand on enlève le chef d'orchestre ?



La grande vadrouille

Lorsque le chef d'orchestre (NSC) quitte la scène (Figure 48). Les musiciens (oscillateurs/horloges périphériques) perdent petit à petit leur synchronisation, rejouant à leurs propres rythmes. Ceci engendre à nouveau l'apparition d'une cacophonie.

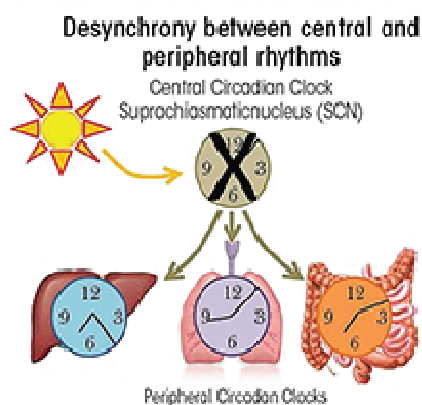


Figure 48: Désynchronisation des horloges périphériques en absence de noyaux suprachiasmatiques fonctionnels. L'absence de l'horloge principale entraîne un déphasage des différentes horloges secondaires. (175)

Le système circadien comprend donc des oscillateurs ou horloges périphériques ayant leurs propres rythmes. Ils sont synchronisés par les NSC, permettant une harmonie des différentes fonctions biologiques entre elles sur 24h. Qu'en est-il de l'implication du système circadien dans la fonction de reproduction ?

Le rôle du système circadien dans la fonction de reproduction chez la femelle

L'ovulation est la phase clé de la reproduction chez la femelle; elle est déclenchée par un pic de LH ayant une composante circadienne. Comment peut-on expliquer une telle régulation temporelle ? Par le système circadien !

Les noyaux suprachiasmatiques

Plusieurs études montrent l'effet délétère d'un dysfonctionnement des NSC ou de leur ablation sur la fonction de reproduction, et particulièrement sur la temporalité du pic pré-ovulatoire de LH. En effet, les premières études lésionnelles des NSC entraînent une abolition du pic de LH et l'altération du cycle estrien (176,177). La mutation des gènes *Clock* et *Bmal1* provoque le même phénotype, à savoir une dérégulation du cycle estrien(178). Par exemple, les souris mutantes *CLOCK*^{-/-} ont des cycles estrien rallongés et irréguliers. Les souris *Cry*^{-/-} présentent également des cycles estriens dérégulés (Figure 49). Ces expériences montrent le rôle primordial des NSC dans la régulation du cycle estrien. Cependant la mutation totale des gènes horloges impacte également les oscillateurs périphériques qui participeraient aux régulations de la fonction de reproduction. Il est intéressant de constater que le phénotype de jeunes souris mutantes pour un gène horloge est identique à des souris sauvage (WT) âgées de plus de 10 mois, à savoir une augmentation de la durée des cycles, et une diminution de la fréquence des cycles estriens (179). On sait actuellement que les souris âgées présentent des dysfonctionnements de leur système circadien. Ces observations permettent ainsi de définir le rôle important des gènes horloges, et donc de l'action de l'horloge principale et peut-être des horloges secondaires dans la fonction de reproduction.

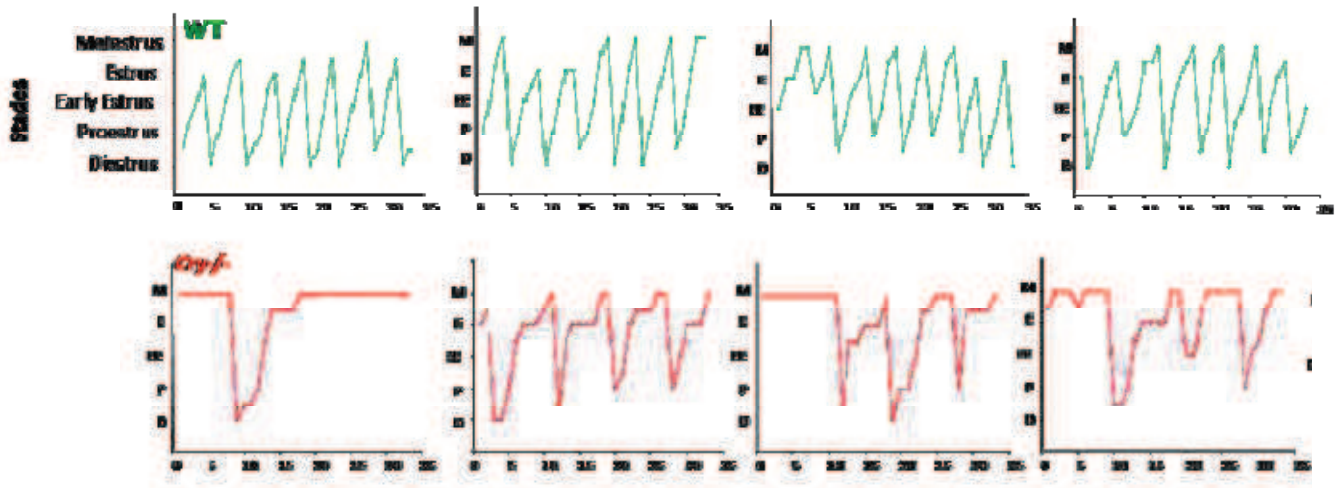


Figure 49: Cycle estrien chez des souris sauvages (WT) et mutées *Cry* $-/-$. Les souris WT présentent un cycle normal, alors que les souris *Cry* $-/-$ présentent des cycles irréguliers. (Bur, non publié)

Le pic pré-ovulatoire de LH est initié par un signal temporel venant des NSC dans une fenêtre temporelle proche du début de l'activité locomotrice du mammifère. Cependant l'intégration de ce signal permettant une stimulation des neurones à GnRH et induisant le pic de LH se fait uniquement lorsque les taux d'E2 circulants atteignent un seuil critique, c'est à dire le jour du proestrus. Si l'on utilise un modèle de souris OVX avec implant d'E2 (mimant ainsi le proestrus), la concentration circulante d'E2 entraînera tous les jours en fin d'après-midi, l'apparition d'un pic de LH (13) (Figure 50).

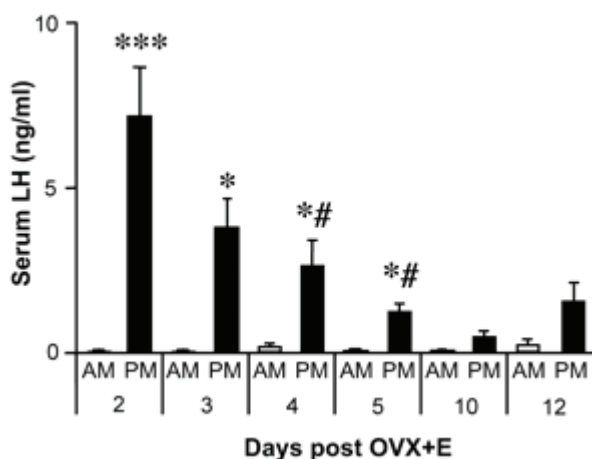


Figure 50: Profil plasmatique de LH chez des souris OVX+E2. Dosage de la LH le matin (AM) et l'après-midi (PM). Chez ces souris, un pic de LH apparaît tous les jours durant l'après-midi. (13)

Des études neuroanatomiques ont permis de mettre en lumière deux sorties des NSC impliquées dans le pilotage temporel de l'axe de reproduction, AVP et le VIP. Les premières études ont identifié la présence de contact VIPergique des NSC sur les neurones à GnRH (180,181). Ces derniers exprimant le récepteur aux VIP (VPAC2). Mais de récentes études démontrent également des appositions AVPergiques sur les neurones à Kp de l'AVPV exprimant le récepteur V1a (182). En effet, des travaux utilisant des traceurs rétrogrades révèlent un grand nombre d'appositions AVPergiques sur les neurones à Kp, mais très peu, voire aucune, terminaison VIPergique (Figure 51).

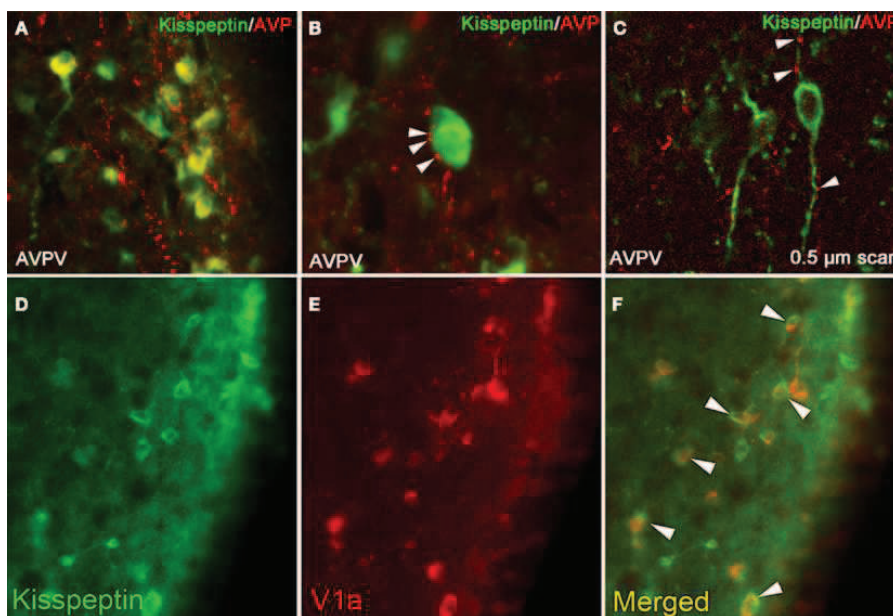


Figure 51: Appositions AVPergiques des NSC sur les neurones à Kp de l'AVPV. A, B, C: visualisation des appositions AVPergiques (rouge) sur les neurones à Kp (vert). D: photo des neurones à Kp. E: Photo des récepteurs à l'AVP (V1a). F: photo de la fusion de D et E. (182)

Singulièrement, la libération de l'AVP se situe dans la même fenêtre temporelle que la survenue du pic de LH. Les terminaisons AVPergiques sont sensibles aux E2 dont le nombre d'appositions augmente lorsque les concentrations d'E2 sont élevées (182). On pourra ajouter que l'expression de l'ARNm V1a est abolie chez des souris OVX (183). Par ailleurs, l'intégration AVPergique des neurones à Kp est E2 dépendante : l'AVP n'active pas les neurones à Kp chez des souris OVX, mais l'effet est restauré quand elles sont supplémentées en E2 (184).

Des études physiologiques pointent du doigt le rôle primordial de l'AVP dans la temporalité du pic pré-ovulatoire GnRH/LH. L'administration d'un antagoniste V1a entraîne une réduction du pic de LH (185), alors qu'une injection intracérébroventriculaire d'AVP chez des rats NSC lésé - OVX + E2 restaure la survenue du pic pré-ovulatoire de LH (186). De plus; la co-culture d'explants de POA et de NSC montre que le rythme d'AVP coïncide avec le pic de GnRH (187). L'exposition de ces explants de POA à l'AVP et non au VIP augmente la libération de GnRH.

Malgré cela, il ne faut pas exclure le rôle potentiel du VIP dans la survenue du pic de LH. Les afférences VIPergiques des neurones à GnRH sont sexuellement dimorphiques (élevées chez les femelles) (181). L'administration d'un anti-sérum de VIP réduit le pic de LH (188), tandis qu'une infusion centrale de VIP est capable de restaurer le pic de LH chez des rats âgés (189). Finalement, le blocage des récepteurs VPAC2 atténue l'activité des neurones à GnRH chez des souris OVX+E2 (190).

Les NSC joueraient un rôle primordial dans le maintien de la fonction de reproduction. La survenue du pic de LH serait particulièrement sensible au message temporel AVPergique, et également VIPergique mais dans une moindre mesure.

Les neurones à GnRH

Les premières études concernant l'implication du système circadien dans la fonction de reproduction se sont focalisées sur les neurones à GnRH. Il a été démontré la présence de tous les gènes horloges, exprimés de manière circadienne dans les neurones à GnRH et la lignée GT1-7 (191,192).

L'implication du système circadien dans les neurones à GnRH se reflète sur plusieurs aspects:

- **Pulsatilité** : la mutation fonctionnelle d'un gène horloge, par exemple Clock, engendre une diminution de la pulsatilité des neurones à GnRH, tandis qu'une surexpression du gène *Cry1* augmente l'amplitude des pulses. Ceci montrant un couplage entre gène horloge et capacité sécrétoire (191).

- **Sensibilité circadienne au VIP** : La capacité de VIP d'activer les neurones à GnRH est dépendante de la journée, ainsi que de l'environnement oestrogénique (193).
- **Sensibilité circadienne au Kp** : L'expression du récepteur GPR54 est régulée de manière circadienne dans les neurones à GnRH (Figure 52). De plus ces derniers présentent une sensibilité différente aux Kp selon le moment de la journée (192). Ceci explique que l'infusion centrale de Kp est incapable d'avancer le pic pré-ovulatoire de LH le matin, que ce soit chez des souris intactes cyclant naturellement ou OVX+E2. La mutation d'un gène horloge réduit l'effet stimulant des Kp sur la libération de GnRH.

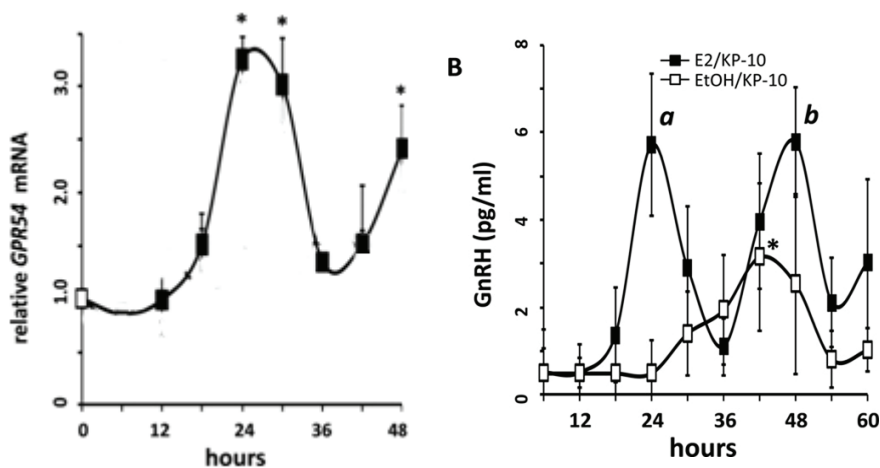


Figure 52: Profil circadien de l'expression de l'ARNm de GPR54 et de la libération de GnRH. (A): expression de l'ARNm GPR54 au cours du temps dans les neurones à GnRH. (B): Sécrétion de GnRH en présence de Kp-10 avec de l'E2 ou de l'éthanol (EtOH).

Les neurones à GnRH expriment un horloge secondaire jouant un rôle primordial dans la pulsativité, dans l'intégration "temps-dépendant" du VIP et de Kp. De ce fait, cette horloge secondaire jouerait un rôle dans la régulation temporelle du pic pré-ovulatoire de LH via sa sensibilité circadienne au message provenant des NSC et de l'AVPV.

L'adénohypophyse

La pituitaire présente de robustes oscillations circadiennes des gènes horloges PER1 ou PER2 avec une période avoisinant 23,8 h chez des souris PER::LUCIFERASE (souris ayant l'expression d'une protéine de fusion PER-Luciférase) (194,195). Tous les gènes horloges sont exprimés avec un rythme journalier dans l'ensemble de la pituitaire mais avec des profils différents selon le stade du cycle estrien (196,197). L'identification des gènes horloges a été faite sur une lignée de cellules gonadotropes appelée alphaT3-1 (198). L'activation de ces cellules par le GnRH induit une augmentation de l'expression de PER1 (199). Le récepteur au GnRH présente des séquences E-BOX et qu'un knockdown de Bmal1 dans les cellules gonadotropes induit une diminution de l'expression du récepteur au GnRH (198). Néanmoins l'oscillateur périphérique présent dans cette structure n'interférerait pas dans le timing du pic pré-ovulatoire de LH. Des souris BMAL1 KO des cellules gonadotropes présentent toujours le pic pré-ovulatoire de LH, mais la durée des cycles estriens est significativement plus longue (197).

L'horloge secondaire présent au niveau des cellules gonadotropes, jouerait plutôt un rôle dans la robustesse des cycles estriens que dans la survenue du pic de LH.

Les ovaires

La présence d'horloges secondaires dans les ovaires a été identifiée dans plusieurs espèces mammaliennes, et ceci *in vivo* ou *in vitro* (200-203). Chaque type cellulaire composant l'ovaire (cellules de la thèque, de la granulosa, ainsi que l'ovocyte) présente des oscillations circadiennes de gènes horloges. Mais le rythme du gène horloge est uniquement observable dans les follicules matures et les cellules lutéales, définissant ainsi l'apparition d'un rythme circadien dépendant du développement folliculaire. Ce rythme serait potentiellement induit par la FSH (204). Cette hormone pourrait jouer le rôle de synchroniseur de l'activité circadienne des cellules folliculaires.

La LH interviendrait en stimulant l'expression de différents gènes horloges. Les oscillations de PER dans des ovaires isolés sont décalées par la FSH et la LH, montrant que l'horloge de l'ovaire est régulée, entraînée par les signaux hormonaux provenant des cellules gonadotropes (202).

Les ovaires présenteraient également une sensibilité circadienne à la LH. En effet, la réponse à la LH serait plus importante la nuit comparativement à la journée, ceci concordant avec l'idée que l'ovaire se conditionnerait pour une réceptivité plus importante au moment du pic pré-ovulatoire de LH (205).

L'expression de différents gènes de l'ovaire codant par exemple le récepteur à la LH, et des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'hormones sexuelles montrent un rythme circadien dans les cellules de la granulosa. Ces rythmes sont abolis chez des souris où Bmal1 n'est plus exprimé (204).

L'oscillateur périphérique présent dans les ovaires jouerait un rôle dans le timing de l'ovulation, la synthèse des hormones stéroïdiennes.

Utérus et oviductes

L'utérus et les oviductes expriment tous les deux les gènes horloges avec des rythmes journaliers (206,207). L'utilisation de souris PER2::LUCIFERASES a permis de montrer que les oscillations du gène horloge Per2 dans l'utérus sont dépendantes de l'environnement oestrogénique. En effet, la période des oscillations est raccourcie lorsque l'explant d'utérus est mis en présence d'E2 (208). Ceci suggère que les oscillations circadiennes de l'utérus sont dépendantes du cycle estrien. La délétion de Bmal1 dans les cellules myométriales indique un rôle de l'oscillateur périphérique dans la survenue de la parturition (209). Plusieurs études sont encore nécessaires pour déterminer le rôle physiologique de l'oscillateur dans le développement embryonnaire aussi bien dans le transfert de l'ovocyte de la trompe utérine vers l'utérus, que dans l'implantation de l'œuf dans l'utérus, ainsi que durant la gestation.

Les horloges secondaires de l'utérus et des oviductes joueraient un rôle dans l'implantation, dans le développement embryonnaire, ainsi que dans la parturition.

La fonction de reproduction : un système multi-oscillant

Nous avons ainsi pu voir que l'axe reproducteur est doté d'une multitude d'horloges périphériques présents à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique : neurones à GnRH, pituitaire, ovaire, utérus, oviducte et que son activité dépend de l'horloge principale, des NSC (Figure 53). Ce système multi-oscillant serait à l'origine de la sensibilité circadienne aux messages des éléments de cet axe et permettrait d'expliquer la temporalité de la survenue du pic de LH. Cependant un maillon important que représentent les neurones à Kp de l'AVPV reste en suspens, quant à son rôle dans la temporalité du pic pré-ovulatoire via le système circadien.

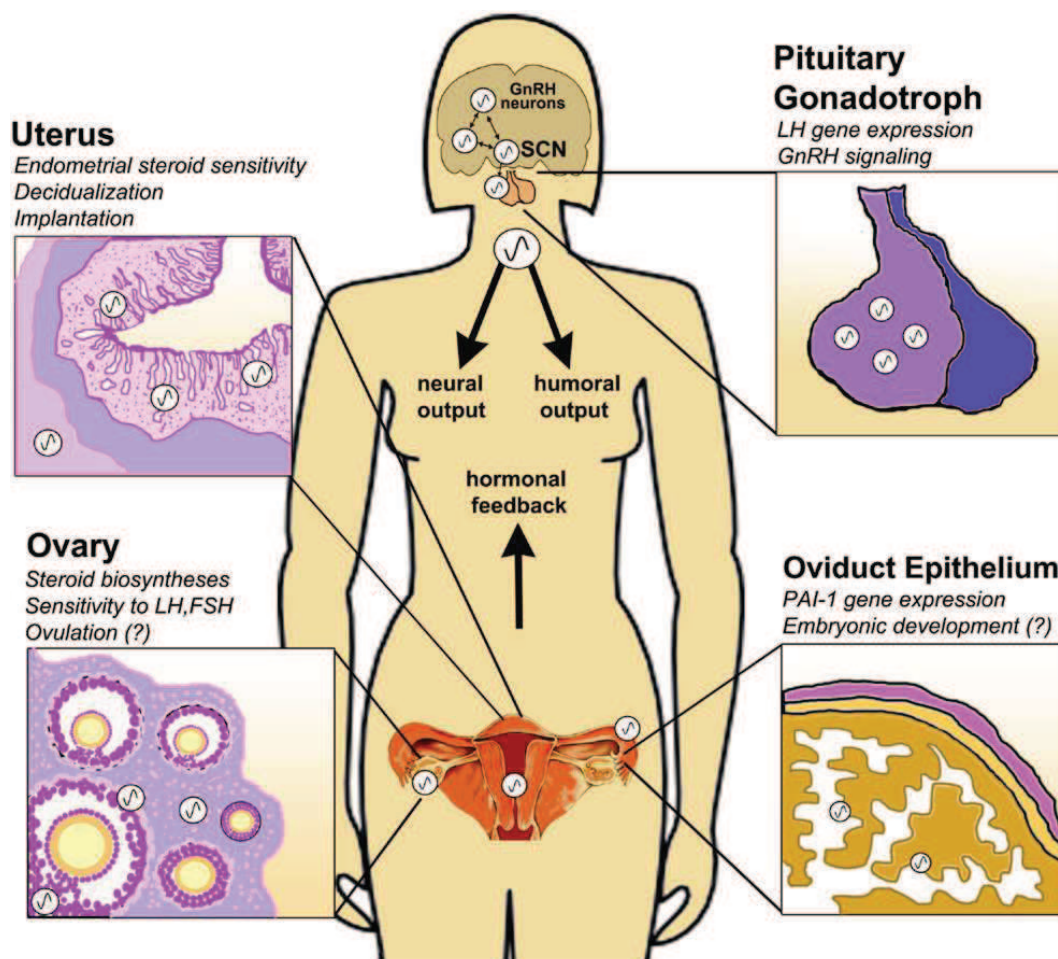


Figure 53: La fonction de reproduction, un système multi-oscillant. Présence d'horloges secondaires dans l'hypothalamus, la pituitaire, les ovaires, l'utérus et les oviductes. (203)

PROBLEMATIQUE

Les neurones à Kisspeptines de l'AVPV : partie intégrante du système circadien multi-oscillant contrôlant la temporalité du pic pré-ovulatoire de LH ?

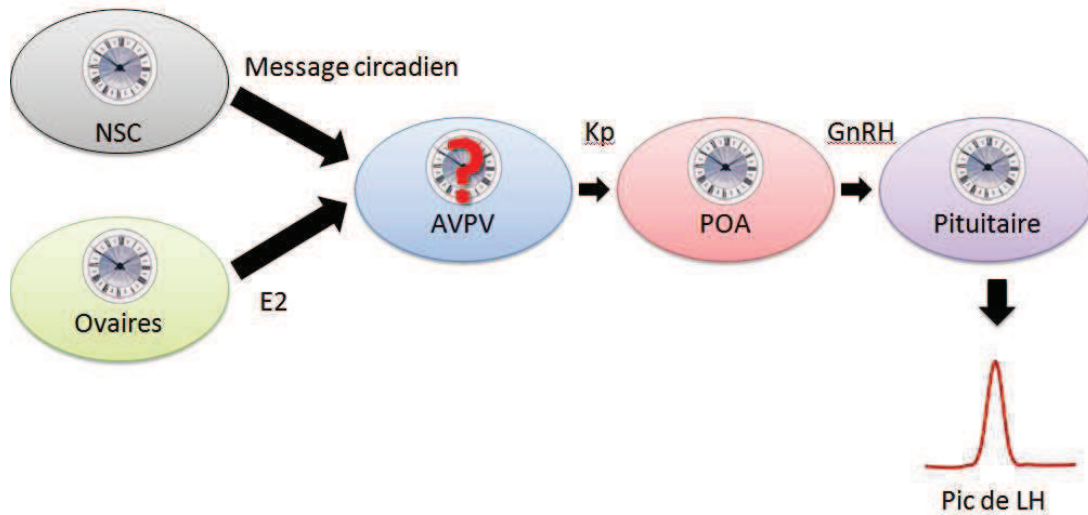


Figure 54: Représentation schématique du contrôle de la temporalité du pic de LH. Présence de l'horloge principale (NSC: noyaux suprachiasmatiques), et d'horloges secondaires dans les ovaires, l'aire préoptique (POA) contenant les neurones à GnRH, la pituitaire. L'hypothèse testée est la présence d'une horloge secondaire dans les neurones à Kp de l'aire antéroventriculaire périventriculaire qui jouerait un rôle dans la temporalité de la survenue du pic de LH. (Chassard, non publié)

Le but de ce travail est de tester si les neurones à Kp de l'AVPV de part leur position stratégique au sein de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique et de leurs connections avec les NSC joueraient un rôle crucial dans la temporalité du pic pré-ovulatoire de LH (Figure 54). Les premières pistes ont été révélées par les études portant sur l'activité journalière et circadienne des neurones à Kp de l'AVPV. En effet, l'activité journalière de ces neurones serait dépendante de l'environnement oestrogénique. Les E2 joueraient un rôle sur la synthèse de Kp. Dans un environnement oestrogénique fort, l'activation de c-fos et la synthèse journalière de l'ARNm *Kiss1* sont significativement augmentées 3 heures avant la

survenue de la nuit. Au contraire, dans un environnement oestrogénique faible, comme en diestrus ou chez des souris OVX, l'expression de l'ARNm *Kiss1* est abolie ou amortie significativement. L'activation journalière des neurones à Kp serait contrôlée par les afférences AVPerigiques des NSC. En effet l'injection centrale d'AVP induit l'activation de c-fos, ainsi que l'expression de *Kiss1*. Une étude récente enregistrant l'activité électrique des neurones à Kp confirme que les neurones à Kp de l'AVPV sont sensibles à l'AVP avec dépendance à l'environnement oestrogénique.

Ainsi, nous nous sommes posés les questions suivantes :

- ***Question 1 : Les neurones à Kp de l'AVPV sont-ils effectivement la cible d'un message temporel ? Autrement dit, ces neurones présentent-ils une expression journalière de l'ARNm *Kiss1* et de son peptide, et ceci en fonction de l'environnement oestrogénique ?***

Approche: Etude de l'ARNm *Kiss1* et du peptide à différents moments du jour et de la nuit au cours du proestrus et du diestrus, avec l'aide de la technique d'hybridation in situ et de l'immunohistochimie

- ***Question 2 : Quelle est l'origine de ce message temporel ? Est-elle intrinsèque aux neurones à Kp ? Autrement dit, les neurones à Kp expriment-ils des protéines horloges avec un rythme journalier ? Le cas échéant, ce rythme est-il sensible à l'E2 circulant ?***

- ***Approche:*** Etude de la présence de la protéine horloge *PER1* au sein des neurones à Kp de l'AVPV à différents moments du jour et de la nuit au cours du diestrus et du proestrus.

- ***Question 3: Les neurones à Kp possèdent-ils une horloge circadienne endogène ? Le cas échéant, est-elle sensible à l'E2 ?***

Approche: Etude d'oscillations circadiennes par la technique de bioluminescence à partir d'explants d'AVPV provenant de souris *PER2::LUCIFERASE* en fonction de l'environnement oestrogénique.

METHODOLOGIE

L'hybridation *in situ*

Principe de la technique

L'hybridation *in situ* est une technique basée sur le principe de complémentarité des bases azotées. Elle permet de localiser des séquences connues d'ARNm monobrin exprimées dans des tissus et des cellules. Le réactif principal est une sonde (oligonucléotide ou ribosonde) dont la séquence est complémentaire (antisens) à celle de la séquence recherchée. Cette sonde est marquée avec un traceur (radioactif ou non-radioactif) qui permet de localiser et quantifier l'expression du gène d'intérêt. Le schéma de principe de la technique d'hybridation *in situ* de *Kiss1* est présenté dans la **figure 55**.

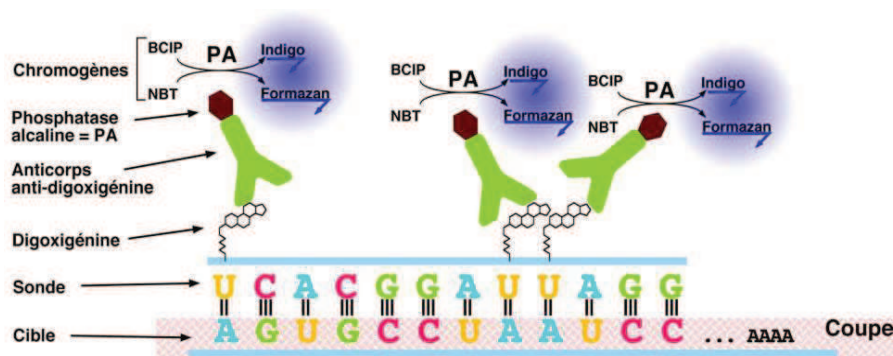


Figure 55: Principe de l'hybridation *in situ* de l'ARNm *Kiss1* non radioactif : la ribosonde anti-sens *Kiss1* de souris couplée à la digoxigénine s'hybride avec l'ARNm *Kiss1* endogène. Un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline permet la transformation du NBT + BCIP en un précipité indigo et bleu de formazan. (cours Paul Klosen, Strasbourg)

Immunohistochimie

Principe de la technique

L'immunohistochimie est une technique qui utilise le principe de reconnaissance d'un antigène par un anticorps. Elle permet de localiser des antigènes (protéines par exemple) dans des tissus, cellules, organites... La reconnaissance de l'antigène par l'anticorps est visualisable grâce à un traceur fixé directement ou indirectement sur l'anticorps. Le schéma général du principe d'une réaction immunohistochimique indirecte est exposé sur la [figure 56](#).

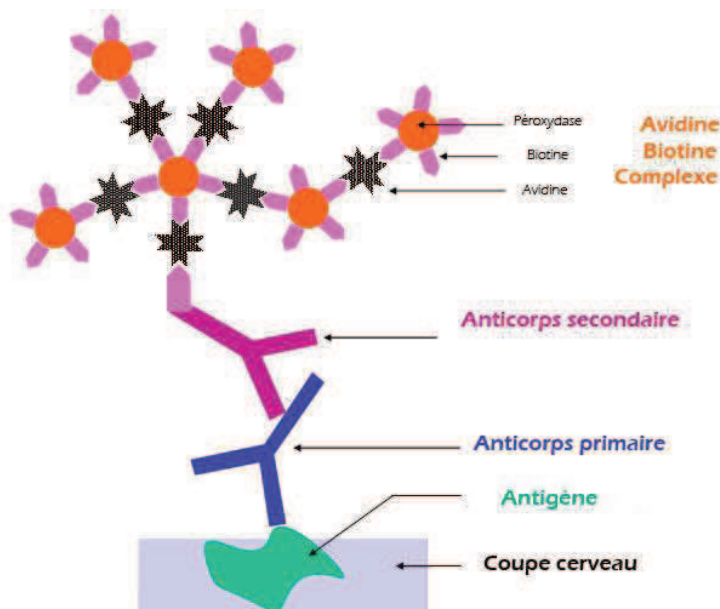


Figure 56: Principe d'une réaction immunohistochimique indirecte : l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène est reconnu par l'anticorps secondaire. Ce dernier est couplé à un système de révélation enzymatique (peroxydase) lié au complexe Avidine-Biotine. (cours Guy Roussel, Strasbourg)

La bioluminescence

Les souris PER2::LUCIFERASE

Il existe plusieurs lignées de souris transgéniques permettant l'étude des horloges circadiennes via la bioluminescence. Ces lignées sont basées sur un transgène exprimant un gène rapporteur: la luciférase (Figure 57). L'étude par la bioluminescence confère un certain nombre d'avantages:

- Suivi des gènes horloges
- Suivi quasi continu
- Suivi durable
- Peu invasif

Dans notre étude nous avons utilisé des souris PER2::LUCIFERASES (173). Cette lignée présente une protéine de fusion PER2 fusionnée à l'enzyme: la Luciférase.

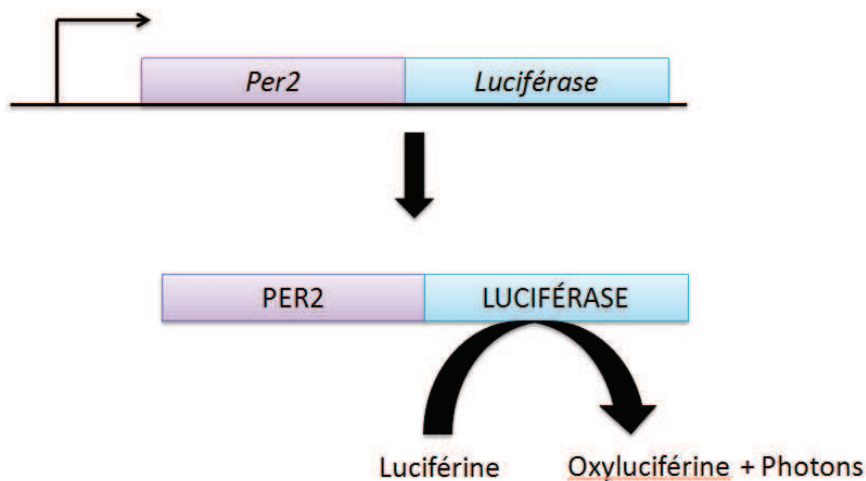


Figure 57: Principe de la bioluminescence avec les souris PER2::LUCIFERASE. La transcription génère une protéine de fusion PER2::LUCIFERASE, l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine accompagnée d'une émission de photons. (Chassard, non publié)

Le tissu sélectionné d'une souris PER2::LUCIFERASE sera mis en culture en présence de luciférine puis placé dans le Lumicycle (Figure 58) (appareil produit par Actimetrics). Cet appareil est doté de photomultiplicateurs qui vont détecter les photons émis par le tissu lors de l'expression de PER2-Luciférase. En effet, lors de l'expression de la protéine de fusion, la luciférine permettra la catalyse de la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Il résultera de l'émission de photons (210). Ainsi lorsque PER2 est exprimée, on observera une augmentation du signal provenant de l'enregistrement via le Lumicycle. Au contraire, une diminution de l'expression de PER2, induira une diminution de la synthèse de luciférase, entraînant une diminution progressive du signal.



Figure 58: Le Lumicycle.

<http://actimetrics.com>

Les oscillations de l'activité de bioluminescence enregistrées donnent de nombreuses informations sur la cinétique d'expression des gènes horloges dans un tissu in vivo ou isolé du reste de l'organisme (en culture) (Figure 59 et tableau 7):

- la période
- la phase
- l'amplitude
- l'acrophase
- la batyphase

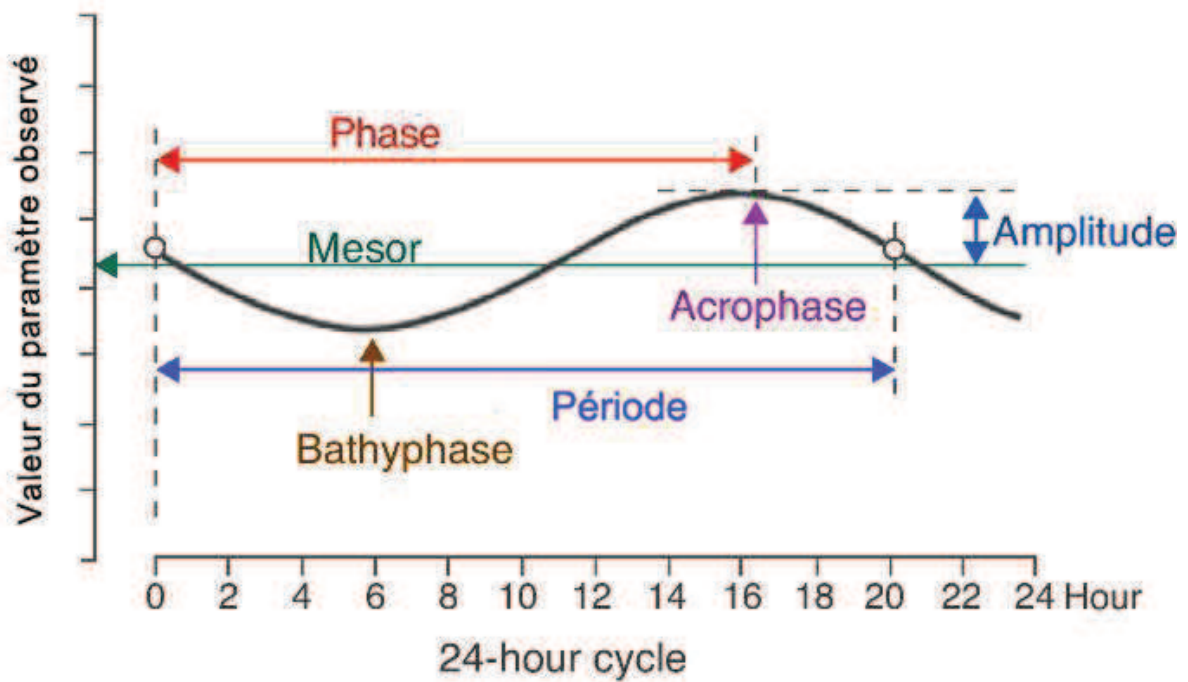


Figure 59: *Caractéristiques d'une oscillation circadienne.* (211)

| Paramètre | Définition |
|-----------|--|
| Période | Temps nécessaire pour faire un cycle |
| Phase | Temps d'un évènement/marqueur externe |
| Amplitude | Différence entre un extrême du cycle et le mesor |
| Acrophase | Position la plus haute de la variable biologique |
| Batyphase | Position la plus basse de la variable biologique |
| Mesor | Moyenne des mesures de la variable biologique |

Tableau 7: *Les paramètres mesurables pour les oscillations circadiennes des gènes horloges.*

Nous pourrons grâce à la technique de bioluminescence comparer plusieurs groupes (action d'un neuropeptide, d'une hormone) sur différents tissus. La comparaison portera sur les différents paramètres présents dans le [tableau](#). Pour comprendre l'analyse de la phase, à savoir déterminer la présence d'avance/retard de phase, la [figure 60](#) illustre parfaitement ce propos.

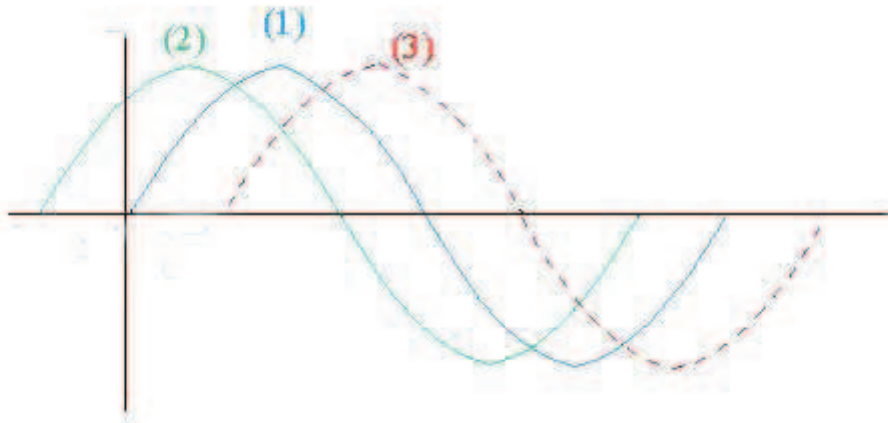


Figure 60: Représentation d'une avance et retard de phase. (1) représente une oscillation circadienne, (2) représente une avance de phase par rapport à (1) et (3). (3) représente un retard de phase par rapport à (1) et (2).

<http://community.fortunecity.ws/marina/heron/468/CourantAlternatif/calternatif1.36.gif>

Analyse via Lumicycle Analysis

L'analyse des différents paramètres précédemment cités est réalisée à l'aide du logiciel Lumicycle Analysis. La [figure 61](#) illustre une capture d'écran du logiciel. On peut y observer les oscillations liées aux données brutes, ainsi que les oscillations après soustraction d'une ligne de base.

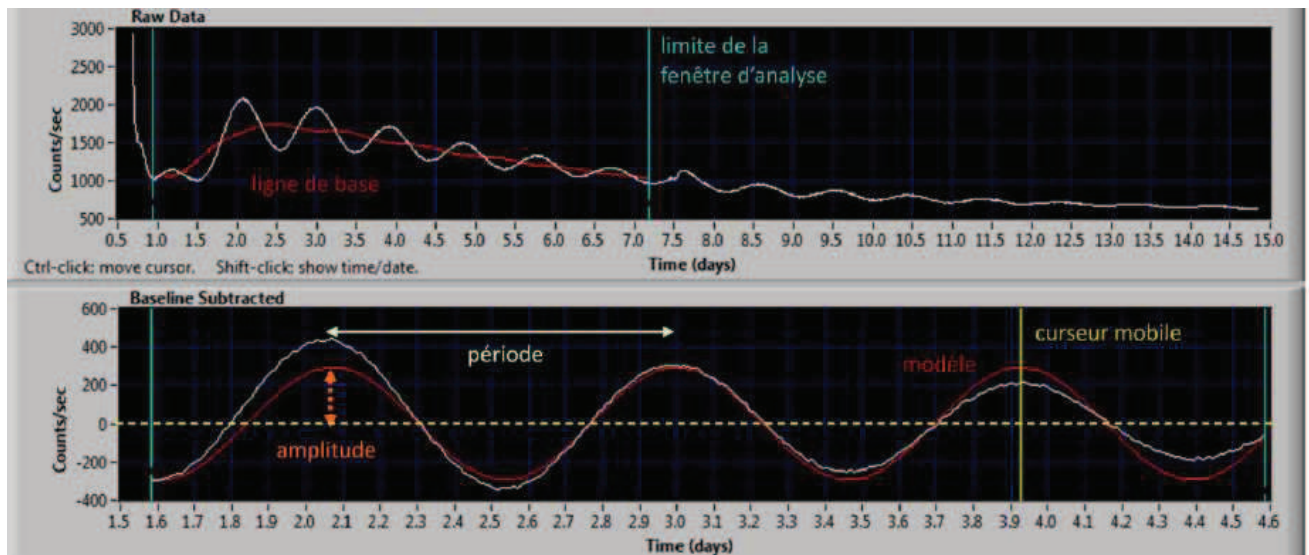


Figure 61: *Capture d'écran du logiciel Lumicycle Analysis. Dans la fenêtre du haut, on peut définir la fenêtre d'analyse des données brutes. Une fois sélectionné les données brutes sont soustraites par une ligne de base donnant les résultats dans la fenêtre du bas. Il est alors possible de définir par différents algorithmes présent dans le logiciel, les paramètres que nous voulons étudier: la période ou encore la période. <http://actimetrics.com>*

RESULTATS

Résumé

Les neurones à Kp de l'AVPV sont essentiels pour la survenue du pic de LH. Celle-ci est conditionnée par les concentrations circulantes d'E2 et le moment du jour. Nous avons étudié si les neurones à Kp de l'AVPV étaient le lieu d'intégration de deux messages chez des souris sauvages intactes : un message oestrogénique provenant de la périphérie, et un message temporel. Nous voulions également savoir si ces neurones hébergeaient une horloge secondaire impliquée dans la temporalité du pic de LH. Durant l'après-midi, le jour du proestrus, une baisse drastique de l'immunoréactivité de Kp apparaît, et ceci deux heures avant la survenue du pic de LH au moment où l'expression de l'ARNm *Kiss1* est élevée. Au contraire durant le diestrus, l'immunoréactivité de Kp, l'expression de l'ARNm *Kiss1* et les concentrations circulantes de LH restent basses. Les neurones à Kp de l'AVPV expriment une protéine horloge PER1 avec un rythme journalier présentant un retard de phase comparativement au rythme de PER1 dans l'horloge principale c'est-à-dire les NSC. Le rythme de PER1 dans les neurones à Kp de l'AVPV exhibe un retard de phase de 2.8 h en diestrus comparativement au proestrus. Des explants d'AVPV exprimant les Kp provenant de souris PER2::LUCIFERASE dévoilent des oscillations circadiennes soutenues avec une période de 23.2h. Cette période est significativement plus courte que celle observée dans les explants de NSC qui est de l'ordre de 24.5h. De plus, l'incubation des explants d'AVPV en présence d'E2 (10nM et 1µM) rallonge la période d'une heure. Aucun effet des E2 sur les explants NSC n'a été observé. En conclusion, cette étude indique que les neurones à Kp de l'AVPV présentent un rythme journalier dépendant des E2, qui pourrait être piloté par la présence d'une horloge secondaire au sein de ces neurones, en plus du signal temporel provenant des NSC.

Evidence for a Putative Circadian Kiss-Clock in the Hypothalamic AVPV in Female Mice

David Chassard,* Isabelle Bur,* Vincent-Joseph Poirel, Jorge Mendoza, and Valérie Simonneaux

Institut des Neurosciences Cellulaires et Integratives (Unité Propre de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité 3212); Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

The kisspeptin (Kp) neurons in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) are essential for the preovulatory LH surge, which is gated by circulating estradiol (E2) and the time of day. We investigated whether AVPV Kp neurons in intact female mice may be the site in which both E2 and daily signals are integrated and whether these neurons may host a circadian oscillator involved in the timed LH surge. In the afternoon of proestrous day, Kp immunoreactivity displayed a marked and transient decrease 2 hours before the LH surge. In contrast, Kp content was stable throughout the day of diestrus, when LH levels are constantly low. AVPV Kp neurons expressed the clock protein period 1 (PER1) with a daily rhythm that is phase delayed compared with the PER1 rhythm measured in the main clock of the suprachiasmatic nuclei (SCN). PER1 rhythm in the AVPV, but not in the SCN, exhibited a significant phase delay of 2.8 hours in diestrus as compared with proestrus. Isolated Kp-expressing AVPV explants from PER2::LUCIFERASE mice displayed sustained circadian oscillations of bioluminescence with a circadian period (23.2 h) significantly shorter than that of SCN explants (24.5 h). Furthermore, in AVPV explants incubated with E2 (10 nM to 1 μ M), the circadian period was lengthened by 1 hour, whereas the SCN clock remained unaltered. In conclusion, these findings indicate that AVPV Kp neurons display an E2-dependent daily rhythm, which may possibly be driven by an intrinsic circadian clock acting in combination with the SCN timing signal. (*Endocrinology* 156: 2999–3011, 2015)

In female mammals, central mechanisms regulating ovulation are gated by both daily timing and estrogenic signals (1). Thus, in female rodents, the preovulatory LH surge occurs every 4–5 days at the proestrus stage when circulating estradiol (E2) levels are high and at a specific time of day, typically at the end of the resting period (2). Although it is well established that the pituitary LH surge is triggered by the release of GnRH from neurons located in the hypothalamus (3), recent studies have disclosed the critical role of kisspeptin (Kp) in triggering the preovulatory GnRH/LH stimulation (4). The Kp role in mammalian reproduction was discovered in two independent studies reporting that the lack of a functional Kp receptor (Kiss1 receptor/G protein-coupled receptor 54) prevents puberty onset (5, 6). Kp neurons are present in two hy-

pothalamic areas, the arcuate nucleus and the anteroventral periventricular nucleus (AVPV)/preoptic nucleus (7). Several studies in female rodents have reported that AVPV Kp neurons are crucial to gate the dual estrogenic/circadian timing of the GnRH-induced preovulatory LH surge. E2 displays a strong positive feedback on AVPV Kp neurons through the activation of ER α receptors (7), and as a consequence ovariectomy prevents the LH surge (8, 9). On the other hand, lesions of the suprachiasmatic nuclei (SCN), which is the locus of the main circadian clock (10–12), or genetic disruption of the molecular clockwork (1) prevent the E2-induced LH surge. Furthermore, the SCN projects vasopressin (VP) fibers directly to AVPV Kp neurons (13) and VP central administration to SCN-lesioned rats is able to induce an LH surge (12). Finally, in ovari-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in USA

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received September 19, 2014. Accepted May 14, 2015.

First Published Online May 20, 2015.

* D.C. and I.B. contributed equally to this work.

Abbreviations: AVPV, anteroventral periventricular nucleus; BMAL1, brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1; DAB, diaminobenzidine; E2, estradiol; ER, estrogen receptor; Kp, kisspeptin; OVX, ovariectomized; PER, period; ROI, region of interest; SCN, suprachiasmatic nuclei; VP, vasoactive intestinal peptide; VP, vasopressin; ZT, Zeitgeber time.

doi: 10.1210/en.2014-1769

Endocrinology, August 2015, 156(8):2999–3011

press.endocrine.org/journal/endo

2999

ectomized E2-treated mice, expression of the Kp encoding gene *Kiss1* is increased at the time of the LH surge (14).

Circadian capacity is not limited to the SCN nuclei. It has been observed that a variety of other central structures (eg, olfactory bulb, cerebellum, dorsomedial hypothalamus) and peripheral organs (eg, heart, liver, muscle) are also able to sustain endogenous circadian oscillations (15–18). Specifically, in the female reproductive system pituitary gonadotrophs along with the uterus and ovaries have been reported to host such circadian oscillators (19–22). Although daily clock gene expression has been reported in the AVPV of female rats (23), the presence of a self-sustained circadian oscillator in AVPV Kp neurons has not yet been demonstrated.

Therefore, the aim of the present study was to delineate whether AVPV Kp neurons might host a circadian oscillator in female mice. We first analyzed the daily regulation of *Kiss1* gene expression and Kp content in intact mice at proestrus or diestrus to determine the effects of the physiological variation of circulating E2 on the daily activity of Kp neurons. In a second set of experiments, we examined whether AVPV Kp neurons express the clock protein, period 1 (PER1) at different times of the day in both proestrus and diestrus. Finally, using transgenic PER2::LUCIFERASE female mice, we investigated whether *ex vivo* AVPV explants display sustained endogenous circadian oscillations and whether these are E2 sensitive.

Materials and Methods

Animals

Adult female C57BL/6J mice (*Mus musculus*) and PER2::LUCIFERASE knock-in mice (Jackson laboratory) on a C57BL/6 background (24) were bred and raised in our animal facility under a 12-hour light, 12-hour dark cycle [lights on at 8:00 AM, Zeitgeber Time (ZT) 0] with controlled temperature (22°C) and humidity (50%) with *ad libitum* food and water access. Estrous cyclicity was followed by daily vaginal smears (at ZT2, 2 h after lights on), and only mice showing regular 4- to 5-day estrous cycles were used for the experiments. All experiments were performed in accordance with the French National Law (license number 67–250), implementing the European Communities Council directive 86/609/EEC.

Immunohistochemistry

Tissue processing

C57BL/6J mice at proestrus or diestrus were euthanized with CO₂ at different time points: ZT0, ZT4, ZT9, ZT11, ZT12, ZT16, and ZT20 (*n* = 5 per time point). For each animal, blood was collected by a cardiac puncture for LH assay, and then an intracardiac perfusion was performed with 10 mL phosphate buffer saline 0.1 M (PBS, pH 7.4) followed by 50 mL of periodate-lysine-paraformaldehyde fixative (formaldehyde 4%,

NaIO₄ 10 mM and lysine 75 mM in 100 mM phosphate buffer, pH 7.3). Brains were collected, placed in periodate-lysine-paraformaldehyde overnight at 4°C, then in 30% sucrose overnight, frozen in isopentane at –35°C and finally kept at –80°C. Six series of coronal brain sections (30 μm) were cut using a cryostat (Leica; Leica Microsystems) and collected at the level of the anteroventral periventricular and periventricular preoptic nuclei (hereafter referred as AVPV) by using landmarks such as the anterior commissure and third ventricle according to the mouse brain stereotaxic atlas (25). Brain sections were placed in 12-well cell culture plates containing PBS with azide (0.02%) and kept at 4°C. To limit variation in the labeling background among tissue sections, AVPV-containing brain sections of all time points of a given estrous stage (proestrus or diestrus) were processed at the same time. For each immunolabeling experiment, there were two to three AVPV sections per mouse, but for the analysis only two sections located at similar level of AVPV (position determined relative to the anterior commissure) were selected for each mouse to limit the difference related to rostrocaudal variations.

Single Kp immunohistochemistry in AVPV

Kp immunohistochemistry was performed using rabbit polyclonal anti-Kp number 566 (generated by Dr Alain Caraty from Institut National de la Recherche Agronomique, Tours, France), which specificity has been previously verified in rodent brain tissues (26, 27). Free-floating brain sections were incubated with the anti-Kp number 566 (1:50 000) in 154 mM PBS buffer containing 10% donkey serum and 0.3% Tween 20 for 24 hours at 4°C and then incubated in biotinylated donkey antirabbit (1:2000; Jackson Labs) for 2 hours at 4°C. To amplify the signal, sections were treated with the avidin biotin complex coupled to peroxidase (1:250, Vectastain kit; Vector Laboratories) for 1 hour at room temperature. Then an immunoreactive signal was revealed using a solution of 0.5 mg/mL 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich) diluted in water and 0.001% hydrogen peroxide urea (Sigma-Aldrich) for about 7 minutes at room temperature. The sections were then mounted on gelatinized slides, air dried, dehydrated through alcohols, and cleared in toluene before mounting with Eukitt (Sigma-Aldrich) resin.

Double PER1/Kp immunohistochemistry in AVPV

Because the clock protein PER2 is considered as one of the core components driving circadian oscillation and for consistency with the analysis of bioluminescence from PER2::LUCIFERASE mice (see below), several protocols of dual-PER2/Kp immunostaining were tested, however with no success. Therefore, PER1, another core clockwork element of the circadian system, was immunolabeled in Kp cells to test the presence of circadian clock components in these neurons. Sections were treated for Kp immunoreactivity as detailed above except that the signal was detected using streptavidin-peroxidase at 1:3000 (Roche) for 1 hour and revealed with rhodamine-labeled tyramide (28) for 1 hour at room temperature. Before processing with the second label, immunostained sections were treated using an elution protocol specifically set for this dual labeling to minimize the background of the first labeling: 2 × 15 minutes wash in 100 mM glycine, 0.3% Triton X-100 (pH 2.2) at room temperature. Brain sections were then incubated overnight at 4°C with an antibody directed against the protein PER1 (1:2000, goat anti-PER1; Santa Cruz Biotechnology) in a PBS buffer containing 10% horse serum and 0.3% Tween 20 for 24 hours at 4°C

and then incubated in biotinylated horse anti-goat (1:1 000; Vector Laboratories) for 2 hours at 4°C. Specificity of the PER1 antibody was previously evaluated by preabsorption experiments (29). PER1 signal was revealed by treatment with the avidin biotin complex coupled to peroxidase (1:250) for 1 hour at room temperature followed by incubation in DAB for about 7 minutes at room temperature. It is possible that DAB quenched Kp immunofluorescence, and we may have an underestimated number of Kp neurons. However, the aim of this experiment was to identify, not quantify, Kp neurons to analyze PER1 in a representative number of individual Kp (or non-Kp) AVPV cells. Treated sections were mounted, dried onto gelatinized glass slides, and covered with 1% DABCO (Sigma-Aldrich; wt/vol) in 90% glycerol and 10% PBS (Sigma-Aldrich) between the slide and coverglass.

In situ hybridization

Tissue processing

C57BL/6J mice at proestrus or diestrus were euthanized with CO₂ at three time points: ZT4, ZT9, and ZT16. Brains were collected, frozen in isopentane at -35°C and kept at -80°C. Each brain was sectioned into 16- μ m slices from the rostral to the caudal part of the AVPV with a cryostat (Leica; Leica Microsystems). Ten series of brain sections were laid on SuperFrost plus slides (Menzel-Gläser) and kept at -80°C until processing. There were two to three AVPV sections per mouse, but for the analysis, only two sections located at a similar level of AVPV were selected for each mouse to limit the difference related to rostrocaudal variations.

Kiss1 mRNA in situ hybridization

Brains sections were fixed in 4% formaldehyde in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), acetylated with acetic anhydride in triethanolamine buffer, and then dehydrated with 5 minutes of graded ethanol baths. A hybridization medium containing 200 ng/mL 313-bp digoxigenin-labeled antisense mouse *Kiss1* riboprobe (30) was applied to each slide for 48 hours at 60°C. The nonspecific binding was removed with six baths of high stringency (0.1 \times saline sodium citrate with 0.05% Tween 20 at 72°C). The bound digoxigenin-labeled probe was detected using an alkaline phosphatase-labeled antidigoxigenin antibody 1:5000 (Roche). Alkaline phosphatase activity was detected using nitroblue tetrazolium (404 μ M; Euromedex) and bromochloroindolyl phosphate (202 μ M in phosphatase alkaline buffer; Euromedex) for 2.5 hours at room temperature, and the duration was validated to be in the linear range of the alkaline phosphatase activation and then stopped with ultrapure water. Brain slices were coated with crystal mount and covered with a coverglass.

Semiquantification of neuron labeling

Daily variation in Kp immunoreactivity and Kiss1 mRNA in AVPV neurons

First, the number of labeled neurons was counted manually on two AVPV sections per mouse by two persons unaware of the time points examined, and both daily patterns were similar. For each experimental point, the value given is the mean number of labeled neurons \pm SEM per AVPV section of the five mice. Second, for each animal two AVPV sections were photographed at

\times 400 with a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems) and converted to 8-bit gray scale using ImageJ Software (W. S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Semi-quantification of the labeling intensity in individual neurons was performed according to a protocol previously described (31) and validated for immunostaining by dot blot analyses on serial dilutions of Kp (32). Briefly, a background image was captured on a slide portion with no section and subtracted from the sample images before analysis. The region of interest (ROI) was determined using a circle surrounding the labeled neurons, and the integrated density of individual neurons was measured and subtracted from a background values taken next to AVPV Kp neurons. An average of 30–40 neurons per AVPV section were analyzed, and the mean integrated density of individual neurons was determined for each animal. For each time point, the labeling intensity was calculated as the mean \pm SEM of five mice.

Daily variation in PER1 immunoreactivity in AVPV kisspeptin neurons

For each animal, photographs of AVPV sections were taken at \times 400. The first picture was taken in red fluorescence to visualize rhodamine stained Kp, and the second picture was taken in bright field to visualize PER1 DAB staining. This second picture was converted to 8-bit gray scale using ImageJ software (National Institutes of Health) for further PER1 quantification. To quantify PER1 staining only in Kp neurons, the two images from the same slice were superimposed: the first picture showing Kp immunoreactivity in red fluorescence and the second showing PER1 immunoreactivity in green (DAB gray scale pictures converted in green color for better visualization). For each AVPV Kp neuron, PER1 labeling intensity was quantified in the gray-scale image using ROIs covering the entire nucleus, following the procedure describe above. Thirty Kp neurons per mouse AVPV were analyzed, and the mean integrated density of PER1 labeling per individual neuron was determined for each animal's AVPV. For each time point, the labeling intensity was calculated as the mean \pm SEM of five mice. Additionally, PER1 labeling intensity was also measured in 30 neighboring non-Kp cells of the AVPV, and for each time point, the labeling intensity was calculated as the mean \pm SEM of five mice per time point.

Quantification of daily variation in PER1 immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei

For each animal, photographs of two medial sections of SCN were taken and converted to 8-bit gray scale using ImageJ software (National Institutes of Health). Quantification of PER1 staining in SCN neurons was performed using ROIs covering the entire SCN as previously reported (33). For each animal, a mean PER1 labeling intensity was calculated from values measured in the two SCN sections. For each time point, the labeling intensity was calculated as the mean \pm SEM of five mice.

Analysis of bioluminescence from PER2::LUCIFERASE mouse tissue explants

Tissue preparation

The brain and uterus of PER2::LUCIFERASE mice ($n = 3-6$) were collected at ZT8 (4 h before lights off) and processed as previously published (34). Tissues were placed in ice-cold Hanks' basic salt solution (Sigma-Aldrich) containing 0.035% sodium

bicarbonate, 10 mM HEPES, and antibiotics (100 μ g/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin; Sigma-Aldrich). SCN and AVPV explants (500 μ m thick; 1.0 to 1.5 mm squares) were made using a stainless steel mouse brain matrix (Brain Slicer Matrix; ZIVIC Instruments) according to the mouse brain stereotaxic atlas (25). Uterine horns were placed in chilled Hanks' basic salt solution, isolated from the surrounding adipose tissue and cut into four to five round sections. Tissues were cultured on Millicell culture membranes (PICMORG 50; Millipore) in a 35-mm culture dish containing 1 mL of serum free, no red phenol, DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.35% glucose, 0.035% sodium bicarbonate, 10 mM HEPES, 2% B27 (Invitrogen/Life Technologies), antibiotics (25 μ g/mL penicillin and 25 U/mL streptomycin), and 0.1 mM beetle luciferin (Promega). Culture dishes were sealed with automotive grease and placed in a Lumicycle device (Actimetrics) inside a light-tight 37°C incubator. For each dish, bioluminescence was counted every 10 minutes for 5 days or longer. The presence of *Kiss1*-expressing neurons in the AVPV explants was assessed before (*ex vivo*) and after (*in vitro*) the 5-day culture by PCR analysis. Total RNA was extracted by using an RNeasy Plus microkit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol (with no use of genomic DNA eliminator column for *ex vivo* AVPV and using optional RNA carrier for *in vitro* AVPV). *Ex vivo* AVPV RNA was reverse transcribed in a reaction containing oligodeoxythymidine, deoxynucleotide triphosphate, ribonuclease inhibitor, revert Aid H-Minus M-MLV reverse transcriptase. Two samples were processed, including one with no reverse transcriptase being a negative control for putative genomic DNA contamination (*ex vivo* AVPV⁻). These samples were incubated for 1 hour at 42°C (*ex vivo* AVPV⁻ and *ex vivo* AVPV⁺). *In vitro* AVPV RNA was reverse transcribed according to the same protocol but using random hexamer primer and no oligodeoxythymidine (*in vitro* AVPV⁺). A second sample with no reverse transcriptase was also processed the same way (*in vitro* AVPV⁻). One microliter of these four samples together with 1 μ L plasmid with a mouse *Kiss1* insert (for positive control) and 1 μ L ultrapure water (for negative control) were amplified by touchdown PCR. The PCR mixtures contained typically both upstream and downstream *Kiss1* mouse specific oligonucleotide primers (TTGAGAT-CATTCTGGGAGGAAG and GCCCGCGCCGCTGCCTC-CTG), deoxynucleotide triphosphate, MgCl₂, specific reaction buffer, and AmpliTaq 360 DNA polymerase according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The PCR conditions were as follows: 19 cycles at 95°C for 30 seconds; 70°C for 30 seconds (1°C decrease every cycle); 72°C for 1 minute and 21 cycles at 95°C for 30 seconds; 50°C for 30 seconds; 72°C for 1 minute; followed by a 10-minute extension at 72°C (AmpliTaq 360 DNA polymerase). Then 1 μ L of each touchdown PCR product was reamplified by regular PCR conditions as follows: 20 cycles at 95°C for 30 seconds; 60°C for 30 seconds; 72°C for 1 minute and 72°C for 20 minutes (AmpliTaq 360 DNA polymerase). PCR products were run together on a 2% agarose gel at 150 V, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

Effect of estradiol on *PER2::LUCIFERASE* oscillations

β -Cyclodextrin-caged E2 at two final concentrations (10 nM or 1 μ M E2; Sigma-Aldrich) or β -cyclodextrin alone (for control; Sigma-Aldrich) was added to the culture medium at the exper-

iment onset. Bioluminescence activity was recorded as previously described for 5 days or longer.

Analysis of circadian rhythm in endogenous bioluminescence

Waveforms of rhythmic bioluminescence emission were analyzed with the Lumicycle software (Actimetrics) after subtracting the 24-hour moving average from the raw luminescence data. Because AVPV oscillations are strongly damped after 5 days in culture, analysis was performed after the first cycle during the next 4 days (cycles 2–5). A sin function was applied to fit the largest sinusoidal component in the data and to assess the period and amplitude (in counts per second [cps]) of the circadian rhythmic bioluminescence for each SCN, AVPV, and uterine explant. Data are given as the mean \pm SEM of three to six samples.

LH assay

Circulating LH levels were measured by a RIA in 25–50 μ L of plasma according to a protocol described previously (35). Data are given as the mean \pm SEM of five mice per time point.

Statistical analyses

For the daily expression of number of Kp neurons, intensity of Kp immunoreactivity, and *Kiss1* mRNA labeling, a one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test was used to assess significant variations among different time points at a given estrous stage. Daily rhythms of *PER1* expression in AVPV Kp neurons and in the SCN were analyzed using the cosinor method (Sigmaplot; Systat Software Inc) by fitting the 24-hour data to a cosinor curve (36); then the amplitude of the oscillations and the phase difference (taken the acrophase, peak maximum of the value of a sine function fitted to the raw data, as a reference time point) were compared between groups. For bioluminescence analysis, a one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test was used to assess the period and amplitude in different groups. If the Shapiro-Wilk test failed, an ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis) was used to assess differences. Differences with a value of $P < .05$ were considered as significant.

Results

Daily pattern of AVPV Kp expression in mice at proestrus or diestrus

Kp expression in the AVPV was analyzed by immunohistochemistry and *in situ* hybridization at different time points throughout the day in mice at proestrus or diestrus.

At the proestrous stage (Figure 1), the number of Kp-immunostained ($P = .679$; Figure 1, A and C) and *Kiss1* mRNA-expressing ($P = .996$; Figure 1, B and C) neurons did not show significant daily variation with an average of 6.5 labeled neurons/AVPV section. In contrast, intensity of Kp immunostaining in AVPV neurons displayed daily variation (Figure 1, A and D) with a marked and transient decrease of approximately 70% at ZT9 ($P = .003$). Furthermore, Kp immunoreactivity in neighboring fibers also appeared reduced at ZT9. Intensity of *Kiss1* mRNA la-

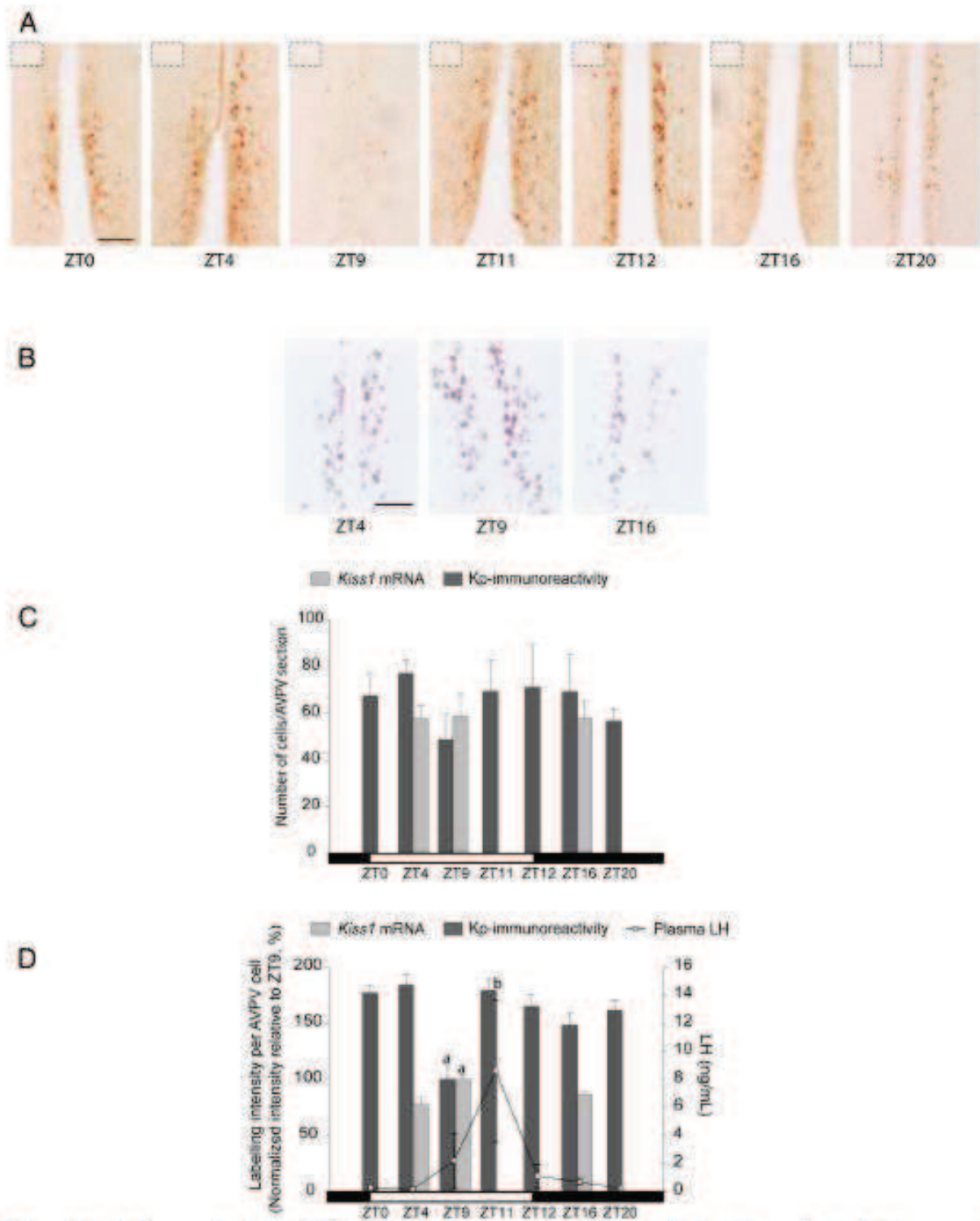


Figure 1. Daily variation in Kp expression in the AVPV of female mice at proestrus. **A**, Representative pictures showing Kp immunoreactivity in AVPV neurons of mice at different zeitgeber times (ZT0, ZT4, ZT9, ZT11, ZT12, ZT16, and ZT20, with ZT0 being light onset) on the day of proestrus; the upper left insert in each photograph shows the labeling background at the level of the cortex of the same brain section. Scale bar, 100 μ m. **B**, Representative pictures showing *Kiss1* mRNA in situ hybridization at three zeitgeber times (ZT4, ZT9, ZT16) on the day of proestrus. Scale bar = 100 μ m. **C**, Number of Kp-immunoreactive cells (dark gray bar) and *Kiss1*-expressing cells (light gray bar) per AVPV section of mice sampled at different zeitgeber times on the day of proestrus; day and night periods are indicated as white and black horizontal bars; values are mean \pm SEM of five mice. **D**, Relative labeling intensity (in percentage of labeling at ZT9 of proestrus) of Kp immunoreactivity (dark gray bar) and *Kiss1* mRNA (light gray bar) in AVPV cells, and LH levels in the plasma (in nanograms per milliliter, white dots) of mice sampled at different zeitgeber times on the day of proestrus; day and night periods are indicated as white and black horizontal bars; values are mean \pm SEM of five mice; a, significant difference with $P < .05$ in labeling intensities at ZT9 as compared with other time points; b, significant difference with $P < .05$ in LH values at ZT11 as compared with other time points.

belonging in AVPV neurons was slightly but significantly higher at ZT9 as compared with other daytime or nighttime values ($P = .019$; Figure 1, B and D). The daily pattern of circulating LH confirmed the proestrous stage of the mice and showed that the decrease in AVPV Kp immunostaining takes place 2 hours before the LH surge, which occurs at ZT11 (Figure 1D).

At the diestrous stage (Figure 2), the number of Kp-immunostained ($P = .810$; Figure 2, A and C) and *Kiss1* mRNA-expressing ($P = .996$; Figure 2, B and C) neurons displayed no daily variation, with an average of 51 labeled neurons per AVPV section. Similarly, the intensity levels of Kp immunostaining ($P = .893$; Figure 2, A and D) as well as *Kiss1* mRNA labeling ($P = .870$; Figure 2, B and D) in AVPV neurons did not show daily variation. Finally, circulating LH was constantly low as is expected from mice in diestrus (Figure 2D).

Daily pattern of PER1 expression in AVPV Kp neurons in proestrus and diestrus

The presence of PER1 protein, a circadian clockwork element, was investigated in AVPV Kp neurons at different time points on the day of proestrus or diestrus.

The double PER1/Kp immunostaining showed that a large majority (>80%) of AVPV Kp neurons express nuclear PER1 (Figure 3A). PER1 expression, analyzed in a representative number of AVPV Kp neurons (30 per mouse AVPV at each time point) displayed a significant daily pattern ($P = .0002$) in mice both at proestrus (Figure 3B, black dots) and diestrus (Figure 3C, black dots). According to the cosinor analysis, the acrophase was at ZT20.3 in proestrus and ZT23.1 in diestrus, leading to a significant phase delay of 2.8 hours in the rhythm during diestrus ($P = .031$). The amplitude of PER1 daily rhythm between proestrus (8.92 ± 2.05 ; $n = 5$) and diestrus (13.90 ± 3.20 ; $n = 5$) was not statistically different ($P = .219$). PER1 expression was also measured in non-Kp cells of the AVPV, and the cosinor analysis indicated no significant daily oscillation in either proestrus (Figure 3B, white dots; $P = .886$) or diestrus (Figure 3C; white dots; $P = .937$). As a matter of comparison, the SCN displayed a daily rhythm in PER1 expression, which was similar in mice at proestrus (Figure 3D) and diestrus (Figure 3E), with an acrophase occurring at ZT16 (proestrus) and ZT15.1 (diestrus). As a consequence, the PER1 rhythm in the AVPV displayed a 4.3 hours phase delay in proestrus ($P = .002$; Figure 2, B and D) and an 8.0-hours phase delay in diestrus ($P = .001$ Figure 2, C and E) as compared with the phase of the SCN.

Analysis of PER2-driven luciferase oscillations in AVPV explants in various E2

To evaluate whether the *in vivo* PER rhythm observed in AVPV Kp neurons could be dependent on an endogenous circadian oscillator, the bioluminescent activity of AVPV explants from PER2::LUCIFERASE female mice was followed for several days *in vitro*.

AVPV explants displayed sustained autonomous oscillations for up to 5 days, like the SCN explants (Figure 4A), suggesting the presence of a circadian oscillator in the AVPV. The period of the AVPV PER2-driven bioluminescence was significantly shorter ($\tau = 23.2 \pm 0.4$ h, $n = 6$) than the period of the SCN explants from the same mice ($\tau = 24.5 \pm 0.9$ h, $n = 6$; $P = .002$, Figure 4B). The amplitude of the SCN explant oscillations was about 7 times larger than that of the AVPV explants (median of the amplitude for SCN = 54.89 ± 9.70 cps and for AVPV = 7.60 ± 2.83 cps; $P = .001$). A post hoc PCR analysis confirmed that the AVPV explants expressed *Kiss1* before and, although to a lesser extent, after the 5-day culture (Figure 4C).

A recent study reported that the uterus, not the SCN, of PER2::LUCIFERASE mice displays endogenous oscillations in which the period value is decreased by the presence of E2 in the culture medium (22). To test whether the AVPV circadian oscillator may also be affected by E2, oscillations of bioluminescence from tissue explants were measured without or with 10 nM or 1 μ M E2 in the culture medium (Figure 5). As already reported (22), the period of the SCN clock was not significantly altered by the presence of E2 in the culture medium (Figure 5, A and D). In contrast, both concentrations of E2 significantly increased the period of the AVPV oscillations from $\tau = 23.2 \pm 0.4$ hours ($n = 6$) in the absence of E2, to $\tau = 24.2 \pm 0.6$ hour ($n = 6$; $P = .002$) in the presence of 1 μ M E2 or $\tau = 24.7 \pm 0.4$ hour ($n = 3$; $P = .005$) in the presence of 10 nM E2 (Figure 5, B and D). In agreement with the previous report (22), and opposite of what we found for the AVPV, 1 μ M or 10 nM E2 decreased the uterine circadian period from $\tau = 23.6 \pm 0.7$ hour ($n = 6$) in the absence of E2, to 22.8 ± 0.5 hour ($n = 6$; $P = .037$) in the presence of 1 μ M E2 or $\tau = 22 \pm 0.8$ hour ($n = 3$; $P = .036$) in the presence of 10 nM E2 (Figure 1, C and D). E2 incubation had no significant effect on the amplitude of the circadian oscillations in any of the three types of explants.

Discussion

This study shows that rodent AVPV Kp neurons display a daily activity sensitive to the natural estrogenic environ-

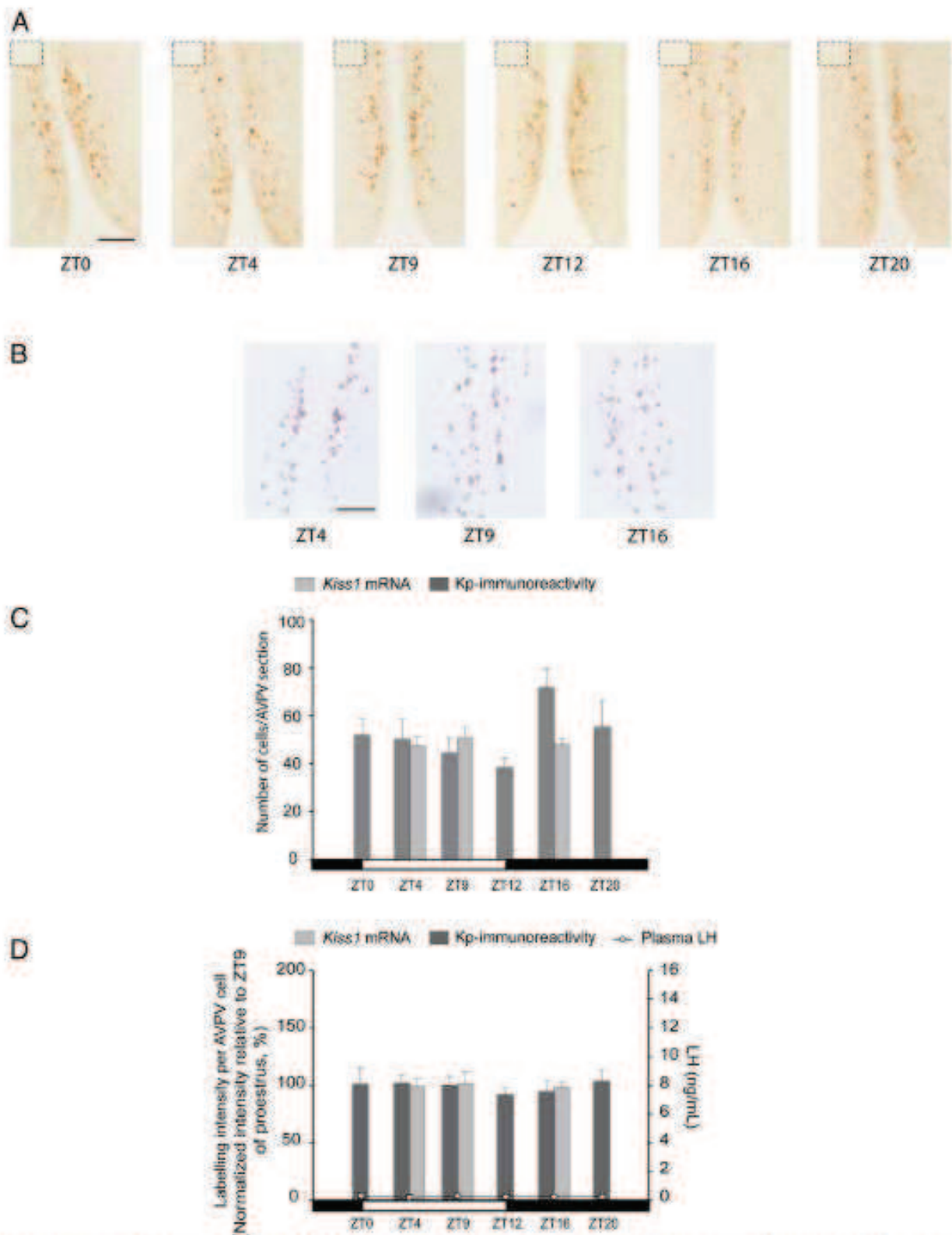


Figure 2. Daily variation in Kp expression in the AVPV of female mice at diestrus. **A**, Representative pictures showing Kp immunoreactivity in AVPV neurons of mice at different zeitgeber times (ZT0, ZT4, ZT9, ZT12, ZT16, and ZT20, with ZT0 being light onset) on the day of diestrus; the upper left insert in each photograph shows the labeling background at the level of the cortex of the same brain section. Scale bar, 100 μ m. **B**, Representative pictures showing *Kiss1* mRNA in situ hybridization at three zeitgeber times (ZT4, ZT9, ZT16) on the day of diestrus. Scale bar, 100 μ m. **C**, Number of Kp-immunoreactive cells (dark gray bar) and *Kiss1*-expressing cells (light gray bar) per AVPV section of mice sampled at different zeitgeber times on the day of diestrus; values are mean \pm SEM of five mice; day and night periods are indicated as white and black horizontal bars. **D**, Relative intensity (in percentage of labeling at ZT9 of proestrus) of Kp immunoreactivity (dark gray bar) and *Kiss1* mRNA (light gray bar) in the AVPV and the LH levels in the plasma (in nanograms per milliliter, white dots) of mice sampled at different zeitgeber times on the day of diestrus; values are mean \pm SEM of five mice; day and night periods are indicated as white and black horizontal bars.

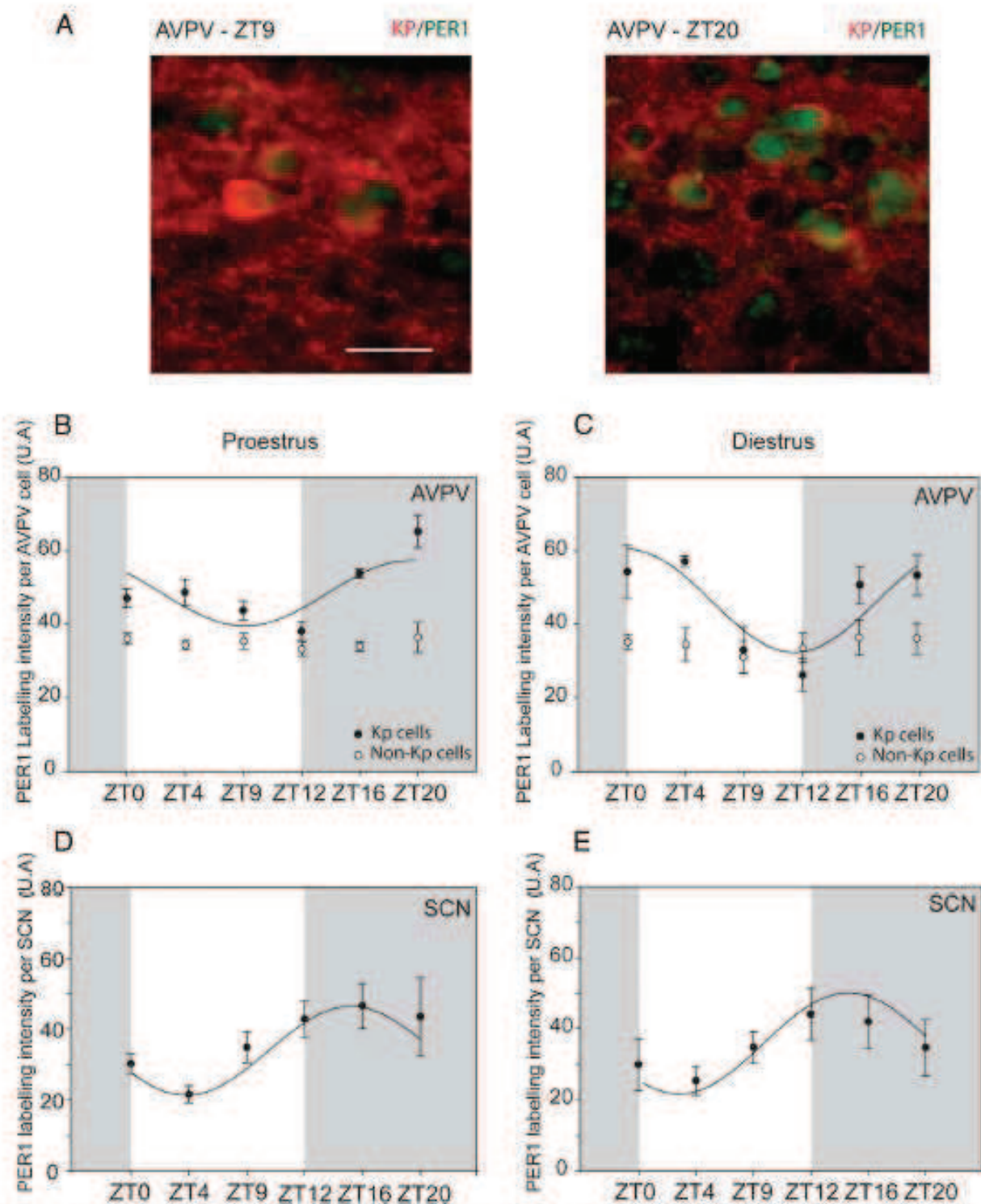


Figure 3. Daily variation in PER1 expression in AVPV Kp neurons and in the SCN of female mice at proestrus or diestrus. **A**, Representative pictures showing PER1 immunoreactivity (green) in Kp-immunoreactive neurons (red) from the AVPV of mice at two zeitgeber times (ZT9, ZT20) on the day of proestrus. Scale bar, 20 μ m. **B** and **C**, Daily profile of PER1-immunoreactivity in Kp cells (black dots) and non-Kp cells (white dots) from the AVPV of mice at proestrus (**B**) or diestrus (**C**). Thirty Kp neurons and 30 non-Kp cells per AVPV were analyzed for PER1 labeling intensity. **D** and **E**, Daily profile of PER1 immunoreactivity in the whole SCN of mice at proestrus (**D**) or diestrus (**E**). Values are mean \pm SEM of five mice. Day and night periods are indicated as white and gray areas.

ment and suggests that this rhythmicity may be partly sustained by an estradiol-sensitive circadian oscillator.

A previous study by Robertson et al (14), using ovariectomized (OVX) E2-supplemented (OVX+E2) mice in constant darkness, reported a significant increase in the level of AVPV *Kiss1* mRNA and c-FOS expression in *Kiss1*

cells at CT9-CT12 (circadian time) that was absent in OVX mice that lack circulating E2. Similarly, our study, using intact mice under a light/dark cycle, shows an increase of AVPV *Kiss1* mRNA at ZT 9 in proestrus when circulating E2 is high but not in diestrus when circulating E2 is low. Other studies performed in female Syrian ham-

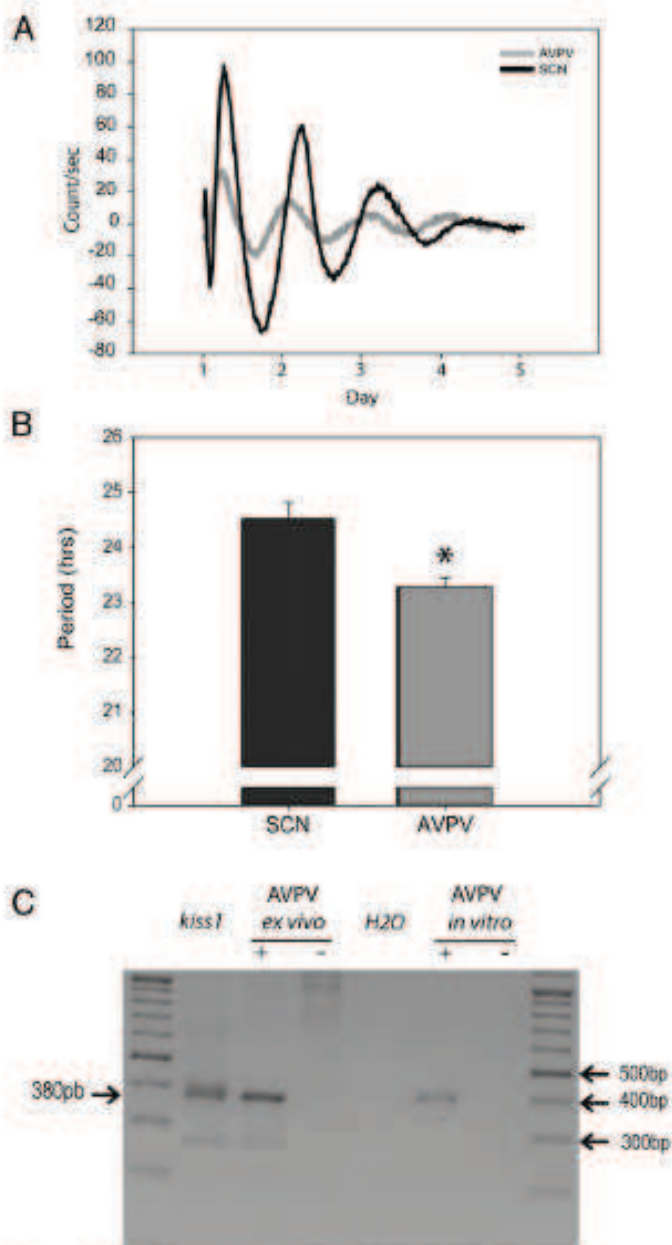


Figure 4. Circadian variation in PER2-driven bioluminescence from SCN and AVPV explants of PER2::LUCIFERASE female mice. **A**, Representative bioluminescence traces showing endogenous circadian rhythms of PER2 expression from SCN (black line) and AVPV (gray line) explants. **B**, Circadian period values of bioluminescence variation from SCN (dark bar) and AVPV (gray bar) explants; values are mean \pm SEM of $n = 6$. *, Significant difference with $P < .05$ between SCN and AVPV circadian periods. **C**, Agarose gel showing PCR-amplified *Kiss1* sequence (380 bp) from ex vivo (before culture) or in vitro (after 5 d in culture) AVPV explants. To verify the absence of genomic contamination, extracted mRNA was converted (AVPV+) or not (AVPV-) into cDNA. A plasmid containing mouse *Kiss1* and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively.

sters (37) or rats (23) have also reported an increase in the levels of *Kiss1* mRNA or c-FOS expression in Kp neurons from OVX + E2 animals. In OVX hamsters and rats, however, the daily rhythm of *Kiss1* mRNA was strongly reduced but not fully abolished. This discrepancy with the studies in mice might be explained by species differences in

the E2 sensitivity of Kp neurons. All of these studies, however, show an E2-dependent increase in Kp neuron activation and *Kiss1* mRNA at the time of the LH surge in OVX + E2 or proestrus females.

In our study, we further analyzed the daily variation in Kp immunoreactivity in the AVPV neurons. In proestrus mice, quantification of immunoreactive signal in each Kp neuron clearly shows a marked and transitory decrease in Kp content at ZT9, 2 hours before the LH surge at ZT11. This decrease in Kp content was absent in diestrous mice, indicating that the regulation of Kp content, as well as *Kiss1* mRNA and c-FOS activation, requires high levels of circulating E2. It is well established that AVPV Kp neurons are the major central site for positive E2 feedback in females. Indeed, AVPV Kp neurons express a high density of estrogen receptor (ER)- α (8) and E2 stimulates Kp synthesis in all rodent species investigated (7, 30, 38), which leads to higher Kp levels at proestrus than at diestrus. Altogether, the large decrease in Kp content, coincident with an increase in *Kiss1* mRNA and neuron activation (14), indicates that on the day of proestrus, there is an activation of the AVPV Kp neurons leading to a synchronized increase in Kp synthesis and decrease in peptide content around ZT9, which is 2 hours before the LH surge. It has been established that AVPV Kp is critical for the GnRH neuron-induced surge of LH (37, 38). Therefore, although the decrease in Kp may be caused by peptide degradation, we hypothesize that the decrease in Kp content at ZT9 results from peptide neuronal release.

Daily regulation of biological functions in mammals relies on the circadian activity of a master biological clock located in the SCN, which is entrained by the light/dark cycle via a retinohypothalamic tract (39, 40). The SCN-driven circadian regulation of reproductive activity appears to involve at least two different peptidergic outputs, vasoactive intestinal peptide (VIP) and VP. Whereas VIP-containing neurons project directly to GnRH neurons (41), VPergic neurons project to AVPV Kp neurons, which express V1a receptors (13, 37). Additionally, SCN lesions suppress the LH surge (11) and central VP infusion induces an LH surge in SCN lesioned OVX + E2 rats (12) or SCN intact OVX + E2 hamsters (37). Therefore, these findings indicate that the SCN-derived VP input onto AVPV Kp neurons is an important component for the regulation of the LH surge. However, the daily rhythm in SCN VP content is constant throughout the estrous cycle (42), whereas the activation of Kp neurons occurs only on the afternoon of proestrus in mice. This estrous stage-dependent gating of the SCN output may take place at the level of the VP terminals/Kp neuron interaction. Indeed previous studies have reported that the number of VP synapses targeting Kp neurons (13), and the expression of

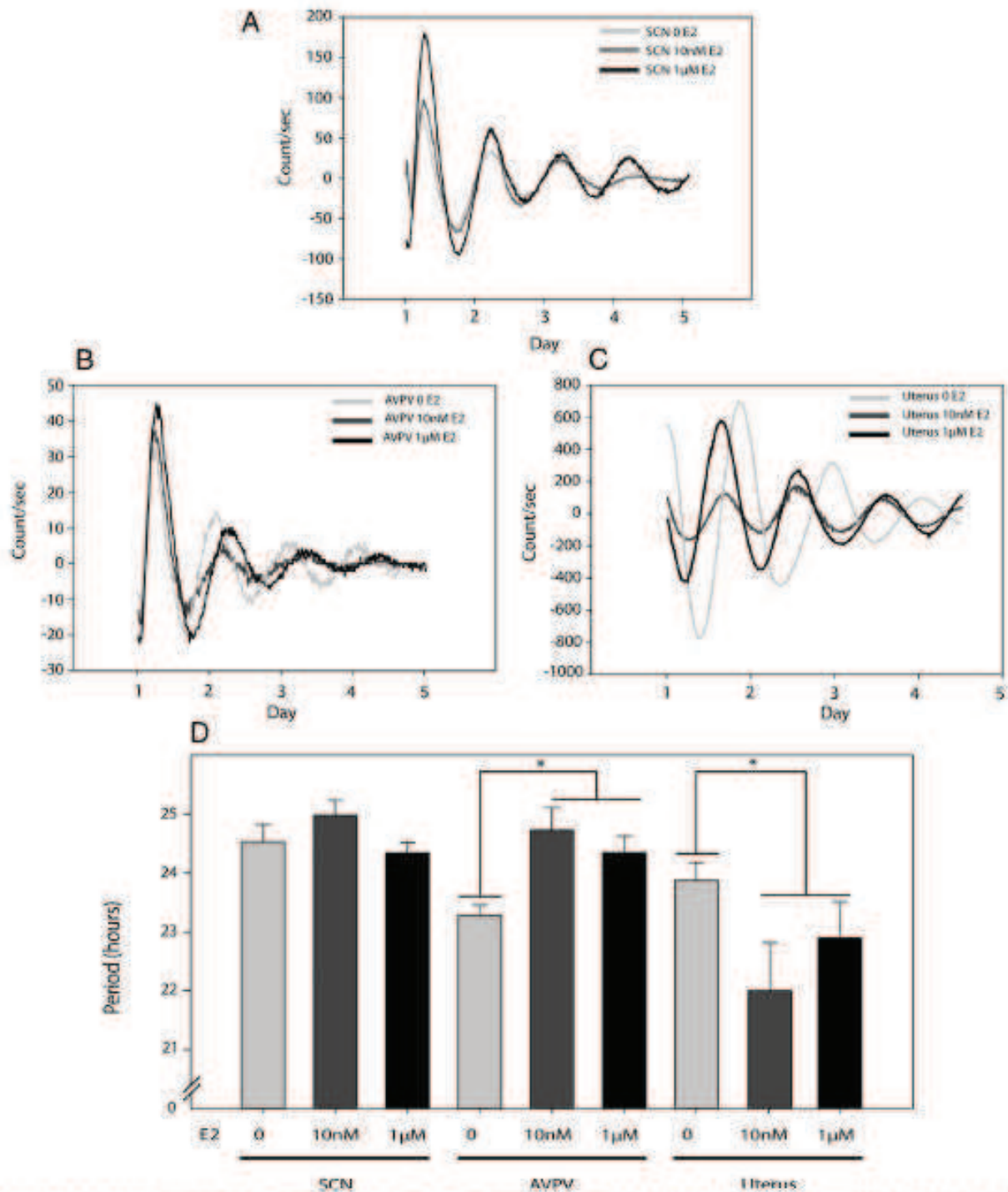


Figure 5. Effect of E2 on the circadian rhythms in PER2-driven bioluminescence from SCN, AVPV, and uterine explants of PER2::LUCIFERASE female mice. A–C, Representative bioluminescence traces of PER2 expression in the SCN (A), AVPV (B), and uterus (C) explants from PER2::LUCIFERASE mice treated with vehicle (β -cyclodextrin, light gray line), 10 nM E2 (dark gray line), or 1 μ M E2 (black line). D, Mean circadian period of SCN, AVPV, and uterus explants from PER2::LUCIFERASE mice treated with vehicle (β -cyclodextrin, light gray bar), 10 nM E2 (dark gray bar), or 1 μ M E2 (black bar). Values are mean \pm SEM of $n = 6$ (vehicle), $n = 3$ (10 nM E2), or $n = 6$ (1 μ M E2). *, Significant difference with $P < .05$ between vehicle- and E2-treated tissue.

Via mRNA in Kp neurons (23) are both increased with higher E2 levels. The mechanisms underlying the time of the day gating of the SCN signal to Kp neurons are still discussed. An earlier study reported that central VP administration in OVX+E2 rats induces an LH surge when infused in the afternoon but not in the morning (43). Additionally, a recent study showed that VP infusion in

OVX+E2 Syrian hamsters at ZT1 or ZT11 displays a similar Kp neuron activation, whereas GnRH neurons were not activated at ZT1 (37). These observations indicate that the circadian control of the reproductive system may occur at more than one place within the reproductive axis.

It is well established that in addition to the master SCN clock, other less robust peripheral circadian oscillators are

located in various central structures and peripheral organs forming a multioscillatory circadian system (44, 45). Of interest, various levels of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis host such circadian oscillators (46) and contribute to the pulsatile hormone release in the pituitary (47). The molecular clockwork of extra-SCN oscillators is similar to that of the master clock; it involves a transcription-based autoregulatory negative feedback loop of interacting clock genes encoding for transcription factors, principally the transcriptional dimer CLOCK-brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1 (BMAL1) and the repressors PER1/PER2 and cryptochrome-1/cryptochrome-2 (45).

In the second part of our study, we examined whether AVPV Kp neurons could host a circadian oscillator that may be involved in the precise timing of LH secretion. We found that most AVPV Kp neurons, but not non-Kp cells, express the clock protein PER1 with a significant daily rhythm. Interestingly, the PER1 rhythm in Kp neurons was phase delayed by 2.8 hours at diestrus as compared with proestrus, indicating that this rhythm in PER1 is E2 sensitive. By contrast, PER1 rhythm in the SCN displayed the same phase and amplitude at both estrous stages, as already reported (48). These findings demonstrate that AVPV Kp neurons express one core clock protein with an E2-sensitive circadian rhythm.

A recent study also reported a circadian expression of *Per1* and *Bmal1* genes in the rat AVPV area (23), but it was not determined whether these clock genes were expressed in Kp neurons. This study also reported no effect of E2 on the rhythmic expression of these clock genes. This difference from our findings may be linked to the fact that only two time points of the circadian cycle were examined in the previous study or because the quantification of the radioactive labeling in the AVPV area was less sensitive than our PER1 labeling locally in Kp neurons. The presence of rhythmic PER1 in a given structure or cell is not sufficient to prove the existence of a circadian oscillator. Indeed, the Kp PER1 rhythm could be driven by direct SCN input as well. To further test the presence of an intrinsic oscillator in the AVPV, we examined the endogenous PER2-driven bioluminescence in Kp containing-AVPV explants from PER2::LUCIFERASE mice. In all female mice AVPV explants examined, we observed sustained autonomous oscillations of luciferase activity up to 4 days, with a period of 23.2 hours, which is 1 hour shorter than the period of SCN explants taken from the same mice. Interestingly, in some other circadian brain structures (eg, olfactory bulb, medial hypothalamus), the endogenous period is also shorter than the SCN (49, 50). Because a fraction of cells in the AVPV explants do not express Kp, we cannot conclude that the AVPV PER2-driven bioluminescence comes

specifically from Kp neurons. Yet this finding combined with the previous demonstration of a daily rhythm in another clockwork protein, PER1, in Kp neurons but not in non-Kp AVPV cells, suggests that the AVPV Kp neurons in mice may host a circadian oscillator. Interestingly, we found that the circadian period of this oscillator is sensitive to E2, being lengthened by about 1 hour in the presence of 1 μ M or 10 nM E2. Because Kp neurons specifically express ER- α receptors (8), this effect of E2 on the AVPV circadian oscillations strengthens our hypothesis of a circadian clock located in the Kp neurons. This action of E2 on the AVPV circadian period is in line with the phase shift observed on the in vivo AVPV PER1 rhythm between proestrus and diestrus. By contrast, E2 displays no effect on the circadian period of SCN explants, as reported previously (22), and is in agreement with the similar patterns of in vivo SCN PER1 rhythms at proestrus and diestrus. As reported previously (22), we found that the uterus also hosts an E2-sensitive circadian clock, although here E2 shortens the circadian period by about 1 hour. The mechanisms through which E2 impacts differently on the period of oscillations in the uterus and AVPV are unknown because both tissues are expressing the same subtype of E2 receptor (51).

Recent studies have indicated that the daily rhythm of AVPV Kp neurons is regulated by the SCN-derived VPerigic input (52). Here, additionally, we provide evidence that AVPV Kp neurons may also host an E2-sensitive circadian oscillator, which might participate in the circadian gating of the LH surge. This finding adds a new circadian component in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis, which has already been reported to display such oscillators in GnRH neurons (53, 54), pituitary gonadotrophs (19, 55), the ovary (20, 56), uterus (22), and oviduct (57). The role of these reproductive circadian oscillators is not yet understood, although they probably represent a potential time-keeping system necessary to appropriately phase daily changes in the sensitivity to upstream signals. This has been established for GnRH neurons, which display a circadian sensitivity to Kp and VIP activation (37, 58). The Kp circadian oscillator could time sensitivity to E2 because ER α gene expression has been reported to be regulated by the BMAL1/CLOCK dimer at specific E-box sites located on its promoter (59). It could also have an impact on *Kiss1* gene expression because a circadian transcriptional factor, albumin D-site binding protein (Dbp), was reported to trigger *Kiss1* transcription via the D-box, and this effect was combined with those of ER α (60). Further experiments, like Kp neuron-specific deletion of clock genes, are now required to establish whether the circadian clock in the AVPV could be involved in the E2-sensitive daily activity of AVPV Kp neurons.

In conclusion, our study demonstrates that the AVPV Kp neuron activity at proestrus involves not only an increase in *Kiss1* synthesis but also a transitory Kp decrease, occurring 2 hours before the LH surge, and that this activation of Kp neurons is absent in diestrus when circulating E2 is low. Furthermore, our study provides evidence for a putative E2-sensitive circadian Kiss-Clock, which may have an important role in the daily control of female reproductive activity.

Acknowledgments

We thank Dominique Ciocca for animal care, Paul Klosen and Dominique Streicher for technical help, Manuel Tena Sempere for LH assays, and Matthew Beymer for English corrections.

Address all correspondence and requests for reprints to: Valérie Simonneaux, PhD, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, 3212, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. E-mail: simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR BLANC-07-0056), the "Region Alsace," and the French Endocrine Society.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*. 2004;14(15):1367–1373.
- Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*. 2010;31(4):544–577.
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1978;202(4368):631–633.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004;145(9):4073–4077.
- de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *Kiss1*-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):10972–10976.
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614–1627.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of *Kiss1* gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005;146(9):3686–3692.
- Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*. 2008;57(2):277–287.
- Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(4):305–311.
- Brown-Grant K, Raisman G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1977;198(1132):279–296.
- Wiegand SJ, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1982;34(6):395–404.
- Palm IF, Van Der Beek EM, Wiegand VM, Buijs RM, Kalsbeek A. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 1999;93(2):659–666.
- Vida B, Deli L, Hrabovszky E, et al. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*. 2010;22(9):1032–1039.
- Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian regulation of *Kiss1* neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2009;150(8):3664–3671.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000;288(5466):682–685.
- Granados-Fuentes D, Tseng A, Herzog ED. A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsiveness. *J Neurosci*. 2006;26(47):12219–12225.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:445–462.
- Bur IM, Zouaoui S, Fontanaud P, et al. The comparison between circadian oscillators in mouse liver and pituitary gland reveals different integration of feeding and light schedules. *PLoS One*. 2010;5(12):e15316.
- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, et al. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*. 2002;22(1):350–356.
- Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gräs S. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*. 2006;147(8):3769–3776.
- Johnson MH, Lim A, Fernando D, Day ML. Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reprod Biomed Online*. 2002;4(2):140–145.
- Nakamura TJ, Sellix MT, Menaker M, Block GD. Estrogen directly modulates circadian rhythms of *PER2* expression in the uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(5):E1025–E1031.
- Smarr BL, Gile JJ, de la Iglesia HO. Oestrogen-independent circadian clock gene expression in the anteroventral periventricular nucleus in female rats: possible role as an integrator for circadian and ovarian signals timing the luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(12):1273–1279.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, et al. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(15):5339–5346.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2001.
- Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, et al. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol*. 2010;22(10):1101–1112.
- Overgaard A, Tena-Sempere M, Franceschini I, Desroziers E, Simonneaux V, Mikkelsen JD. Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic *Kiss1* systems between rats and mice. *Peptides*. 2013;45:85–90.
- Hopman AH, Ramaekers FC, Speel EJ. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(6):771–777.
- Mendoza J, Revel FG, Pevet P, Challet E. Shedding light on circadian clock resetting by dark exposure: differential effects between diurnal and nocturnal rodents. *Eur J Neurosci*. 2007;25(10):3080–3090.
- Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simo-

- neaux V. Differential regulation of kissI expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms*. 2010;25(2):81–91.
31. Bartz-Sprauer J, Klosen P, Crofi P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Photoperiodic co-regulation of kisspeptin, neurokinin B and dynorphin in the hypothalamus of a seasonal rodent. *J Neuroendocrinol*. 2014;26(8):510–520.
 32. Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*. 2009;30(1):26–33.
 33. Grosbellet E, Gourmelin S, Pevet P, Criscuolo F, Challet E. Leptin normalizes photic synchronization in male ob/ob mice, via indirect effects on the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*. 2014;en20141570.
 34. Yamazaki S, Takahashi JS. Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. *Methods Enzymol*. 2005;393:288–301.
 35. Ancel C, Bentsen AH, Sebret M-E, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology*. 2012;153(3):1352–1363.
 36. Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia*. 1979;6(4):305–323.
 37. Williams WP, Jarjisian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the pre-ovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2011;152(2):595–606.
 38. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, et al. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 2007;53(2):367–378.
 39. Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*. 1987;7(6):1626–1638.
 40. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990;247(4945):975–978.
 41. van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol*. 1993;5(2):137–144.
 42. Greer ER, Caldwell JD, Johnson MF, Prange AJ Jr, Pedersen CA. Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Sci*. 1986;38(25):2311–2318.
 43. Palm IF, van der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A. The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. *Brain Res*. 2001;901(1–2):109–116.
 44. Mendoza J, Challet E. Brain clocks: from the suprachiasmatic nuclei to a cerebral network. *Neuroscientist*. 2009;15(5):477–488.
 45. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*. 2012;74(2):246–260.
 46. Sellix MT. Clocks underneath: the role of peripheral clocks in the timing of female reproductive physiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:91.
 47. Bur IM, Cohen-Solal AM, Carmignac D, et al. The circadian clock components CRY1 and CRY2 are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism. *J Biol Chem*. 2009;284(14):9066–9073.
 48. Perrin JS, Segall LA, Harbour VL, Woodside B, Amir S. The expression of the clock protein PER2 in the limbic forebrain is modulated by the estrous cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(14):5591–5596.
 49. Guilding C, Hughes AT, Brown TM, Namvar S, Piggins HD. A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Mol Brain*. 2009;2:28.
 50. Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED. The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 2004;24(3):615–619.
 51. Moutsatsou P, Sekeris CE. Estrogen and progesterone receptors in the endometrium. *Ann NY Acad Sci*. 1997;816:99–115.
 52. Williams WP, Kriegsfeld LJ. Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:60.
 53. Chappell PE, White RS, Mellon PL. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J Neurosci*. 2003;23(35):11202–11213.
 54. Hickok JR, Tischkau SA. In vivo circadian rhythms in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology*. 2010;91(1):110–120.
 55. Shieh K-R. Distribution of the rhythm-related genes rPERIOD1, rPERIOD2, and rCLOCK, in the rat brain. *Neuroscience*. 2003;118(3):831–843.
 56. Karman BN, Tischkau SA. Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. *Biol Reprod*. 2006;75(4):624–632.
 57. Kennaway DJ, Varcoe TJ, Mau VJ. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(9):503–507.
 58. Zhao S, Kriegsfeld LJ. Daily changes in GT1-7 cell sensitivity to GnRH secretagogues that trigger ovulation. *Neuroendocrinology*. 2009;89(4):448–457.
 59. Resuehr D, Wildemann U, Sikes H, Oleese J. E-box regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in immortalized gonadotrope cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;278(1–2):36–43.
 60. Xu Z, Kaga S, Tsubomizu J, et al. Circadian transcriptional factor DBP regulates expression of KissI in the anteroventral periventricular nucleus. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;339(1–2):90–97.

CONCLUSION

Nous allons répondre aux questions posées durant ma thèse :

- **Question 1:** *Les neurones à Kp de l'AVPV sont-ils effectivement la cible d'un message temporel ? Autrement dit, ces neurones présentent-ils une expression journalière de l'ARNm Kiss1 et de son peptide, et ceci en fonction de l'environnement oestrogénique?*

Réponse: Nous avons pu observer que les neurones à Kp de l'AVPV présentent un profil circadien dans l'expression de l'ARNm et du peptide Kp, mais ceci uniquement en proestrus, quand les taux d'E2 sont élevés. En effet, l'immunoréactivité de Kp est constante et élevée en début de jour, puis une baisse drastique se fait à ZT9, pour ensuite remonter à des taux constants identiques au début de jour. Notre hypothèse est que cette baisse de l'immunoréactivité Kp à ZT9 serait à l'origine de la survenue du pic de LH qui se fait deux heures après. La baisse de l'immunoréactivité à ZT9 n'est pas dû à une baisse de la synthèse, car l'expression de *Kiss1* est élevée durant le proestrus. On serait donc dans une optique de libération massive du peptide à ZT9. En diestrus, lorsque l'environnement oestrogénique est faible, les taux de Kp et *Kiss1* sont constants et faibles.

Les neurones à Kp de l'AVPV présentent une expression journalière de l'ARNm et du peptide le jour du proestrus mais celle-ci reste absente durant le diestrus. Les Neurones à Kp de l'AVPV sont donc la cible d'un message temporel pilotant cette rythmicité.

- **Question 2:** *Quelle est l'origine de ce message temporel ? Est-elle intrinsèque aux neurones à Kp ? Autrement dit, les neurones à Kp expriment-ils des protéines horloges avec un rythme journalier ? Le cas échéant, ce rythme est-il sensible à l'E2 circulant ?*

Réponse: Nous avons démontré l'existence d'une protéine horloge PER1 dans les neurones à Kp de l'AVPV, dont l'expression présente un rythme journalier. De plus, nous démontrons que des explants contenant des neurones à Kp présentent des oscillations circadiennes d'un autre gène horloge *Per2* suggérant l'existence d'une horloge circadienne "KissClock" dans les neurones à Kp de l'AVPV.

Les neurones à Kp de l'AVPV présentent une horloge secondaire appelé "KissClock".

- **Question 3:** *Cet horloge secondaire serait-elle influencée par les E2 ?*

Réponse: Nous avons constaté que les E2 modulaient les oscillations journalières de PER1 *in vivo* car la synthèse est différente selon le cycle estrien. De manière *in vitro*, les E2 modulent également les oscillations circadiennes de PER2.

Ces résultats in vivo et in vitro sur deux protéines horloges PER1 et PER2 suggèrent que le fonctionnement de l'horloge secondaire des neurones à Kp de l'AVPV est conditionné par le stade du cycle estrien, autrement dit, par les taux d'E2.

En résumé, mes résultats ont montré que les neurones à Kp de l'AVPV, maillon indispensable pour déclencher la survenue du pic de LH, présentaient une rythmicité journalière de l'ARNm et du peptide seulement durant le stade du proestrus. Au cours de cette rythmicité, la baisse drastique de Kp serait à l'origine de la survenue du pic pré-ovulatoire de LH. Ces variations journalières pourraient être dues à la présence d'une horloge secondaire au sein de ces neurones, en complément de l'action de l'AVP provenant des NSC. Ainsi les neurones à Kp de l'AVPV feraient partie intégrante du système multi-oscillant circadien de l'axe reproducteur (figure 62). La survenue du pic de LH serait alors la résultante d'une convergence de 2 types de messages : un message oestrogénique provenant des gonades reflétant la maturation folliculaire et un message temporel qui pourrait être l'AVP complétant l'action de l'horloge secondaire présente dans les neurones à Kp de l'AVPV.

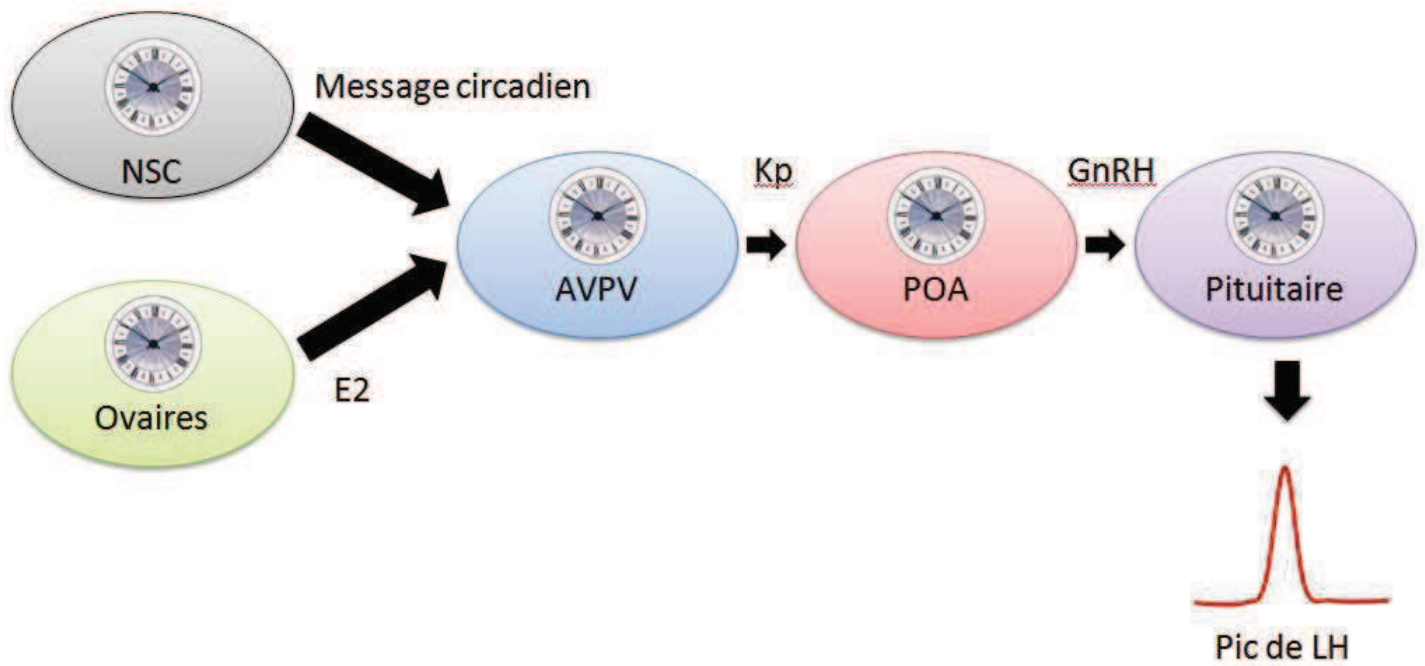


Figure 62: *Un système multi-oscillant pilotant la survenue du pic de LH. Présence d'horloges secondaires à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysaire: neurones à Kp de l'AVPV (aire antéroventrale périventriculaire), POA (aire préoptique), pituitaire et l'ovaire. Ceci accompagné par les NSC (noyaux suprachiasmatiques). E2 = oestrogènes. Ce système multi-oscillant serait à l'origine de la temporalité du pic de LH. (Chassard, non publié)*

DISCUSSION PERSPECTIVES

Rythme journalier de Kisspeptine dans l'AVPV : libération ?

Nous avons pu observer lors des expériences d'immunohistochimie et d'hybridation, une augmentation de la synthèse d'ARNm *Kiss1* (en concordance avec de précédentes expériences) ainsi qu'une diminution importante de l'immunoréactivité de Kp durant la phase de proestrus qui serait à l'origine de la survenue du pic de LH. Tout porte à croire que cette baisse drastique de Kp serait le reflet d'une libération massive du peptide aux terminaisons nerveuses. En effet, la baisse de l'immunoréactivité pourrait être liée soit à :

- une diminution de la synthèse du peptide
- un transport et une libération du peptide
- une dégradation du peptide

C'est avec les résultats de l'hybridation in situ ainsi que le rôle l'AVPV qui est la pierre angulaire du déclenchement du pic pré-ovulatoire du pic de LH, que nous nous orientons vers la deuxième la possibilité. Cependant cette libération du peptide devra être testée pour confirmer cette hypothèse.

L'hypothèse d'une libération massive de Kp à ZT9 reste à confirmer. Elle pourra être testée par l'application d'un antisérum, ou d'un antagoniste spécifique de Kp, peu de temps avant cette hypothétique libération. Il sera possible de mesurer les concentrations de LH à l'aide d'un dosage ELISA. Deux cas de figure peuvent s'inscrire dans cette expérience:

- La survenue du pic de LH est abolie : cela confirmera la libération du peptide à ZT9, du fait du blocage de l'action du peptide sur son récepteur GPR54.
- Il n'y a pas d'abolition du pic de LH : infirme l'hypothèse de la libération massive.

Action de la vasopressine sur le rythme de Kp

Nous savons que l'AVP libérée par les NSC est un important message temporel pour le contrôle de différentes structures cérébrales. Il est important de noter que l'AVP agit sur les neurones à Kp de l'AVPV via des appositions AVPergiques (182). Des injections ICV de l'AVP entraînent une activation cellulaire visualisée par une augmentation de l'expression du gène précoce c-fos (212) . Ceci à n'importe quel moment de la journée où se fait l'injection, mais uniquement lorsque l'environnement oestrogénique est fort. Au contraire, on ne sait pas encore quel est le rôle exact de l'AVP. Elle pourrait avoir un rôle sur:

- la libération du peptide.
- la synthèse du peptide.
- sur la régulation de l'horloge secondaire présent dans les neurones à Kp de l'AVPV.

Pour déterminer l'action exacte de l'AVP sur la survenue du pic de LH via les neurones à Kp de l'AVPV, il sera intéressant d'étudier l'effet d'injection AVPergique sur la synthèse et l'expression de Kp. Pour ce faire, il sera préférable d'administrer un agoniste V1a, ou un antagoniste V1a, à différents moments de la journée et ceci, à différents stades du cycle estrien par la technique d'injection intra-cérébro-ventriculaire [Figure 63](#). Nous pourrons alors définir :

- La possibilité d'avance ou de retard de phase de la survenue du pic de LH.
- L'action sur la synthèse via la technique d'hybridation in situ.
- L'action sur l'expression du peptide via la technique d'immunohistochimie.
- L'intégration différentielle de l'AVP en fonction de l'environnement oestrogénique.

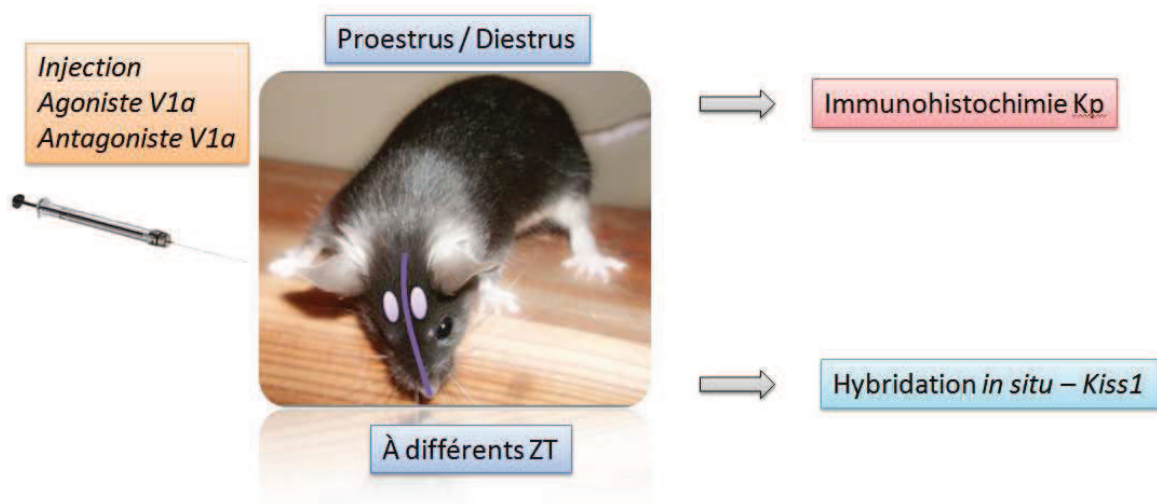


Figure 63: Modélisation de l'expérience d'injection ICV d'agoniste/antagoniste vasopressinergique et sa conséquence sur l'expression de Kp. Ligne violette correspond à la ligne médiane du crane, les deux zone ovoïdes violettes définit la zone d'injection (chassard, non publié)

Action de la vasopressine sur l'horloge secondaire

In vivo

Les NSC ayant un rôle synchroniseur des différents oscillateurs périphériques, il serait primordial de définir l'action de l'AVP sur les rythmes des gènes horloges présents dans les neurones à Kp de l'AVPV (Figure 64). L'étude du rythme journalier des protéines horloges au sein de ces neurones après injection de l'AVP à différents stades du cycle estrien permettra :

- de définir le rôle de l'AVP sur l'expression des protéines horloges dans les neurones à Kp.
- de définir la présence ou non, d'une intégration différentielle en fonction du stade du cycle estrien.

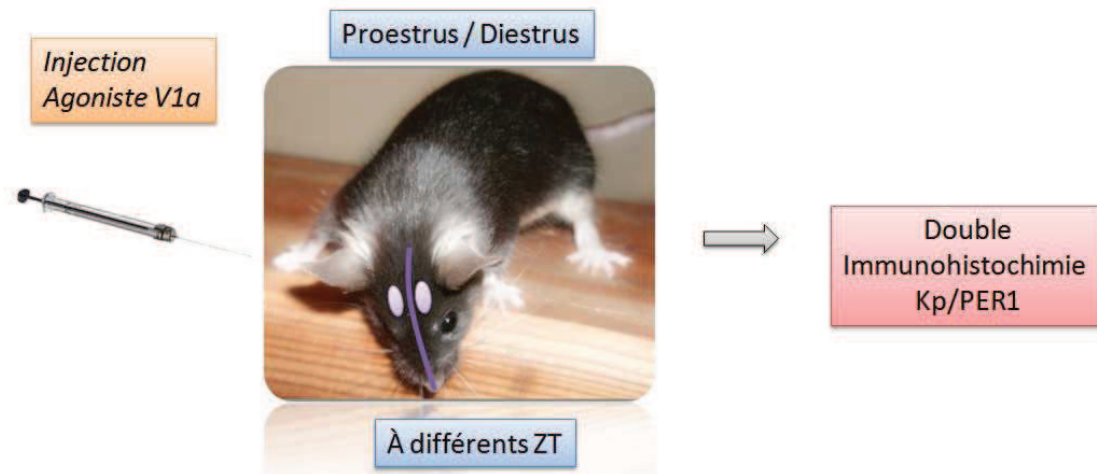


Figure 64: *Modélisation de l'expérience d'injection ICV d'agoniste vasopressinergique et sa conséquence sur l'expression de la protéine horloge PER1 dans les neurones à Kp.* Ligne violette correspond à la ligne médiane du crane, les deux zone ovoïdes violettes définit la zone d'injection (*chassard, non publié*)

In vitro

Une deuxième possibilité est d'utiliser la technique de bioluminescence à partir d'explants d'AVPV de souris PER2::LUCIFERASE. Il sera intéressant de définir le rôle de l'AVP sur les oscillations circadiennes PER2 de l'AVPV. Pour définir son rôle, nous pourrons tester une incubation de l'AVP sur des explants d'AVPV, en fonction de la présence/absence d'E2 [Figure 65](#).

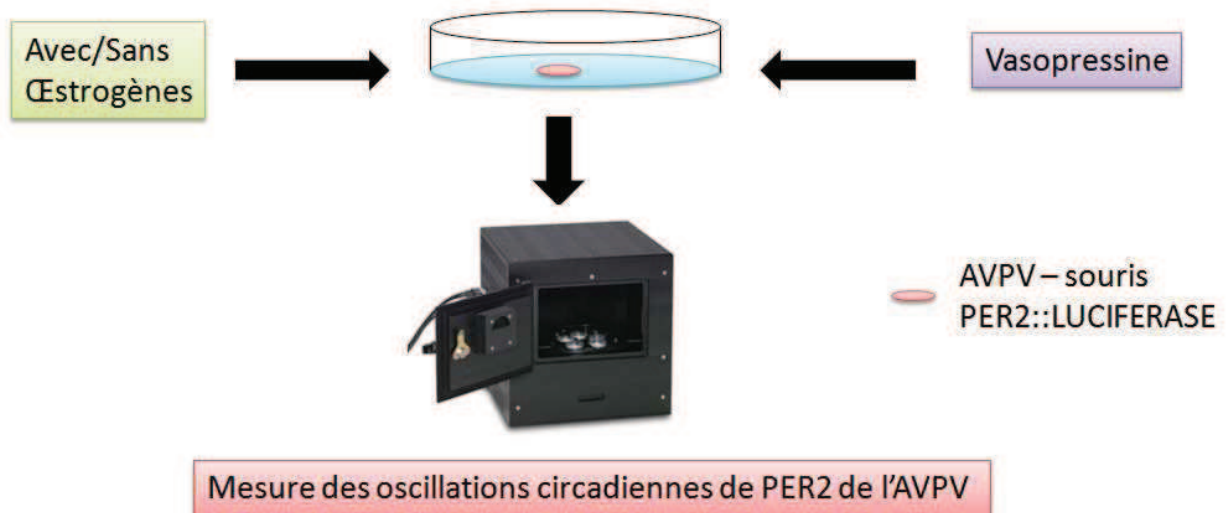


Figure 65: *Modélisation de l'expérience concernant l'effet de la vasopressine sur les oscillations circadiennes de PER2 dans l'aire antéroventrale périventriculaire.* (chassard, non publié)

Notre appareil, le Lumicycle utilise un système statique de culture, permettant uniquement d'appliquer une concentration constante d'AVP et d'E2 sur les explants. Il serait déterminant d'obtenir un système permettant l'application aigüe et temporaire d'agents pharmacologiques. Ceci dans le but d'appliquer des concentrations croissantes et décroissantes d'E2, mimant un cycle estrien, et d'appliquer de manière aigüe l'AVP en concordance avec la libération discontinue de ce neuropeptide par les noyaux suprachiasmatiques [Figure 66](#).

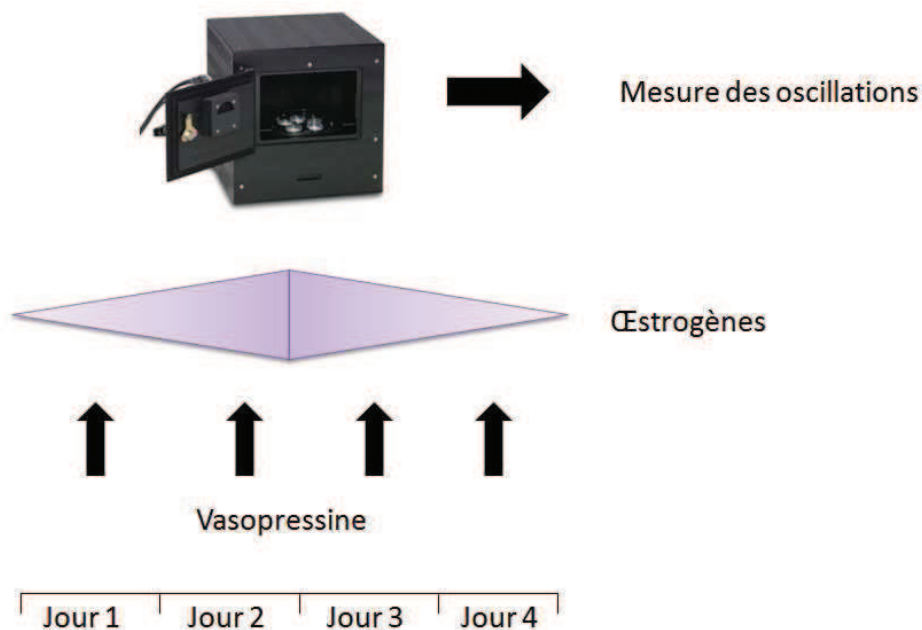


Figure 66: *Modélisation d'un système de flux continu pour le Lumicycle*: permettant de créer des gradients de concentration d'E2, accompagnés d'augmentation aiguë de la concentration en vasopressine. (chassard, non publié)

Action des NSC sur l'horloge secondaire de l'AVPV

D'autres part, une autre expérience possible, serait de prendre un explant de NSC provenant d'une souris WT dont la période endogène aura été définie préalablement par le suivi de l'activité locomotrice de la souris placée en DD et de le placer à côté d'un explant d'AVPV d'une souris PER2::LUCIFERASE, en présence/absence d'E2. Nous pourrions ainsi obtenir des informations concernant l'action des NSC sur l'horloge secondaire Figure 67. Afin de déterminer si c'est bien l'AVP qui est à l'origine de changement dans les oscillations circadiennes de PER2 dans l'AVPV, il pourra être tout à fait envisageable d'appliquer un antagoniste V1a ou antagoniste VIPergique.

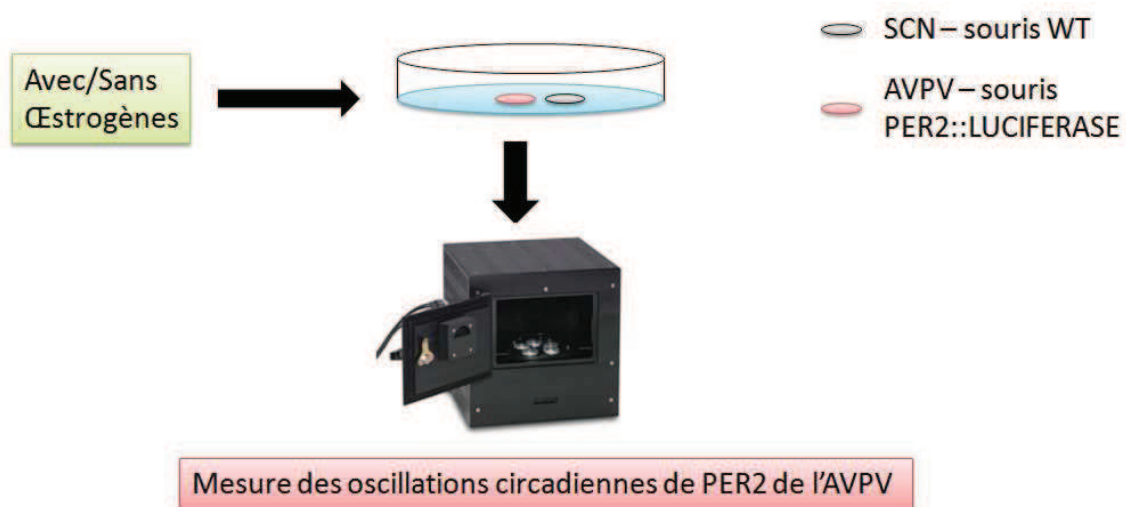


Figure 67: *Modélisation de l'expérience concernant l'effet des noyaux suprachiasmatiques sur les oscillations circadiennes de PER2 dans l'aire antéroventrale périventriculaire*. (chassard, non publié)

Récemment, il a été possible d'introduire des fibres optiques dans certaines régions cérébrales de souris PER2::LUCIFERASES, permettant de visualiser des oscillations

circadiennes chez l'animal vigile, et de voir in vivo les changements occasionnés par la succession des différents stades du cycle estrien.

Rôle de l'horloge secondaire dans les neurones à Kisspeptine de l'AVPV sur la fonction de reproduction

Pour expliquer le profil circadien de l'expression de l'ARNm *Kiss1*, l'implication de l'horloge secondaire pourrait être la clé ouvrant une nouvelle porte concernant la compréhension du rôle de ce dernier dans les neurones à Kp de l'AVPV. La transcription du gène *Kiss1* n'est pas dépendante des protéines horloges *Bmal1/Clock*, mais sous la dépendance d'une autre protéine horloge appelée DBP (213). Ainsi lorsque les taux d'E2 sont importants et que l'expression circadienne de la protéine horloge DBP augmente, une activité transcriptionnelle importante de *Kiss1* se fait. Cependant ces conclusions ont été définies in vitro et non sur un système intégré physiologique.

Pour définir le rôle exact de cette horloge secondaire, il sera possible de croiser des souris KissCre avec des souris "*Bmal1* LoxP". Cela induira l'invalidation d'un gène horloge spécifiquement dans les neurones à Kp [Figure 68](#). On pourra alors déterminer le rôle de cet oscillateur dans la synthèse et/ou la libération du peptide. Il faudra prendre la précaution d'utiliser des souris OVX+E2, permettant de mimer le proestrus. En effet, si l'horloge secondaire présente dans les neurones à Kp de l'ARC touche directement le cycle normal de la pulsativité des neurones à GnRH et ainsi de la maturation folliculaire, nous ne pourrions pas voir le rôle dans les neurones à Kp de l'AVPV, en raison de taux d'E2 trop faibles pour induire un rétrocontrôle positif.

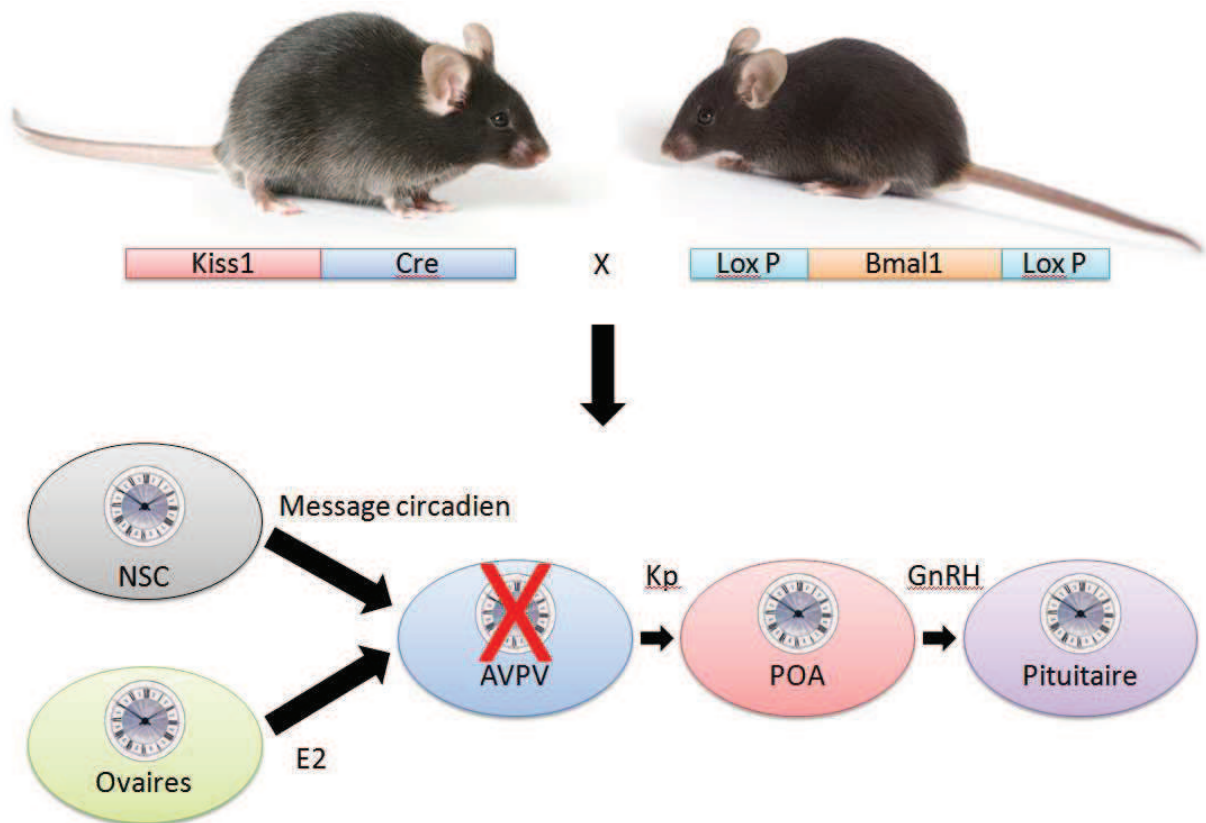


Figure 68: *Modélisation de l'inactivation fonctionnelle de l'oscillateur périphérique présent dans les neurones à Kisspeptine de l'aire antéroventrale périventriculaire. Utilisation de souris Kiss1-Cre et Bmal1-LoxP pour invalider l'horloge secondaire dans les neurones à Kp (chassard, non publié)*

Nous pourrions également tester la fertilité de ces souris en les croisant entre elles et en évaluant leur succès reproducteur, ainsi que l'âge de la puberté.

Les espèces diurnes

Jusqu'à présent nous avons porté nos études sur des souris C57BL/6 qui sont nocturnes, donc définies comme une espèce ayant activité locomotrice durant la nuit. Que se passe-t-il chez les espèces diurne comme chez l'Homme? Nous savons que l'horloge principale, les NSC ont une activité similaire entre les espèces nocturnes et diurnes. Le fonctionnement des gènes horloges est le même avec des profils circadiens identiques. Une synthèse et une

libération des messages temporels similaire cependant certaines sécrétions hormonales sont différentes entre espèces nocturnes et diurnes. Par exemple, le pic de LH a lieu en fin de nuit/début de jour chez la femme. Comment expliquer que le pic de LH arrive toujours en fin de période de repos chez les animaux nocturnes et diurnes alors que le fonctionnement de l'horloge interne est identique ?

Il serait intéressant de définir le profil journalier de l'expression de Kp chez une espèce diurne pour définir si sa cinétique d'expression est identique à celui d'une espèce nocturne. On pourra alors définir si il y a une intégration différentielle de messages temporels entre les deux types d'espèces au niveau des neurones à kp de l'AVPV, ou si le "gating" se fait plus en aval dans l'axe hypothalamo-hypophysaire.



Figure 69: *Arvicanthis Ansorgei*. <http://www.planet-mammiferes.org/>

Pour ce faire, il est possible d'utiliser une espèce rongeur diurne, *Arvicanthis Ansorgei* Figure 69. Il n'est pas techniquement possible de réaliser des frottis vaginaux sur ces animaux, étant vifs et agressifs comparativement aux souris C57BL/6, il faudra récupérer le sang de ces animaux après leur mise à mort ou faire des microprélèvements séquentiels au niveau de la queue, pour définir le profil oestrogénique et à quel moment exactement se fait le pic de LH. Ainsi, on définira deux groupes : environnement oestrogénique fort et faible. Une fois le profil estrien de cette espèce déterminé, une immunohistochimie Kp sur l'AVPV de ces animaux mis à mort à différents points horaires, permettra de définir la présence ou non d'un rythme journalier de Kp. Nous pourrons alors le comparer à celui d'une espèce nocturne pour déterminer si le rythme est identique ou différent.

Le travail posté et les troubles de la fertilité

On sait actuellement que le travail posté ou travail de nuit dérègle l'intégrité fonctionnelle de l'horloge principale, induisant par la même occasion une désynchronisation partielle ou complète des horloges secondaires. Si vous avez déjà voyagé à l'autre bout du monde, et que vous avez subi le jet-lag, imaginez ce qu'endurent les travailleurs postés... on peut assimiler cela à un jet-lag continu. Le rapport médico-social de surveillance des travailleurs de nuit/postés de 2012 dévoile un inquiétant constat. Le travail posté ou de nuit accroît nettement (214):

- les risques cardiovasculaires
- le diabète
- les troubles digestifs
- les troubles de l'attention
- les cancers
- l'anxiété
- la dépression
- les troubles du sommeil
- les troubles métaboliques
- les troubles de la fertilité:
 - cycles menstruels irréguliers
 - endométriose
 - accouchements prématurés
 - retards de croissance intra-utérins
 - fausses couches

Cependant l'effet sur les troubles de la fertilité chez les femmes est beaucoup moins développé. Il est donc nécessaire de faire des études sur des modèles animaux et des analyses épidémiologiques chez des femmes.

Modélisation de travail posté chez des rongeurs

Le travail posté est une situation très complexe à modéliser chez des animaux. Allez demander à l'animal de travailler en horaire décalé ... il vous regardera avec ses grands yeux et vous dira cause toujours...

Cependant il existe 4 modèles pouvant se rapprocher des conditions de travail posté utilisant (215):

- un timing de prise alimentaire,
- d'activité,
- de période de sommeil,
- d'exposition à la lumière,
- ou tout ces paramètres combinés ensemble.

En effet, l'activité des travailleurs postés induit plusieurs changements au niveau:

- Activité locomotrice
- Période de sommeil
- Nutritionnel
- Exposition à la lumière artificielle (de type lampe, néon)
- Exposition à la lumière du soleil

Ces changements peuvent être modélisés par les 4 modèles cités précédemment (Figure 70).

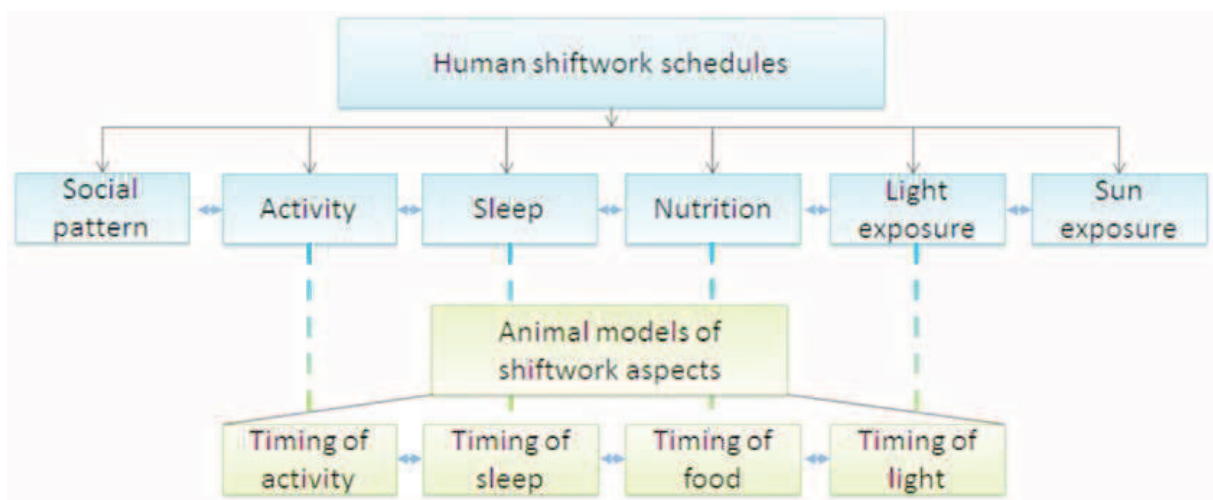


Figure 70: Modélisation du travail posté pour les rongeurs. (215)

Le travail posté se caractérise donc par des changements multiples impactant le fonctionnement du système circadien. Il faudrait alors utiliser un modèle regroupant plusieurs de ces paramètres afin d'étudier leurs conséquences sur la fonction de reproduction chez le rongeur. On pourra alors imaginer un protocole, mettant dans ces conditions ces rongeurs. Cela étudiera l'impact du travail posté sur :

- les cycles estriens, en faisant des frottis vaginaux.
- la survenue du pic de LH, en procédant à des prélèvements sanguins.
- la rythmicité journalière de Kp par hybridation in situ et immunohistochimie.
- la rythmicité des protéines horloges dans les neurones à Kp de l'AVPV, par double immunohistochimie PER1/Kp.

En conclusion, après avoir défini un rythme journalier d'expression de Kp qui serait à l'origine du pic de LH et qui pourrait expliquer ainsi la temporalité de ce pic, plusieurs questions restent en suspens et nécessiteront une investigation plus approfondie. Ceci pour définir le rôle exact de l'horloge secondaire des neurones à Kp, son interaction avec le milieu oestrogénique et l'horloge principale. De manière à intégrer, à comprendre comment et à quel niveau le travail posté peut impacter la physiologie de la reproduction.

BIBLIOGRAPHIE

1. STAPLES RE. Behavioural induction of ovulation in the oestrous rabbit F. *Reprod. Fert* 13, 429-435. 1967.
2. BAKER DEJ. Chapter 7 - Reproduction and Breeding. In: Weisbroth HJBR LH, ed. *The Laboratory Rat*: Academic Press; 153-168 1979.
3. BARTHOLD SW KD. Biology and Diseases of Rats. In : *Laboratory Animal Medicine 1st ed* : Academic Press. ;91-120. 1984.
4. BENNETT JP VB. Rats and Mice. In : HAFEZ ES, editor *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals 1st ed Philadelphia* : Lea and Febiger,299-315. 1970.
5. COLEMANN D.L. DCP, FULLER J.L. Biology of the Laboratory Mouse. *2nd ed New York* : McGraw-Hill Book Company:706 p. 1966
6. CUNLIFFE-BEAMER TL LE. The Laboratory Mouse In : POOLE TB, editor. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. Harlow, UK : Longman Scientific and Technical: 275-295. 1987
7. FOX JG JR. Biology and Diseases of Mice. In : *Laboratory Animal Medicine 1st ed* : Academic Press:31-90. 1984
8. LAROCHE MJ RF. Les animaux de laboratoire, éthique et bonnes pratiques. *1ère éd Paris* : Masson:188 p. 1990
9. MARIE SAINT-DIZIER SC-M. La reproduction animale et humaine. *Editions Quae*. 2014.
10. GAYRARD V. Mémento des critères numériques de reproduction des mammifères domestiques. *Physiologie de la Reproduction Ecole nationale veterinaire Toulouse*. 2005.
11. SILVERMAN AJ, JHAMANDAS J, RENAUD LP. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*.;7(8):2312-2319. 1987
12. SHUPNIK MA. Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*.;7(8):272-276. 1996
13. CHRISTIAN CAM, SUZANNE M. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*.;31(4):544-577. 2010
14. AMOSS M BR, BLACKWELL R, VALE W, FELLOWS R, GUILLEMIN R. Purification, amino acid composition and Nterminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun* 44:205- 210. 1971.

15. MATSUO H BY, NAIR RM, ARIMURA A, SCHALLY AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339. 1971.
16. SILVERMAN A-J LI, WITKIN JW. The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neural systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. *Knobil E ed The Physiology of Reproduction 2nd ed Raven Press, New York, 1994: 1683-1709.* 1994.
17. MERCHENTHALER I GT, SETALO G, PETRUSZ P, FLERKO B. Gonadotropinreleasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res*, 237:15-29. 1984.
18. MIYAMOTO K, HASEGAWA, Y., MINEGISHI, T., NOMURA, M., TAKAHASHI, Y., IGARASHI, M., KANGAWA, K., MATSUO, H. Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 820-7. 1982.
19. MILLAR RP LZ, PAWSON AJ, FLANAGAN CA, MORGAN K, MAUDSLEY SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25:235-275. 2004.
20. NEWTON RPMCL. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues *Nature Reviews Endocrinology* 9, 451-466. 2013.
21. CARATY A DA, PELLETIER J, THIÉRY JC, TILLET Y, BOUCHARD P. Libération pulsatile des gonadotropines, de la prolactine et de la GH. Le contrôle de la pulsativité de LH. In : « La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme. C Thibault, MC Levasseur, ed Ellipse, Chap 4, pages 85-98. 2001.
22. MASON AJ HJ, ZOELLER RT, YOUNG WS 3RD, PHILLIPS HS, NIKOLICS K, SEEBURG PH. deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234:1366-1371. 1986.
23. HSIEH KAM, TF. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropinreleasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol*, 6, 1673-1681. 1992.
24. GROSSE R, SCHMID, A, SCHONEBERG, T, HERRLICH, A, MUHN, P, SCHULTZ, G AND GUDERMANN, T. Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to Gq/11-proteins. *J Biol Chem*, 275, 9193-9200. 2000.
25. NAOR Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(1):10-29.
26. ISLAMI D, CHARDONNENS, D, CAMPANA, A AND BISCHOF, P. Comparison of the effects of GnRH I and GnRH II on hCG synthesis and secretion by first trimester trophoblast. *Mol Hum Reprod*, 7, 3-9. 2001.

27. AZAD N, LAPAGLIA, N, KIRSTEINS, L, UDDIN, S, STEINER, J, WILLIAMS, DW, LAWRENCE, AM AND EMANUELE, NV. Jurkat cell proliferative activity is increased by Luteinizing hormone-releasing hormone. *J Endocrinol*, 153, 241-249. 1997.
28. CHEN A, GANOR, Y, RAHIMIPOUR, S, BEN-AROYA, N, KOCH, Y AND LEVITE, M. The neuropeptides GnRH II and GnRH I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med*, 8, 1421-1426. 2002.
29. ROMANELLI R, BARNI, T, MAGGI, M, LUCONI, M, FAILLI, P, PEZZATINI, A, PELO, E, TORRICELLI, F, CRESCIOLI, C, FERRUZZI, P, SALERNO, R, MARINI, M, ROTELLA, CM AND VANNELLI, GB. Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration. *J Biol Chem*, 279, 117-126. 2004.
30. MORETTI R, MONTAGNANI MARELLI, M, VAN GROENINGHEN, JC AND LIMONTA, P. Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 3791-3797. 2002.
31. CHEN L, SUN, XD, ZHAO, J, YANG, AG AND HUANG, WQ. Distribution, cloning and sequencing of GnRH, its receptor, and effects of gastric acid secretion of GnRH analogue in gastric parietal cells of rats. *Life Sci*, 76, 1351-1365. 2005.
32. CALDANI M, BATAILLER, M., THIERY, J. C., DUBOIS, M. P. LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry* 89, 129-39. 1988.
33. BOEHM U ZZ, BUCK LB. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell*, 123:683-695. 2005.
34. HERBISON A. Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neural Network. In: E Jimmy D Neill, (Ed), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 1415-1482. 2006.
35. GOTTSCH ML CM, SMITH JT, POPA SM, ACOHIDO BV, CROWLEY WF, SEMINARA S, CLIFTON DK, STEINER RA A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077. 2004.
36. TANNENBAUM GS, MARTIN, J. B.,. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 98, 562-70. 1976.
37. IXART G, SZAFARCZYK, A., BELUGOU, J. L., ASSENMACHER, I.,. Temporal relationships between the diurnal rhythm of hypothalamic corticotrophin releasing factor, pituitary corticotrophin and plasma corticosterone in the rat. *J Endocrinol*. 72, 113-20. 1977.

38. BRABANT G PK, RANFT U, BERGMANN P, SCHUERMEYER T, HESCH RD, VON ZUR MÜHLEN A. Circadian and pulsatile TSH secretion under physiological and pathophysiological conditions. *Horm Metab Res Suppl.* 23:12-7. 1990.
39. CHRISTIAN CA, MOBLEY, J. L., MOENTER, S. M., . Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 15682-7. 2005.
40. SARKAR DKC, S. A. FINK, G. SHERWOOD, N. M. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*;264(5585):461-463. 1976
41. CARATY A, GRINO, M., LOCATELLI, A., OLIVER, C. Secretion of corticotropin releasing factor (CRF) and vasopressin (AVP) into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *Biochem Biophys Res Commun.* 155, 841-9. 1988.
42. LEVINE JE, RAMIREZ, V. D. In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology.* 107, 1782-90. 1980.
43. VAN VUGT DA, DIEFENBACH, W. D., ALSTON, E., FERIN, M. Gonadotropin-releasing hormone pulses in third ventricular cerebrospinal fluid of ovariectomized rhesus monkeys: correlation with luteinizing hormone pulses. *Endocrinology.* 117, 1550-8. 1985.
44. SKINNER DC, MALPAUX, B., DELALEU, B., CARATY, A. Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology.* 136, 3230-7. 1995.
45. MOENTER SM, BRAND, R. M., MIDGLEY, A. R., KARSCH, F. J., . Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology.* 130, 503-10. 1992.
46. XIA L VVD, ALSTON EJ, ET AL: . A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131: 2812. 1992.
47. CLARKE IJ, THOMAS, G. B., YAO, B., CUMMINS, J. T. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. . *Neuroendocrinology* 46, 82-8. 1987.
48. MOENTER SM, CARATY, A., KARSCH, F. J., . The estradiol-induced surge of gonadotropinreleasing hormone in the ewe. *Endocrinology.* 127, 1375-84. 1990.
49. MOENTER SM, CARATY, A., LOCATELLI, A., KARSCH, F. J.,. Pattern of gonadotropinreleasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology.* 129, 1175-82. 1991.

50. RL. G. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 2. New York: Raven Press; 659–709. 1994.
51. GUILLEMIN R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol.* 184, 11-28. 2005.
52. COMBARNOUS Y, COLETTE, G., CRÉPIEUX, P., CHOPINEAU, M., COUNIS, R. Les gonadotropines: Structure, fonction, mécanismes d'action. In: M. L. C.Thibaut, (Ed.), *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme* Ellipses INRA, Paris, pp. 108-121. 2001
53. PIERCE JG, PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 50, 465-95. 1981.
54. DALKIN AC HD, ORTOLANO GA, ELLIS TR, MARSHALL JC. . The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*; 125:917–924. 1989.
55. HAISENLEDER DJ DA, ORTOLANO GA, MARSHALL JC, SHUPNIK MA. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: Thompson and Kaiser Page 10 *Mol Cell Endocrinol.* Author manuscript; available in PMC 2015 March 25. NIH-PA Author Manuscript NIH-PA Author Manuscript NIH-PA Author Manuscript evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*; 128:509–517. 1991
56. KAISER UB JA, STEINBERGER A, CHIN WW. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology*; 138:1224–1231. 1997
57. LANDY H BP, MANSFIELD MJ, WHITCOMB RW, SCHNEYER AL, CRAWFORD JD, CRIGLER JF JR. CROWLEY WF JR. . Altered patterns of pituitary secretion and renal excretion of free alpha-subunit during gonadotropin-releasing hormone agonist-induced pituitary desensitization. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991.
58. WEISS J DK, CROWLEY WF JR. . Gonadotropin-releasing hormone-induced stimulation and desensitization of free alpha-subunit secretion mirrors luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology.* 1990.
59. BELCHETZ PE PT, NAKAI Y, KEOGH EJ, KNOBIL E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science.* 202:631–633. 1978.
60. BURGER LL HD, DALKIN AC, MARSHALL JC. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol*;33:559–584. 2004

61. FERRIS HA SM. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod*; 74:993–998. 2006
62. GHARIB SD WM, SHUPNIK MA, CHIN WW. . Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*; 11:177–199. 1990
63. KAISER IRTAUB. GnRH Pulse Frequency-dependent Differential Regulation of LH and FSH Gene Expression *Mol Cell Endocrinol.*; 385(0): 28–35. doi:10.1016/j.mce.2013.09.012. 2014
64. A. S. MCNEILLY¹ JLC, C. TARAGNAT², L. NICOL¹ AND J. R. MCNEILLY¹. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging, *Society for Reproduction and Fertility*. 2003.
65. MARIEB EN. Anatomie et physiologie humaines PEARSON Education 6ème édition. 2005.
66. Physiologie de la Reproduction Ecole nationale veterinaire Toulouse. 2005.
67. MONNIAUX D CA, CLEMENT F, CALBIES-TRAN R, DUPONT J, FABRE S, GERARD N, MERMILLOD P, MONGET P, UZBEKOVA S. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Productions Animales*, 22 (2), 1-18. 2009.
68. DRIANCOURT MA GA, MONNIAUX D, ROYERE D, THIBAUT C. Folliculogenèse et ovulation. In : THIBAUT C, LEVASSEUR MC. La reproduction chez les mammifères et l’homme. Paris, Ellipses, 316-347. 2001.
69. HAWKINS MB, THORNTON, J.W., CREWS, D., SKIPPER, J.K., DOTTE, A. ET THOMAS, P. . Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10751-10756, 2000.
70. MA CH, DONG, K.W. ET YU, K.L. . cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochim Biophys Acta*, 1490, 145-152. 2000.
71. MENUET A, PELLEGRINI, E., ANGLADE, I., BLAISE, O., LAUDET, V., KAH, O. ET PAKDEL, F. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod*, 66, 1881-1892. 2002.
72. ERIC R. PROSSNITZ, 2 JEFFREY B. ARTERBURN,⁴ AND LARRY A. SKLAR^{2,3}. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen *Mol Cell Endocrinol.* 265-266: 138–142. 2008.
73. SHIVERS BD, HARLAN, R. E., MORRELL, J. I. & PFAFF, D. W. . Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*, 304, 345-74:993–998, GNRH1. *Biol Reprod*. 2006.

74. SKINNER DC, CARATY, A. & ALLINGHAM, R. . Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology*, 142, 573-9. 2001.
75. HERBISON AE, SKINNER, D. C., ROBINSON, J. E. & KING, I. S. . Androgen receptor-immunoreactive cells in ram hypothalamus: distribution and co-localization patterns with gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology*, 63, 120-31. 1996.
76. MAKRI A PN, LEMBESSIS P, POLYCHRONAKOS C, KOUTSILIERIS M The kisspeptin(KISS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev* 34:682-692. 2008.
77. NAVENOT JM WZ, CHOPIN M, FUJII N, PEIPER SC. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer Res* 65:10450-10456. 2005.
78. DE ROUX N GE, CAREL JC, MATSUDA F, CHAUSSAIN JL, MILGROM E Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10972-10976. 2003.
79. SEMINARA SB MS, CHATZIDAKI EE, THRESHER RR, ACIERNO JS, JR., SHAGOURY JK, BO-ABBAS Y, KUOHUNG W, SCHWINOF KM, HENDRICK AG, ZAHN D, DIXON J, KAISER UB, SLAUGENHAUPT SA, GUSELLA JF, O'RAHILLY S, CARLTON MB, CROWLEY WF, JR., APARICIO SA, COLLEDGE WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627. 2003.
80. FUNES S HJ, VASSILEVA G, MARKOWITZ L, ABBONDANZO S, GOLOVKO A, YANG S, MONSMA FJ, GUSTAFSON EL. The Kiss-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357-1363. 2003.
81. D'ANGLEMONT DE TASSIGNY X FL, DIXON JP, DAY K, LEITCH HG, HENDRICK AG, ZAHN D, FRANCESCHINI I, CARATY A, CARLTON MB, APAR ICIO SA, COL LEDGE WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10714-10719. 2007.
82. LAPATTO R PJ, ZHANG D, CHAN YM, MAHAN A, CERRATO F, LE WW, HOFFMAN GE, SEMINARA SBARRA, C. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* 148:4927-4936. 2007.
83. KOTANI M DM, VANDENBOGAERDE A, COMMUNI D, VANDERWINDEN JM, LE POUL E, BREZILLON S, TYLDESLEY R, SUAREZ-HUERTA N, VANDEPUT F, BLANPAIN C, SCHIFFMANN SN, VASSART G, PARMENTIER M. . 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. 2001.

84. MUIR AI CL, ELSHOUBAGY NA, MICHALOVICH D, MOORE DJ, CALAMARI A, SZEKERES PG, SARAU HM, CHAMBERS JK, MURDOCK P, STEPLEWSKI K, SHABON U, MILLER JE, MIDDLETON SE, DARKER JG, LARMINIE CG, WILSON S, BERGSMA DJ, EMSON P, FAULL R, PHILPOTT KL, HARRISON DC. AXOR12, . a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276: 28969–28975. 2001.
85. OHTAKI T SY, 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, FUJINO M. . Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411: 613–617. 2001.
86. BILBAN M G-TN, HINTERMANN E, BAUER S, MOLZER S, ZORATTI C, MALLI R, SHARABI A, HIDEN U, GRAIER W, KNOFLER M, ANDREAE F, WAGNER O, QUARANTA V, DESOYE G. . Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* 117: 1319–1328. 2004.
87. LEONOR PINILLA EA, CARLOS DIEGUEZ, ROBERT P. MILLAR, MANUEL TENA-SEMPERE. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms *Physiological Reviews* Published Vol. 92 no. 3, 1235-1316 DOI: 10.1152/physrev.00037.2010. 2012.
88. SMITH JT CM, RISSMAN EF, CLIFTON DK, STEINER RA Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686-3692. 2005a.
89. SMITH JT PS, CLIFTON DK, HOFFMAN GE, STEINER RAAS, M. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating thepreovulatory luteinizing hormone surge. *JNeurosci* 26:6687-6694. 2005b.
90. REVEL FG SM, MASSON-PEVET M, PEVET P, MIKKELSEN JD, SIMONNEAUX V Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16:1730-1735. 2006.
91. MASON AO GT, SCOTTI MA, LEVINE J, FROMMEYER S, KETTERSON ED, DEMAS GE, KRIEGSFELD LJ Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. *Horm Behav* 52:492-498. 2007.
92. CLARKSON J HA. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147: 5817–5825. 2006.
93. KAUFFMAN AS GM, ROA J, BYQUIST AC, CROWN A, CLIFTON DK, HOFFMAN GE, STEINER RA, TENA-SEMPERE M. . Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148: 1774–1783. 2007.

94. CHRISTIAN CA MS. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 31: 544–577. 2010.
95. ALEXANDER S. KAUFFMAN VMN, JOSHUA KIM, DONALD K. CLIFTON, ROBERT A. STEINER. Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* Published Vol. 297 no. 5, E1212-E1221 DOI: 10.1152/ajpendo.00461.2009. 2009.
96. LEE DK NT, O'NEILL GP, CHENG R, LIU Y, HOWARD AD, COULOMBE N, TAN CP, TANG-NGUYEN AT, GEORGE SR, O'DOWD BF Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107. 1999.
97. HORIKOSHI Y MH, TAKATSU Y, OHTAKI T, KITADA C, USUKI S, FUJINO M. 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. 2003.
98. JANNEAU JL M-EJ, TACHDJIAN G, MIRAN I, MOTTE N, SAULNIER P, SABOURIN JC, COTE JF, SIMON B, FRYDMAN R, CHAOUAT G, BELLET D. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5336-5339. 2002.
99. TERAO Y KS, TAKATSU Y, HATTORI M, NISHIMURA A, OHTAKI T, SHINTANI Y. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta* 1678:102-110. 2004.
100. FARINA A SA, PURWOSUNU Y, RIZZO N, BANZOLA I, CONCU M, MORANO D, GIOMMI F, BEVINI M, MABROOK M, CARINCI P, OKAI T. Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls. *Prenat Diagn* 26:1115-1120. 2006.
101. HIDEN U BM, KNOFLER M, DESOYE G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord* 8:31-39. 2007.
102. NAVARRO VM F-FR, CASTELLANO JM, ROA J, MAYEN A, BARREIRO ML, GAYTAN F, AGUILAR E, PINILLA L, DIEGUEZ C, TENA- SEMPERE M Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 561:379-386. 2004.
103. HAN SK GM, LEE KJ, POPA SM, SMITH JT, JAKAWICH SK, CLIFTON DK, STEINER RA, HERBI SON AE Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349-11356. 2005.
104. IRWIG MS FG, SMITH JT, ACOHIDO BV, POPA SM, CUNNINGHAM MJ, GOTTSCH ML, CLIFTON DK, STEINER RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264-272. 2004.

105. MESSENGER S CE, MA D, HENDRICK AG, ZAHN D, DIXON J, THRESHER RR, MALINGE I, LOMET D, CARLTON MB, COLLEDGE WH, CARATY A, APARICIO SA. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1761-1766. 2005.
106. KINOSHITA M TH, ADACHI S, MATSUI H, UENOYAMA Y, IWATA K, YAMADA S, INOUE K, OHTAKI T, MATSUMOTO H, MAEDA K. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146:4431-4436. 2005.
107. CLARKSON J HA. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons . *Endocrinology* 147:5817-5825. 2006.
108. NAVARRO VM CJ, FERNANDEZ-FERNANDEZ R, BARREIRO ML, ROA J, SANCHEZ-CRIADO JE, AGUILAR E, DIEGUEZ C, PINILLA L, TENA- SEMPERE M. 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. 2004a.
109. PINEDA R G-GD, ROSEWEIR A, ROMERO M, SANCHEZ-GARRIDO MA, RUIZ-PINO F, MORGAN K, PINILLA L, MILLAR RP, TENA-SEMPERE M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151:722-730. 2010.
110. ROBERTSON JL CD, DE LA IGLESIA HO, STEINER RA, KAUFFMAN AS Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150:3664-3671. 2009.
111. SMITH JT PS, CLIFTON DK, HOFFMAN GE, STEINER RA Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26:6687-6694. 2006b.
112. CLARKSON JDADT, XAVIER MORENO, ADRIANA SANTOS COLLEDGE, WILLIAM H HERBISON, ALLAN E. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci.*;28(35):8691-8697. 2008
113. GOTTSCH ML NV, ZHAO Z, GLIDEWELL-KENNE C, WEISS J, JAMESON JL, CLIFTON DK, LEVINE JE, STEINER RA. Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci* 29:9390-9395. 2009.
114. WINTERMANTEL TM CR, PORTEOUS R, BOCK D, GRONE HJ, TODMAN MG, KORACH KS, GREINER E, PEREZ CA, SCHUTZ G, HERBISON AE. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52:271-280. 2006.

115. D'ANGLEMONT DE TASSIGNY X FL, CARLTON MB, COLLEDGE WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerveterminals. *Endocrinology* 149:3926-3932. 2008.
116. RAMASWAMY S GK, GIBBS RB, PLANT TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149:4387-4395. 2008.
117. KEEN KL WF, BLOOM SR, GHATEI MA, TERASAWA E. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalkmedian eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 149:4151-4157. 2008.
118. GOODMAN RL LM, SMITH JT, COOLEN LM, DE OLIVEIRA CV, JAFARZADEHSHIRAZI MR, PEREIRA A, IQBAL J, CARATY A, CIOFI P, CLARKE IJ Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752-5760. 2007.
119. ROMETO AM KS, VOYTKO ML, RANCE NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2744-2750. 2007.
120. NAVARRO VM GM, CHAVKIN C, OKAMURA H, CLIFTON DK, STEINER RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859-11866. 2009.
121. WAKABAYASHI Y NT, MURATA K, OHKURA S, MOGI K, NAVARRO VM, CLIFTON DK, MORI Y, TSUKAMURA H, MAEDA K, STEINER RA, OKAMURA H Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30:3124-3132. 2010.
122. OHKURA S TK, MATSUYAMA S, MOGI K, ICHIMARU T, WAKABAYASHI Y, UENOYAMA Y, MORI Y, STEINER RA, TSUKAMURA H, MAEDA KI, OKAMURA H. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 21:813-821. 2009.
123. D'ORTOUS DE MAIRAN J-J. Observation botanique. In *Histoire de l'Académie Royale des Sciences*, pp. 35–36. 1729.
124. JOHNSON M. Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white footed mice (*Peromyscus*). *J Exp Zool.* 82, 315-328. 1939.
125. ASCHOFF J. Circadian Rhythms in Man: A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. *Science* 148, 1427–1432. 1965.

126. HALBERG F, HALBERG, E., BARNUM, C.P., AND BITTNER, J.J. Physiologic 24-hour Periodicity in Human Beings and Mice, the Lighting Regimen and Daily Routine. In *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, (Washington, D.C.), pp. 803–878. 1959.
127. DIBNER C, SCHIBLER, U., AND ALBRECHT, U. . The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 517–549. 2010.
128. ASCHOFF J. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 41, 49–56. 1954.
129. TAKAHASHI JS, HONG, H.-K., KO, C.H., AND MCDEARMON, E.L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775. 2008.
130. PANDA S, HOGENESCH, J. B., KAY, S. A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature.* 417, 329-35. 2002.
131. GEKAKIS N, STAKNIS, D., NGUYEN, H. B., DAVIS, F. C., WILSBACHER, L. D., KING, D. P., TAKAHASHI, J. S., WEITZ, C. J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 280, 1564-9. 1998.
132. HOGENESCH JB, GU, Y. Z., JAIN, S., BRADFIELD, C. A., . The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 5474-9. 1998.
133. KUME K, ZYLKA, M. J., SRIRAM, S., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., JIN, X., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H., REPPERT, S. M. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 98, 193-205. 1999.
134. SHEARMAN LP, SRIRAM, S., WEAVER, D. R., MAYWOOD, E. S., CHAVES, I., ZHENG, B., KUME, K., LEE, C. C., VAN DER HORST, G. T., HASTINGS, M. H., REPPERT, S. M. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science.* 288, 1013-9. 2000.
135. MORSE D, AND SASSONE-CORSI, P. Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci.* 25, 632–637. 2002.
136. PREITNER N, DAMIOLA, F., LOPEZ-MOLINA, L., ZAKANY, J., DUBOULE, D., ALBRECHT, U., SCHIBLER, U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell.* 110, 251-60. 2002.

137. TRIQUENEUX G, THENOT, S., KAKIZAWA, T., ANTOCH, M. P., SAFI, R., TAKAHASHI, J. S., DELAUNAY, F., LAUDET, V.,. The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol.* 33, 585-608. 2004.
138. GUILLAUMOND F, DARDENTE, H., GIGUERE, V., CERMAKIAN, N. . Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms.* 20, 391- 403. 2005.
139. ALBRECHT U, SUN, Z.S., EICHELE, G., AND LEE, C.C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* 91, 1055–1064. 1997.
140. SHEARMAN LP, ZYLKA, M.J., WEAVER, D.R., KOLAKOWSKI, L.F., JR, AND REPPERT, S.M. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261–1269. 1997.
141. GAU D, LEMBERGER, T., VON GALL, C., KRETZ, O., LE MINH, N., GASS, P., SCHMID, W., SCHIBLER, U., KORF, H.W., AND SCHÜTZ, G. Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34, 245–253. 2002.
142. GINTY DD, KORNHAUSER, J.M., THOMPSON, M.A., BADING, H., MAYO, K.E., TAKAHASHI, J.S., AND GREENBERG, M.E. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 260, 238–241. 1993.
143. TRAVNICKOVA-BENDOVA Z, CERMAKIAN, N., REPPERT, S.M., AND SASSONE-CORSI, P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7728–7733. 2002.
144. JIN X, SHEARMAN, L.P., WEAVER, D.R., ZYLKA, M.J., DE VRIES, G.J., AND REPPERT, S.M. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57–68. 1999.
145. LOPEZ-MOLINA L, CONQUET, F., DUBOIS-DAUPHIN, M., AND SCHIBLER, U. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* 16, 6762–6771. 1997.
146. ABRAHAMSON EE MR. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172-191. 2001.
147. MOORE RY SJ. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150:112-116. 1993.
148. MOORE RY SJ, LEAK RK. . Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309:89-98. 2002.
149. KRIEGSFELD LJ, SILVER, R. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Horm Behav.* 49, 557-74. 2006.

150. WELSH DK LD, MEISTER M, REPPERT SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14:697-706. 1995.
151. DARDENTE H, AND CERMAKIAN, N. How many pieces to build a circadian clock?. *Médecine Sci. MS* 21, 66–72. 2005.
152. MOORE RY, AND EICHLER, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201–206. 1972.
153. STEPHAN FK, AND ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1583–1586. 1972.
154. RALPH MR, FOSTER, R.G., DAVIS, F.C., AND MENAKER, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978. 1990.
155. GREEN DJ, AND GILLETTE, R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245, 198–200. 1982.
156. GROOS G, AND HENDRIKS, J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34, 283–288. 1982.
157. HERZOG ED, TAKAHASHI, J.S., AND BLOCK, G.D. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 708–713. 1998.
158. HONMA S, NAKAMURA, W., SHIRAKAWA, T., AND HONMA, K. Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci. Lett.* 358, 173–176. 2004.
159. GRANADOS-FUENTES D, AND HERZOG, E.D. The clock shop: coupled circadian oscillators. *Exp. Neurol.* 243, 21–27. 2013.
160. YAN L, TAKEKIDA, S., SHIGEYOSHI, Y., AND OKAMURA, H. Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* 94, 141–150. 1999.
161. WELSH DK, TAKAHASHI, J.S., AND KAY, S.A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577. 2010.
162. HICKEY TL, SPEAR, P.D. Retinogeniculate projections in hooded and albino rats. *Exp. Brain Res.* 24, 523–529. 1976.
163. ANDREW C LIU WGLSAK. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets *Nature Chemical Biology* 3, 630 - 639 (2007) Published online: doi:10.1038/nchembio.2007.37. 2007.

164. LEAK RK MR. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 433:312-334. 2001.
165. KALSBECK A BR. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309:109-118. 2002.
166. HAKIM H DA, SILVER R. Circadian locomotor rhythms, but not photoperiodic responses, survive surgical isolation of the SCN in hamsters. *J Biol Rhythms* 6:97-113. 1991.
167. MEYER-BERNSTEIN EL JA, MATSUMOTO SI, MARKUNS JF, LEHMAN MN, BITTMAN EL (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140:207-218. 1999.
168. TAKAHASHI HMAJS. Central circadian control of female reproductive function *Front. Endocrinol.* <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2013.00195>. 2014.
169. PITTENDRIGH CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25, 159–184. 1960.
170. ABRAHAM U, PRIOR, J.L., GRANADOS-FUENTES, D., PIWNICA-WORMS, D.R., AND HERZOG, E.D. Independent circadian oscillations of *Period1* in specific brain areas in vivo and in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 8620–8626. 2005.
171. STRATMANN M, AND SCHIBLER, U. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J. Biol. Rhythms* 21, 494–506. 2006.
172. LAMIA KA, STORCH, K.-F., AND WEITZ, C.J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15172–15177. 2008.
173. YOO SH, YAMAZAKI, S., LOWREY, P. L., SHIMOMURA, K., KO, C. H., BUHR, E. D., SIEPKA, S. M., HONG, H. K., OH, W. J., YOO, O. J., MENAKER, M., AND TAKAHASHI, J. S. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5339-5346. 2004.
174. CAMILLE SAINI1 SABACD. Human peripheral clocks: applications for studying circadian phenotypes in physiology and pathophysiology *Front. Neurol.*, <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2015.00095>. 2015.
175. ROBIN M. VOIGT PDCBF, PH.D.; AND ALI KESHAVARZIAN, M.D. Circadian Disruption: Potential Implications in Inflammatory and Metabolic Diseases Associated With Alcohol *Alcohol Research: Current Reviews*, Volume 35, Issue Number 1. 2013.
176. BROWN-GRANT KR, G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proceedings of the Royal*

Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain), 198(1132), pp.279–96. . 1977.

177. WIEGAND SJE. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology*, 31(2), pp.147–57. 1980.
178. MILLER BHO, SUSAN LOSEE TUREK, FRED W LEVINE, JON E HORTON, TERESA H TAKAHASHI, JOSEPH S. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*. 2004;14(15):1367-1373.
179. PILORZ VS, S. Low reproductive success in Per1 and Per2 mutant mouse females due to accelerated ageing? *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(4), pp.559–68. 2008.
180. VAN DER BEEK EMEA. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *The Journal of comparative neurology*, 384(4), pp.569–79. . 1997.
181. HORVATH TL, CELA, V. & VAN DER BEEK, E.M. Gender-specific apposition between vasoactive intestinal peptide-containing axons and gonadotrophin-releasing hormone-producing neurons in the rat. *Brain research*, 795(1-2), pp.277–81. 1998.
182. VIDA BD, L HRABOVSKY, E KALAMATIANOS, T CARATY, A COEN, C W LIPOSITS, Z KALLÓ, I. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*.22(9):1032-1039. 2010
183. SMARR BLG, J J DE LA IGLESIA, H O. Oestrogen-independent circadian clock gene expression in the anteroventral periventricular nucleus in female rats: possible role as an integrator for circadian and ovarian signals timing the luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol*.25(12):1273-1279. 2013
184. PIET REA. Estrogen permits vasopressin signaling in preoptic kisspeptin neurons in the female mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(17), pp.6881–92. 2015.
185. FUNABASHI TEA. Intracerebroventricular injection of arginine-vasopressin V1 receptor antagonist attenuates the surge of luteinizing hormone and prolactin secretion in proestrous rats. *Neuroscience letters*, 260(1), pp.37–40. 1999.
186. PALM IFVDB, E M WIEGANT, V M BUIJS, R M KALSBECK, A. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*.93(2):659-666. 1999
187. FUNABASHI TEA. Gonadotropin-releasing hormone exhibits circadian rhythm in phase with arginine-vasopressin in co-cultures of the female rat preoptic area and suprachiasmatic nucleus. *Journal of neuroendocrinology*, 12(6), pp.521–8. 2000.

188. VAN DER BEEK EM, SWARTS, H.J. & WIEGANT, V.M. Central administration of antiserum to vasoactive intestinal peptide delays and reduces luteinizing hormone and prolactin surges in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology*, 69(4), pp.227–37. 1999.
189. SUN YEA. Intracerebroventricular infusion of vasoactive intestinal Peptide rescues the luteinizing hormone surge in middle-aged female rats. *Frontiers in endocrinology*, 3, p.24. 2012.
190. CHRISTIAN CAM, S.M. Critical roles for fast synaptic transmission in mediating estradiol negative and positive feedback in the neural control of ovulation. *Endocrinology*, 149(11), pp.5500–8. 2008.
191. CHAPPELL PE, WHITE, R.S. & MELLON, P.L. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(35), pp.11202–13. 2003.
192. ZHAO SK, L.J. Daily changes in GT1-7 cell sensitivity to GnRH secretagogues that trigger ovulation. *Neuroendocrinology*, 89(4), pp.448–57. 2009.
193. CHRISTIAN CAM, S.M. Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(8), pp.1913–21. 2007.
194. ABE MEA. Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), pp.350–6. 2002.
195. YOO S-HEA. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), pp.5339–46. 2004.
196. BUR IEA. The comparison between circadian oscillators in mouse liver and pituitary gland reveals different integration of feeding and light schedules. *PloS one*, 5(12), p.e15316. 2010.
197. CHU AEA. Global but not gonadotrope-specific disruption of *Bmal1* abolishes the luteinizing hormone surge without affecting ovulation. *Endocrinology*, 154(8), pp.2924–35. 2013.
198. RESUEHR DEA. E-box regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in immortalized gonadotrope cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 278(1-2), pp.36–43. 2007.

199. OLCESE J, SIKES, H.E. & RESUEHR, D. Induction of PER1 mRNA expression in immortalized gonadotropes by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of protein kinase C and MAP kinase signaling. *Chronobiology international*, 23(1-2), pp.143–50. 2006.
200. FAHRENKRUG JEA, 2006. . Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary. *Endocrinology*, 147(8), pp.3769–76.
201. KARMAN BNT, S.A. Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*, 75(4), pp.624–32. 2006.
202. YOSHIKAWA TEA. Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology*, 150(9), pp.4338–47. 2009.
203. SELLIX MT. Clocks underneath: the role of peripheral clocks in the timing of female reproductive physiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:91.
204. CHEN HEA. Downregulation of core clock gene Bmal1 attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 304(12), pp.C1131–40. 2013.
205. SELLIX MT YT, MENAKER M. . A circadian egg timer gates ovulation. *Curr Biol* 20:R266–7 10.1016/j.cub.2010.01.045. 2010.
206. JOHNSON MHEA. Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reproductive biomedicine online*, 4(2), pp.140–5. 2002.
207. KENNAWAY DJ, VARCOE, T.J. & MAU, V.J.,. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular human reproduction*, 9(9), pp.503–7. . 2003.
208. NAKAMURA TJEA. Estrogen directly modulates circadian rhythms of PER2 expression in the uterus. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(5), pp.E1025–31. 2008.
209. RATAJCZAK CK, BOEHLE, K.L. & MUGLIA, L.J. Impaired steroidogenesis and implantation failure in Bmal1^{-/-} mice. *Endocrinology*, 150(4), pp.1879–85. 2009.
210. ZHAO H, DOYLE, T.C., COQUOZ, O., KALISH, F., RICE, B.W., AND CONTAG, C.H. . Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. *J. Biomed. Opt.* 10, 41210. 2005.
211. MARIO H. VARGASA, IRASEMA RODRÍGUEZ-GODÍNEZB, JESÚS ARIAS-GÓMEZCD, M. ELENA Y. FURUYAA. Circadian Variability of Pulse Oximetry in Healthy Children Under the Age of 7 *Arch Bronconeumol* ;48:202-6. - Vol. 48 Num.06 DOI: 10.1016/j.arbr.2012.02.003. 2012.

- 212.** WILLIAMS WPJ, STEPHAN G MIKKELSEN, JENS D KRIEGSFELD, LANCE J. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*.;152(2):595-606. 2011
- 213.** XU ZK, S. TSUBOMIZU, J. FUJISAKI, J. MOCHIDUKI, A. SAKAI, T. TSUKAMURA, H. MAEDA, K. INOUE, K. ADACHI, A. A. Circadian transcriptional factor DBP regulates expression of Kiss1 in the anteroventral periventricular nucleus. *Mol Cell Endocrinol.*;339(1-2):90-97. 2011
- 214.** TRAVAIL SFDMD. Surveillance médico-professionnelle des travailleurs postés et/ou de nuit. 2012.
- 215.** ANNE-LOES OPPERHUIZEN^{1†} LWMVK, KARIN I. PROPER³, WENDY RODENBURG² AND ANDRIES KALSBEK^{1,4*}. Rodent models to study the metabolic effects of shiftwork in humans *Front. Pharmacol.* <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00050>. 2015.

Implication du système circadien dans la fonction de reproduction chez la souris femelle

Résumé

Les neurones à Kisspeptine (Kp) de l'AVPV sont essentiels pour la survenue du pic de LH. Celle-ci est conditionnée par les concentrations circulantes d'oestrogènes (E2) et le moment du jour. Nous avons étudié si les neurones à Kp de l'AVPV étaient le lieu d'intégration de deux messages chez des souris sauvages intactes : un message E2, et un message temporel. Nous voulions savoir si ces neurones hébergeaient une horloge secondaire impliquée dans la temporalité du pic de LH. Durant l'après-midi du proestrus, une baisse drastique de l'immunoréactivité (ir) de Kp apparaît 2h avant la survenue du pic de LH au moment où l'expression de l'ARNm *Kiss1* est élevée. Au contraire durant le diestrus, Kp-ir, l'expression de l'ARNm *Kiss1* et les concentrations circulantes de LH restent basses. Les neurones à Kp de l'AVPV expriment une protéine horloge PER1 avec un rythme journalier exhibant un retard de phase de 2.8 h en diestrus comparativement au proestrus. Des explants d'AVPV exprimant les Kp provenant de souris PER2::LUCIFERASE dévoilent des oscillations circadiennes soutenues avec une période de 23.2h, significativement plus courte que celle observée dans les NSC. L'incubation des explants d'AVPV en présence d'E2 (10nM) rallonge la période d'une heure. En conclusion, cette étude indique que les neurones à Kp de l'AVPV présentent un rythme journalier dépendant des E2, qui pourrait être piloté par la présence d'une horloge secondaire au sein de ces neurones.

Mots-clés : Circadien, Clock, Kisspeptine, Reproduction

Abstract

The kisspeptin (Kp) neurons in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) are essential for the preovulatory LH surge, which is gated by circulating estradiol (E2) and the time of day. We investigated whether AVPV Kp neurons in intact female mice may be the site in which both E2 and daily signals are integrated and whether these neurons may host a circadian oscillator involved in the timed LH surge. In the afternoon of proestrous day, Kp immunoreactivity displayed a marked and transient decrease 2 hours before the LH surge. In contrast, Kp content was stable throughout the day of diestrus, when LH levels are constantly low. AVPV Kp neurons expressed the clock protein period 1 (PER1) with a daily rhythm that is phase delayed compared with the PER1 rhythm measured in the main clock of the suprachiasmatic nuclei (SCN). PER1 rhythm in the AVPV, but not in the SCN, exhibited a significant phase delay of 2.8 hours in diestrus as compared with proestrus. Isolated Kp-expressing AVPV explants from PER2::LUCIFERASE mice displayed sustained circadian oscillations of bioluminescence with a circadian period (23.2 h) significantly shorter than that of SCN explants (24.5 h). Furthermore, in AVPV explants incubated with E2 (10 nM to 1 μ M), the circadian period was lengthened by 1 hour, whereas the SCN clock remained unaltered. In conclusion, these findings indicate that AVPV Kp neurons display an E2-dependent daily rhythm, which may possibly be driven by an intrinsic circadian clock acting in combination with the SCN timing signal.

Mots-clés : Circadian, Clock, Kisspeptin, Reproduction