



HAL
open science

Régulation saisonnière et rôles des neuropeptides Kisspeptine et RFRP-3 dans l'homéostasie énergétique chez la gerboise (*Jaculus orientalis*)

Rajae Talbi

► **To cite this version:**

Rajae Talbi. Régulation saisonnière et rôles des neuropeptides Kisspeptine et RFRP-3 dans l'homéostasie énergétique chez la gerboise (*Jaculus orientalis*). Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc), 2016. Français. NNT : 2016STRAJ061 . tel-01562220

HAL Id: tel-01562220

<https://theses.hal.science/tel-01562220>

Submitted on 13 Jul 2017

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN

ABDELLAH



ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives
CNRS UPR 3212

THÈSE EN COTUTELLE présentée par :
Rajae TALBI

Soutenue le : **26 Septembre 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Et
Docteur de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Régulation saisonnière et rôles des neuropeptides
Kisspeptine et RFRP-3 dans l'homéostasie énergétique
chez la gerboise (*Jaculus orientalis*)**

THÈSE dirigée par :

Mme Valérie Simonneaux
Mme Seloua El Ouezzani

Docteur, Université de Strasbourg
Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès

RAPPORTEURS :

Mr Hugues Dardente
Mme Nouria Lakhdar-Ghazal

Docteur, Université de Tours
Professeur, Université Mohamed V de Rabat

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Rabia Magoul
Mr Khalid El Allali
Mr Andries Kalsbeek
Mr François Gauer

Professeur, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès
Professeur, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat
Professeur, Université d'Amsterdam
Professeur, Université de Strasbourg

You see, Daddy?

Your little girl has become stronger ... and she is now a Doctor

I Miss You...

**Each time we conquer a step there will always be another
challenge waiting. It's a long road .. It never ends.
As "scientists" this is our journey**

H.S

Cette thèse a été préparée en cotutelle entre l'Université de Strasbourg en France, à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives «INCI», et l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès au Maroc, au Laboratoire de Neuroendocrinologie et Environnement Nutritionnel et Climatique «LANENC», Sous la co-direction du Dr. Valérie Simonneaux et du Pr. Seloua El Ouezzani.

Elle a été financièrement supportée par le Groupement de recherche international Franco-Marocain de Neurosciences Fondamentales et Cliniques “**GDRI Neurosciences**”, **Nœuromed**, **PICS (CNRST-Maroc / CNRS-France) Volubilis # 5631**, l'**ANR Repramide : 13-BSV1-0001** et la bourse doctorale du **Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Formation des cadres du Maroc**.

PUBLICATIONS :

Janati A, **Talbi R**, Klosen P, Mikkelsen J. D, Magoul R, Simonneaux V, and El Ouezzani S. (2013) Distribution and seasonal variation in hypothalamic RF-amide peptides in a semi-desert rodent, the jerboa. *J Neuroendocrinol.* 25, 402–411. doi: 10.1111/jne.12015.

Talbi R, Klosen P, Laran-Chich M. P, El Ouezzani S, and Simonneaux V. (2016) Coordinated seasonal regulation of metabolic and reproductive hypothalamic peptides in the desert jerboa. *J. Comp. Neurol.* doi: 10.1002/cne.24026.

Talbi R, Laran-chich MP, Magoul R, EL Ouezzani S, Simonneaux V. (2016) Kisspeptin and RFRP-3 display differential metabolic effects in the female jerboa. *Sci. Rep.* 6, 36057. doi:10.1038/srep36057.

Les publications figurent dans la partie « Annexe »

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS ORALES :

Talbi R. RFRP-3 and Kisspeptin as new regulators of energy balance: lessons from the seasons. Symposium title : Clocks and photoperiod in seasonality. Topic: Neurobiology of rhythms. 12th International meeting of the Society of Neuroscientists of Africa, March 26-30, 2015, Durban, South Africa.

Talbi R. RFRP-3 and Kisspeptin as new regulators of energy balance: lessons from the desert Jerboa (*Jaculus orientalis*). Doctoral School Day of the University of Strasbourg, February 26-27, 2015, Strasbourg, France.

Talbi R. Kisspeptin in the hypothalamus of the jerboa and its involvement in the mechanisms controlling energy balance and reproduction. 44th congress of the SFC “Société Francophone de Chronobiologie”, October, 29-31, 2014, Paris, France.

Talbi R. Kisspeptin and its involvement in the energy balance regulation. Annual conference of the Society of Neuroendocrinology, September 29-30, 2014, Paris, France.

Talbi R. Kisspeptin in the hypothalamus of the jerboa: possible role in the mechanisms controlling energy balance and reproduction. IBRO/ARC Specialized Course on Neurobiology of Adaptations to Environments: Focus on African Biotopes, June 18-24, 2014, Dakhla, Morocco.

Talbi R. Kisspeptin in the hypothalamus of the jerboa: possible role in the mechanisms controlling energy balance. Doctoral School Day of the University of Strasbourg, February 19, 2014, Strasbourg, France.

Talbi R. The involvement of kisspeptin in the the Energy Expenditure. FENS-IBRO Supported School 2013 “Summer School in neuroendocrinology, July 27- August 2, 2013, Prato, Italy.

Talbi R. Kisspeptin: a potential role in the mechanisms controlling energy balance? Final Neuromed meeting, May 2-3, 2013, Marseille, France.

Talbi R. RF-amide neuropeptides in the hypothalamus of the jerboa and their functional roles. Scientific conference at the University of Sidi Mohamed Ben Abdellah of Fes, March 14, 2013, Fes, Morocco.

Talbi R. Seasonal plasticity of RF-amide peptides in the hypothalamus of the jerboa. Annual meeting of GDRI School of Fundamental and Clinical Neurosciences, May 14-15, 2012, Marseille, France.

POSTERS :

Talbi R, Laran-chich MP, Magoul R, EL Ouezzani S, Simonneaux V. Kisspeptin and RFRP-3 display differential metabolic effects in the female jerboa. The 41th Conference of the Society of Neuroendocrinology (SNE), October 2016, Corte, France. (Abstract accepted).

Talbi R, Klosen P, Laran-chich MP, El Ouezzani S, Simonneaux V. Kisspeptin in the hypothalamus of the jerboa and its involvement in the mechanisms controlling energy balance and reproduction. The 39th Symposium of the Society of Neuroendocrinology “SNE”, September 2013, Fez, Morocco.

Talbi R, Klosen P, Laran-chich MP, El Ouezzani S, Simonneaux V. Kisspeptin and its involvement in the mechanisms controlling reproduction and energy balance in Jerboa. The 13th Congress of the European Biological Rhythms Society, EBRS, August 2013, Munich, Germany.

Talbi R, Klosen P, Laran-chich MP, El Ouezzani S, Simonneaux V. Kisspeptin and its involvement in the energy balance neuroendocrine networks in Jerboa. FENS-IBRO Supported School 2013 “Summer School in neuroendocrinology”, July 2013, Prato, Italy.

Talbi R, Klosen P, Laran-chich MP, El Ouezzani S, Simonneaux V. Kisspeptin and energy balance in Jerboa. The 11th International Conference of the Society of Neuroscientists of Africa “SONA”, June 2013, Rabat, Morocco.

Talbi R, Janati A, Klosen P, Laran-chich MP, El Ouezzani S, Simonneaux V. Seasonal plasticity of RF-amide peptides in the hypothalamus of the jerboa and their

functional roles in the integration of environmental factors. The Doctorial of the University of Sidi Mohamed Ben Abdellah, February 2013, Fes, Morocco.

ECOLEES :

Neurobiology of Adaptations to Environments course: Focus on African Biotopes. Dakhla- Maroc (Juin 2014). Organisé par IBRO/ARC.

Summer School in Neuroendocrinology, Prato- Italie (Juillet- Aout 2013). Organisé par FENS-IBRO.

Liste non exhaustive

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier chaleureusement mes deux directrices de thèse, **Pr. Seloua El Ouezzani** et **Dr. Valérie Simonneaux**.

Merci infiniment **Pr. El Ouezzani**, ma réussite actuelle est sans doute le fruit de votre intervention. C'est en m'accueillant au sein de votre équipe et me prenant sous vos ailes que vous avez permis l'évolution de mes études à un niveau avancé. Vous m'avez guidé dans mes tout premiers pas de chercheur et je vous en serai toujours reconnaissante. Je vous remercie énormément de m'avoir formé, de m'avoir fait profiter de votre savoir et de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Travailler sous votre supervision était un réel honneur pour moi. Vos remarques constructives, votre rigueur scientifique et votre soutien m'ont permis de bien mener cette thèse. Je tiens à vous en faire part de l'expression de ma réelle gratitude. Sans votre expérience, cette thèse n'aurait certainement pas eu la même tonalité.

Valérie, je te remercie vivement de m'avoir encadré et soutenu depuis 5 ans maintenant. Tu m'as guidé dans mes premiers pas de chercheur et je te dois beaucoup de ce que je suis aujourd'hui. J'ai énormément appris à tes côtés. Ton enthousiasme, ton dynamisme, ton expertise et ton soutien de tous les jours, surtout dans les périodes difficiles m'ont permis de surpasser plusieurs obstacles. Je te remercie surtout pour tes encouragements sans faille et de m'avoir donné ma liberté dans mon projet de thèse tout en étant présente pour me guider et m'encourager. J'ai eu un vrai plaisir de travailler sous ta supervision. Sans toi, rien n'aurait été pareil.

Ensuite, je tiens à exprimer tout mon respect à l'égard des membres de Jury de ma thèse qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie d'abord le **Pr. Nouria Lakhdar-Ghazal**, qui me fait l'honneur de juger mon travail et d'être la présidente du jury. Mes sincères remerciements s'adressent ensuite aux **Pr. Rabia Magoul**, **Dr. Hugues Dardente** et **Pr. Khalid El Allali** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail de thèse et pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de le juger en qualité de rapporteurs.

De même, je suis très heureuse de compter parmi les membres de mon jury le **Dr. Patrick Vuillez** qui a aimablement accepté d'examiner mon travail de thèse.

And finally... in Shakespeare's language, I am deeply grateful to **Dr. Andries Kalsbeek** for having kindly accepted to evaluate this PhD work.

Un grand merci au **Dr. Paul Klosen** pour son aide inestimable et ses vastes connaissances dont il nous fait part constamment. Merci Paul de m'avoir appris une bonne partie des techniques que je maîtrise aujourd'hui.

Marie-pierre, que puis-je dire ? Je te remercie infiniment pour ton aide précieuse surtout avec les techniques d'ISH. Tu m'as été d'un grand secours. Mais au-delà des aspects scientifiques tu as su m'écouter, m'encourager et me soutenir dans tous les moments de cette thèse. Merci beaucoup à toi !

Un grand merci aussi à **Dominique Streicher** d'avoir toujours été d'un grand secours, aussi bien au labo qu'ailleurs, à **Béatrice Bothorel et André Malan** qui m'ont beaucoup accompagné pour l'aspect analyses et statistiques de mes travaux de thèse, à **Denis Wagner** pour sa disponibilité et ses aides précieuses avec mon ordinateur qui n'a jamais cessé de tomber en panne et à **Eléa Fessler** pour son aide considérable avec quelques unes de mes manip.

Merci beaucoup à **Paul et Mireille Pevet** pour toutes les discussions scientifiques et les moments partagés au laboratoire et autour des dîners sympas qu'on a eu l'occasion de partager. Vous étiez toujours là pour croire en moi. Vos conseils précieux m'ont été d'une grande utilité et je les garderai là où je vais.

I also need to thank some friends and colleagues without whom this outcome would not have been possible for many reasons. To my two best friends **Jo** (My Danish blondy queen and my partner in crimes xD), and **Cristina** (My Spanish beautiful friend and my partner in investigations xD). Thank you for making this experience so beautiful, your friendship has been a great motivation. You were always here when things went wrong, and also when things were just great. I owe you a lot and without you my thesis would not have been the same.

Sebastien, Fernando, David, Thibault and **Math**, thanks for all the great moments in and outside the lab. **Thibault**, thank you for being my doctor from time to time xD **Fernando** I will definitely miss your smile. And you **Seb**, thank

you for all the crazy moments, I have never thought meeting someone as crazy as I am xD. I will definitely miss you ALL guys ☺.

Puis un clin d'œil particulier à toi **Cathy, Adrien, Julien, Félix, Hanan, Ouafa, Tounes, Ibtissam, Pawan, Satish, Rosana, Marion, Célia, Edith et Stephanie Monecke**. Merci beaucoup pour votre amitié, je vous souhaite une réussite brillante.

Et aux membres du laboratoire marocain, je tiens à remercier spécialement le **Pr. Magoul** et le **Pr. Alaoui** à qui j'exprime ma gratitude et mon profond respect pour leurs qualités humaines, leur temps et leur gentillesse de tous les jours. Je remercie également tous les collègues du laboratoire, les anciens et les nouveaux, et j'envoie un clin d'œil particulier à **Fatima Zohra El Yamani, Abdel karim Janati** et **Fatima Tribak** pour leur gentillesse et leurs disponibilités.

Parce qu'il y a une vie en dehors du laboratoire, je remercie chaleureusement ma chère **Amina**, tu as été le témoin de mes plus grands coups de blues et de mes plus grands fous rires, et ce depuis toujours. Merci d'être toujours là « Mina », avec toute la bonté et la bonne humer qu'on puisse imaginer. Je te souhaite le meilleur du monde.

Je remercie également mes amis **Sadik, Ouafae, Houda, Khadija et Latifa Gragui** pour leur bonté, amabilité, compréhension et leur bonne humeur.

A tous mes chers(es) amis(es) d'ici et d'ailleurs que j'ai omis de citer et qui se reconnaîtront un par un, je vous remercie infiniment pour votre affection, soutien et encouragements sans faille. Et a tous les membres de ma famille, merci pour TOUT.

A vous tous, Merci de rendre ma vie si agréable. Vous avez tous une place spéciale dans mon cœur.

Je dédie ce travail ...

À la mémoire de mon cher papa « My one and only hero », dont le souvenir éclaire mon cœur. J'aurai tant aimé que tu sois avec moi. Tu me manques tant. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi papa. Tu as été pour moi le plus grand symbole

d'amour et de dévouement qui ont ni cessé ni diminué. Je te dédie ce travail en témoignage de mon grand amour que je n'ai su exprimer avec les mots. Que ce travail soit l'expression de ton éternel présence dans mon cœur.

Et toi ma très chère maman, que puis-je te dire ! Affable, honorable et aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence et la source de tendresse. Tu n'as jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi, et tu m'as appris à me battre jusqu'au bout pour réussir. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

A Redouane et Soukaina, les mots ne suffiront pas pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous mes très chers. **Douane**, merci pour ton amour, ton soutien et ton cœur bienveillant ...

Et toi **Kina**, tu as été mon ange gardien dans les moments les plus délicats, et tu l'es toujours. Ta présence dans ma vie ne cesse d'illuminer mon cœur. N'oublie jamais que tu es et tu resteras la prunelle de mes yeux.

Une pensée particulière à **papa Denys** ... Celui qui m'est le père spirituel. Avec sa bonne humeur, ses conseils, son soutien il a toujours su m'encourager et me remonter le moral. Nul mot ne saurait exprimer à sa juste valeur la profonde estime et l'immense gratitude que je porte envers toi papa Denys. Je te dédie mon travail en témoignage de mon amour.

Last but not least ☺ Une dédicace particulière ... Très particulière à une personne qui m'est très très chère ; à ma sœur de cœur et ma meilleure amie ; à toi **ma Safa chérie**. Tu es le plus beau des cadeaux que la vie m'a offerte. C'est grâce à toi que j'ai pu tenir le coup dans les moments les plus difficiles. Au gré de tous les hauts et les bas tu étais mes yeux quand je ne pouvais plus y voir clair et mon cerveau quand je ne pouvais plus réfléchir correctement. Tu es ma source de motivation et je te dois tout cela. Tu étais là pendant la thèse et tu resteras là pour toute la vie et toute l'éternité, main dans la main jusqu'au bout et coûte que coûte. **Dr. Safa Bouabid**, je te souhaite pleins de réussite et de bonne chance pour la suite, qui s'annonce déjà belle :=)

RÉSUMÉ DE THÈSE

Vivre sur terre implique l'existence de changements saisonniers de photopériode, de température et de ressources alimentaires. Il est donc nécessaire que les espèces vivantes adaptent leurs fonctions biologiques à ces changements saisonniers afin de survivre lorsque les conditions de vie deviennent difficiles. Chez les mammifères saisonniers, la lecture du temps annuel se fait via la production nocturne de la mélatonine, une hormone produite par la glande pinéale exclusivement pendant la nuit. Le changement photopériodique de la production de mélatonine synchronise de nombreuses fonctions physiologiques avec les saisons, telles que la reproduction et le métabolisme. Les mécanismes neuronaux régulant ces deux fonctions doivent être corrélés de façon à ce qu'elles soient synchronisées avec les saisons et l'une avec l'autre afin d'assurer la survie des individus et la perpétuité de l'espèce. La gerboise *Jaculus orientalis* est un rongeur saisonnier chez lequel les activités de la reproduction et du métabolisme sont synchronisées avec les variations saisonnières de la photopériode qui sont contrôlées en partie par la mélatonine. Au printemps, quand les conditions environnementales sont favorables, la gerboise devient sexuellement active ; elle présente une augmentation de la taille des gonades et des taux circulants de stéroïdes sexuels corrélée avec une augmentation de peptides régulant la reproduction, notamment le GnRH. En parallèle avec ces changements, la gerboise présente une diminution de son poids corporel. Au contraire en automne, quand les conditions environnementales deviennent défavorables, la gerboise inhibe son axe reproducteur, augmente son poids corporel et se prépare ainsi à l'hibernation.

Notre équipe s'intéresse particulièrement à deux neuropeptides RF-amides récemment découverts et considérés comme des pivots du contrôle central de l'axe gonadotrope, et dont l'expression est modulée par la photopériode chez les rongeurs saisonniers, il s'agit de Kisspeptine (Kp) et de l'Arg-Phe-related peptide-3 (RFRP-3). Les Kp, localisés dans le noyau arqué et le noyau anteroventral périventriculaire sont toujours de puissants stimulateurs de l'axe reproducteur tandis que l'action de RFRP-3, localisé dans le noyau dorso-ventro médian, est dépendante des espèces et du sexe et est parfois activatrice, et parfois inhibitrice. Depuis leur découverte, l'implication de ces deux peptides dans la régulation de la fonction de la reproduction saisonnière a été clairement établie chez plusieurs espèces, cependant leur implication dans la régulation saisonnière du métabolisme constitue toujours un grand point d'interrogation.

Mon travail de thèse, réalisé en cotutelle entre l'Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès au Maroc et l'Université de Strasbourg en France, a ciblé l'étude de l'implication de Kp et de RFRP-3 dans la régulation saisonnière de la balance énergétique chez la gerboise et s'est articulé autour de deux grands axes principaux.

Le premier objectif de mon projet de thèse avait pour but d'effectuer une analyse comparative de la régulation saisonnière de gènes codant pour Kp et RFRP-3 en tant que deux régulateurs pivots de l'activité de la reproduction, et de la POMC, le NPY et la somatostatine, tous connus pour réguler la balance énergétique notamment la prise alimentaire. Par hybridation *in situ* non-radioactive, l'intensité de marquage et le nombre de neurones exprimant l'ARNm du *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* ont été analysés dans le noyau arqué, tandis que l'expression de l'ARNm du *Rfrp* a été analysée dans le DMH/VMH chez des gerboises mâles capturées de leur propre biotope et sacrifiées au printemps et en automne. En parallèle nous avons évalué les variations saisonnières de l'activité gonadique de la gerboise et de la prise alimentaire, afin de corrélérer ces variations à celles des neuropeptides hypothalamiques régulant ces deux axes. De façon remarquable, nous avons observé qu'au printemps il y a une activation gonadique, attestée par une augmentation du poids testiculaire et des taux circulants de la testostérone, ceci a été corrélé avec une augmentation générale de l'expression des gènes codants pour le RFRP-3 au niveau du DMH/VMH, et le Kp, la POMC et la somatostatine au niveau de l'ARC pendant cette saison de l'activité sexuelle des animaux. Cependant, nous avons trouvé que la prise alimentaire présente des variations opposées par rapport à celles du statut reproducteur, avec une augmentation en automne et une diminution au printemps. L'augmentation de la synthèse de Kp et de RFRP-3 chez les animaux sexuellement actifs du printemps est en accord avec l'activation gonadique de la gerboise trouvée pendant cette saison ainsi qu'avec l'effet stimulateur connu de ces peptides sur l'axe reproducteur, et vient en complément d'une première étude réalisée dans notre laboratoire par une approche immunohistochimique et publiée dans le Journal of Neuroendocrinology (**Janati, et al., 2013**), et dans laquelle nous avons trouvé que les cellules immunoréactives de Kp et de RFRP-3 présentent des variations saisonnières avec une augmentation importante au printemps comparée à l'automne. L'augmentation au printemps de la synthèse de la POMC et de la somatostatine, tous les deux anorexigènes, est en accord avec la diminution du poids corporel et de la prise alimentaire observée chez

cet animal pendant cette période. La synthèse du NPY, ne présente pas de variations saisonnières significatives, ce qui peut être dû au fait que ce peptide peut être impliqué à la fois dans la régulation de la reproduction et de la prise alimentaire. L'ensemble des résultats de cette première partie a fait l'objet d'un article publié dans *le Journal of Comparative Neurology* (Talbi et al., 2016).

Le deuxième axe de mes travaux de recherche a ciblé l'implication de Kp et de RFRP-3 dans la régulation saisonnière de la balance énergétique, notamment la prise alimentaire et les sites d'action hypothalamiques sous-jacents par lesquels ces deux peptides pourraient exercer leur effet. Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une injection intra-cérébro-ventriculaire de Kp10 (la forme la plus courte du peptide, 4 µg) sur la prise alimentaire des gerboises. Nos études préliminaires ont montré que le Kp n'avait pas d'effet sur la prise alimentaire de gerboises nourries *ad-libitum*. En se basant sur des travaux récents montrant la sensibilité du système Kisspeptinergique à une balance énergétique négative, les gerboises ont été privées de nourriture pendant 48 heures avant l'injection du Kp ou du solvant (NaCl) et leur prise alimentaire a été mesurée 1h, 2h, 3h, 5h et 24h après l'injection. Cette expérience a été faite chez des gerboises mâles et femelles pendant les deux saisons de printemps et d'automne. Nos résultats montrent qu'une injection centrale de Kp inhibe la prise alimentaire pendant les 5h qui suivent l'injection chez les gerboises femelles de printemps mais pas chez les gerboises d'automne, sous les mêmes conditions expérimentales. Au contraire, Kp n'a aucun effet sur la prise alimentaire chez les gerboises mâles de printemps ou d'automne. Ces résultats sont très importants car ils montrent un effet inédit du Kp sur la prise alimentaire et suggèrent que cet effet dépend des saisons, du sexe et de l'état de la balance énergétique de l'animal.

Pour comprendre les mécanismes neuronaux qui sous-tendent cet effet inhibiteur saisonnier du Kp sur la prise alimentaire, nous avons renouvelé les injections du peptide chez des gerboises mâles et femelles d'automne et de printemps que nous avons sacrifié 1h30 après pour analyser l'expression des gènes codant les neuropeptides POMC, NPY et RFRP-3 par hybridation *in situ* non-radioactive. Nous avons observé que l'injection centrale du Kp10 augmente l'activité de l'axe reproducteur, attesté par l'expression de c-FOS dans le noyau préoptique médian où sont localisés les neurones à GnRH et par

l'augmentation des taux circulants de testostérone, confirmant ainsi que la gerboise répond de façon attendue à cette dose centrale de Kp10. Chez la gerboise mâle, aucun effet du Kp n'a été observé sur l'expression de la POMC et des RFRP-3 ni au printemps ni en automne. Cependant, un effet saison-dépendant sur le gène codant pour le NPY a été observé, une augmentation de l'expression de ce peptide a été observée au printemps mais pas en automne. Chez la gerboise femelle, l'injection icv de Kp10 augmente l'expression génique de la POMC aussi bien au printemps qu'en automne avec un effet plus important au printemps, mais n'a aucun effet sur l'expression du gène codant pour le NPY. Ces effets étant similaires pendant les deux saisons, ne peuvent pas expliquer l'effet saison-dépendant du Kp sur la prise alimentaire entre le printemps et l'automne. De façon très intéressante, le Kp exerce un effet saison-dépendant sur l'expression du gène *Rfrp* en inhibant son expression au printemps, alors qu'il n'exerce aucun effet sur ce peptide en automne. Cet effet corrélé du Kp sur la prise alimentaire et sur l'expression du RFRP-3 uniquement au printemps suggère que le Kp pourrait réguler la prise alimentaire en partie par l'intermédiaire du RFRP-3 chez la gerboise femelle.

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un effet du RFRP-3 sur la prise alimentaire chez les gerboises femelles et nous avons évalué l'effet de l'injection centrale des RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes qui la régule en amont, notamment les gènes codant la POMC et le NPY chez la gerboise femelle nourrie *ad-libitum*. De façon intéressante, nous avons observé que le RFRP-3 (injecté en icv à une dose de 5 µg) a un effet stimulateur puissant sur la prise alimentaire dès la première heure et jusqu'à 24h après l'injection, sans aucune différence entre le printemps et l'automne. Nous avons également observé que le RFRP-3 central augmente l'expression génique du peptide orexigène NPY et diminue l'expression du peptide anorexigène POMC 1h30 après injection, et ceci pendant les deux saisons. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la prise alimentaire induite par l'administration centrale du RFRP-3 pourrait s'exercer via une augmentation concomitante de l'expression du peptide orexigène NPY associée à une diminution de l'expression du peptide anorexigène POMC, et ceci quel que soit la saison.

L'ensemble de nos résultats suggère l'existence d'un effet des deux peptides RF-amides Kp et RFRP-3 sur la balance énergétique, avec un effet anorexigène du Kp et orexigène du RFRP-3. Ces effets opposés de ces deux neuropeptides sur la prise alimentaire sont à

mettre en parallèle avec leurs effets opposés sur la reproduction chez quelques rongeurs saisonniers (activateur pour le Kp et inhibiteur pour le RFRP-3). Ainsi chez la gerboise femelle, le Kp et le RFRP-3 pourraient jouer des rôles opposés à la fois sur l'activité de la reproduction et sur le métabolisme énergétique. Cependant l'effet des RFRP-3 sur l'axe reproducteur de la gerboise femelle doit être évalué afin de confirmer cette hypothèse. L'ensemble de ces résultats fait le sujet d'un article publié dans le journal *Scientific Reports* **(Talbi et al., 2016)**.

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis de démontrer non seulement que les neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la reproduction et la balance énergétique sont fortement régulés par la photopériode et probablement aussi par l'état sexuel des animaux (via des mécanismes directs ou indirects impliquant les stéroïdes sexuels ou d'autres neuropeptides hypothalamiques que ceux étudiés), mais aussi que le Kp et le RFRP-3, deux régulateurs puissants de l'axe gonadotrope, sont fortement impliqués dans la régulation centrale saisonnière du comportement alimentaire, à travers l'implication de neuropeptides métaboliques orexigènes et anorexigènes, notamment la POMC et le NPY. Nos résultats suggèrent que les deux peptides Kp et RFRP-3 transmettent l'information photopériodique non seulement à l'axe reproducteur pour synchroniser la reproduction avec la saison la plus favorable à la naissance de la progéniture, comme il a été déjà démontré, mais également à l'axe régulant la balance énergétique pour assurer une adaptation du comportement alimentaire avec les changements saisonniers des ressources alimentaires.

SUMMARY

Living on earth implies the existence of seasonal changes in photoperiod, temperature and food resources. It is therefore necessary that living organisms adapt their biological functions with seasons in order to survive harsh conditions. In seasonal mammals, the annual time is “read” via the nocturnal production of melatonin, a pineal hormone produced exclusively at night. The photoperiodic changes of melatonin production synchronize many physiological functions with seasons, particularly reproduction and metabolism. The neuronal mechanisms that regulate these two functions should be synchronized with the seasons and with each other to ensure the individuals survival and the species perpetuity. Jerboas (*Jaculus orientalis*) are wild seasonal rodent exhibiting exceptional adaption to their desert environment. In order to survive harsh seasons, jerboa displays strong seasonal variations in biological functions with a special adaptation of its reproductive and metabolic activities with seasonal changes in photoperiod, mainly controlled by melatonin. In spring, when environmental conditions are favorable, jerboa becomes sexually active, with an increase in circulating levels of sex steroids associated with synchronized increase in the expression of peptides regulating reproduction, particularly GnRH. In parallel with these changes, jerboas decrease their body weight. Under harsh autumnal conditions, the animals shut down their reproductive axis, increase body weight and hibernate.

Since their discovery, our team has been particularly interested in two newly identified RF-amide peptides recently highlighted as pivotal central regulators of gonadotropic axis, and whose the expression is modulated by photoperiod in seasonal rodents, Kisspeptin (Kp) and Arg-Phe-related peptide-3 (RFRP-3). Kp, whose the neurons are located in the anteroventral periventricular nucleus and the arcuate nucleus, is always a potent stimulator of the reproductive axis while the action of RFRP-3, expressed in neurons exclusively located in the dorso (DMH) and ventro (VMH)-medial hypothalamus, is still controversial exhibiting either stimulatory or inhibitory action in a sex- and species-dependent manner. The involvement of these RF-amide peptides in the seasonal regulation of reproduction in rodents has been studied since their discovery, while their involvement in the seasonal regulation of metabolism is still one big unanswered question.

My thesis project, conducted under a joint PhD between the University of Sidi Mohamed Ben Abdellah of Fez in Morocco and the University of Strasbourg in France, was dedicated

to study the involvement of Kp and RFRP-3 in the seasonal regulation of energy balance in the jerboa. The first aim of my thesis work was to conduct a comparative study of the seasonal regulation of the genes encoding Kp and RFRP-3 as pivotal regulators of reproductive activity and POMC, NPY and somatostatin known to regulate energy homeostasis, notably food intake. Using non-radioactive *in situ* hybridization, both the labeling intensity per neuron and the number of mRNA neurons expressing *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* and *Npy* were analyzed in the ARC, while the expression of *Rfrp* mRNA was analyzed in the DMH / VMH in male jerboas captured from their own biotope and sacrificed in spring and autumn. In parallel, we evaluated the seasonal variations of jerboa's gonadal activity and food intake in order to correlate these changes to those of hypothalamic neuropeptides. Remarkably, in spring we observed a gonadal activation, as evidenced by an increase in testicular weights and circulating levels of testosterone, along with a spring general increase in the expression of genes coding for RFRP-3 in the DMH / VMH, and Kp, POMC and somatostatin at the level of the ARC. In contrast, we found opposite seasonal variations in food intake with an increase in autumn and a decrease in spring. The synthesis increase of *kiss1* and *Rfrp* mRNA expressing neurons observed in sexually active animals of spring is consistent with the reported jerboa's gonadal activation during this season and with the known stimulatory effect of these peptides on the reproductive axis, and comes to complete our first immunohistochemical study (**Janati et al., 2013**), where we reported that both Kp and RFRP-3 show seasonal variations with a significant increase in the number of Kp- and RFRP-immunoreactive neurons in the ARC and the DMH/VMH respectively, of male jerboas in spring as compared to autumn. The spring increase in the number of mRNA expressing cells of *Pomc* and *somatostatin*, both anorectics, is in agreement with the decrease in body weight and food intake observed in jerboa during this period of the year. The NPY gene expression, does not display any significant seasonal variation, which may be due to the fact that this peptide may display different effects in both the regulation of reproduction and energy balance as suggested in several studies. The overall result of this first part was the subject of an article published in the *Journal of Comparative Neurology* (**Talbi et al., 2016**).

The second part of my research project has targeted the involvement of Kp and RFRP-3 in the seasonal regulation of energy balance, mainly food intake and the central

hypothalamic sites of action by which these two peptides might exert their effects. we have started by evaluating the effect of intra-cerebroventricular injection of Kp10 (the shortest form of the peptide, 4 μ g) on jerboa's food intake. Preliminary studies have shown that Kp had no effect on food intake in the *ad-libitum* fed jerboa. Based on evidences showing the sensitivity of Kisspeptinergic system to negative states of energy balance, jerboas were food deprived for 48 hours before the injection of Kp or vehicle (NaCl) and food intake was measured 1h, 2h, 3h, 5h and 24h after injection. This experiment was conducted both in male and female jerboas of spring and autumn. Our results show that icv injection of Kp inhibits food intake during the 5 hours post-injection in female jerboas of spring but have no effect in autumn under the same experimental conditions. In males, Kp failed to induce any effect on food intake neither in spring nor in autumn. These results evidence a new effect of Kp in food intake and suggest this effect to depend on season, sex and the state of animal's energy balance. To further explore the neuronal mechanisms underlying this inhibitory effect of seasonal Kp on food intake, we performed injections of Kp in male and female jerboas of spring and autumn that were sacrificed 1h30 post-injections, to analyze expression of genes encoding POMC, NPY and RFRP-3 by non-radioactive *in situ* hybridization. We found that Kp10 icv injection induces the activity of gonadotropic axis, attested by c-FOS expression in the preoptic area where GnRH neurons are located and increases the circulating testosterone levels, demonstrating that jerboa responds as expected to the central dose of Kp10. In the male jerboa, no effect of Kp was observed on the expression of POMC and RFRP-3 neither in spring nor in autumn. However, a season-dependent effect on the gene encoding NPY was observed in these animals, with an increase in this peptide expression in spring but not in autumn. In the female jerboa, icv injection of Kp10 increases the number of *Pomc* mRNA neurons, both in spring and autumn with a greater effect in spring as compared to autumn, but has no effect on the *Npy* mRNA expressing cells neither in spring nor in autumn. These effects in both seasons, can not explain the season-dependent effect of Kp on food intake. However, interestingly Kp injection has a season-dependent effect on *Rfrp* mRNA expressing cells with an inhibition in spring, and no effect in autumn. This correlated effect of Kp on food intake and on the expression of gene expression encoding RFRP-3 suggests that Kp could regulate food intake partly through RFRP-3 neurons and only in female jerboas of spring.

With these results, we hypothesized the existence of an RFRP-3 effect on the female jerboas feeding behavior and so we evaluated the effect of central injection of RFRP-3 on food intake and on the gene expression of POMC and NPY in *ad-libitum* fed females of spring and autumn. Interestingly, the results indicated that RFRP-3 (icv injected at a dose of 5 µg) has a potent stimulatory effect on food intake from the first hour and up to 24 hours post-injection, without any significant difference between spring and autumn. We also found that the central RFRP-3 injection increases the gene expression of the orexigenic peptide NPY and decreases the expression of the anorectic POMC 1h30 after injection, with the same effect during both seasons. These results suggest that the increase in food intake induced by the central administration of RFRP-3 could be exerted via an increase in the expression of the orexigenic NPY associated with a decreased in the expression of the anorexigenic POMC, whatever the season is. Altogether, these results suggest the existence of a seasonal effect of the RF-amide peptides, Kp and RFRP-3, on energy balance, with an anorexigenic effect of Kp and orexigenic effect of RFRP-3. These opposing effects of Kp and RFRP-3 on food intake are to be compared with their opposite effects on reproductive axis in some seasonal rodents (activatory effect for Kp and inhibitory effect for RFRP-3). Thus in the female jerboa, the Kp and RFRP-3 could play opposite roles on both reproduction and energy homeostasis. However, the effect of RFRP-3 on the female jerboa's reproductive axis should be evaluated in order to support such a hypothesis. The results of this chapter of my thesis are the subject of an article published in the journal of *Scientific Reports* (Talbi et al., 2016).

In conclusion, this thesis work show that reproductive and metabolic hypothalamic peptides display seasonal variations and are regulated by photoperiod and probably by the sexual status of animals (through direct or indirect mechanisms involving sex steroids or other hypothalamic neuropeptides than those studied). Also, this work provides evidence about the involvement of Kp and RFRP-3 in the seasonal regulation of energy balance, through involvement of orexigenic and anorexigenic metabolic peptides, mainly POMC and NPY. Our results suggest that Kp and RFRP-3 not only transmit photoperiodic information to the reproductive axis to synchronize reproduction with the most favorable season of the year to ensure the offspring survival, as showed in several studies, but also to the metabolic axis to ensure the adaptation of feeding behavior with seasonal changes in food resources.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION GÉNÉRALE	5
I. LE CONCEPT DES RYTHMES SAISONNIERS	6
II. PHOTOPÉRIODISME, HORLOGE CIRCANUELLE ET PHOTORÉFRACTION : MECANISMES D'ENTRAINEMENT DES FONCTIONS SAISONNIERES	11
1. Photopériodisme	12
1.1 La transmission de la photopériode à l'organisme par un système photoneuroendocrinien	12
1.2 La lecture du message photopériodique par le tractus rétinohypothalamique	13
2. La mélatonine	21
2.1 Les sites d'action de la mélatonine	23
2.2 La photopériode et la mélatonine dans le contrôle des fonctions saisonnières	24
3. L'horloge circannuelle	26
4. La photoréfraction	29
5. Les mécanismes neuroendocriniens impliqués dans la transmission du message photopériodique de la mélatonine vers l'hypothalamus	32
5.1 L'importance des hormones thyroïdiennes dans la saisonnalité	32
5.2 Régulation saisonnière de TSH dans la pars tuberalis	33
5.3 Rôle de la TSH, de la PT et des tanycytes dans la régulation neuroendocrine des fonctions saisonnières	34
5.3.1 <i>Les tanycytes : siège de la synthèse des TH et relais essentiel du message photopériodique entre la TSH et l'hypothalamus</i>	34
5.3.2 <i>Plasticité des tanycytes et le contrôle central de la fonction de la reproduction</i>	37
5.3.3 <i>Rôle des tanycytes dans la régulation de la balance énergétique</i>	37
III. LE CONTRÔLE CENTRAL DE L'AXE HYPOTHALAMO-PITUITO-GONADIQUE	40
1. Description neuroanatomique et fonctionnelle	40
2. Variations saisonnières des neurones à GnRH	43
3. Les peptides RF-amides	43
3.1 Les kisspeptines	46
3.1.1 <i>Découverte, mode et sites d'action des kisspeptines</i>	46
3.1.2 <i>Kisspeptine et la régulation de l'axe reproducteur</i>	49
3.1.3 <i>Kisspeptine et la saisonnalité de la reproduction</i>	51
3.2 Le RF-amide related peptides-3	52
3.2.1 <i>Découverte, mode et sites d'action du RFRP-3</i>	52
3.2.2 <i>RFRP-3 et la régulation de l'axe reproducteur</i>	55
3.2.3 <i>RFRP-3 et la saisonnalité de la reproduction</i>	56
4. Le lien entre la mélatonine et les variations saisonnières des peptides RF-amides	59
IV. LE CONTRÔLE CENTRAL DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE	61
1. La régulation saisonnière de la balance énergétique	64
2. Les peptides orexigènes et anorexigènes dans la régulation de la prise alimentaire	65
2.1 Le neuropeptide Y	66
2.2 La POMC	67
2.3 La somatostatine	69

3.	Rôle des peptides RF-amides dans l'interaction des axes métaboliques et reproducteurs	70
3.1	Kisspeptine et régulation de la balance énergétique	71
3.2	RFRP-3 et la régulation de la balance énergétique	72
	OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	74
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	77
I.	MATERIEL BIOLOGIQUE	78
II.	GROUPES EXPERIMENTAUX	82
1.	<i>Animaux</i>	82
III.	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> NON-RADIOACTIVE	84
1.	<i>Préparation du tissu cérébral et prélèvement de sang</i>	84
2.	<i>Préparation et validation des ribosondes</i>	84
3.	<i>Hybridation</i>	85
4.	<i>Semi-quantification du marquage des ARNm hybridés</i>	86
IV.	INJECTION CENTRALE DE NEUROPEPTIDES	89
1.	<i>Poses de canules intra-cérébro-ventriculaires</i>	89
2.	<i>Administration des peptides</i>	90
3.	<i>Etude de l'effet des injections centrales de Kp10 et de RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes hypothalamiques</i>	91
V.	MESURE DES VARIATIONS SAISONNIERES DE LA PRISE ALIMENTAIRE JOURNALIERE	93
VI.	DOSAGE DE TESTOSTERONE	93
VII.	CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES ET ANALYSES STATISTIQUES	93
	RÉSULTATS	95
I.	REGULATION SAISONNIERE DES NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES REGULANT L'ACTIVITE DE LA REPRODUCTION (KP ET RFRP-3) ET DE LA BALANCE ENERGETIQUE (POMC, NPY ET SOMATOSTATINE) CHEZ LA GERBOISE.	96
1.	<i>Variations saisonnières de l'activité gonadique des gerboises</i>	96
2.	<i>Variations saisonnières de la prise alimentaire journalière chez les gerboises femelles</i>	97
3.	<i>Distribution neuroanatomique des neurones exprimant Rfrp, Kiss1, Pomc, somatostatin ou Npy chez les gerboises mâles</i>	97
4.	<i>Variations saisonnières de l'expression des gènes Rfrp et Kiss1 chez les gerboises mâles</i>	99
5.	<i>Variations saisonnières de l'expression des gènes Pomc, somatostatin et Npy chez les gerboises mâles</i>	99
II.	EFFET DES INJECTIONS CENTRALES DE KISSPEPTINE ET DE RFRP-3 SUR LA PRISE ALIMENTAIRE ET SUR L'EXPRESSION DES GENES CODANT POUR LES PEPTIDES HYPOTHALAMIQUES CHEZ LA GERBOISE	102
1.	<i>Effet de l'injection centrale du Kp10 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides POMC, NPY et RFRP-3 chez les gerboises femelles et mâles d'automne ou de printemps</i>	102

2. <i>Effet de l'injection centrale du RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides hypothalamiques POMC et NPY chez les gerboises femelles d'automne et de printemps</i>	110
DISCUSSION GÉNÉRALE	114
I. REGULATION SAISONNIERE DES NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES REGULANT L'ACTIVITE DE LA REPRODUCTION (KP ET RFRP-3) ET DE LA BALANCE ENERGETIQUE (POMC, NPY ET SOMATOSTATINE) CHEZ LA GERBOISE.	116
II. KISSPEPTINE ET RFRP-3 ET LEUR IMPLICATION DANS LA REGULATION SAISONNIERE DE LA BALANCE ENERGETIQUE CHEZ LA GERBOISE FEMELLE	123
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	131
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136
ANNEXE	165

ABREVIATIONS

3V:	3 ^{ème} ventricule	ISH:	<i>In situ</i> hybridization (Hybridation <i>in situ</i>)
5-HT:	5-hydroxytryptamine	KO:	Knock-out
AA-NAT:	Aralkylamine N-acétyltransférase	Kp:	Kisspeptine
Ach:	Acétylcholine	Kpergique:	Kisspeptinergique
AgRP:	Agouti-related protein	LH:	Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
ARC:	Arcuate nucleus (noyau arqué)	NE:	Norépinephrine
AVP:	Arginine Vasopressine	NKB:	Neurokinine B
AVPV :	Anteroventral periventricular nucleus (Noyau antéroventral périventriculaire)	NMU:	Neuromédine U
BF:	Basal forebrain (Télencéphale basal)	NPY :	Neuropeptide Y
BNST:	Bed Nucleus of the Stria Terminalis (Noyau du lit de la strie terminale)	NRM :	Noyau Raphé Médian
CRH:	Corticotropin Releasing Hormone (Corticolibérine)	OVLT:	Organum vasculosum laminae terminalis (Vasculosum Organum Laminae Terminalis)
CSF:	Cerebrospinal fluid (liquide céphalo-rachidien)	PACAP:	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (Le polypeptide activant l'adénylate cyclase hypophysaire)
Dio2:	Déiodinase 2	PC:	Photopériode Courte
Dio3:	Déiodinase 3	PG:	Pineal gland (Glande Pinéale)
DMH:	Dorso-medial hypothalamus (noyau hypothalamique dorso-médian)	PL:	Photopériode Longue
EOP:	Endogenous opiates peptides (peptides opioïdes endogènes)	POA:	Preoptic area (aire préoptique)
FSH:	Follicle-stimulating hormon (hormone folliculo-stimulante)	POMC:	Pro-opiomélanocortine
GABA:	Acide γ -aminobutyrique	PT:	Pars Tuberalis
GnIH:	Gonadotropin Inhibitory Hormone (hormone inhibitrice de gonadotrophine)	PVN	Hypothalamic Paraventricular nucleus (noyau hypothalamique paraventriculaire)
GnRH:	Gonadotropin Releasing Hormone (hormone de libération de gonadotrophine)	PVT:	Thalamic Paraventricular nucleus (noyau thalamique paraventriculaire)
GRP:	Gastrin-Releasing Peptide	RFRP-3:	RF-Amide-Related Peptide-3
HIOMT:	Hydroxyindole O- méthyltransférase	RHT:	Retinohypothalamic tract (tractus rétino-hypothalamique)
MBH :	Mediobasal hypothalamus (hypothalamus mediobasal)	SCN:	Suprachiasmatic nucleus (Noyau suprachiasmatique)
HPG:	Axe Hypothalamo-Pituito-Gonadique	SEM:	Standard Errors of Mean (Erreur Standard Moyenne)
ICV:	Intra-cérébro-ventriculaire	TH:	Thyroid hormones (hormones thyroïdiennes)
IGL:	Intergeniculate leaflet (feuillet intergeniculé latéral)	TRH:	Thyreotropin releasing hormone (thyroolibérine)
IML:	Colonne Intermédiolatérale de la moelle épinière	TSH:	Tyrosine Stimulating Hormone (La thyroostimuline)
IpRGC:	Intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells	VIP:	Vasoactive intestinal peptide (peptide vasoactive intestinal)
		VMH :	Ventro-medial hypothalamus (noyau hypothalamique ventro-médian)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. LE CONCEPT DES RYTHMES SAISONNIERS

La vie telle que nous la connaissons, a évolué sous l'influence de deux mouvements constants de notre planète Terre. La rotation de celle-ci autour de son propre axe toutes les 24 heures, déterminant une alternance entre le jour et la nuit et conduisant ainsi à des rythmes journaliers, et la révolution de la Terre autour du Soleil qui se produit tous les 365 jours. L'inclinaison de son axe de rotation, qui est d'environ $23,5^\circ$ par rapport à son plan orbital, fait qu'à certains moments, un hémisphère de la Terre sera davantage réchauffé par le Soleil. Ces phénomènes définissent les variations annuelles de la longueur du jour (photopériode) et donnent naissance à quatre saisons, chacune marquée par des conditions météorologiques particulières auxquelles tout être vivant sur Terre est soumis.

L'orbite de la Terre autour du Soleil définit le plan de l'écliptique. Compte tenu du plan de l'axe de rotation de la Terre qui forme avec la perpendiculaire à l'écliptique un angle de $23,5^\circ$, il existe 4 positions remarquables en fonction de la position du Soleil par rapport à ce plan : les solstices d'été et d'hiver et les équinoxes d'automne et de printemps. Dans l'hémisphère nord, l'équinoxe du 21 mars marque le début du printemps (équinoxe de printemps) alors que celui du 23 septembre marque le début d'automne (équinoxe d'automne). Dans l'hémisphère nord comme dans celui du sud, les dates des équinoxes sont approximativement les mêmes. Par contre, les saisons sont inversées entre les hémisphères nord et sud, et plus la distance de l'équateur est grande plus les différences intersaisonniers dans la température ambiante et les radiations solaires sont prononcées. Les deux hémisphères sont illuminés identiquement aux équinoxes qui se caractérisent par une durée égale entre le jour et la nuit et se produisent à mi-chemin entre les dates du solstice, qui eux même, servent de frontières entre les saisons. En effet, ils ont lieu lorsque la position apparente du Soleil est située sur l'équateur céleste. Les solstices correspondent à une durée de jour minimale ou maximale ; au solstice d'été, le pôle nord est éclairé alors que le pôle sud reste constamment dans l'ombre. En hiver, le contraire se produit. La date de tout solstice ou équinoxe dans une année donnée peut varier d'un jour ou deux, étant donné que la période de la révolution de la Terre n'est pas exactement de 365 jours (Figure 1).

L'alternance des saisons implique des changements de l'intensité et de la durée de la lumière solaire qui atteint la surface de la Terre et affectent des paramètres tels que la température, les précipitations, l'humidité, l'hygrométrie, et la disponibilité de la nourriture. L'amplitude du changement photopériodique varie avec la latitude. Les autres indices saisonniers alternatifs, tels que la température ou les précipitations, sont moins reproductibles et donc moins prévisibles et sont utilisés comme indices permissifs dans des environnements saisonniers plus stables, comme les zones équatoriales où le changement photopériodique est minime. Dans ces régions équatoriales, deux saisons peuvent être observées en fonction de l'hydrométrie. Plus on est proche de la région polaire, plus les saisons sont marquées.

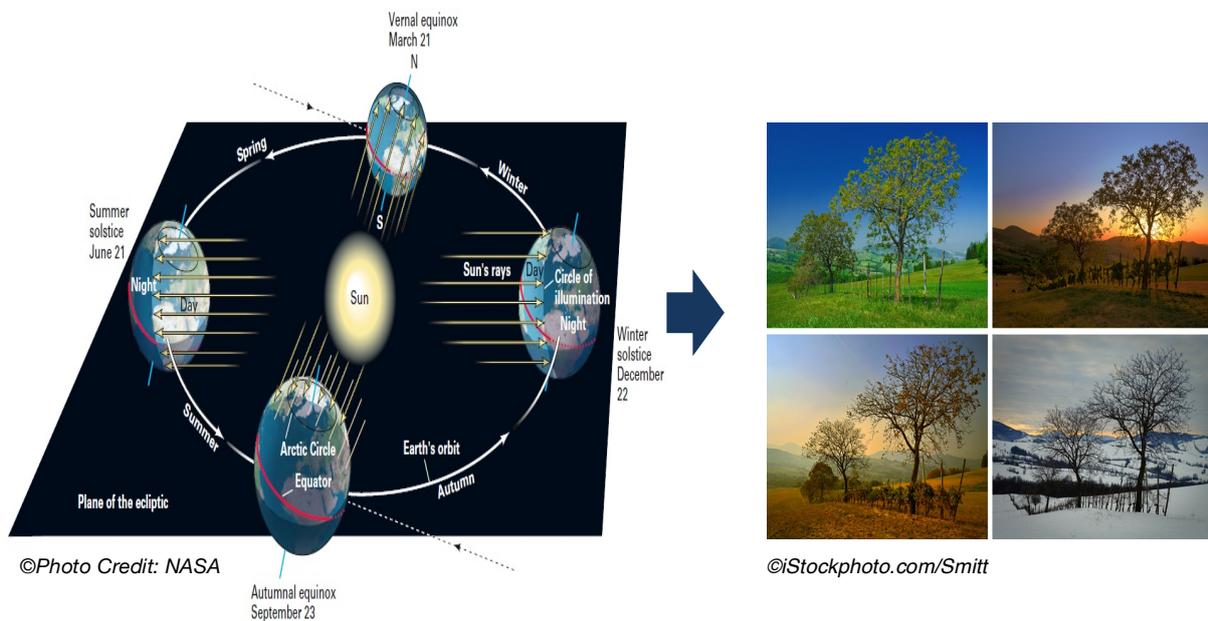


Figure 1 : La révolution de la Terre avec son axe penché autour du Soleil est à l'origine de l'existence des saisons. Le 22 décembre, l'extrémité du pôle nord de l'axe de la Terre s'incline vers l'extérieur par rapport au Soleil de façon à ce que le pôle nord n'est jamais éclairé par le Soleil, c'est la nuit polaire. Il s'agit du solstice d'hiver dans l'hémisphère nord. En même temps, l'hémisphère sud est incliné vers le Soleil et subit un réchauffement solaire fort du fait qu'il est éclairé en permanence, il s'agit de l'été dans l'hémisphère sud. Six mois plus tard (le 21 Juin), la Terre accomplit son voyage vers le côté opposé de son orbite, ce qui correspond au solstice d'été dans l'hémisphère nord. L'extrémité du pôle nord de l'axe de la terre est inclinée de $23,5^\circ$ vers le Soleil, tandis que le pôle sud et l'hémisphère sud sont inclinés plus loin.

Afin de survivre aux saisons difficiles, la majorité des espèces vivantes allant des non-vertébrés aux grands mammifères aquatiques, développent des mécanismes d'adaptation et d'anticipation des variations saisonnières de l'environnement de manière à modifier leurs fonctions physiologiques et leurs comportements en conséquence. Certaines de ces espèces migrent et parcourent de longues distances pour changer leur écosystème et chercher de nouvelles ressources alimentaires ou se reproduire dans des environnements plus appropriés. D'autres, restent dans le même environnement toute l'année, où ils s'adaptent aux changements saisonniers et affrontent les saisons difficiles avec des réponses physiologiques spécifiques pour survivre. Ces espèces adaptent leur activité métabolique ou limitent leur fonction de reproduction à une durée définie de l'année pour veiller à ce que leurs progénitures naissent pendant la saison la plus favorable de l'année, car produire une descendance à la mauvaise saison compromettrait la survie des petits. Ces espèces peuvent aussi hiberner, changer la couleur du pelage ou la densité de leur fourrure et se camoufler ou s'isoler pour réduire la perte de la chaleur. Toutes ces stratégies d'adaptation sont énergétiquement exigeantes et impliquent des changements physiologiques et comportementaux importants (Figure 2).



Figure 2 : L'adaptation des animaux aux variations saisonnières. L'hibernation, la migration et le changement de la densité et/ou la couleur de la fourrure, sont quelques stratégies adaptatives que développent les animaux pour survivre les saisons difficiles.

(1. www.lelabodanissa.blogspot.com ; 2. www.bhavanajagat.com ; 3. www.wakeuppp.myblog.arts.ac.uk)

Les défis climatiques et nutritionnels de l'hiver posent les plus grandes menaces à la survie des animaux sauvages vivant dans des zones tempérées ou désertiques. Pour s'adapter à ces changements environnementaux et afin d'augmenter leurs chances de survie, ces espèces montrent des variations saisonnières dans plusieurs processus physiologiques et comportementaux dont les plus importants sont la reproduction et le métabolisme.

Les variations saisonnières de l'activité de la reproduction favorisent la survie et la continuité des espèces. Il s'agit de restreindre la naissance de la progéniture au moment le plus favorable de l'année. Selon la durée de l'activité sexuelle, deux catégories d'animaux saisonniers peuvent être distinguées : les animaux de jours longs (sexuellement actifs en photopériode longue ; au printemps et en été) et ceux de jours courts (sexuellement actifs en photopériode courte ; en automne et en hiver). Cependant, au sein des différentes espèces à photopériode longue ou courte, les mécanismes

impliqués dans la régulation saisonnière de la reproduction varient considérablement d'une espèce à une autre, selon leur physiologie et le milieu dans lequel ils vivent.

Les hamsters syrien (*Mesocricetus auratus*) et sibérien (*Djungarian hamster*) ou encore la gerboise (*Jaculus orientalis*), sont des animaux de jours longs. Ils sont sexuellement actifs au printemps et en début d'été en sorte que les petits naissent pendant les conditions environnementales favorable de cette période. Cependant, lorsque la photopériode chute, la taille des gonades et le taux circulant des stéroïdes sexuels diminuent progressivement et les animaux deviennent sexuellement quiescents.

Les variations saisonnières de l'activité de reproduction représentent juste une partie des changements physiologiques multiples que ces animaux présentent comme une étape naturelle de leur cycle annuel. Les variations saisonnières de la masse corporelle, de la prise alimentaire ou encore du stockage des graisses, constituent de véritables stratégies que les animaux saisonniers développent, en vue de vaincre les températures basses et réduire les ressources alimentaires. De nombreux petits mammifères présentent de fortes variations de leur poids corporel et/ou de leur prise alimentaire. La gerboise et le hamster sibérien font partie de ces petits rongeurs saisonniers qui présentent des variations saisonnières importantes du poids corporel. La gerboise s'engraisse en automne pour hiberner en hiver (El Ouezzani et al., 2011), et pendant l'hibernation ces réserves de graisse seront lentement oxydées pour fournir l'essentiel de l'énergie pour la survie hivernale, jusqu'à ce que la disponibilité des aliments redevienne favorable au printemps. Contrairement à la gerboise, le hamster sibérien diminue son poids corporel en hiver, car une faible masse corporelle lui coûte moins d'énergie (Bolborea, 2010).

II. PHOTOPÉRIODISME, HORLOGE CIRCANUELLE ET PHOTORÉFRACTION : MECANISMES D'ENTRAÎNEMENT DES FONCTIONS SAISONNIÈRES

Afin d'anticiper les variations saisonnières de l'environnement, les animaux doivent se situer dans le temps annuel, et ce par l'indicateur le plus stable et le plus fiable au cours des années : La photopériode.

La photopériode (durée relative du jour sur la période de 24 heures) est le signal saisonnier le plus prévisible utilisé pour anticiper à l'avance les changements des facteurs environnementaux (Goldman, 2001). Contrairement à la température, les précipitations ou la disponibilité de la nourriture, qui sont aussi potentiellement synchroniseurs des fonctions physiologiques et comportementales à l'environnement (Bronson, 1985), la photopériode est hautement reproductible d'une année à une autre, et afin de lire, intégrer et convertir l'information de la lumière en un message endocrinien, les mammifères utilisent un système photo-neuro-endocrinien pour mesurer le temps annuel et synchroniser leurs fonctions biologiques avec les saisons.

Les fluctuations annuelles de la physiologie et du comportement ainsi que les programmes de synchronisation interne permettant aux organismes d'anticiper et de faire face aux cycles géophysiques dans l'environnement ont été l'objectif d'un grand nombre de recherche. Une observation fondamentale a été que les événements cycliques persistent souvent de façon endogène, même en l'absence complète de l'information de temps externe donnée par les « Zeitgebers » (repères temporels externes donneurs de temps). En effet, un Zeitgeber peut être tout repère externe ou environnemental entraînant ou synchronisant les rythmes biologiques d'un organisme vivant aux cycles journaliers ou saisonniers de notre planète Terre. L'alternance jour/nuit, la température, la disponibilité de la nourriture, ou les interactions sociales, sont tous des « Zeitgebers » qui synchronisent les rythmes biologiques en déterminant leurs périodes (la durée d'un cycle) et leurs phases (le moment où le cycle a lieu). Les rythmes endogènes ont une période proche des cycles géophysiques de 24 heures et sont appelés « circadiens » ou d'une année et sont appelés « circannuels » (Gwinner, 1986, 2003; Kumar et al., 2004; Bradshaw and Holzapfel, 2007; Helm, 2009).

En plus de la réponse adaptative aux variations photopériodiques, certaines espèces possèdent un mécanisme endogène de mesure du temps saisonnier. En effet, chez ces espèces, particulièrement celles à vie longue, une horloge circannuelle est responsable de

la synchronisation des rythmes physiologiques et neuroendocriniens avec les saisons. Dans ce cas, les rythmes sont entièrement endogènes, et persistent dans des conditions constantes avec une période d'environ 12 mois. Cependant, chez les espèces saisonnières qui ne disposent pas d'une horloge circannuelle, un mécanisme appelé la photoréfraction est responsable de la réactivation de la fonction saisonnière après une exposition prolongée à des conditions photo-inhibitrices. Ce phénomène est particulièrement important chez les animaux hibernants qui ne peuvent pas visualiser l'augmentation de la photopériode accompagnant l'arrivée du printemps. Dans les deux cas, ces événements endogènes sont synchronisés par les variations annuelles de la photopériode. Il est important de noter que les notions de photopériode longue (PL) ou photopériode courte (PC) sont subjectives et dépendent des espèces. Chaque espèce a sa propre photopériode critique, correspondant à la quantité de lumière perçue par l'animal par période de 24 heures et au-dessus de laquelle le signal photopériodique sera traduit à une information de jour long.

1. Photopériodisme

1.1 La transmission de la photopériode à l'organisme par un système photoneuroendocrinien

Quelque soient les mécanismes endogènes à long terme existant chez les espèces saisonnières et quelque soit leur importance, les changements saisonniers de l'environnement sont capables de synchroniser les fonctions biologiques (comme discuté auparavant). Il est admis que les changements annuels de la photopériode sont le facteur le plus puissant pour synchroniser les fonctions saisonnières.

Afin de décoder l'information photopériodique, les animaux reposent sur «un système photoneuroendocrinien» qui assure la lecture puis la transmission de cette information photopériodique. Ce système fait intervenir un circuit complexe qui débute avec la détection de la lumière par les cellules photosensibles de la rétine, implique l'activation de l'horloge circadienne des noyaux suprachiasmatiques (SCN), et se termine avec la production de la mélatonine par la glande pinéale (PG) (Figure 3).

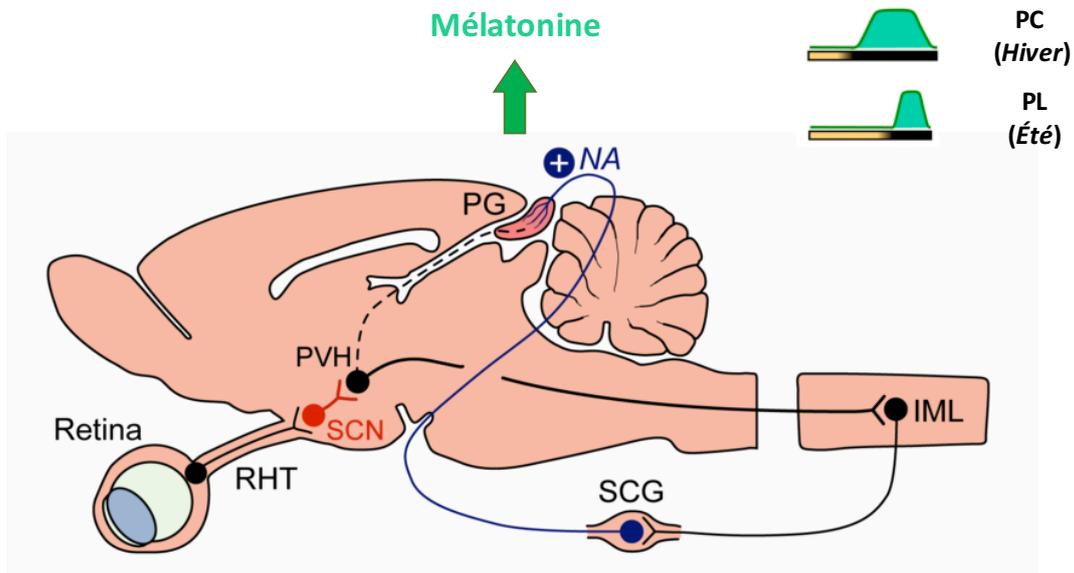


Figure 3 : La transmission du signal photopériodique chez les mammifères. L'information de photopériode longue (PL) ou photopériode courte (PC) perçue par les cellules provenant de la rétine, est transmise par une voie multi-synaptiques reliant les noyaux suprachiasmatiques ; le siège de l'horloge circadienne (SCN), les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVH), la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (IML), et les ganglions cervicaux supérieurs (SCG). Etant donné que la durée de la nuit varie en fonction des saisons, la durée du pic nocturne de la mélatonine donne une indication fiable, stable et fidèle des saisons. En été, une longue photopériode est associée à un pic de mélatonine court, tandis qu'en hiver, la photopériode courte est associée à un pic de mélatonine long (Revel, 2006).

1.2 La lecture du message photopériodique par le tractus rétinohypothalamique

L'information « présence ou absence de lumière » est perçue par la rétine et est transmise au siège de l'horloge circadienne situé dans l'hypothalamus, les SCN. Au niveau de la rétine, l'alternance rythmique des périodes claires et sombres est perçue par une classe de cellules ganglionnaires de la rétine d'un intérêt particulier pour les rythmes circadiens ; les ipRGC (Intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells). Elles sont intrinsèquement photosensibles et expriment un photopigment particulier, la mélanopsine (Freedman et al., 1999; Lucas and Foster, 1999; Mrosovsky et al., 2001; Hattar et al., 2002). Ce photopigment a été initialement mis en évidence dans les cellules

photosensibles de la peau de grenouille il y a moins de 20 ans (Freedman et al., 1999; Lucas et al., 1999; Mrosovsky et al., 2001; Hattar et al., 2002). Les ipRGC, qui représentent 1 à 3% des cellules ganglionnaires, n'ont pas de fonctions visuelles mais elles sont considérées comme étant le centre intégrateur et distributeur des informations photiques provenant de tous les photopigments rétiniens (Göz et al., 2008; Güler et al., 2008). Elles peuvent détecter les changements de l'intensité lumineuse et ajuster le diamètre de la pupille en conséquence (Hattar et al., 2003; Lucas et al., 2003). Ces cellules sont également indispensables pour l'entraînement de l'horloge circadienne par la photopériode (Panda et al., 2002, 2003; Ruby et al., 2002; Gooley et al., 2003; Rollag et al., 2003). Cependant, des souris invalidées pour le gène exprimant la mélanopsine (Opn4) continuent à être entraînées par la lumière (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002), suggérant que les cellules à mélanopsine ne sont pas les seules à transmettre l'information photique à l'horloge circadienne et que les photorécepteurs classiques, les cônes et les bâtonnets, sont aussi impliqués dans la transmission photique aux SCN (Hattar et al., 2003; Panda et al., 2003).

Les ipRGC envoient des projections directes vers les SCN (Hattar et al., 2002) où elles libèrent le polypeptide activant l'adénylate cyclase hypophysaire (pituitary adenylate cyclase activating peptide, PACAP) et le glutamate. Ce dernier étant le principal neurotransmetteur transmettant l'information photique vers les SCN (Ding et al., 1994; Hannibal et al., 1997; Mintz et al., 1999). Les ipRGC projettent aussi indirectement vers les SCN via le tractus géniculo-hypothalamique (TGH), une voie distincte passant par le feuillet intergeniculé latéral (IGL), en libérant ainsi le neuropeptide Y (NPY) et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Moore and Speh, 1993).

Les SCN sont le siège de la principale horloge circadienne chez tous les mammifères. En effet, les premières études ciblant les SCN ont montré que des lésions électrolytiques de ces noyaux provoquent une arythmie (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972), et que ces derniers contiennent un "pacemaker" circadien autonome (Schwartz and Gainer, 1977; Inouye and Kawamura, 1979; Groos and Hendriks, 1982; Prosser et al., 1989). De plus, des études ultérieures ont montré que des SCN exogènes transplantés chez des animaux dont les SCN ont été lésés, sont capables de restaurer la fonction circadienne (Lehman et al., 1987; Ralph et al., 1990). L'ensemble de ces études a démontré que les SCN sont une composante nécessaire du système circadien.

Les SCN sont constitués de deux petits noyaux situés dans la partie antérieure de l'hypothalamus, juste au-dessus du chiasma optique et contenant environ 10 000 neurones chacun (Figure 4). Ils sont composés d'une partie ventrolatérale (appelée cœur) et une dorsomédiane (appelée coquille), les deux étant couplés par un mécanisme GABAergique (Moore and Speh, 1993). Les neurones dorsomédiens expriment la vasopressine (AVP) d'une manière circadienne avec un pic survenant au cours de la phase lumineuse (Tominaga et al., 1992; Abrahamson and Moore, 2001; Moore et al., 2002), tandis que les neurones ventrolatéraux expriment principalement le peptide vasoactif intestinal (VIP) d'une manière journalière avec un pic survenant au cours de la phase d'obscurité (Abrahamson and Moore, 2001). Les noyaux ventrolatéraux sont impliqués dans la transmission des informations lumineuses, alors que le noyau dorsomédian possède un rythme endogène de 24 heures pouvant persister dans des conditions d'obscurité constante. Les SCN expriment une variété d'autres neuropeptides tels que la GRP (gastrin-releasing peptide), la somatostatine, la cholécystokinine, la substance P, la galanine, la neurotensine ou la calrétinine (Abrahamson and Moore, 2001).

Lorsque les neurones individuels des SCN sont mis en culture *in vitro*, chacune de ces cellules présente un rythme circadien d'activité pendant plusieurs semaines en culture, indiquant que chaque cellule contient sa propre machinerie moléculaire requise pour générer les oscillations circadiennes (Welsh et al., 1995).

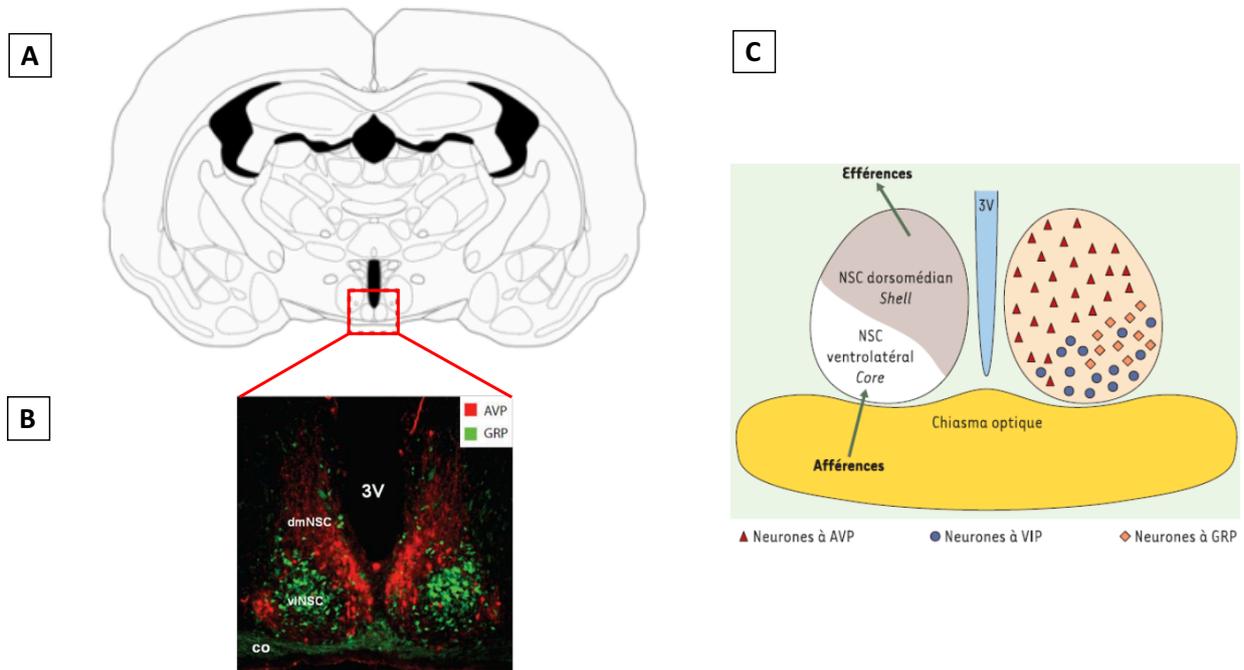


Figure 4 : Localisation et anatomie des SCN chez les rongeurs. (A) Section coronale de cerveau de rongeur avec élargissement sur la zone des SCN situés de part et d'autre du 3ème ventricule. **(B)** Section coronale des SCN avec la partie dorsomédiane (dmNSC) en rouge indiquant l'AVP et la partie ventrolatérale (vlNSC) en vert indiquant les neurones à GRP (Karatsoreos et al., 2004). **(C)** Représentation schématique simplifiée de l'organisation anato-chimique des SCN. La partie cœur (Core) des SCN est localisée ventrolatéralement et elle reçoit les afférences rétiniennes et exprime les neuropeptides VIP et GRP. La partie coquille (Shell) est dorsomédiane, elle envoie les efférences vers d'autres structures hypothalamiques et exprime le neuropeptide AVP (Dardente and Cermakian, 2005). SCN = Noyau Suprachiasmatique 3V = 3ème ventricule ; AVP = arginine vasopressine ; GRP = gastrin-releasing peptide ; VIP = peptide vasoactive intestinal.

Les SCN envoient des projections vers de nombreuses régions cérébrales telles que la zone médiane préoptique (MPO), le noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN), le noyau hypothalamique sous paraventriculaire (SPV), le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH), le noyau thalamique paraventriculaire (PVT), l'IGL et le noyau du lit de la strie terminale (bed nucleus of the stria terminalis, BNST) (Moore and Leak, 2001; Kalsbeek and Buijs, 2002) (Figure 5).

En dehors des SCN, il est maintenant établi que d'autres structures cérébrales possèdent également leurs propres horloges circadiennes (dite secondaires). Cependant, ils ont tous besoin des SCN pour synchroniser leurs activités, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle les SCN pourraient être considérés comme le chef d'orchestre de tous les oscillateurs secondaires, et ce par un mécanisme qui reste encore mal connu. Les bases moléculaires de l'horloge circadienne sont des oscillations complexes mais organisées sous forme de boucles de rétroaction positives et négatives de gènes spécifiques, appelés "gènes horloge" (Figure 6). Ces boucles de régulation impliquent des réactions de dimérisation, phosphorylation et déphosphorylation permettant la genèse du message rythmique sur une période d'environ 24 heures (Dunlap, 1999).

La boucle centrale est positive et comprend deux activateurs de transcription BMAL1 et CLOCK qui forment des hétérodimères et se lient à des séquences E-box dans les promoteurs des gènes Période (*Per1*, *Per2* et *Per3*) et Cryptochrome (*Cry1* et *Cry2*), contribuant à l'activation de leur expression. Dans le cytoplasme, les protéines PER et CRY s'hétérodimerisent, subissent des phosphorylations par une Caséine Kinase puis entrent dans le noyau pour inhiber l'activité du complexe CLOCK/BMAL1, constituant la boucle négative qui ralentit leur propre transcription (Ripperger and Brown, 2010). Les protéines PER et CRY sont dégradées et la répression sur CLOCK/BMAL1 est levée. Un nouveau cycle de 24 heures recommence (Shirogane et al., 2005; Siepka et al., 2007). Une boucle secondaire existe également pour assurer le contrôle rythmique de l'expression de *Bmal1*, et impliquent des gènes codant pour les facteurs de transcription REV-ERB α et ROR qui créent une boucle auxiliaire participant à la stabilisation et à la régulation de la boucle principale. Ils répriment et activent respectivement l'expression de *Bmal1* par fixation compétitive sur les mêmes séquences RRE (retinoic acid-related orphan receptors element)(Ripperger and Brown, 2010). Cette boucle introduit un retard dans l'expression de l'ARNm de *Cry1*. Ce retard étant indispensable pour le bon timing circadien (Teboul et al., 2009).

Les CCG (Clock Controlled Genes), dont le gène principal étant celui de l'AVP sont d'autres gènes contrôlés par l'horloge et qui ont une transcription rythmique dépendante des gènes horloges. Ces gènes, forment la voie de sortie des messages rythmiques dans les SCN (Duffield, 2003). Ils ne participent pas à la genèse de la rythmicité mais sont responsables de sa transmission aux autres structures. Ils possèdent des E-box sur leurs promoteurs, et l'expression de leurs ARNm est rythmique dans le SCN (Lopez-Molina et

al., 1997; Kako and Ishida, 1998; Brown and Schibler, 1999).

Les PVN constituent l'une des cibles principales des SCN, du fait qu'ils jouent un rôle important dans le contrôle des sécrétions neuroendocriniennes, notamment celle de la mélatonine. La sécrétion nocturne de la mélatonine par la PG est sous le contrôle exclusif des SCN. La PG est reliée aux SCN par une voie poly-neuronale comprenant plusieurs structures cérébrales mais dont les PVN constituent le premier relais, avec essentiellement comme neurotransmetteurs le GABA et le glutamate (Klein, 1985; Hermes et al., 1996; Moore, 1996; Kalsbeek et al., 1999; Perreau-Lenz et al., 2004). Ainsi, les SCN contrôlent la libération rythmique de la mélatonine, qui est véhiculée dans la circulation sanguine afin de transmettre le message temporel dans l'organisme entier.

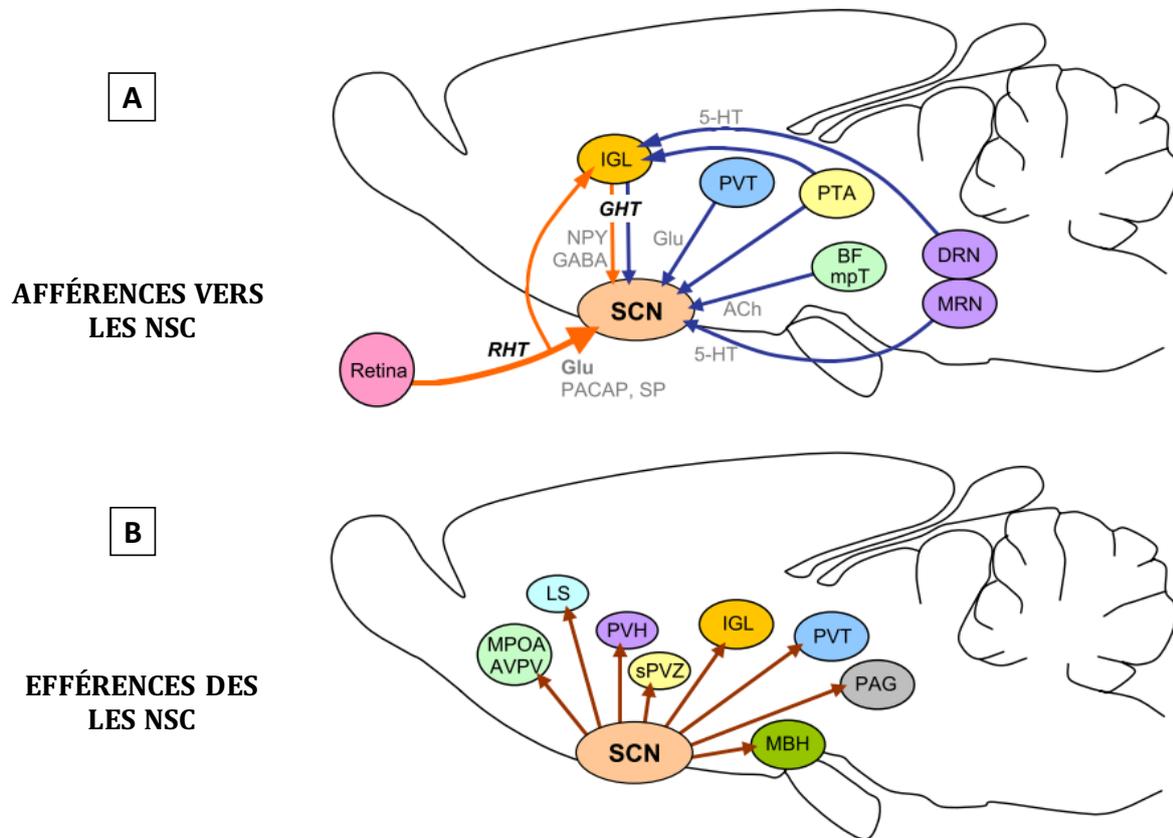
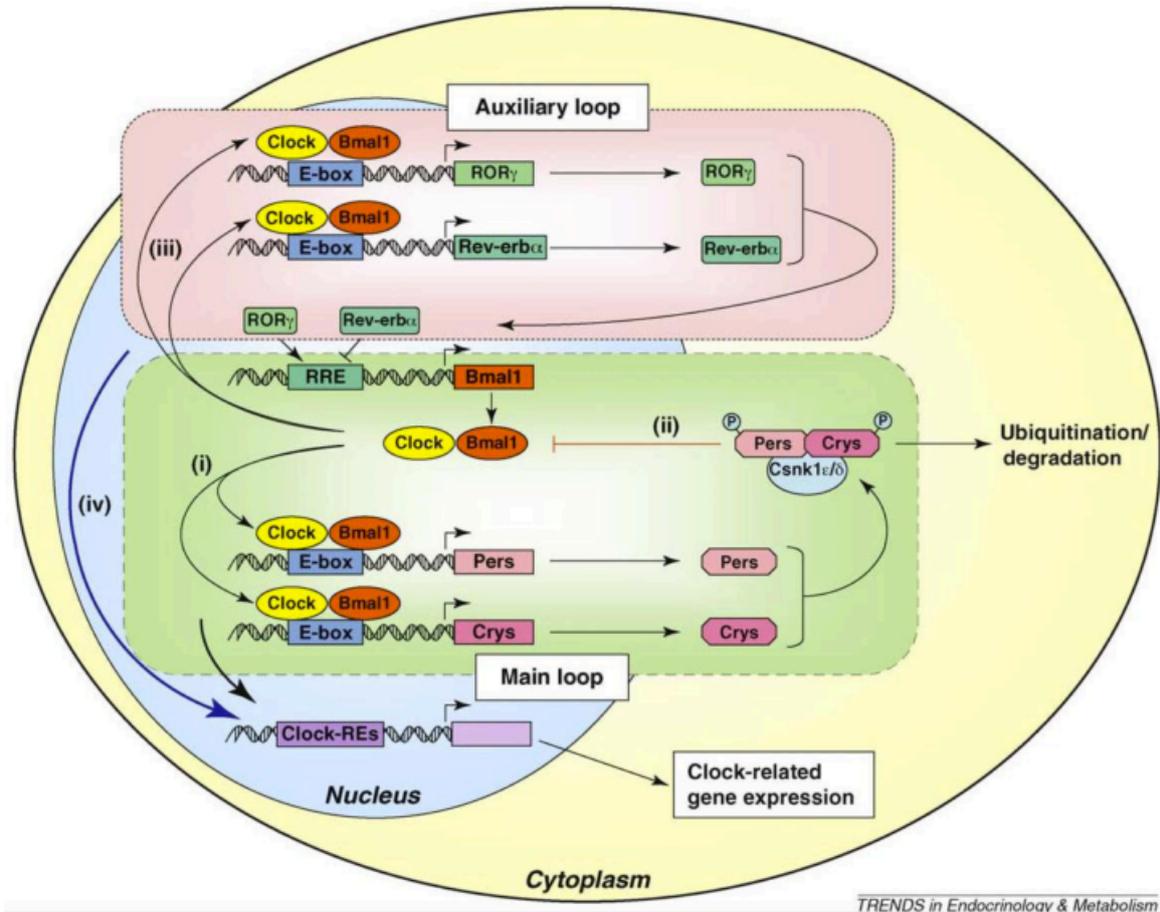


Figure 5 : Coupe sagittale de rongeur représentant les principales afférences et efférences des SCN. (A) Les principales afférences sont représentées avec les flèches oranges pour les entrées photiques et les flèches bleues pour les entrées non-photiques. En gris clair sont les principaux neurotransmetteurs impliqués. **(B)** Les principales efférences des SCN vers d'autres structures cérébrales sont représentées par les flèches oranges (Revel, 2006).

5-HT: 5-hydroxytryptamine; Ach: acétylcholine; BF: basal forebrain (télencéphale basal); DRN: noyau dorsal du raphé; GABA: acide γ -aminobutyrique; GHT: Tractus géniculo-hypothalamique; Glu: glutamate; IGL: feuillet intergéniculé latéral; mpT: mesopontine tectum; MRN : noyau médian du raphé; NPY: neuropeptide Y; PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PTA: zone prétectale; PVT: noyau thalamique paraventriculaire; RHT: tractus rétino-hypothalamique; SCN: noyau suprachiasmatique; SP: substance P.



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire de l'horloge circadienne localisée dans les SCN chez les mammifères. L'hétérodimère CLOCK/BMAL1 stimule la transcription des gènes horloge *Pers* et *Crys*, en se liant sur leurs séquences "E-box". **(i)** Une fois traduit en protéines dans le cytoplasme, PER et CRY forment des hétérodimères et sont phosphorylés par les caséines kinases 1ε et 1δ, **(ii)** puis ils entrent dans le noyau et inhibent l'activité transcriptionnelle des hétérodimères CLOCK/BMAL1 en inhibant ainsi leur propre expression. **(iii)** Les dimères CLOCK/BMAL1 stimulent également l'expression d'autres protéines horloge, les REV-ERB et les ROR, qui créent une boucle auxiliaire qui participe à la stabilisation et à la régulation de la boucle principale ; **(iv)** les différents facteurs de transcription contrôlent l'expression de nombreux gènes de sortie de l'horloge. Un cycle autorégulateur prend environ 24 heures (Nader et al., 2010).

2. La mélatonine

La mélatonine, découverte vers la fin des années 1950, est une neurohormone sécrétée par la PG. Son rôle majeur est de véhiculer les informations temporelles (circadiennes et saisonnières) à l'ensemble de l'organisme. C'est une hormone synthétisée par la PG, qui est innervée par des fibres nerveuses de différentes origines contenant une variété de neurotransmetteurs, dont la noradrénaline est le neurotransmetteur principal (Simonneaux et Ribelayga, 2003). Chez presque tous les vertébrés étudiés, la synthèse et la libération de la mélatonine par la PG suit un rythme circadien. Ce rythme, contrôlé par les SCN, est le même aussi bien pour les espèces diurnes que nocturnes (Garidou et al., 2002) avec toujours des niveaux élevés la nuit et faibles le jour (Klein and Moore, 1979). Les fibres noradrénergiques sympathiques provenant des ganglions cervicaux supérieurs stimulent la synthèse de la mélatonine via deux types de récepteurs adrénergiques ($\alpha 1$ et $\beta 1$) uniquement pendant la nuit.

La mélatonine est une molécule amphiphile qui n'est pas stockée mais immédiatement libérée après sa synthèse par la PG. De plus, sa demi-vie plasmatique est courte (20 min chez le rat (Gibbs and Vriend, 1981; Skene et al., 2001), ce qui permet des changements dynamiques rapides de ses taux circulants. L'ensemble de ces éléments fait de cette hormone un indicateur temporel fiable.

La synthèse de la mélatonine se fait à partir du tryptophane qui est converti en sérotonine ; la sérotonine est ensuite convertie en mélatonine par l'intermédiaire de l'action successive de l'enzyme AA-NAT (aralkylamine N-acétyltransférase) et HIOMT (hydroxyindole O- méthyltransférase). Ces deux dernières enzymes sont essentielles à la synthèse de la mélatonine (Figure 7).

L'activité de l'enzyme AA-NAT exprime des variations journalières de grande amplitude avec une expression plus élevée la nuit. Cette protéine est instable et disparaît rapidement vers la fin de la nuit, étant donc à l'origine de la biosynthèse rythmique de la mélatonine (Klein and Weller, 1970; Gastel et al., 1998). L'activité de l'enzyme HIOMT, quant à elle, est plus stable et présente une augmentation faible pendant la nuit. Au contraire, elle exprime des variations importantes en fonction des changements de la photopériode, son activité étant importante en PC. L'incidence de ses variations sur la sécrétion de la mélatonine reste mineure, par contre cette enzyme est impliquée dans la modulation

photopériodique de l'amplitude du pic de la mélatonine nocturne (Ribelayga et al., 1999a, 1999b; Simonneaux and Ribelayga, 2003).

Chez les vertébrés, la mélatonine est également synthétisée dans la rétine, les glandes de Harder, l'épithélium intestinal, les cellules mononucléaires, les globules rouges ou encore les plaquettes sanguines (Reiter et al., 1983; Pierce and Besharse, 1985; Vakkuri et al., 1985; Iuvone, 1990; Bertrand et al., 2014). Bien que la rétine a une forte capacité à synthétiser la mélatonine, elle ne semble pas contribuer au rythme de synthèse de la mélatonine plasmatique, car même après pinéalectomie, l'amplitude du rythme de la mélatonine est réduite de 60 à 100% (Bittman et al., 1983; Reppert and Sagar, 1983; Vaughan and Reiter, 1986; Coghburn et al., 1987) ce qui est probablement dû à un catabolisme rapide de cette hormone dans la rétine (Bagnara and Hadley, 1970; Cahill and Besharse, 1989). Chez la plupart des mammifères, la PG forme une masse compacte entre l'habenula et les commissures postérieures. Chez les rongeurs, la majeure partie de la PG a migré pour former une glande, dite superficielle située à l'intersection des hémisphères cérébraux et du cervelet. Cette PG superficielle est liée par sa tige à une deuxième partie dite profonde, située sur le toit du troisième ventricule.

La PG, fortement vascularisée, est située en dehors de la barrière hémato-encéphalique. Il a été suggéré que la mélatonine peut être libérée non seulement dans la circulation générale mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien (CSF), conduisant au concept que cette hormone est distribuée dans deux compartiments corporels : le plasma, où elle peut agir sur les organes périphériques et le CSF, pour son action sur le cerveau (Guerra et al., 2010). Chez le mouton, de fortes concentrations de la mélatonine ont été trouvées dans le CSF avec des fluctuations importantes (Reppert et al., 1979; Kanematsu et al., 1989; Skinner and Malpoux, 1999; Tricoire et al., 2002, 2003), mais cela n'a pas été démontré chez les rongeurs, dont la partie profonde de la PG, est très réduite.

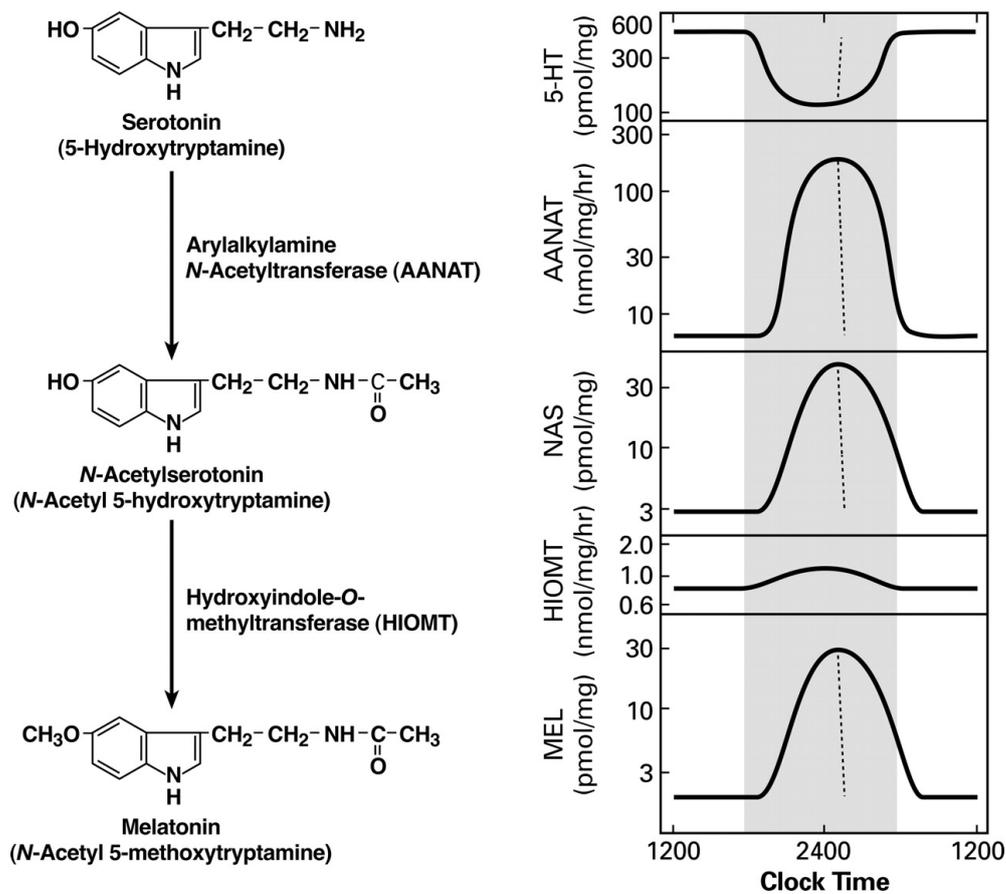


Figure 7 : Voie de synthèse de la mélatonine et rythmes journaliers des indoles de la glande pinéale. L'augmentation de l'activité de l'enzyme AA-NAT exclusivement pendant la nuit est à l'origine de la durée du pic nocturne de la mélatonine, alors que la variation photopériodique de la production de HIOMT entraîne l'amplitude du pic nocturne de la mélatonine. La régulation de ces deux enzymes définit le profil de production de la mélatonine et sa variation photopériodique. Les parties grisées représentent la période nocturne du jour (Klein, 2007).

2.1 Les sites d'action de la mélatonine

La localisation des récepteurs de la mélatonine dans le système nerveux est toujours difficile, d'une part à cause de l'absence d'anticorps spécifiques capables de reconnaître les récepteurs de cette hormone, et d'autre part parce que le niveau d'expression est faible pour être correctement détecté par hybridation *in situ* (ISH). Cependant, le clonage des gènes codant pour les récepteurs de la mélatonine a permis d'identifier trois types de

récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G : le MT1, MT2 et Mel1c. Ces récepteurs sont tous couplés négativement à l'adénylate cyclase (Reppert et al., 1994, 1995).

Les récepteurs MT1 sont présents dans quelques structures cérébrales telles que les SCN, l'hypothalamus mediobasal (MBH), et la pars tuberalis (PT) de l'adénohypophyse. Les récepteurs MT2 sont également exprimés dans les SCN mais aussi dans l'hippocampe et la rétine (Reppert et al., 1995). Dans les SCN, les récepteurs MT1 et MT2 sont tous les deux impliqués dans l'inhibition de l'activité de décharge neuronale et donc la médiation de la synchronisation de l'horloge centrale par la mélatonine (Dubocovich et al., 2005). Cependant, la transmission de l'information photopériodique est médiée uniquement par les MT1 (Jilg et al., 2005; Yasuo et al., 2009). Les récepteurs MT2 ne semblent pas être impliqués dans la régulation des rythmes saisonniers car les espèces saisonnières telles que les hamsters syriens et sibériens n'ont pas de récepteurs MT2 fonctionnels (Weaver and Godson, 1996). Les récepteurs Mel1c, ont été identifiés uniquement chez les vertébrés non-mammifères (Reppert et al., 1996). Cependant un récepteur orphelin, le GPR50 a été identifié comme étant l'orthologue du Mel1C chez les mammifères (Dufourny et al., 2008) mais ce dernier est incapable de se lier à la mélatonine (Drew et al., 1998).

La distribution des récepteurs de la mélatonine varie considérablement d'une espèce à une autre. Chez de nombreuses espèces étudiées, plusieurs sites de liaison de cette hormone ont été identifiés dans plus de 100 cibles centrales et 30 structures périphériques (Masson-Pévet and Gauer, 1994; Morgan and Mercer, 1994; Morgan et al., 1994; Vanecek, 1998). Mais généralement chez les mammifères, seulement deux structures expriment les récepteurs mélatoninergiques : Les SCN et la PT (Morgan and Williams, 1989; Bartness et al., 1993; Morgan and Mercer, 1994; Morgan et al., 1994). Particulièrement, d'autres sites de liaison ont été identifiés chez le hamster syrien à part les SCN et la PT, tel que le DMH, le PVT et la partie médiane du noyau habénulaire latéral (Weaver et al., 1989; Williams, 1989).

2.2 La photopériode et la mélatonine dans le contrôle des fonctions saisonnières

La synthèse de la mélatonine par son expression rythmique est proportionnelle à la longueur de la nuit (Ribelayga et al., 1999). Elle constitue un marqueur endocrinien des saisons ((Goldman, 2001; Simonneaux and Ribelayga, 2003), pour revue). En effet, le

rythme de synthèse de la mélatonine est sous le contrôle exclusif des SCN et les variations de ce rythme sont une conséquence directe de l'intégration de la photopériode par les SCN, qui ajustent la durée de la sécrétion de la mélatonine à la durée de la nuit et la survenue du pic de synthèse de la mélatonine pendant la nuit (Vivien-Roels et al., 1999). Les variations photopériodiques de la mélatonine jouent un rôle crucial dans la régulation saisonnière de la reproduction et d'autres fonctions biologiques comme le poids corporel, la prise alimentaire, la mue du pelage, le système digestif, le système immunitaire et la température corporelle (Hoffmann, 1979; Steinlechner and Heldmaier, 1982; Dausmann et al., 2004; Geiser, 2004; Prendergast and Pyter, 2009).

Les effets de la suppression de la mélatonine par pinéalectomie ou de son augmentation par des injections à durée variable ont été étudiés en vue de mettre en évidence son rôle indispensable dans la régulation des fonctions saisonnières, notamment la fonction de la reproduction. Ce rôle a été démontré pour la première fois en 1965 par Hoffman et Reiter qui ont montré qu'une pinéalectomie avant l'exposition des hamsters syriens à des conditions de PC empêche la régression gonadique normalement induite dans les conditions de PC chez ces animaux (Czyba et al., 1964; Hoffman and Reiter, 1965). De même, une infusion de la mélatonine en PL chez le hamster syrien (Gauer et al., 1994) et sibérien (Hoffmann, 1979), ayant pour but de mimer le profil d'une durée de nuit longue chez ces espèces de jours longs, est à l'origine d'une régression testiculaire, comme si les animaux étaient placés dans des conditions de PC. De la même manière, il a été démontré que chez le hamster syrien, des perfusions répétées de mélatonine de courte durée et séparées de 5h30 induisent une atrophie des gonades. Cette atrophie ressemble à celle normalement observée avec un signal mélatoninergique de longue durée (Pitrosky et al., 1995).

Chez la gerboise mâle, quand les animaux sont pinealectomisés puis transférés en PC, ils restent sexuellement actifs après 10 semaines alors que les animaux contrôles rentrent en quiescence sexuelle dès la 4^{ème} semaine du traitement photopériodique. En PL, une administration de mélatonine 4 heures avant l'extinction de la lumière induit une diminution du volume testiculaire à partir de la 6^{ème} semaine de traitement, alors que les contrôles restent en état d'activité sexuelle (EL Qandil et al., 2002). Ces résultats indiquent que chez la gerboise aussi, la mélatonine est responsable de la transmission de l'information photopériodique à l'axe de la reproduction.

En 1995, Maywood et Hastings ont montré que des lésions de structures contenant des récepteurs de la mélatonine au niveau du MBH, empêchent la régression testiculaire chez les hamsters syriens exposés à une PC (Maywood and Hastings, 1995; Maywood et al., 1996). Chez les hamsters sibériens, une infusion de la mélatonine et une lésion des SCN, tous les deux altèrent la réponse de l'axe reproducteur aux variations saisonnières (Bartness et al., 1991; Badura and Goldman, 1992). Chez le mouton, la région préammillaire de l'hypothalamus contient des sites de liaison de la mélatonine (de Reviers et al., 1989; Malpaux et al., 1998). Les implantations de la mélatonine dans cette structure, empêchent la synchronisation de la reproduction avec la photopériode (Lincoln GA, 1992; Malpaux et al., 1993, 1995, 1998).

L'ensemble de ces données mettent en évidence le rôle important que pourrait jouer les SCN chez les hamsters ou la région préammillaire chez le mouton dans l'intégration du signal mélatoninergique dépendant de la photopériode pour agir sur l'axe de reproduction chez ces espèces. Cependant, les études actuelles ciblent la PT comme site majeur pour l'intégration hypothalamique du signal de la mélatonine chez les espèces saisonnières, et proposent une voie de transmission photopériodique permettant au signal mélatoninergique d'être intégré par la PT puis traduit dans le MBH afin de réguler la fonction saisonnière de la reproduction (Clarke et al., 1983; Hanon et al., 2008; Dardente et al., 2014; Hazlerigg and Simonneaux, 2014, 2015; Saenz de Miera et al., 2014).

3. L'horloge circannuelle

Les rythmes circannuels existent principalement chez les espèces dont la durée de vie se prolonge sur plusieurs saisons de reproduction et ils sont observés en absence de changements environnementaux, lorsque la photopériode est maintenue constante pendant un temps suffisant (Goss, 1980; Canguilhem et al., 1986; Karsch et al., 1989). En l'absence des synchroniseurs externes, ces rythmes suivent une période endogène d'environ 10 mois (Lincoln and Hazlerigg, 2010) et sont donc appelés rythmes circannuels.

Les rythmes circannuels sont observés sur un large éventail d'espèces à travers le règne animal. Chez les vertébrés, ces rythmes assurent plusieurs fonctions vitales et des comportements indispensables à la survie des espèces tels que la reproduction (Goss, 1980; Karsch et al., 1989; Masson-Pévet and Gauer, 1994; Zucker, 2001) la mue (Gwinner, 2003), la migration (Gwinner, 2003), l'hibernation et le métabolisme (Pengelley and

Asmundson, 1975; Canguilhem, 1989; Kondo et al., 2006) ainsi que le rythme circannuel de l'activité locomotrice circadienne par exemple (Bertolucci et al., 1999). Cette rythmicité est considérée comme la base des mécanismes d'adaptation, conservée de façon ancestrale de génération en génération et différente d'une espèce à une autre (Hazlerigg and Loudon, 2008; Helm et al., 2013).

Le mouton est un animal saisonnier de jours courts. Les jours courts d'automne stimulent son axe reproducteur. Lorsque cet animal est transféré artificiellement à des conditions de PL, il subit une inhibition complète de sa fonction de reproduction, suggérant que la PL pourrait aussi être directement inhibitrice chez cette espèce. Ce phénomène limite la naissance de la progéniture au printemps, quand les ressources alimentaires sont les plus abondantes. De façon intéressante, les brebis maintenues en photopériode constante expriment des cycles d'activité de la reproduction avec une période d'environ un an, révélant ainsi la présence d'une horloge circannuelle synchronisant ce rythme annuel de l'activité de la reproduction à un an exactement (Karsch et al., 1989; Wayne et al., 1990; Jansen and Jackson, 1993).

Par analogie avec l'horloge circadienne, ces rythmes circannuels seraient pilotés par une horloge circannuelle. Les rythmes circannuels bien que robustes (Gwinner and Wozniak, 1982; Karsch et al., 1989), présentent également de grandes variations interindividuelles. Ces rythmes sont entrainés par des facteurs externes, notamment les variations annuelles de photopériode.

L'existence de cycles circannuels est particulièrement importante lorsque l'information photopériodique n'est pas accessible ou peu fiable (comme dans le cas des animaux vivants en terriers). Sans repères photopériodiques saisonniers fiables, de nombreux animaux peuvent maintenir des cycles annuels d'activité/quiescence sexuelle, de changements métaboliques, d'hibernation, de mue, ou de migration pendant plusieurs années en comptant sur leur horloge circannuelle endogène (Gwinner, 1986; Nisimura and Numata, 2001; Kondo et al., 2006). Néanmoins, la phase de l'horloge circannuelle et le moment de l'apparition des événements saisonniers sont souvent régulés par les variations annuelles de la photopériode. Ces variations annuelles de la photopériode sont le synchroniseur principal de l'ajustement de la période des rythmes circannuels à un an, de la même façon que le cycle jour/nuit ajuste les rythmes circadiens à une durée d'un jour.

La température pourrait également jouer un rôle, mais elle constitue généralement un signal moins précis que la photopériode pour déterminer le moment précis de l'année pour adapter un processus physiologique quelconque du fait que la température ambiante varie considérablement d'une année à une autre. En effet, il a été montré que la température ambiante pourrait influencer le rythme circannuel de l'hibernation chez les mammifères (Mrosovsky, 1986; El Ouezzani et al., 2011). Elle pourrait par ailleurs agir en combinaison avec la diminution de la photopériode pour arrêter totalement l'activité reproductive, comme cela a été montré chez la caille du japon (Wada et al., 1990; Wada, 1993).

La sensibilité des rythmes circannuels aux changements saisonniers des facteurs environnementaux varie au cours de l'année du fait que les mécanismes de réponse dépendent de l'horloge circannuelle, et la photopériode est généralement considérée comme étant l'indice saisonnier le plus puissant. Par exemple, chez le hamster européen, le transfert artificiel en PC est capable de faire avancer la fin de la saison de reproduction, qui normalement dans les conditions naturelles, a lieu en été vers le mois d'août. Ce changement est plus flagrant quand il est effectué entre mi-mai et juillet, les mois correspondants à la période de la sensibilité des animaux à la PC (Saboureau et al., 1999). Chez la même espèce, le transfert en PL juste après l'involution des gonades en automne, n'a aucun effet. Par contre ce transfert devient capable d'induire une réactivation des gonades vers mi-novembre, indiquant donc une phase de sensibilité à la PL (Monecke and Wollnik, 2004).

La gerboise présente également un cycle annuel de reproduction qui est sous le contrôle d'une horloge circannuelle endogène (Bouhaddou, 2016 ; Chakir, 2001). En effet, des gerboises sexuellement actives capturées au printemps puis maintenues dans des conditions de PL contrôlées de 12 semaines, présentent une régression gonadique similaire à celle obtenue chez des animaux transférés en PC. Cette observation indique que chez la gerboise, comme chez le hamster d'Europe (Masson-Pévet and Gauer, 1994), les variations saisonnières de l'activité de la reproduction peuvent être contrôlées par une horloge circannuelle.

Les mécanismes à l'origine de la rythmicité circannuelle ne sont toujours pas clairement établis. Les changements physiologiques endogènes ayant lieu dans des conditions photopériodiques constantes, ne proviennent pas d'une modification de la configuration

du profil de sécrétion de la mélatonine, qui en fait ne reflète que la durée d'éclairement de l'environnement (Lincoln et al., 2005).

En ce qui concerne l'emplacement de l'horloge circannuelle chez les mammifères, beaucoup d'efforts ont été faits dans le but d'isoler des structures cérébrales soupçonnées d'être le siège de cette horloge, notamment des noyaux hypothalamiques tels que le PVN (Dark and Zucker, 1985) et les SCN (Ruby et al., 1998) mais la lésion de ces noyaux n'abolit pas les rythmes circannuels. Par contre, des études plus récentes suggèrent que cette horloge pourrait être localisée ou au moins agir sur la PT (Saenz de Miera et al., 2014).

En effet, plusieurs études mettent la lumière sur un rôle indispensable de la PT dans la transmission de l'information photopériodique codée par la mélatonine et dans la synchronisation de la fonction de la reproduction avec les saisons. Chez le hamster syrien, une corrélation entre la régression gonadique et la diminution de la densité des récepteurs de la mélatonine dans la PT chez des animaux de PC a été mise en évidence (Gauer et al., 1994). De même, la densité des récepteurs mélatoninergiques de la PT chez des hamsters syriens et des rats photoréfractaires exposés à une PC (27 semaines pour les hamsters et 13 semaines pour les rats) a été similaire à celle observée chez les animaux contrôles maintenus dans des conditions de PL (Gauer et al., 1994), mais ce n'est que récemment que l'implication de la PT dans la génération des rythmes circannuels a été mise en évidence chez le mouton, et ce après déconnexion chirurgicale de la glande pituitaire (Lincoln et al., 2003, 2006), alors que chez le hamster d'Europe, des résultats récents de notre laboratoire suggèrent que la PT peut être le siège de l'horloge circannuelle et que la thyroïdostimuline (TSH), l'hormone libérée par la PT, est la sortie de cette horloge (Saenz de Miera et al., 2014) (cf. chapitre II.5).

4. La photoréfraction

Le phénomène de la photoréfraction représente un autre type de l'effet de la photopériode. Il semblerait qu'il soit déclenché par l'action d'un mécanisme de synchronisation endogène neuroendocrinienne (Prendergast et al., 2000; Gorman. et al., 2001). De façon générale, un état réfractaire à la photopériode est un état physiologique empêchant l'animal de répondre à la photopériode ambiante à laquelle il est soumis. Lorsque les animaux saisonniers sont artificiellement exposés à des conditions de photopériode constante pendant de longues durées, une inversion spontanée de leur état

saisonnier se produit, et ce indépendamment du signal photopériodique reçu. Ce phénomène s'impose généralement dans la régulation des fonctions physiologiques critiques telle que la reproduction saisonnière. Lorsque la photopériode est encore longue, ce processus assure que la reproduction se termine assez tôt pour éviter toute naissance tardive avant la « mauvaise » saison. Ceci est appelé la photoréfraction, c'est la phase où la photopériode n'est plus capable d'agir sur l'axe de la reproduction.

Les espèces qui ne vivent généralement pas plus que deux saisons de reproduction, ou qui passent l'hiver en hibernation, notamment les petits rongeurs saisonniers, ne possèdent généralement pas d'horloge circannuelle. Néanmoins, ils sont capables de générer des mécanismes endogènes indépendamment de la photopériode environnementale, et ce par photoréfraction. Ces espèces sexuellement actives en PL, lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de PC constantes inhibitrices de l'axe reproductif pendant longtemps, elles deviennent réfractaires, cessent de répondre à la photopériode ambiante réelle, et retrouvent spontanément leurs phénotypes de printemps/été caractérisé par une recrudescence gonadique importante. Ce comportement observé au laboratoire est tout à fait similaire à celui observé dans la nature, plus particulièrement lorsque les mammifères hibernants, qui sont dans leurs terriers loin de détecter les changements de la photopériode ambiante, subissent une restauration spontanée de leurs activités sexuelles au printemps avant d'abandonner leurs terriers (Prendergast, 2005). Une fois que la photoréfraction aux conditions de PC est mise en place, ces animaux ne subissent plus d'involution gonadique. Afin de briser cet état photoréfractaire de la PC, ces espèces doivent être exposées en PL (Goldman, 2001; Paul et al., 2008)(Figure 8).

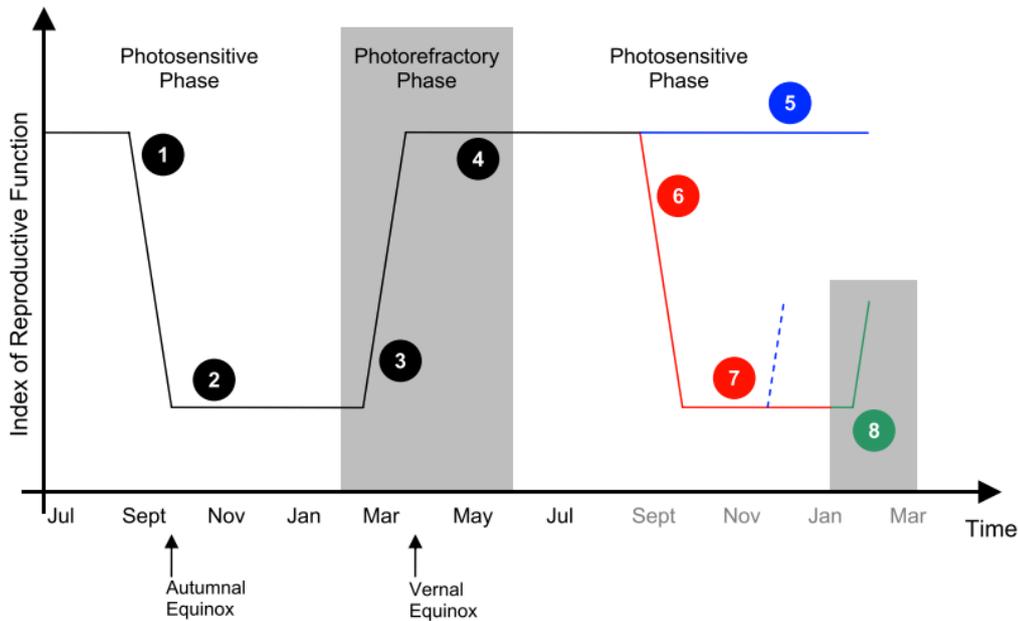


Figure 8 : Phénomène de la photoréfraction du système reproducteur chez le hamster syrien. *Ce prototype étant le même chez une grande variété de mammifères photopériodiques.* Les étapes **(1, 2, 3, 4)** décrivent les situations telles qu'elles se produisent dans la nature dans des conditions naturelles de photopériode et les étapes **(5, 6, 7, 8)** représentent les situations telles qu'elles se produisent dans le laboratoire sous des conditions contrôlées de photopériode. Les deux phases **(1)** et **(2)** correspondent à **la phase de la photosensibilité**, pendant laquelle l'animal réagit aux changements de photopériode. Les phases **(3)** et **(4)** correspondent à **la phase photoréfractaire**, pendant laquelle l'animal ne répond pas à la PC. **(1)** Dans des conditions de PC (conditions d'hiver par exemple), l'activité de la reproduction diminue. **(2)** L'exposition continue à des jours courts provoque une inhibition remarquable de l'axe reproducteur, caractérisée par une régression gonadique chez ces animaux. **(3)** La fonction de la reproduction est complètement restaurée avec l'avènement de la phase de photoréfraction. **(4)** Afin de briser l'état photoréfractaire auquel les animaux sont soumis et retrouver de nouveau leur sensibilité à la photopériode, plusieurs semaines d'expositions à une PL est nécessaire. Lorsque l'animal atteint l'état photoréfractaire, l'axe reproducteur n'est plus inhibé par exposition à une PC. **(5)** L'activité de la reproduction est maintenue tant que les animaux sont maintenus en PL. **(6)** L'exposition à des jours courts induit une diminution de l'activité de la reproduction. **(7)** L'exposition continue à des jours courts est nécessaire pour que l'inhibition de la reproduction ait lieu (Une exposition à des jours longs se traduira par la stimulation de l'axe de la reproduction). **(8)** L'activité reproductrice est restaurée avec l'avènement de la phase réfractaire (même si l'exposition de courte journée se poursuit)(Revel, 2006).

Le phénomène de la photoréfraction ne s'impose pas uniquement dans la fonction de la reproduction saisonnière mais dans tout comportement saisonnier qui nécessite le respect de la saison en cours afin d'assurer la survie de l'espèce, comme les variations saisonnières du poids corporel par exemple. En effet, il a été montré que l'exposition des hamsters sibériens mâles à une PC, normalement connue pour induire une régression testiculaire importante et une perte de 30% du poids corporel chez cet animal (Figala K et al., 1973 ; Steinlechner S et Heldmaier G, 1982), induit un état photoréfractaire du poids corporel de ces animaux à partir de la vingtième semaine après soumission à la PC. Ce phénomène a permis aux animaux sous photoréfraction d'atteindre le même poids corporel observé chez les animaux contrôles maintenus en PL 37 semaines après le transfert en PC (Herwig et al., 2013).

Pendant un état réfractaire, le profil de la mélatonine ne change pas et il continue à correspondre à la photopériode ambiante (Bittman, 1978; Malpaux et al., 1987; Lincoln et al., 2005). Les hamsters photoréfractaires ne répondent pas aux infusions de longue durée de mélatonine (Bittman, 1978), mais de façon intéressante, une exposition de courte durée à la mélatonine arrête l'état photoréfractaire de la même façon que fait une exposition à la PL (Bittman and Zucker, 1981). La photoréfraction et la rythmicité circannuelle jouent des rôles centraux similaires sur l'anticipation de la physiologie saisonnière. L'apparition de ces phénomènes endogènes sont similaires sous photopériode constante et ils sont susceptibles de partager des mécanismes sous-jacents communs (Goldman, 2001; Lincoln et al., 2003; Lincoln and Hazlerigg, 2010). Néanmoins, les mécanismes moléculaires intrinsèques qui génèrent ces rythmes endogènes restent inconnus à l'heure actuelle.

5. Les mécanismes neuroendocriniens impliqués dans la transmission du message photopériodique de la mélatonine vers l'hypothalamus

5.1 L'importance des hormones thyroïdiennes dans la saisonnalité

En 1936, les résultats révolutionnaires de Benoit et ses collègues ont révélé que chez les canards, la glande thyroïdienne est indispensable pour les transitions de la reproduction saisonnière (Benoit, 1936). Après, il a été établi que les hormones thyroïdiennes (TH) jouent un rôle clé dans plusieurs fonctions physiologiques transitoires entre les différents cycles de vie telles que la puberté, le développement et la différenciation du cerveau chez

les mammifères et la métamorphose chez les amphibiens (Mann and Plant, 2010; Laudet, 2011; Williams, 2008). L'implantation chirurgicale de micro-implants permettant de libérer des petites quantités de TH dans le cerveau de la brebis a mis en évidence l'implication de cette hormone dans la transmission du message photopériodique de jour long et a révélé son action probable dans le MBH pour réguler la saisonnalité de la reproduction (Viguié et al., 1999; Anderson et al., 2003).

L'implication des TH dans la régulation saisonnière de la reproduction a été particulièrement mise en évidence depuis que des études ont démontré qu'une thyroïdectomie, effectuée au cours de la saison de la quiescence sexuelle, est capable de réactiver immédiatement l'axe de la reproduction (Jacquet et al., 1986 ; Parkinson et al., 1995). Cependant, il a été montré que l'activité de la reproduction persiste quand l'ablation de la glande thyroïdienne est effectuée en PL chez les oiseaux (Woitkewitsch, 1940; Nicholls et al., 1984) les moutons (Nicholls et al., 1988; Webster et al., 1991) et les cerfs (Anderson and Barrell, 1998).

Les mécanismes neuroendocriniens via lesquels le message mélatoninergique parvient aux TH pour réguler la fonction saisonnière de la reproduction sont restés un grand point d'interrogation pendant longtemps. C'est la découverte de la PT, une petite structure hypophysaire qui exprime des récepteurs de la mélatonine et de la TSH qui a permis de faire le lien entre les variations annuelles de la photopériode/la mélatonine et le rôle des TH dans le contrôle saisonnier des fonctions biologiques.

5.2 Régulation saisonnière de TSH dans la pars tuberalis

La PT, partie rostrale de l'adénohypophyse, a été considérée pendant des décennies comme un vestige embryologique indifférencié de l'hypophyse dont la fonction principale est de fournir un support mécanique pour les vaisseaux du système porte hypothalamo-hypophysaire (Gross, 1984). Cependant, la découverte que cette structure possède la plus grande densité de récepteurs à mélatonine chez tous les mammifères étudiés a plaidé en faveur d'un rôle spécifique de la PT dans l'effet physiologique de la mélatonine (Weaver and Reppert, 1990).

La mélatonine, en se fixant sur les récepteurs MT1 de la PT, contrôle la synthèse et la sécrétion d'une hormone, la TSH. En effet, le récepteur MT1 co-localise avec la sous unité β de la TSH (TSH β) dans les cellules de la PT (Dardente et al., 2003). De plus il est

maintenant bien établi que la photopériode, à travers la mélatonine, régule l'expression de l'ARNm de la TSH chez les de nombreux mammifères (Bockmann et al., 1996; Dardente et al., 2003; Revel et al., 2006c; Ono et al., 2008; Wagner et al., 2008). Les mécanismes moléculaires responsables de cette régulation photopériodique de la TSH dans la PT sont similaires chez les oiseaux et les mammifères, même si chez les oiseaux c'est la variation photopériodique de la lumière, plutôt que la mélatonine, qui régule l'expression de la TSH via des photorécepteurs profondément enfouis dans la partie antérieure de l'hypothalamus médian (Halford et al., 2009; Nakane and Yoshimura, 2010, 2014).

Chez les mammifères, le signal mélatoninergique régule l'expression saisonnière de la TSH via une régulation photopériodique de l'expression du facteur de transcription *Eya3* (Dardente et al, 2010 ; Masumoto et al., 2010). La transcription de *Eya3* dans la PT est sensible au contrôle circadien de l'horloge par la mélatonine et est soumise à une régulation activatrice par l'AMPc. En PC l'expression élevée de *Eya3* est inhibée suite à la répression de l'AMPc par la mélatonine, alors que sous PL, l'inhibition est levée sur la l'AMPc entraînant ainsi l'expression de *Eya3* d'une manière circadienne (Dardente et al., 2010; Masumoto et al., 2010). Cette double régulation de l'expression de *Eya3* par la mélatonine est à l'origine de son expression photopériodique.

5.3 Rôle de la TSH de la PT et des tanocytes dans la régulation neuroendocrine des fonctions saisonnières

5.3.1 Les tanocytes : siège de la synthèse des TH et relais essentiel du message photopériodique entre la TSH et l'hypothalamus

La TSH agit dans la partie basale de l'hypothalamus sur les tanocytes, des cellules bipolaires allongées qui tapissent la cavité du troisième ventricule et dont l'implication dans la régulation de la fonction de reproduction a bien été établie depuis quelques années. En effet, les tanocytes expriment les récepteurs de la TSH, et l'activation de ces récepteurs augmentent l'expression de la déiodinase 2 (*Dio2*), une enzyme qui active l'hormone thyroïdienne de sa forme circulante ; la thyroxine (T4) en sa forme active ; la tri-iodothyronine (T3) et augmente par conséquent les niveaux de T3 dans le MBH, et ce chez beaucoup de mammifères saisonniers étudiés jusqu'à aujourd'hui (Revel et al., 2006c; Hanon et al., 2008, 2010; Ono et al., 2008; Dardente, 2012; Klosen et al., 2013; Bolborea et al., 2015).

En 2003, une découverte importante a permis de dévoiler un lien remarquable entre la TSH et la reproduction saisonnière. En effet, il a été montré que le transfert en PL induit une expression rapide de la Dio2. L'augmentation de l'expression de la Dio2 en PL a été associée à une augmentation des niveaux de la T3 et de la T4 dans le MBH, régulant ainsi la réponse photopériodique des gonades chez les oiseaux (Yoshimura et al., 2003). Depuis, il a été montré qu'une autre enzyme du métabolisme des TH, la déiodinase 3 (Dio3) est également exprimée dans les tanocytes et est régulée négativement par la TSH (Hanon et al., 2010). La Dio3 catalyse à la fois la conversion de la T4 en sa forme biologique inactive, la T3 reverse, et la conversion de la T3 en T2 (diiodothyronine) aussi inactive. Ainsi, la régulation opposée de Dio2 (élevée en PL) et Dio3 (élevée en PC) régule l'équilibre entre la T4 et la T3 selon la photopériode, avec toujours une production plus élevée de T3 en PL. De façon intéressante cette augmentation des niveaux hypothalamiques de T3 en PL s'observe aussi bien chez les animaux de jours longs que chez ceux de jours courts (Revel et al., 2006c; Barrett et al., 2007; Hanon et al., 2008, 2010; Ono et al., 2008; Dardente, 2012; Klosen et al., 2013; Saenz de Miera et al., 2014; Bolborea et al., 2015), indiquant que ces deux types d'espèces utilisent les mêmes mécanismes d'intégration photopériodique de la mélatonine. Cependant, la part active de Dio2 et Dio3 présente des différences interspécifiques. Ainsi chez le hamster syrien, la régulation photopériodique de Dio2 est beaucoup plus importante que celle de Dio3 alors que c'est l'inverse chez le hamster sibérien. Chez le hamster d'Europe et le mouton, les deux enzymes semblent également être importantes (Köhrle, 1999; Yoshimura et al., 2003; Revel et al., 2006c; Barrett et al., 2007; Yasuo et al., 2007; Hanon et al., 2008, 2010; Saenz de Miera et al., 2014).

Chez le hamster européen, il a été suggéré que la PT est le siège de l'horloge circannuelle et que la TSH est régulée par cette horloge. En effet, chez les hamsters pinealectomisés et exposés à une photopériode constante, l'expression de la TSH dans la PT montre une variation circannuelle robuste avec des niveaux plus élevés en PL subjective attestée par une reproduction activée et un poids corporel élevé (Saenz de Miera et al., 2014).

Deux études récentes ont démontré l'importance de la TSH (Klosen et al. 2013) et de la T3 (Barrett et al., 2008) centrales dans le contrôle des fonctions saisonnières. Notre laboratoire a en effet montré qu'une administration centrale de la TSH chez les hamsters syrien et sibérien, maintenus en PC, augmente l'expression de la Dio2 dans les tanocytes et réactive complètement la fonction de la reproduction chez les deux espèces de hamsters et le poids corporel chez le hamster sibérien (Klosen et al., 2013). Chez le

hamster sibérien transféré en PC, des micro-implants intra-hypothalamiques de T3 ont empêché l'inhibition de l'activité reproductrice et la réduction du poids corporel (Ebling and Barrett, 2008).

L'ensemble de ces résultats a permis de proposer un modèle d'intégration des variations photopériodiques impliquant la TSH de la PT et les Dio2/3 des tanocytes (Figure 9). En effet, pendant les nuits longues en automne/hiver, la production accrue de mélatonine inhibe la synthèse et la sécrétion de la TSH par la PT, ce qui a pour effet l'arrêt de l'activation de la Dio2 et éventuellement une augmentation de l'activité de la Dio3, entraînant une réduction des niveaux de T3 intra-hypothalamiques. La T3 semble contrôler plusieurs axes fonctionnels notamment celui de la reproduction, par des mécanismes encore en cours d'élucidation (voir chapitre III.4).

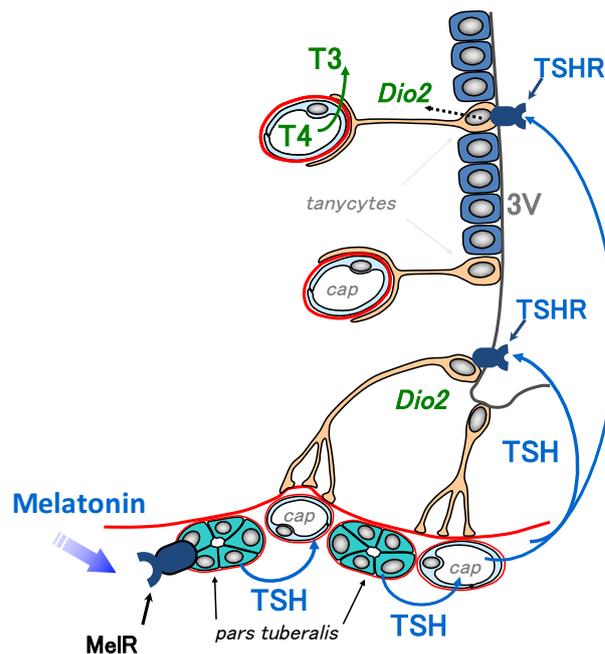


Figure 9 : La régulation des niveaux de T3 dans l'hypothalamus mediobasal par la mélatonine via une activité de Dio2 médiée par la TSH (Klosen *et al.*, unpublished)

5.3.2 Plasticité des tanocytes et le contrôle central de la fonction de la reproduction

Chez les rongeurs femelles, il a été montré que lors du cycle oestrien, les tanocytes présentent une plasticité de leurs prolongements, appelés pieds tanocytaires, jusqu'au méninges de l'hypothalamus et de l'éminence médiane afin de moduler la sécrétion de la GnRH durant le cycle reproducteur (King and Rubin, 1994; Prevot et al., 1999, 2000; Prevot, 2002). Les terminaisons nerveuses de la GnRH dans l'éminence médiane sont entourées par ces pieds tanocytaires et sont empêchées d'accéder à leur zone de libération au niveau de la lame basale parenchymateuse. Au moment du pic préovulatoire de la GnRH, les prolongements des tanocytes se rétractent, permettant donc un contact neurovasculaire direct des terminaisons des neurones à GnRH.

Une plasticité structurale similaire des pieds tanocytaires pourrait être impliquée dans la régulation saisonnière de la fonction de la reproduction. En effet, chez la caille japonaise, les tanocytes pourraient moduler localement la libération de la GnRH en contrôlant l'accès des terminaisons des neurones GnRH au système porte hypothalamo-hypophysaire en fonction des saisons (Yamamura et al., 2004). De plus, chez le hamster sibérien, il a été montré que la morphologie des tanocytes ainsi que l'expression de la vimentine et de la NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) sont diminués en PC de façon dépendante de la mélatonine (Kameda et al., 2003; Bolborea et al., 2011). Ces processus de plasticité pourraient participer aux variations saisonnières de la libération de la GnRH entre les conditions de PC et PL, en plus des variations saisonnières de l'expression de la production de la GnRH.

5.3.3 Rôle des tanocytes dans la régulation de la balance énergétique

Depuis longtemps, l'idée que les tanocytes pourraient contribuer au contrôle de la balance énergétique a été fortement proposée, même si elle était spéculative. En effet, les tanocytes projettent vers les noyaux hypothalamiques qui contrôlent l'homéostasie énergétique et ils semblent entrer en contact étroit avec les neurones de ces noyaux (Coppola et al., 2007; Levin et al., 2011) (Figure 10). De même, les tanocytes expriment plusieurs gènes importants dans la régulation du poids corporel et de la balance énergétique, et ceci en réponse à une restriction alimentaire ou à des changements de la photopériode (Ebling and Barrett, 2008).

Ainsi, il a été montré que la privation de nourriture augmente l'expression de la Dio2 et de la MTC8 ; un transporteur polypeptidique de T3 et T4 et à travers lequel la T4 est captée par les tanocytes de la circulation générale (Barrett et al., 2006; Coppola et al., 2007). L'augmentation de l'expression de ces deux éléments en état de jeûne, permet une augmentation de la production locale de T3 dans l'hypothalamus qui est très importante dans la régulation des réponses du NPY, dans le noyau arqué (ARC), à la privation de nourriture (Coppola et al., 2007). En parallèle, il a été montré que des implants de T3 inhibent la perte de poids et le catabolisme des dépôts de graisse, qui se produisent normalement dans des conditions de PC (Ebling and Barrett, 2008; Herwig et al., 2009; Murphy et al., 2012).

Les tanocytes expriment également un récepteur proche des récepteurs MT1 et MT2 de la mélatonine, le GPR50, dont l'implication dans le métabolisme énergétique a récemment été proposée. L'homologie du GPR50 avec les récepteurs de la mélatonine, est suffisante pour que ce récepteur soit considéré comme un troisième membre des récepteurs de cette famille, bien qu'il soit incapable de lier la mélatonine. Le GPR50 est exprimé dans les tanocytes mais également dans différents noyaux du MBH (Sidibe et al., 2010; Batailler et al., 2012). Le rôle de ce récepteur, dont on ne connaît pas de ligands sélectifs, a été analysé à partir de souris KO pour le gène *Gpr50*. En effet il a été montré que les souris dont le récepteur GPR50 est invalidé sont résistantes à l'obésité (Ivanova et al., 2008). Dans les tanocytes, le GPR50 pourrait être impliqué dans des processus saisonniers de la balance énergétique car en PC, une diminution significative du GPR50 dans les tanocytes est observée chez le hamster sibérien et cette faible expression est corrélée avec la tendance de l'animal à entrer en torpeur pendant cette période de l'année (Barrett et al., 2006).

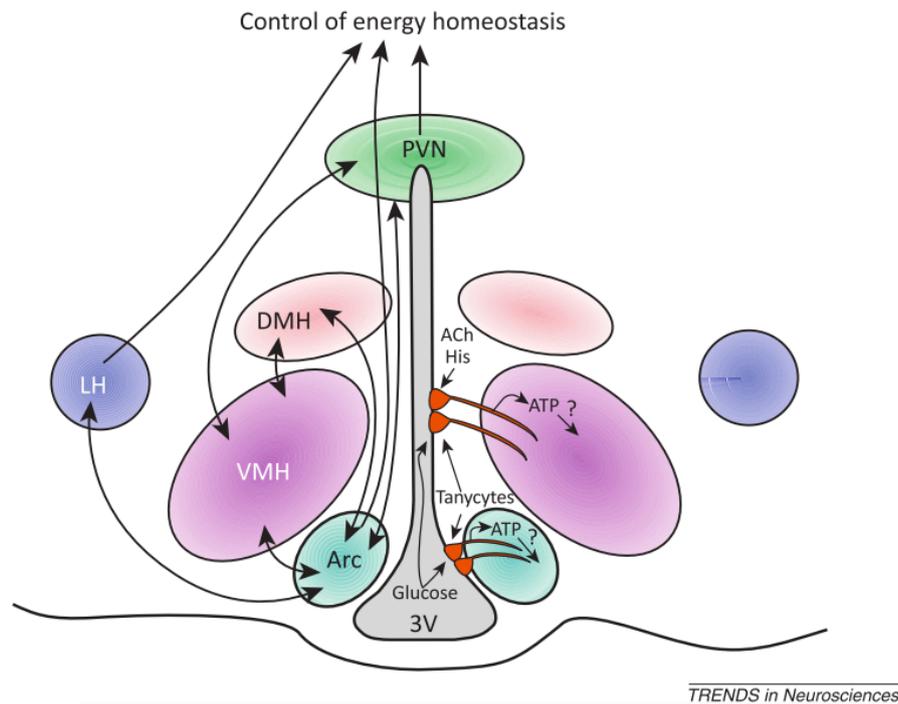


Figure 10 : Illustration schématique des projections des tanocytes vers certains noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique.

PVN : noyau paraventriculaire ; ACh : acétylcholine ; His : histamine ; LH : Hypothalamus latéral (Bolborea and Dale, 2013).

Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence la contribution des tanocytes dans la balance énergétique en impliquant la neuromédine U (NMU), un neuropeptide du tube digestif et du système nerveux central impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique (Budhiraja and Chugh, 2009). La NMU exerce ses fonctions physiologiques en se liant sur deux récepteurs : la NMU1, exprimée de façon abondante dans les tissus périphériques et la NMU2 exprimée dans les tanocytes, l'ARC et le DMH (Graham et al., 2003). Des injections intracérébrales de la NMU diminuent la prise alimentaire et augmente l'activité physique, les dépenses énergétiques et la thermogenèse chez le rat, tandis que les souris NMU-KO présentent une hyperphagie, une augmentation du poids corporel, et une réduction des dépenses énergétiques (Budhiraja and Chugh, 2009). L'augmentation spécifique de ce récepteur dans les tanocytes de rats F344 en PL suggère que l'action de la NMU sur les tanocytes pourrait être primordiale pour le contrôle saisonnier de la balance énergétique (Helfer et al., 2012).

III. LE CONTRÔLE CENTRAL DE L'AXE HYPOTHALAMO-PITUITO-GONADIQUE

1. Description neuroanatomique et fonctionnelle

L'activité de la reproduction est contrôlée par un axe complexe comprenant l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades, d'où l'appellation de l'axe hypothalamo-pituito-gonadique (HPG). Le système hypothalamique responsable de la régulation centrale de la reproduction est constitué des neurones produisant la GnRH. Ces neurones sont localisés de façon éparpillée dans l'aire préoptique (POA) médiane où ils libèrent la GnRH qui, via la circulation porte hypothalamo-hypophysaire, active la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires ; l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH).

La libération de la GnRH doit être pulsatile pour induire la sécrétion de la LH et de la FSH, car les récepteurs de la GnRH se désensibilisent très facilement. Cette sécrétion pulsatile est assurée par un système "générateur de pulsations de la GnRH" (Knobil, 1980), dont la localisation et le fonctionnement restent encore un mystère. En effet, il peut être dicté par l'activité intrinsèque des neurones à GnRH, comme il peut nécessiter la contribution d'afférences hypothalamiques assurant un équilibre dynamique entre des signaux excitateurs et inhibiteurs (Clarke and Pompolo, 2005; Ojeda et al., 2006, 2010; Maeda et al., 2010; Terasawa et al., 2010) (Figure 11).

Un grand nombre de neurotransmetteurs et de facteurs de croissance jouent un rôle important dans la régulation de la libération pulsatile de la GnRH, et sont aujourd'hui l'objet d'intenses recherches (Ojeda et al., 2006, 2010). Ainsi le glutamate, la norépinephrine (NE), le GABA, les peptides opioïdes endogènes (EOP), le NPY, la neurokinine B (NKB), les kisspeptines (Kp) et les RF-amide related peptides (RFRP) sont tous capables de réguler la sécrétion de la GnRH chez les mammifères (Clarke et al., 2009; García-Galiano et al., 2010; Lehman et al., 2010; Pralong, 2010; Smith and Clarke, 2010; Herbison and Moenter, 2011).

La GnRH, libérée de façon pulsatile, agit sur l'adénohypophyse où elle se lie à son récepteur couplé à la protéine Gq11 situé sur les cellules gonadotropes. L'activation de ces récepteurs active la voie de la phospholipase C, qui stimule la libération du calcium intracellulaire par l'intermédiaire de la protéine kinase C et d'un système d'IP3 (Bliss et al., 2010).

Chez les mâles, la LH stimule la production de la testostérone par les cellules de Leydig des testicules et la FSH induit la spermatogenèse dans les cellules de Sertoli. Chez les femelles, la FSH initie la croissance folliculaire tandis que la LH stimule la production des androgènes et des œstrogènes à partir des cellules de la thèque des ovaires et participe à la stimulation de l'ovulation par son pic pré-ovulatoire. L'axe HPG est fortement soumis à l'effet rétroactif des hormones sexuelles agissant principalement dans l'hypothalamus. Chez les mâles, la testostérone inhibe la libération de la GnRH, alors que chez les femelles l'œstradiol exerce une action inhibitrice sur la libération de la GnRH, sauf avant l'ovulation où ce feedback devient activateur pour conduire à la montée pré-ovulatoire de la LH (Levine, 2015).

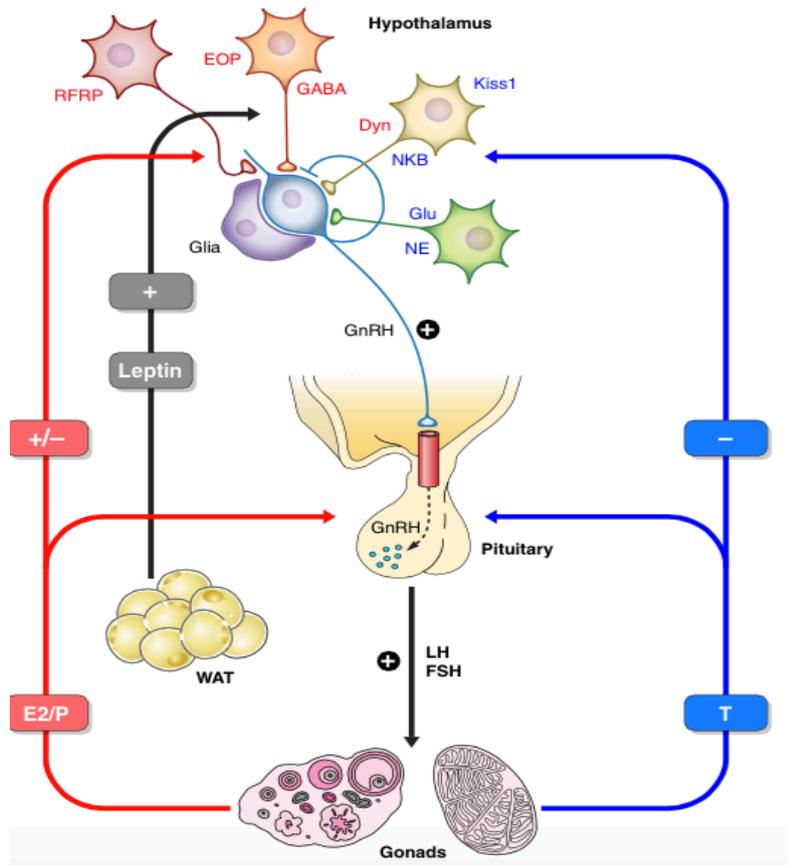


Figure 11 : Représentation schématique des principaux éléments de l'axe HPG. Les neurones hypothalamiques à GnRH, reçoivent des inputs trans-synaptiques et gliaux. La GnRH, libérée dans le système porte hypophysaire contrôle la sécrétion des gonadotrophines, la LH et la FSH. Ces gonadotrophines stimulent la maturation et régulent l'activité des gonades (ovaires et testicules). La fonction de l'axe HPG est sous la régulation de plusieurs signaux centraux et périphériques. Les neurotransmetteurs centraux impliqués dans le contrôle des neurones à GnRH sont inhibiteurs (en rouge : RFRP, EOP, GABA, Dyn) et excitateurs (en bleu : Kiss1, NKB, Glu, NE). Les signaux périphériques comprennent les stéroïdes sexuels qui exercent un contrôle rétroactif (la testostérone testiculaire (T) mène une action inhibitrice sur la GnRH et sur la sécrétion des gonadotrophines tandis que les stéroïdes ovariens, principalement l'œstradiol (E2) et la progestérone (P), peuvent effectuer les deux actions de rétroaction, un feedback négatif ou positif selon le stade du cycle ovarien). D'autres régulateurs périphériques de l'axe HPG sont des hormones métaboliques, telles que la leptine, produite par le tissu adipeux blanc (WAT). (Modifié après Pinilla et al., 2012)). Glu : Glutamate ; NKB : Neurokinine B ; NE : norépinephrine ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; les peptides opioïdes endogènes (EOP) ; Dyn : Dynorphine. Kiss1 : Kisspeptine ; RFRP : RF-amide related peptides.

2. Variations saisonnières des neurones à GnRH

L'activité saisonnière de l'axe HPG est médiée par les neurones à GnRH quelque soit la photopériode. Ainsi, chez le hamster syrien mâle, des injections de la GnRH dans des conditions de PC et PL produisent les mêmes effets (Pickard and Silverman, 1979). De même, les hypophyses antérieures des hamsters adaptés à la PC mises en culture sont capables de libérer la LH et la FSH en réponse à des sécrétions de la GnRH (Bacon et al., 1981; Steger et al., 1983; Steger and Gay-Primel, 1990). De plus, chez le hamster syrien, la photopériode ne modifie pas l'expression de l'ARNm de la GnRH (Brown et al., 2001) ni le nombre ni la morphologie de ces neurones (Urbanski et al., 1991). Au contraire, chez la gerboise, la GnRH affiche des variations saisonnières importantes dans la POA, le MBH et l'éminence médiane (El Ouezzani et al., 2000; El Qandil et al., 2004).

Bien que la régulation saisonnière de la reproduction soit médiée par la mélatonine, les récepteurs de la mélatonine n'ont pas été identifiés dans la POA (Weaver et al., 1989; Williams, 1989), suggérant que les neurones à GnRH ne sont probablement pas la cible directe de la mélatonine. Dans l'ensemble, les travaux actuels suggèrent que la mélatonine régule l'activité des neurones à GnRH par des neurones en amont, probablement en agissant sur des structures localisées dans le MBH. Des travaux réalisés au cours de ces dernières années ont mis l'accent sur l'identification de neuropeptides régulateurs agissant en amont de l'activité neuronale de la GnRH, et qui pourraient être impliqués dans la régulation photopériodique de la fonction de la reproduction. Il s'agit de deux peptides hypothalamiques appartenant à la famille des peptides RF-amide ; le Kisspeptine et le RFRP-3.

3. Les peptides RF-amides

La famille des RF-amides est une grande famille de peptides phylogénétiquement riche, qui possède un large profil d'activité biologique. Ces peptides partagent tous la région C-terminal Arg-Phe-NH₂, d'où l'appellation des RF-amides.

Ces peptides, conservés au cours de l'évolution, jouent des rôles majeurs dans le contrôle de la régulation centrale de plusieurs fonctions physiologiques vitales telles que la douleur, la reproduction, la prise alimentaire et les dépenses énergétiques (Pinilla et al., 2012; Dodd and Luckman, 2013; Jhamandas and Goncharuk, 2013; Ubuka and Tsutsui, 2014).

Les modes d'expression des peptides RF-amides et leurs récepteurs suggèrent que ces peptides agissent aussi bien au niveau central que périphérique. Chez les vertébrés, il est maintenant connu qu'il existe au moins cinq familles des peptides de la famille des RF-amides et leurs récepteurs qui agissent tous à travers des récepteurs couplés à la protéine G. Parce que plusieurs groupes de recherche ont parfois identifié les mêmes gènes et leur ont donné des noms différents, Dockray (2004) a proposé une classification complète, et a proposé les termes allant de farp-1 à farp-5 pour désigner ces gènes dans l'ordre où ils ont été décrits (Dockray, 2004)(Tableau 1).

Jusqu'à présent, les rôles les plus étudiés des peptides de cette famille sont principalement l'implication dans la modulation de la nociception et du système cardiovasculaire via le peptide FF (NPFF) et le neuropeptide AF (NPAF) (Yang et al., 1985; Allard et al., 1995; Panula et al., 1999; Dong et al., 2001), la régulation de la prise alimentaire via le peptide 26RFa (Navarro et al., 2006; Lectez et al., 2009) et la modulation de la fonction de l'axe HPG via les kisspeptines et les RFRP-3/GnIH.

Tableau 1 : La famille des peptides RF-amides chez les vertébrés. Seuls les peptides endogènes identifiés sont représentés dans ce tableau, à part ceux avec (*) chez lesquels la séquence déduite de l'ADNc est représentée. (X = L ou Q). Pour chaque famille, les motifs contenant les résidus d'acides aminés conservés sont représentés par des lettres en couleur. (Revel, 2006),

RFamide Gene & Group Name	Putative peptide products	Animal	Sequence	Putative Receptor	Receptor Gene
<i>farp-1</i>	NPFF	Bovine / Rat / Mouse	FLFQPQRF-NH2	GPR74 / NPFF-2 / HLWAR77	<i>rfr-3</i>
	NPA-NPFF	Rat	NPAFLFQPQRF-NH2		
NPFF Group	NPAF	Human	AGEGLNSQFWSLAAAPQRF-NH2	(GPR147 / NPFF-1 / OTT7022)	
	NPAF	Bovine	AGEGLSSPFWSLAAAPQRF-NH2		
	NPSF	Bovine / Human / Rat / Mouse	SLAAPQRF-NH2		
<i>farp-2</i>	PrRP31	Bovine	SRAHQHSMETRPDINPAWYAGRGIRPVGRF-NH2	GPR10 / hGR3 / UHR-1	<i>rfr-1</i>
	PrRP31	Rat *	SRAHQHSMETRPDINPAWYTGIRPVGRF-NH2		
	PrRP31	Human *	SRTRHSMETRPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH2		
	PrRP20	Bovine	TPDINPAWYAGRGIRPVGRF-NH2		
	PrRP20	Rat *	TPDINPAWYTGIRPVGRF-NH2		
	PrRP20	Human *	TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH2		
	C-RFa	Fish	SPEIDPFWYVGRGVRPIGRF-NH2		
LPXRFa Group	LPLRFa	Chicken	LPLRF-NH2	GPR147 / NPFF-1 / OTT7022	<i>rfr-2</i>
	GnlH	Quail	SIKPSAYLPLRF-NH2		
	GnlH-RP-1	Quail *	VPNSVANLPLRF-NH2		
	GnlH-RP-2	Quail	SSIQSLNLLPQRF-NH2		
	RFRP-1 / NPSF	Bovine	SLTTFEEVKDPAFKIKMKNKPVVKNMPFSAANLPLRF-NH2		
LPXRFa Group	RFRP-3 / NPVF	Bovine	AMAHLPRLGKNREDSLSRWVPLPQRF-NH2	(GPR74 / NPFF-2 / HLWAR77)	
	RFRP-3 / NPVF	Rat	ANMEAGTMSHFPSLPQRF-NH2		
<i>farp-3</i>	fGRP / R-RFa	Bullfrog / Green Frog	SLKPAANLPLRF-NH2	GPR54 / AXOR12 / OTT1175	<i>rfr-4</i>
	fGRP-RP-1 / INRP	Bullfrog	SIPNLQRF-NH2		
	fGRP-RP-2	Bullfrog	YLSGKTKVQSMANLPQRF-NH2		
	fGRP-RP-3	Bullfrog	AQYTNHFVHSLDTLPLRF-NH2		
	gflPXRFa-	Goldfish	SGTGLSATLPQRF-NH2		
<i>farp-4</i>	Metastin / kisspeptin	Human	GTSLSPPESSGRQPGLSAPHSRQIPAPQGA- -VLVQREKDLPNYNWNSFGLRF-NH2	GPR103 / AQ27 / SP9155	<i>rfr-5</i>
	Kisspeptin Group	Human			
<i>farp-5</i>	P518 / 26RFa	Human *	TSGPLGNLAEELNGYRRKGGFSFRF-NH2	GPR103 / AQ27 / SP9155	<i>rfr-5</i>
	P518 / 26RFa	Mouse *	ASGPLGTLAEEELSSYSRGKGGFSFRF-NH2		
	P518 / 26RFa	Rat *	ASGPLGTLAEEELSSYRRKGGFSFRF-NH2		
QPRF Group	26RFa	Frog	VGTALGSLAEELNGYRRKGGFSFRF-NH2		
	QRFP	Human	EDEGSEATGFLPAAGEKTSGLGNLAEELNGYRRKGGFSFRF-NH2		

3.1 Les kisspeptines

3.1.1 Découverte, mode et sites d'action des kisspeptines

Les kisspeptines, découverts au cours des années 2000 constituent la clé de voûte du contrôle central de l'axe reproducteur, allant du déclenchement de la puberté au contrôle de l'ovulation. Il s'agit d'un groupe de peptides dérivé du même précurseur, composé de 145 acides aminés et clivé en plusieurs formes actives avec des séquences variantes de 10 à 54 acides aminés (Kotani et al., 2001 ; Ohtaki et al., 2001). Il est d'abord clivé en 54 acides aminés, appelé Kp54. Ensuite, par clivages successifs, la Kp54 donne des formes plus courtes contenant 14, 13 ou 10 acides aminés nommées respectivement Kp14, Kp13 et Kp10 (Kotani et al., 2001 ; Ohtaki et al., 2001). Ces formes sont toutes biologiquement actives et ont toutes en commun les dix derniers acides aminés de la partie C-terminale, qui est hautement conservée chez les mammifères (Figure 12).

La cible moléculaire des kisspeptines est le récepteur GPR54 (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001), maintenant appelé Kiss1r. Il s'agit d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à la protéine G, particulièrement à la protéine Gq11.

En 1996, le gène codant pour les kisspeptines *Kiss1*, a été découvert par Lee et ses collaborateurs (Lee et al., 1996). Le Kp54 était d'abord connu pour ses propriétés anti-métastatiques et a été désigné sous le nom de métastatine, mais en 2003 des travaux ont montré que des mutations du gène codant pour le récepteur des Kp, le GPR54 induisent un phénotype hypogonadique chez les souris et les humains (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). L'inactivation du gène *kiss1* n'a pas d'effet sur la migration des neurones à GnRH, ni sur la synthèse de la GnRH ou ses effets sur l'hypophyse (Seminara et al., 2003; d'Anglemont de Tassigny et al., 2007). Par contre de nombreuses études pharmacologiques et électrophysiologiques ont montré que le Kp active les neurones à GnRH et que l'absence de l'expression du récepteur Kiss1r dans les neurones à GnRH supprime la sécrétion de la GnRH (Lehman et al., 2013 pour revue). Le Kp stimule puissamment l'axe de la reproduction par l'activation du GPR54 exprimé spécifiquement sur les neurones à GnRH (Clarkson and Herbison, 2006).

Les données sur la localisation du récepteur Kiss1r sont limitées du fait qu'aucun anticorps spécifique de ce récepteur n'a pu être validé jusqu'à présent. Cependant, il a été montré par les techniques de Northern blot, d'ISH et de RT-PCR quantitative que l'ARNm

du *Kiss1r* est largement exprimé dans le système nerveux central. Chez le rat, l'ARNm du *Kiss1r* est fortement exprimé dans l'ARC, le DMH, l'aire tegmentale ventrale, le gyrus denté, le cortex primaire olfactif, le noyau habénulaire latéral, l'aire hypothalamique latérale et antérieure, le locus coeruleus et les noyaux de l'amygdale ainsi que dans le noyau hypothalamique postérieur (Lee et al., 1999; Muir et al., 2001). A la périphérie, l'ARNm codant pour le *Kiss1r* est fortement exprimé dans le pancréas et le placenta, et faiblement exprimé dans les testicules et les ovaires, la rate, l'intestin grêle, les glandes surrénales, les ganglions lymphatiques et les leucocytes (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001; Funes et al., 2003).

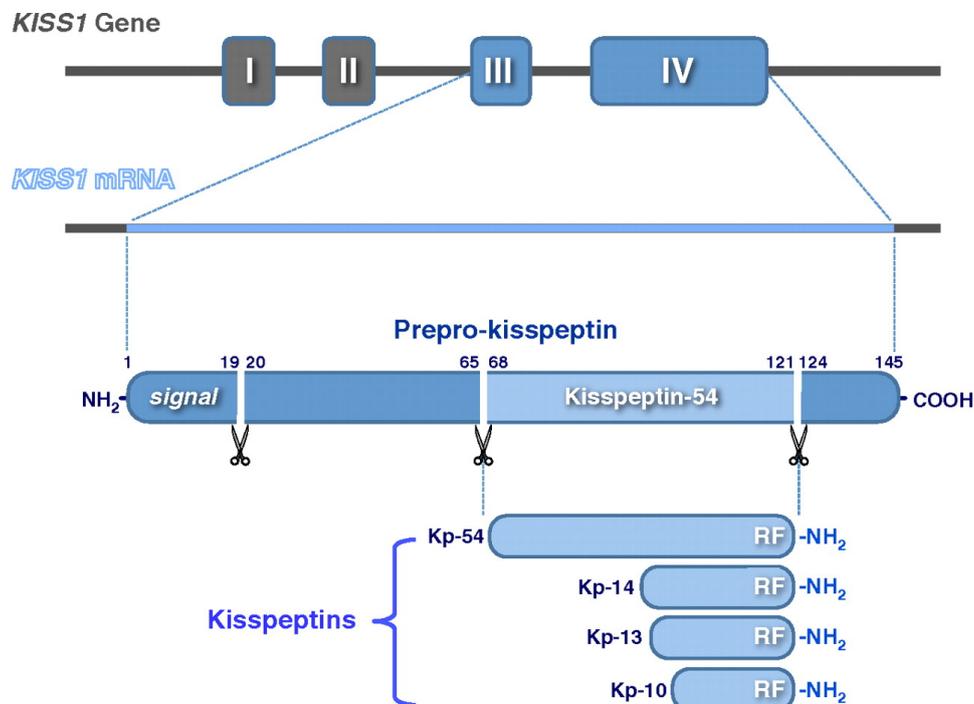


Figure 12 : Les produits du gène *Kiss1*. Chez l'Homme, le gène *Kiss1* est composé de quatre exons, les deux premiers étant des exons non codants. La prépro-kisspeptine, codée dans les exons III et IV, contient 145 acides aminés, incluant un peptide signal composé de 19 acides aminés et une région centrale de 54 acides aminés. D'autres Kp plus petits sont issus du clivage du Kp54 : le Kp14, Kp13, et Kp10. Ils ont tous en commun une extrémité C-terminale commune composée de 10 acides aminés dont le motif (Arg)(Phe)-amide, suffisante pour une activation complète du GPR54 (Pinilla et al., 2012).

Dans le système nerveux central, le gène *kiss1* s'exprime principalement dans l'ARC, l'AVPV, le noyau périventriculaire, le noyau préoptique -antérodorsal et dans l'amygdale médiane (Gottsche et al., 2004 ; Smith et al., 2005 ; Revel et al., 2006 ; Mason et al., 2007). Chez le mouton, les neurones à Kp se trouvent principalement dans l'ARC. Cependant, une seconde population de ces neurones existe dans la zone préoptique, qui semble être l'équivalent de l'AVPV chez les rongeurs (Franceschini et al., 2006; Pompolo et al., 2006). De même, chez la jument le Kp est également présent dans l'ARC avec une extension vers la région pré-mamillaire. Une deuxième population plus faible des neurones à Kp existe dans la zone préoptique périventriculaire de l'hypothalamus (Magee et al., 2009), alors que chez le singe (Plant, 2006; Rometo et al., 2007; Shibata et al., 2007) et l'Homme (Rometo et al., 2007), *Kiss1* est exprimé dans le noyau infundibulaire ; l'homologue de l'ARC chez les primates, avec la présence d'une petite population neuronale dans la zone préoptique médiane (Rometo et al., 2007). Périphériquement, Kp est exprimé dans le placenta, le thymus, les testicules et les ovaires. L'ARNm du gène *Kiss1* a été également détecté dans le foie, le pancréas, l'intestin grêle, la rate et le côlon (Ohtaki et al., 2001).

Chez les rongeurs, les Kp sont exprimés par des neurones regroupés dans deux régions hypothalamiques distinctes, le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) et l'ARC (Gottsche et al., 2004 ; Smith et al., 2005 ; Mason et al., 2007 ; Revel et al., 2006). La population neuronale de l'AVPV présente un dimorphisme sexuel important. Le nombre des neurones à Kp est plus élevé dans l'AVPV des femelles que des mâles (Clarkson and Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007). Chez les femelles, les neurones à Kp de l'AVPV sont essentiels au déclenchement du pic pré-ovulatoire et à sa restriction temporelle en fin de la période de repos le jour du proestrus (Smith et al., 2006; Robertson et al., 2009). Des différences sexuelles des neurones à Kp dans l'ARC ont également été mises en évidence, avec un nombre plus grand des cellules immunoréactives au Kp chez les rats et les souris femelles que chez les mâles (Overgaard et al., 2013) (Figure 13).

Chez la gerboise, nous avons récemment rapporté la présence et la distribution neuroanatomique des Kp. En effet, nous avons montré la distribution des neurones à Kp dans la POA et tout au long de l'ARC aussi bien chez les gerboises mâles que femelles. De même, à l'instar des autres espèces, nous avons aussi rapporté l'existence d'un dimorphisme sexuel des neurones à Kp dans l'AVPV. En effet, le nombre de corps cellulaires immunopositifs au Kp était plus élevé chez la gerboise femelle que chez la

gerboise mâle, et la densité des fibres Kisspeptinergiques (Kpergiques) était plus élevée dans l'éminence médiane et tout autour de la tige pituitaire des gerboises femelles par rapport aux gerboises mâles (Janati et al., 2013).

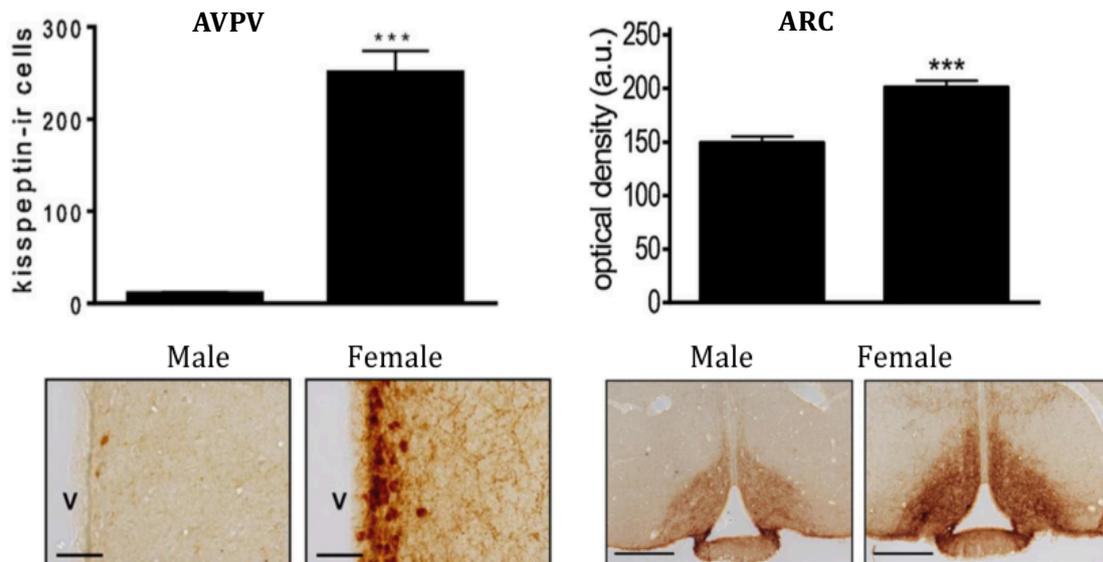


Figure 13 : Expression du Kp dans l'AVPV et l'ARC des souris mâle et femelle. Les panneaux de gauche représentent le nombre de cellules immunoréactives de Kp dans l'AVPV chez les souris mâles et femelles (Barre d'échelle = 20 µm, V = 3ème ventricule). Les panneaux de droite représentent la mesure de la densité optique de neurones immunoréactifs à Kp dans l'ARC des souris mâles et femelles (Barres d'échelle = 250 µm). (Henningsen, 2016 ; Modifié à partir de Overgaard et al., 2013).

3.1.2 Kisspeptine et la régulation de l'axe reproducteur

La découverte des effets qu'induit une mutation du *Kiss1r* sur le déclenchement de la puberté a conduit à une série d'études intensives visant à comprendre la participation du système Kpergique dans la régulation de la fonction de la reproduction. Ces études ont montré qu'une administration soit centrale soit périphérique du Kp était capable de stimuler la sécrétion des gonadotrophines et par conséquent les hormones gonadiques chez toutes les espèces des mammifères étudiées à ce jour, y compris le hamster, la souris, le rat, le mouton, la chèvre, le porc, la vache, le singe et l'Homme (Thompson et al., 2004; Gottsch et al., 2004a; Matsui et al., 2004; Navarro et al., 2004; Dhillo et al., 2005; Messenger

et al., 2005; Shahab et al., 2005; Lents et al., 2008; Ezzat Ahmed et al., 2009; Hashizume et al., 2010; Ansel et al., 2011a).

Le Kp stimule la sécrétion des gonadotrophines et des stéroïdes sexuels via une action directe sur les neurones à GnRH. En effet, les fibres immunoréactives du Kp se trouvent en étroite apposition aux corps cellulaires des neurones à GnRH (Kinoshita et al., 2005; Clarkson and Herbison, 2006) et plus de 90% des neurones à GnRH sont dépolarisés après injection du Kp chez les rongeurs (Han et al., 2005). De plus, environ 80% des neurones à GnRH expriment l'ARNm du récepteur *Kiss1r* et présentent une activation du marqueur neuronal c-Fos après administration du Kp (Irwig et al., 2004; Han et al., 2005; Messenger et al., 2005; Herbison et al., 2010). D'autre part, les effets du Kp sur la sécrétion des gonadotrophines sont complètement abolis par un prétraitement avec les antagonistes des récepteurs de la GnRH (Gottsch et al., 2004a; Matsui et al., 2004; Shahab et al., 2005).

Le fait que Kp soit capable d'induire la libération de la GnRH à partir d'explants de MBH contenant des terminaisons nerveuses de la GnRH, a conduit à l'hypothèse que Kp pourrait agir à la fois au niveau des corps cellulaires des neurones à GnRH et des terminaisons nerveuses de l'éminence médiane (d'Anglemont de Tassigny et al., 2008). A cause de l'inexistence d'anticorps sélectifs pour *Kiss1r*, la présence de ce récepteur dans l'éminence médiane reste difficile à évaluer. Néanmoins, une étude récente d'activation optogénétique spécifique des neurones à Kp a montré que non seulement l'activation des corps cellulaires de Kp dans l'ARC mais aussi leurs terminaisons dans l'éminence médiane étaient capables d'induire une libération de LH (Han et al., 2015).

Des études récentes faites chez la souris, le rat, le hamster, la chèvre et le singe montrent que la majorité des neurones à Kp de l'ARC co-expriment d'autres neuropeptides, tels que la NKB et la Dyn. Ils sont ainsi nommés les neurones KNDy (Goodman et al., 2012). La NKB stimule la libération du Kp (Amstalden et al., 2010; Navarro et al., 2011), tandis que la Dyn inhibe les neurones à Kp (Goodman et al., 2012). Aussi, il a été proposé que l'effet opposé de ces deux neuropeptides sur le Kp confierait aux neurones KNDy un rôle de générateur d'impulsions à GnRH (Ramaswamy et al., 2008; Roseweir et al., 2009; Wakabayashi et al., 2010; Bartzén-Sprauer et al., 2014).

Les mécanismes des feedbacks qui régulent l'activité de la GnRH sont médiés en partie par Kp. En effet, Les neurones à Kp de l'ARC expriment les récepteurs des œstrogènes et

les récepteurs des androgènes et sont inhibés par l'estradiol (E2) et par la testostérone. Par conséquent, la suppression de cet effet du feedback par gonadectomie augmente l'expression de Kp dans l'ARC (Navarro et al., 2004; Smith et al., 2005; Revel et al., 2006; Ansel et al., 2010). En revanche, les neurones à Kp de l'AVPV sont stimulés par les E2 (Smith et al., 2005b; Kauffman et al., 2007; Quennell et al., 2010). De façon intéressante, les deux feedbacks positif et négatif des E2 sont médiés par le récepteur des œstrogènes ER α (Clarkson et al., 2008; Mayer et al., 2010; Xu et al., 2012).

3.1.3 Kisspeptine et la saisonnalité de la reproduction

Les neurones à Kp sont fortement régulés par la photopériode chez les espèces saisonnières comme le hamster syrien, le hamster sibérien, le mouton et la gerboise (Ansel et al., 2010 ; Revel et al., 2006 ; Saenz de Miera et al., 2014, Janati et al., 2013).

Récemment, nous avons rapporté chez la gerboise mâle une variation photopériodique de l'immunoréactivité des neurones à Kp dans l'ARC avec une augmentation chez les animaux sexuellement actifs capturés au printemps comparés à des gerboise d'automne en quiescence sexuelle (Janati et al., 2013). Chez le hamster syrien, une infusion centrale de mélatonine diminue fortement l'expression du Kp à la fois chez des mâles et des femelles adaptés à des conditions de PL (Ansel et al., 2010). De façon intéressante, la suppression du feedback négatif des stéroïdes sexuels chez les mâles par castration, conduit à ce que seule la population des neurones à Kp de l'ARC est inhibée par la mélatonine. Ces résultats révèlent que les deux populations Kpergiques sont régulées par la photopériode via des mécanismes différents. Dans l'ARC, la mélatonine en PC inhibe l'expression des Kp indépendamment des stéroïdes sexuels tandis que dans l'AVPV l'inhibition est consécutive à la diminution de l'activité gonadique par la mélatonine. Chez le mouton qui est un animal sexuellement actif en jours courts, l'expression de Kp est augmentée en PC (Smith et al., 2008; Wagner et al., 2008; Chalivoix et al., 2010).

Il est admis que les variations photopériodiques du Kp sont critiques pour le contrôle saisonnier de la reproduction, du fait qu'une infusion centrale chronique de Kp chez le hamster syrien en PC ou le mouton en PL est capable de restaurer l'activité gonadique en dépit de l'environnement photo-inhibiteur (Revel et al., 2006a; Caraty et al., 2007; Ansel et al., 2011a). Néanmoins, le concept que les neurones à Kp constituent une composante essentielle entre le signal photopériodique et l'activation saisonnière des neurones à GnRH est à discuter à cause des résultats trouvés chez deux autres modèles de hamsters

dont la reproduction est activée en PL, le hamster sibérien et le hamster européen, chez lesquels l'expression de Kp dans l'ARC est diminuée en PL (Mason et al., 2007; Greives et al., 2008; Saenz de Miera et al., 2014). Il est possible que ces différences dans la régulation photopériodique soient dues à des différences dans l'effet des feedbacks des stéroïdes sexuels ou d'autres facteurs présentant des différences photopériodiques et qui sont donc à l'origine de ces régulations différentes. Ces observations contradictoires indiquent que le Kp est peu susceptible d'être le seul responsable de la médiation du signal saisonnier de la mélatonine sur l'axe de la reproduction.

3.2 Le RF-amide related peptides-3

3.2.1 Découverte, mode et sites d'action du RFRP-3

Le RF (ARG-PHE) Amide-Related Peptide-3 (RFRP-3) est un autre neuropeptide qui a été largement étudié au cours de cette dernière décennie pour son rôle dans la régulation de l'axe reproducteur. Le RFRP-3 a été d'abord décrit comme inhibiteur de l'activité de reproduction via une inhibition des neurones à GnRH et des cellules gonadotropes de l'hypophyse (Kriegsfeld et al., 2006 ; Clarke et al., 2008 ; Anderson et al., 2009 ; Ducret et al., 2009 ; Pineda et al., 2010), jusqu'à ce que d'autres études ont rapporté un rôle stimulateur de l'axe gonadotrope chez les hamsters syriens et sibériens (Ancel et al., 2012 ; Ubuka et al., 2012). En dépit de ses effets stimulateurs, le RFRP-3 est encore souvent appelé GnIH (Gonadotrophin Inhibitory Hormone), en rappel de l'effet inhibiteur du GnIH sur la sécrétion de LH par des hypophyses de caillies en culture (Hinuma et al., 2000 ; Tsutsui et al., 2000).

Chez les mammifères, le gène *Rfrp* code pour un précurseur produisant 3 neuropeptides de tailles différentes (RFRP-1, -2 et -3) dont deux sont fonctionnels : RFRP-1 et RFRP-3 (Hinuma et al., 2000). L'effet inhibiteur puissant du GnIH sur la libération des gonadotrophines a conduit à examiner l'effet des RFRP-1 et RFRP-3 sur la régulation des fonctions neuroendocrines. En 2006, le groupe de Kriegsfeld a été le premier à montrer l'existence de ce neuropeptide dans le cerveau des rongeurs, et il a confirmé l'effet inhibiteur du GnIH sur la sécrétion de LH chez des femelles de hamsters syriens ovariectomisées (Kriegsfeld et al., 2006). Toutefois, des données récentes indiquent que l'effet du RFRP-3 sur l'axe gonadotrope pourrait être dépendant des espèces (Ancel et al., 2012; Ubuka et al., 2012).

Chez les espèces de rongeurs étudiés jusqu'à présent, les neurones à RFRP-3/GnIH sont

principalement localisés dans le MBH, particulièrement dans le DMH, le VMH, et entre le DMH et le VMH, avec quelques neurones situés dans les limites de VMH (Hinuma et al., 2000; Kriegsfeld et al., 2006; Janati et al., 2013; Henningsen et al., 2015) (Figure 14). Chez la gerboise, les corps cellulaires immunopositifs de RFRP-3 sont exprimés surtout dans le DMH mais aussi entre le DMH et le VMH s'étendant latéralement jusqu'à la zone hypothalamique latérale (Janati et al., 2013). Par contre chez les oiseaux, il a été montré aussi bien par ISH que par immunohistochimie que les neurones à GnIH sont regroupés dans le PVN (Tsutsui et al., 2000; Ubuka et al., 2003). Chez le mouton, le profil d'expression de RFRP-3 semble être différent ; tout comme les oiseaux, le *Rfrp* est fortement exprimé dans le PVN, mais également dans le DMH comme chez les rongeurs (Clarke et al., 2008a; Dardente et al., 2008; Smith et al., 2008).

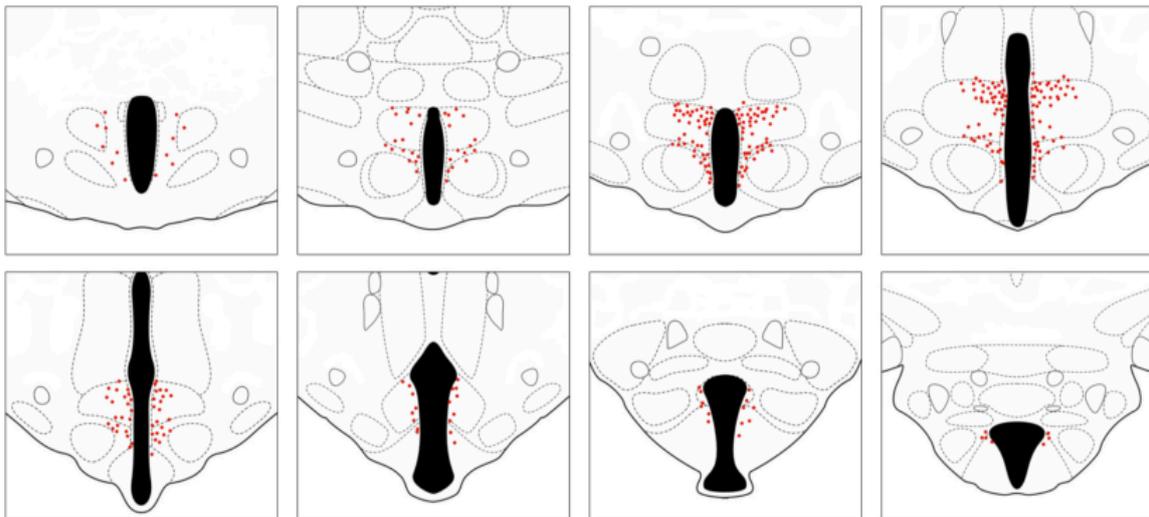


Figure 14 : Distribution des neurones à RFRP-3 dans le cerveau de l'hamster syrien. Les neurones immunoréactifs de RFRP-3 sont détectés tout au long de la partie dorsale (DMH) et la partie ventrale (VMH) de l'hypothalamus mediobasal. Les points rouges représentent les neurones immunoréactifs à RFRP-3 (Henningsen, 2016).

Le DMH est une région hypothalamique intéressante car elle est impliquée dans une variété de réponses aussi bien physiologiques que comportementales, telles que la reproduction, le stress et la balance énergétique. De plus, le DMH reçoit des afférences à partir d'un grand nombre d'autres régions hypothalamiques, suggérant que les neurones de cette région pourraient intégrer plusieurs signaux environnementaux et physiologiques pour réguler différentes réponses endocrines.

Chez les mammifères, l'Homme y compris, les réseaux de fibres immunoréactives de RFRP-3 sont largement distribuées dans le cerveau, mais sont principalement concentrées dans et autour du vasculosum organum laminae terminalis (OVLT), la POA, l'ARC, l'AVPV, le septum latéral, l'hypothalamus antérieur, le PVT, et le BNST (Ukena and Tsutsui, 2001; Kriegsfeld et al., 2006; Johnson et al., 2007; Mason et al., 2010; Henningsen et al., 2015). De façon intéressante, les fibres immunoréactives au RFRP-3 contactent 20 à 40 % d'une sous-population de neurones à GnRH chez les rongeurs et les moutons (Kriegsfeld et al., 2006; Smith et al., 2008; Poling et al., 2012; Rizwan et al., 2012; Ubuka et al., 2012) et environ 20% des neurones à Kp de l'AVPV et 35% des neurones à Kp de l'ARC chez les souris femelles (Rizwan et al., 2012; Poling et al., 2013). Ces observations neuroanatomiques montrent que le RFRP-3 agit centralement pour contrôler l'axe de la reproduction.

Les peptides RFRP-1 et -3 se lient à deux récepteurs, le GPR147 (également connu sous le nom NPFRR1) et GPR74 (également connu sous le nom NPFRR2) (Hinuma et al., 2000). L'affinité envers le récepteur GPR147 est plus élevée, ce récepteur constitue la cible préférée des peptides RFRP (Yoshida et al., 2003; Elhabazi et al., 2013).

L'ARNm codant pour le GPR147 est largement distribué dans le cerveau, mais il est plus fortement exprimé dans l'OVLT, AVPV, SCN, PVN, VMH et ARC, et en dehors de l'hypothalamus dans la partie postérieure du BNST, de l'habenula et la couche de cellules pyramidales de l'hippocampe (Gouardères et al., 2004; Dardente et al., 2008; Henningsen et al., 2015). Il a été également trouvé dans les yeux, les testicules et le bulbe rachidien. Le GPR147 est notamment exprimé dans 15 à 33% des neurones à GnRH et une sous-population de neurones à Kp de l'AVPV (5-16%) et de l'ARC (25%) (Poling et al., 2012, 2013; Rizwan et al., 2012). L'ensemble de ces observations, renforce l'hypothèse d'un rôle central du RFRP-3 dans le contrôle central de la reproduction.

3.2.2 RFRP-3 et la régulation de l'axe reproducteur

Dans les premières études visant à examiner les effets des RFRP sur l'activité de la reproduction, il a été rapporté que les RFRP-3 et RFRP-1 inhibent l'activité des neurones à GnRH et la libération des gonadotrophines chez plusieurs espèces telles que la souris, le rat et le mouton (Kriegsfeld et al., 2006, 2010; Johnson et al., 2007; Clarke et al., 2008a; Anderson et al., 2009; Ducret et al., 2009; Pineda et al., 2010). Chez les rats mâles, une injection intracérébroventriculaire (icv) de RFRP-3 supprime tous les aspects du comportement sexuel avec une réduction des taux plasmatiques de LH (Johnson et al., 2007; Pineda et al., 2010), alors que chez le rat femelle, une infusion icv chronique de RFRP-3 provoque une inhibition dose-dépendante de l'activation neuronale de la GnRH coïncidant avec le pic de LH (Anderson et al., 2009). De même, l'application de RFRP-3 sur des sections de cerveau de souris inhibe l'activité d'environ 41% des neurones à GnRH, mais curieusement, une petite population de ces neurones (12%) sont en revanche stimulés par le RFRP-3 (Ducret et al., 2009).

L'effet de RFRP-3 sur l'axe gonadotrope semble être sexe-dépendant. Chez le hamster syrien mâle, le RFRP-3 stimule l'expression du c-Fos dans les neurones à GnRH, induit un effet dose dépendant sur la sécrétion de la LH, la FSH et la testostérone et restaure l'activité testiculaire et les niveaux du *Kiss1* dans l'ARC chez des hamsters dont l'axe reproducteur est inhibé par la photopériode (Ancel et al., 2012). De même, un effet stimulateur similaire a été trouvé chez le hamster sibérien mâle (Ubuka et al., 2012), cependant l'effet varie selon le statut sexuel de l'animal. Le RFRP-3 stimule la libération de LH chez des animaux sexuellement quiescents en PC, alors qu'il inhibe la libération de LH chez des animaux sexuellement actifs en PL (Ubuka et al., 2012), proposant un effet saison-dépendant du peptide au moins chez cette espèce.

Il existe des preuves d'un effet hypophysiotrope du GnRH chez les oiseaux, alors que cet effet n'a pas été trouvé chez le rat ni chez le hamster syrien (Anderson et al., 2009; Ancel et al., 2012). L'effet du RFRP-3 chez les brebis reste encore controversé. En 2008, Clarke et ses collaborateurs ont montré qu'une infusion de RFRP-3 inhibe les sécrétions pulsatiles de LH chez des brebis ovariectomisées (Clarke et al., 2008a), alors que d'autres études plus récentes rapportent qu'aucun effet de RFRP-3 n'existe (injecté en icv et en intraveineuse (iv)) ni sur les taux plasmatiques de LH ni chez des brebis ovariectomisées ou intactes (Caraty et al., 2012; Decourt et al., 2016).

3.2.3 RFRP-3 et la saisonnalité de la reproduction

Plusieurs observations pointent vers un rôle essentiel de la région du MBH, où sont localisés les neurones à RFRP-3, dans la médiation des effets de la photopériode sur l'axe reproducteur. En effet, des lésions de cette région empêchent la régression gonadique induite par une PC chez le hamster syrien (Maywood et al., 1996). Cependant, même si des récepteurs de la mélatonine ont été trouvés dans le MBH, il est à l'heure actuelle difficile de lier la présence de ces récepteurs au rôle saisonnier de la mélatonine sur la reproduction.

L'expression du RFRP-3 est fortement inhibée en PC chez tous les mammifères saisonniers étudiés jusqu'à présent (Dardente et al., 2008; Revel et al., 2008; Smith et al., 2008; Ancel et al., 2012; Simonneaux and Ancel, 2012; Janati et al., 2013; Saenz de Miera et al., 2014; Henningsen et al., 2015). Des études menées chez des hamsters syriens et sibériens mâles ont montré que la diminution de l'expression du RFRP-3 en PC est dépendante de la mélatonine, et peut être empêchée par ablation de la PG (Revel et al., 2008; Ubuka et al., 2012). Chez la gerboise femelle comme la gerboise mâle le RFRP-3 montre des variations saisonnières remarquable entre le printemps et l'automne, sans différences entre les deux sexes (Janati et al., 2013). Fait intéressant, l'inhibition de l'expression du RFRP en PC est similaire chez les espèces de reproduction de jours courts (comme la gerboise et le hamster) ou de jours longs (comme le mouton) (Smith et al., 2008)(Dardente et al., 2008), soulignant que le profil de régulation de RFRP-3 par la mélatonine est conservé chez les espèces saisonnières.

Contrairement aux neurones à Kp, l'idée que l'expression de RFRP-3 soit contrôlée, ou non, par le feedback des stéroïdes sexuels est controversée. En effet, l'expression de RFRP-3 n'exprime pas seulement des différences dépendantes des espèces mais aussi de sexe. Chez le rat et le hamster syrien, une expression de RFRP-3 s'est avérée plus importante chez les femelles que chez les mâles (Jørgensen et al., 2014; Henningsen et al., 2015). Ces différences pourraient être entraînées par des différences de feedback des stéroïdes sexuels. Afin de tester cette hypothèse des études ont rapporté la présence du récepteur ER α dans les neurones à RFRP chez la souris et le hamster syrien femelle (Kriegsfeld et al., 2006; Molnár et al., 2011; Poling et al., 2012). En parallèle avec ces observations, il a été rapporté que l'estradiol E2 stimule l'expression de RFRP-3 chez le rat et le hamster syrien femelle, tandis que chez le mâle la testostérone ne semble avoir

aucun effet sur l'expression de RFRP-3 (Kriegsfeld et al., 2006; Revel et al., 2008; Mason et al., 2010; Iwasa et al., 2012). En revanche, la testostérone et l'estradiol diminuent l'expression du gène *Rfrp* chez la souris. Chez le hamster syrien mâle (Revel et al., 2008) et femelle (Henningsen et al., submitted), il a été montré que ni la gonadectomie ni les implants des hormones sexuelles ne peuvent modifier l'expression de RFRP-3.

Par ailleurs, du fait que l'expression de RFRP-3 est fortement inhibée en PC chez les hamsters syriens sexuellement inactifs, l'effet d'une infusion centrale chronique de RFRP-3 chez ces hamsters a été testé sur leur statut de reproduction. Les résultats ont montré qu'après 5 semaines de traitement, le RFRP-3 a réactivé totalement l'activité gonadique via une augmentation de l'expression du Kp dans l'ARC. Ceci suggère que chez le hamster syrien mâle, les neurones à RFRP-3 semblent intégrer et transférer le message saisonnier vers les neurones à Kp (Figure 15).

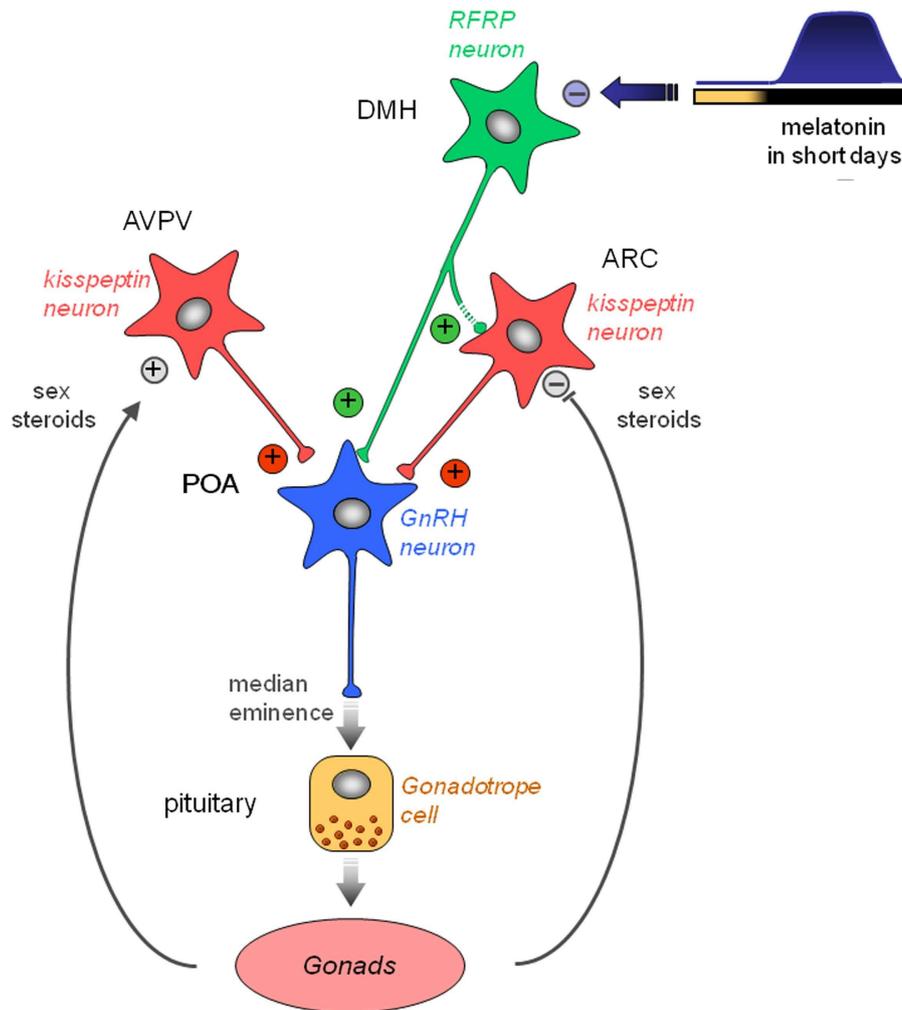


Figure 15 : Interaction entre RFRP-3 et Kisspeptine dans le contrôle saisonnier de l'activité de la reproduction chez le hamster syrien. L'activité des neurones à GnRH est régulée en amont par les neurones à Kp, localisés dans l'ARC et l'AVPV, et les neurones à RFRP localisés dans le DMH. Les neurones à RFRP-3 projettent vers les neurones à GnRH et possiblement vers les neurones à Kp de l'ARC. Les stéroïdes sexuels exercent une action activatrice sur les neurones Kp de l'AVPV et une action inhibitrice sur les neurones de l'ARC. Ce modèle suggère que les neurones à RFRP jouent un rôle indispensable dans la régulation saisonnière de l'activité de la reproduction par la mélatonine chez les rongeurs saisonniers. En PC la mélatonine inhibe, via une action directe ou indirecte, l'expression des RFRP, inhibant ainsi les neurones Kp de l'ARC, ce qui diminue la sécrétion des hormones sexuelles et inhibe l'activité des neurones à GnRH. L'activité de la reproduction est alors inhibée par conséquent. Ceci se fait d'une manière dépendante du sexe et de l'espèce (Simonneaux et al., 2013).

4. Le lien entre la mélatonine et les variations saisonnières des peptides RF-amides

Bien qu'il semble évident que les peptides RF-amides, Kp et RFRP-3, constituent un lien fort dans l'adaptation de la fonction de la reproduction aux saisons, mais ce n'est que dernièrement que leur implication dans ce processus a commencé à s'éclaircir.

Récemment, une étude de notre laboratoire a montré qu'une infusion centrale de 5 semaines de TSH chez des hamsters syrien et sibérien sexuellement quiescents maintenus en PC, induit l'expression de la Dio2 dans les tanocytes et réactive complètement la fonction de la reproduction (Klosen et al., 2013). En effet, l'infusion de la TSH chez ces deux types de hamsters a permis de restaurer les niveaux d'expression de Kp et de RFRP-3 à des niveaux correspondant aux valeurs de jours longs d'été avec une réactivation de la sécrétion des stéroïdes sexuels et de la croissance testiculaire.

Ainsi, ces résultats ont permis de proposer un modèle clair de la synchronisation de la reproduction avec les saisons impliquant la TSH, produite par la PT sous le contrôle saisonnier de la mélatonine, et les peptides RF-amides contrôlant l'activité de l'axe reproducteur. Ce modèle propose que pendant les jours longs de printemps, la sécrétion réduite de la mélatonine lève l'inhibition sur la sécrétion de la TSH par les cellules de la PT dans l'hypophyse. La TSH, en stimulant l'activité de la Dio2 qui convertit la T4 en T3, mène à une augmentation locale des niveaux de T3 contrôlant l'expression des neurones à RFRP, et éventuellement les neurones à Kp qui régulent l'activité des neurones à GnRH et la libération de la LH et la FSH par conséquent, afin de réguler l'activité des gonades (testicules et ovaires) (Figure 16).

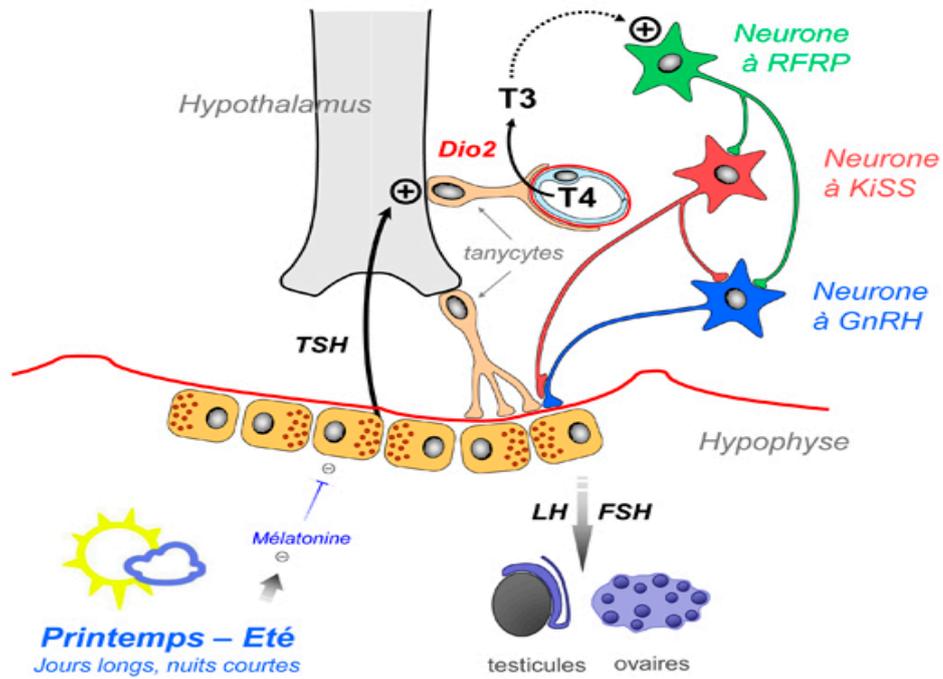


Figure 16 : Mécanismes neuroendocriniens de la synchronisation de l'activité de la reproduction des mammifères avec les saisons. Mise en jeu des peptides RF-amide dans la circuiterie neuronale reliant la TSH et les neurones à GnRH (Klosen et al., 2013).

IV. LE CONTRÔLE CENTRAL DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE

L'homéostasie énergétique repose sur le maintien d'une balance énergétique équilibrée entre apports et dépenses énergétiques, et les variations de la balance énergétique sont généralement associées à des changements du poids corporel mais surtout de la masse grasse. Cette régulation des réserves énergétiques nécessite l'implication d'un système central capable de contrôler les entrées et les sorties énergétiques.

En 1940 et 1951, Hetherington, Anand et leurs collaborateurs ont émis l'hypothèse selon laquelle le comportement alimentaire résulterait d'une interaction entre le VMH et l'hypothalamus latéral. La lésion électrolytique du VMH entraîne une hyperphagie et une obésité, alors que celle de l'hypothalamus latéral induit une inanition et une perte du poids corporel. Le VMH a été considéré donc comme étant le centre de la satiété alors que l'hypothalamus latéral a été représenté comme le centre de la faim (Hetherington and Ranson, 1940; Anand and Brobeck, 1951). Quelques années plus tard, cette théorie que seuls ces deux centres gouvernent la régulation du comportement alimentaire, a été remise en question et l'implication d'autres noyaux hypothalamiques dans ce processus a été soulevée. Ceci concerne en particulier le DMH, l'ARC, le PVN et les SCN. De là, l'importance anatomique de l'ARC et du PVN dans la régulation de la balance énergétique a été mise en évidence, ainsi que la découverte d'un certain nombre de régulateurs neuronaux importants tels que le neuropeptide Y et le système des mélanocortines (Kalra et al., 1999).

L'homéostasie énergétique implique un système de rétroaction négative de l'adiposité à travers lequel les hormones circulantes, telles que la leptine et l'insuline, informent les principaux centres du cerveau au sujet des réserves énergétiques corporelles (Schwartz et al., 2000). En réponse à un changement de la masse grasse, des changements correspondants de niveaux plasmatique de la leptine et donc de la signalisation de la leptine dans ces zones cérébrales, suscitent des changements à la fois de l'apport et des dépenses énergétiques favorisant ainsi le retour du poids corporel à ses niveaux normaux. D'autre part, la leptine répond d'une manière robuste aux changements à court terme de la balance énergétique précédant des changements dans l'adiposité, et intègre donc des informations à la fois à long terme et à court terme du statut énergétique (Kolaczynski et al., 1996; Grinspoon et al., 1997). Plusieurs populations neuronales sensibles à la leptine ont été identifiées, et leurs rôles dans les changements adaptatifs de la balance

énergétique sont de plus en plus mieux compris. Parmi ces populations neuronales les mieux étudiées sont celles situées dans l'ARC et qui expriment des peptides tels que le NPY et la pro-opiomélanocortine (POMC).

Les neurones à NPY et à POMC sont des neurones de premier ordre qui reçoivent des informations de la périphérie et jouent des rôles pivots dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique et qui afin de réguler la prise alimentaire, projettent leurs axones sur des neurones de "second ordre" situés dans le PVN, tels que les neurones à CRH (Corticotropin Releasing Hormone) et à TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) (Figure 17).

La leptine, ce peptide anorexigène, diminue la prise alimentaire par une double action sur les neurones à POMC et les neurones à NPY qui constituent les cibles directes de la leptine. En effet, la leptine active la libération de l' α -MSH par son action directe sur la POMC via les récepteurs MC4R, en réduisant la prise alimentaire et stimulant les dépenses énergétiques. En parallèle, la leptine inhibe l'activité des neurones co-exprimant le NPY et l'AgRP (Agouti-related peptide), eux même étant des antagonistes de l' α -MSH (Pénicaud et al., 2012).

L'insuline peut agir aussi dans l'ARC pour exercer un effet anorexigène, en réduisant la prise alimentaire et le poids corporel (Woods et al., 1979). Les récepteurs d'insuline sont largement exprimés dans le cerveau et co-localisent les neurones à POMC et à NPY/AgRP (Marks et al., 1990; Benoit et al., 2002). Comme pour la leptine, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline dans l'ARC diminue l'expression du NPY et de l'AgRP, et augmente l'expression de la POMC pour exercer un effet anorexigène (Schwartz et al., 1992; Sipols et al., 1995; Benoit et al., 2002; Plum et al., 2006). Les glucocorticoïdes (GCs) quant à eux, exercent des effets opposés sur la prise alimentaire et la balance énergétique. En se liant et activant leurs récepteurs exprimés par les neurones à NPY et à POMC, les GCs stimulent la prise alimentaire et le poids corporel (Misaki et al., 1992; Lee et al., 2013).

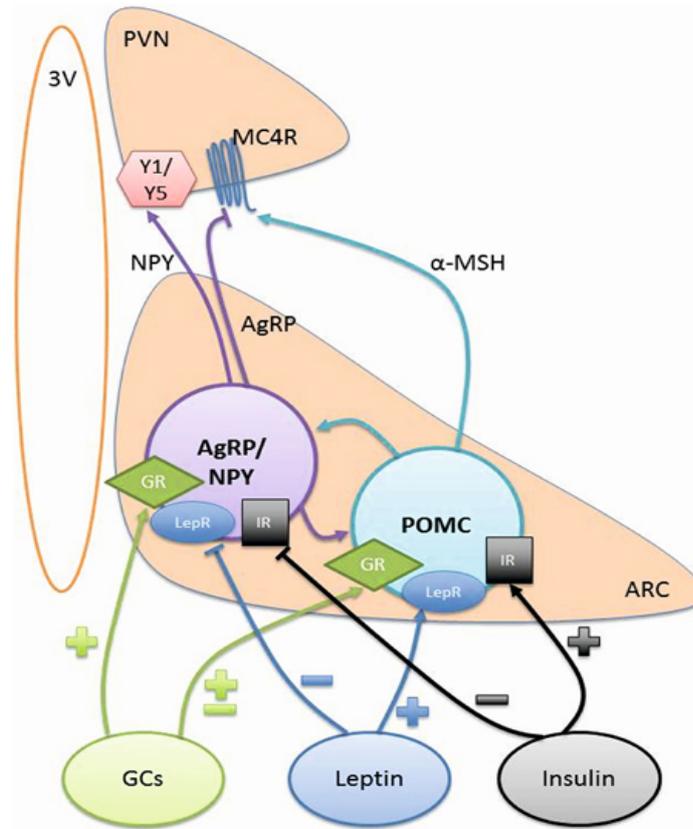


Figure 17 : la signalisation hypothalamique contrôlant la balance énergétique. Les neurones à NPY/AgRP et à POMC du noyau arqué projettent vers les neurones du PVN pour contrôler la prise alimentaire et la balance énergétique. Les signaux provenant de ces neurones peuvent être influencés par différents facteurs périphériques tels que les glucocorticoïdes, la leptine et l'insuline (Gali Ramamoorthy et al., 2015). GCs : glucocorticoïdes ; AgRP, agouti-related peptide ; GR, le récepteur des glucocorticoïdes; IR, le récepteur de l'insuline; LepR, le récepteur de la leptine; MC4R, le récepteur 4 de la mélanocortine; α -MSH, α melanocyte stimulating hormone; NPY, neuropeptide Y; POMC, pro-opiomelanocortine; PVN, le noyau paraventriculaire; 3V, 3ème Ventricule.

1. La régulation saisonnière de la balance énergétique

La plupart des animaux qui expriment un phénotype saisonnier expriment un changement de poids corporel dans le cadre des processus adaptatifs de l'animal à son environnement, le hamster sibérien a été l'un des modèles animaux les plus étudiés (Hoffmann, 1973; Steinlechner et al., 1983; Bartness et al., 2002). En effet, le poids corporel d'un hamster sibérien mâle non-juvénile reste relativement constant lorsqu'il est maintenu en une PL de 16 h de lumière / 8 h d'obscurité. Mais quand ces animaux sont transférés à une PC de 8 h de lumière / 16 h d'obscurité ils subissent une perte robuste et progressive du poids corporel. La majorité du poids perdu est due à une réduction du tissu adipeux (Mercer et al., 2000). Il est important de noter que la perte de poids atteint un maximum d'environ 30 à 40% du poids corporel initial après 12-18 semaines. Par la suite, les animaux deviennent réfractaires à la PC, et retrouvent spontanément le poids corporel précédemment atteint sous la PL. Lorsqu'une période de restriction alimentaire est imposée à la perte de poids corporel induite en PC, une perte plus importante du poids corporel se produit. Remarquablement lorsque les hamsters sont ensuite re-nourris librement après la courte période de restriction alimentaire, une période d'hyperphagie se produit leur permettant de retrouver le poids corporel perdu (Mercer et al., 2000). Cependant, les animaux reprennent le poids corporel seulement à des niveaux correspondant à ceux normalement observés en PC. Dans certaines expériences, il a été rapporté que la réduction du poids corporel chez le hamster sibérien se produit suite à une réduction de la prise alimentaire, suivie d'une diminution des dépenses d'énergie (Knopper and Boily, 2015). Cependant, d'autres travaux ont rapporté que l'augmentation de la dépense énergétique précède temporellement la diminution de la prise alimentaire, et par conséquent la diminution de la prise alimentaire est secondaire aux changements touchant les dépenses d'énergie (Wade and Bartness, 1984). Mais à l'heure actuelle, il est toujours difficile de distinguer l'ordre temporel de ces événements avec certitude.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la découverte de la leptine en 1994 (Zhang et al., 1994) a fourni une énorme impulsion pour identifier les systèmes centraux impliqués dans l'homéostasie énergétique, mais il est vite devenu évident que des changements dans la production de leptine ne sont pas à l'origine des cycles saisonniers de poids corporel. Les concentrations circulantes de la leptine diminuent en parallèle avec une perte de

l'adiposité et du poids corporel chez le hamster sibérien en réponse à la soumission à des conditions de PC (Atcha et al., 2000; Horton et al., 2000).

Dans les modèles de restriction alimentaire aiguë, une baisse de la leptine circulante conduit à la régulation des gènes codant pour des peptides hypothalamiques anorexigènes tels que la POMC, la TRH, et orexigènes tels que le NPY et l'orexine. En effet, il a été montré que l'expression de ces gènes change en concordance chez des hamsters sibériens en réponse à un déficit énergétique. Cependant, les changements dans l'expression de ces gènes, chez des hamsters exposés à une PC, ne reflètent pas un état de déficit énergétique chez ces animaux (Reddy et al., 1999; Mercer et al., 2000, 2001; Robson et al., 2002; Rousseau et al., 2002).

Ceci a été démontré en comparant l'expression de ces différents gènes hypothalamiques régulant la balance énergétique chez des animaux sous PC avec des animaux sous PL qui ont été soumis à des restrictions alimentaires pour simuler la perte de poids observée chez les animaux de jours courts (Mercer et al., 2000), ces deux groupes avaient des profils distincts de l'expression de ces gènes hypothalamiques, et donc les animaux qui étaient sous PC ne reflètent pas les hamsters privés de nourriture (Mercer et al., 2000). En revanche, la perte de poids corporel en jours courts pourrait être induite par une augmentation dans l'hypothalamus de l'activité des peptides anorexigènes impliqués dans le contrôle de la masse corporelle tels que la POMC et la somatostatine et une diminution de l'activité des peptides orexigènes, principalement le NPY.

2. Les peptides orexigènes et anorexigènes dans la régulation de la prise alimentaire

La régulation du comportement alimentaire se fait par une multitude de neuropeptides hypothalamiques et d'hormones périphériques assurant tous une bonne homéostasie énergétique. Cependant, dans le présent travail de thèse nous n'avons ciblé que trois neuropeptides situés au cœur des régulations centrales de la balance énergétique, notamment la prise alimentaire et étant des cibles directes des hormones périphériques et aussi d'autres populations neuronales régulant la balance énergétique et la reproduction, il s'agit du NPY, de la POMC et de la somatostatine.

2.1 Le neuropeptide Y

Le neuropeptide Y, est un peptide de 36 acides aminés, trouvé en abondance aussi bien dans le système nerveux central que périphérique. Il appartient à la famille des neuropeptides Y, qui comprend le polypeptide pancréatique et le peptide YY, avec lesquels il présente de fortes homologues structurales (Tatemoto et al., 1982).

Le NPY est exprimé dans de nombreux neurones du système nerveux central et périphérique. Il a été localisé dans les plexus nerveux à proximité des vaisseaux sanguins irriguant les différents organes. Il peut être stocké et libéré à partir des terminaisons nerveuses sympathiques comme il peut être également trouvé dans les fibres nerveuses parasympathiques. C'est un peptide très abondant dans le cerveau, d'importantes concentrations sont décelées dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus et la moelle épinière. En effet, les techniques immunocytochimiques ont permis de mettre en évidence une large distribution des corps cellulaires du NPY dans l'hypothalamus, le cervelet, et le noyau du tractus solitaire. Les terminaisons nerveuses contenant le NPY, occupent en grande partie l'hypothalamus, la moelle épinière et certaines régions du système limbique (Adrian et al., 1983; de Quidt and Emson, 1986; Gehlert et al., 1999). Cette distribution importante du NPY dans différentes régions du cerveau, confirment le rôle fondamental que joue ce peptide dans un grand nombre de fonctions cérébrales, somatiques, sensorielles et cognitives.

Le NPY est surtout connu pour son rôle orexigène puissant permettant de réguler la prise alimentaire et le poids corporel en agissant via ses récepteurs Y1 et Y2 (Clark et al., 1984; Bai et al., 1985; Morley et al., 1987; Leibowitz, 1991; Mashiko et al., 2009; Xu et al., 2009). En effet, une injection icv du NPY produit un effet orexigène, dont la durée change en fonction des espèces (Levine and Morley, 1984). Chez le rat par exemple, la stimulation de la prise alimentaire par le NPY est fortement limitée aux 30 premières minutes. Deux heures après l'injection du peptide, les rats mangent normalement (Stanley and Leibowitz, 1985). Le NPY augmente aussi la prise alimentaire par des micro-injections directement dans le PVN du rat (Stanley and Leibowitz, 1984), suggérant que chez le rat, le PVN semble être le site d'action du NPY (Billington et al., 1994). Par contre quand il est injecté dans le striatum, l'hypothalamus latéral antérieur et le globus pallidus, le NPY n'a aucun effet sur la prise alimentaire (Morley et al., 1987; Sahu et al., 1988). Chez le rat et la souris, l'administration aigue du NPY dans les ventricules cérébraux, ou directement dans

l'hypothalamus augmente considérablement la prise alimentaire, alors qu'une administration centrale chronique du peptide sur plusieurs jours entraîne une augmentation du poids corporel et des concentrations plasmatiques d'insuline, de corticostérone et de triglycérides, un état correspondant au syndrome clinique de l'obésité (Kalra et al., 1999).

Bien que le NPY soit principalement connu pour son rôle métabolique, des effets de ce neuropeptide dans la régulation de l'axe reproducteur ont également été rapportés. Les neurones exprimant le NPY sont adjacents aux corps cellulaires et dendrites des neurones à GnRH (Skinner and Herbison, 1997) dans la POA (Guy et al., 1988; Tsuruo et al., 1990) et l'ARC (Chronwall et al., 1985; Li et al., 1999a). Aussi, une libération pulsatile corrélée de GnRH et du NPY dans l'éminence médiane a été rapportée chez des singes rhésus gonadectomisés (Woller et al., 1992).

Les effets du NPY sur la libération de la GnRH sont controversés et varient en fonction de l'environnement hormonal des animaux. En effet, il a été rapporté que le NPY stimule l'axe reproducteur quand les niveaux des œstrogènes sont élevés alors qu'il inhibe la libération du GnRH lorsque de faibles concentrations d'œstrogènes sont présentes (Kerkerian et al., 1985; Crowley and Kalra, 1987; Khorram et al., 1987a; Kaynard et al., 1990).

2.2 La POMC

La POMC est un précurseur protéique de nombreuses hormones polypeptidiques, dont les hormones mélanotropes, corticotropes, lipotropes et les endorphines. Il est synthétisé dans le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral, l'hypophyse et l'ARC (Joseph et al., 1983). Dans l'hypothalamus, les neurones à POMC innervent la POA, l'éminence médiane et le VMH (Gonzalez et al., 1997). Une autre population projette vers le PVN, l'hypothalamus latéral, l'hypothalamus postérieur et le noyau central de l'amygdale. C'est un régulateur important de l'homéostasie énergétique (Boston, 2001), il produit plusieurs peptides biologiquement actifs connus pour jouer un rôle central dans la régulation de la balance énergétique, parmi lesquels figurent la β -endorphine, l'ACTH, et l' α -MSH qui a particulièrement des effets importants dans la régulation de la prise alimentaire (Fan et al., 1997a; Murphy et al., 1998; Schulz et al., 2010). Au niveau central, les neurones à POMC sont situés essentiellement dans l'hypothalamus, notamment dans l'ARC, les régions péri-archés de l'hypothalamus mediobasal et dans la région rétrochiasmatic, et ils

projetent dans divers régions cérébrales (Bloch et al., 1978; Khachaturian et al., 1985). Au niveau périphérique, la glande surrénale constitue une source supplémentaire de libération des opioïdes endogènes principalement dans la partie médullaire (Cheng et al., 2001).

La POMC est surtout connue pour son effet anorexigène inhibant la prise alimentaire, qui est principalement médié par l' α -MSH (Brown et al., 1998). Ce processus active les récepteurs mélanocortines MC3 / MC4 (Cowley et al., 2001; Heisler et al., 2003; Hill et al., 2008). Ces récepteurs sont principalement exprimés dans les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire, notamment le PVN, le DMH et le VMH. Une administration de l' α -MSH supprime de façon très puissante la prise alimentaire lorsqu'elle est injectée en icv (Fan et al., 1997a; Murphy et al., 1998). De même, l'administration centrale d'un antagoniste du récepteur de la mélanocortine stimule la prise alimentaire (Fan et al., 1997a; Murphy et al., 1998), même chez des rats déjà suralimentés (Hagan et al., 1999), et peut induire une hyperphagie et une obésité sévère (Kask et al., 1999). Cependant, des effets orexigènes de la β -endorphine ont été rapportés (Leibowitz and Hor, n.d.; Silva et al., 2001). De plus, il a été rapporté que la β -endorphine antagonise les effets de l' α -MSH sur la prise alimentaire et aussi sur la masse corporelle (Dutia et al., 2012).

L'administration icv des agonistes de la POMC induit une forte diminution de la prise alimentaire et une augmentation des dépenses énergétiques d'où son rôle catabolique (Brady et al., 1990).

Tout comme le NPY, la POMC possède également un effet bipolaire sur l'axe reproducteur en agissant centralement pour réguler les taux de la LH (Scimonelli and Celis, 1990; Gonzalez et al., 1997). C'est un inhibiteur de la reproduction lorsqu'il est injecté en période d'œstrus ou métœstrus après le pic de LH (Volosin and Celis, 1984; Celis, 1985) et stimulateur lorsqu'il est injecté en pro-œstrus avant la libération de la LH (Alde and Celis, 1980; Celis, 1985).

2.3 La somatostatine

La somatostatine est un autre neuropeptide classé dans la case des peptides métaboliques pour son implication dans la régulation de la balance énergétique, notamment la prise alimentaire et la masse corporelle. Il s'agit d'un neuropeptide multifonctionnel produit par le noyau périventriculaire de l'hypothalamus, l'ARC, ainsi que d'autres régions cérébrales (Guillemin and Gerich, 1976). Il se lie à des récepteurs situés dans différents noyaux du cerveau impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, notamment l'ARC. C'est un peptide du système nerveux central qui régule l'axe endocrinien en inhibant un grand nombre d'hormones (Guillemin and Gerich, 1976), dont la plus importante est l'hormone de croissance (Vale et al., 1972; Brazeau et al., 1974; Rogers et al., 1988). Il agit comme un neurotransmetteur dans le système nerveux central et comme une hormone dans la périphérie, mais l'une de ses missions les plus importantes est la régulation du comportement alimentaire. En effet, lorsqu'elle est administrée au niveau périphérique, la somatostatine réduit la prise alimentaire chez les rats et les babouins (Lotter et al., 1981), et modifie, en fonction du cycle lumière/obscurité, le poids corporel, la prise alimentaire et la motilité intestinale chez le rat (Scalera and Tarozzi, 1998). De plus, des études récentes ont rapporté l'implication de la somatostatine dans la régulation saisonnière de la masse corporelle et du métabolisme. Chez le hamster sibérien, des variations saisonnières de l'expression de l'ARNm de la somatostatine ont été détectées dans l'ARC et l'augmentation de son expression en PC a été liée à la diminution de la masse corporelle de l'animal observée normalement dans ces conditions photopériodiques (Herwig et al., 2012; Dumbell et al., 2015).

Une communication bidirectionnelle a été mise en évidence entre les neurones de la somatostatine et ceux de la POMC, puisque des récepteurs de la somatostatine sont exprimés par les neurones à POMC de l'ARC et les neurones à POMC projettent sur la majorité des neurones à somatostatine du noyau périventriculaire, suggérant que les effets de la somatostatine sur la croissance pourraient être sous l'influence des mélanocortines (Fodor et al., 1998).

3. Rôle des peptides RF-amides dans l'interaction des axes métaboliques et reproducteurs

La reproduction et la balance énergétique sont deux axes intimement liés plus particulièrement chez les espèces sauvages exposées à des changements saisonniers marqués par des variations synchrones de la durée d'éclaircissement, de la température ambiante et surtout de la disponibilité en nourriture.

Depuis la découverte des peptides RF-amides notamment Kp et RFRP-3, leur localisation dans des structures hypothalamiques impliquées dans le métabolisme énergétique et dans la régulation saisonnière de la reproduction, a poussé plusieurs recherches à se focaliser sur leur implication dans l'interaction entre les deux axes reproducteur et métabolique (Figure 18).

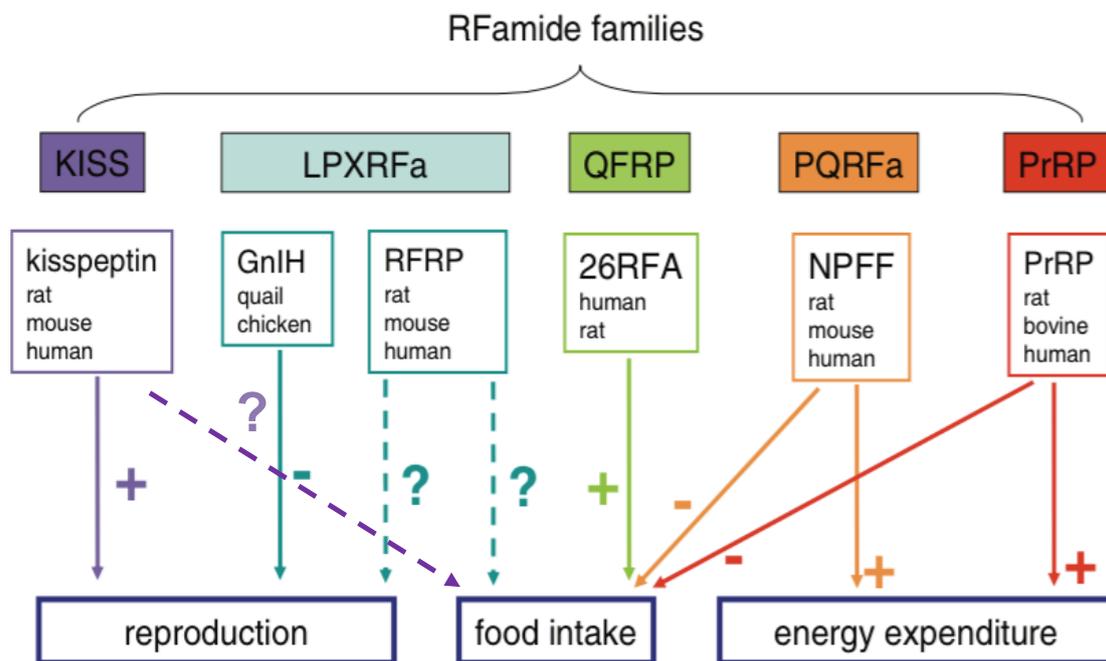


Figure 18: Les peptides RF-amides chez les vertébrés et leurs implications dans la régulation de la reproduction, de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques. Les points d'interrogation représentent les rôles qui ne sont pas encore clairement établis. Modifié d'après (Ebling and Luckman, 2008).

3.1 Kisspeptine et régulation de la balance énergétique

En raison de sa synthèse dans l'ARC, il a été supposé que Kp pourrait être sensible à l'état métabolique et peut transmettre les informations du statut énergétique à des composants de l'axe reproducteur.

Le Kp est surtout connu pour sa sensibilité à une balance énergétique négative. En effet, il a été montré que les niveaux de l'ARNm du *kiss1* diminuent chez les rats femelles adultes après une privation de nourriture de 18 heures (Brown et al., 2008) et chez les souris mâles adultes après un jeûne de 12 heures (Luque et al., 2007). De même, une privation de nourriture de 72 heures chez des rats pubertaires mâles et femelles, diminue significativement les niveaux d'ARNm du *Kiss1* et les taux plasmatiques de la LH (Castellano et al., 2005). Une observation de la même étude montre qu'une administration de Kp exerce un effet plus puissant sur l'axe reproducteur chez des animaux privés de nourriture que chez d'autres nourris *ad-libitum* (Castellano et al., 2005). De façon intéressante, le Kp stimule la libération de la LH chez les rates allaitantes, mais son effet reste moins puissant chez les rates allaitantes que chez les témoins non allaitantes (Roa et al., 2006; Yamada et al., 2007). Suite à ces observations, un rôle de Kp dans la régulation de la prise alimentaire a été proposé. Cependant, des travaux ont rapporté que le Kp n'affecte pas la prise alimentaire des rats (ni quand ils sont à jeun ni nourris *ad-libitum*) (Thompson et al., 2004; Castellano et al., 2005). De même, aucun effet de Kp n'a été détecté chez le mouton (Clarke et al., 2012). Par contre, à l'inverse de ces résultats, un effet anorexigène de Kp a été rapporté chez la souris sous balance énergétique négative. En effet, cet effet anorexigène du Kp a été trouvé chez les souris privées de nourriture pendant 12h, mais pas celle nourries *ad-libitum* (Stengel et al., 2011). Ces observations suggèrent que les neurones à Kp sont très sensibles à l'état métabolique et transmettent la stimulation ou l'inhibition subséquente de l'axe métabolique à des structures en aval agissant sur l'axe reproducteur, mais ceci est dépendant des espèces, du sexe, et de l'état énergétique de l'animal.

En 2010, Fu et Van den Pol ont mis en évidence chez la souris une forte innervation des neurones à POMC par les fibres Kpergiques, Cette innervation a été couplée avec une excitation robuste des neurones à POMC (Fu and van den Pol, 2010). Il a été suggéré que cet effet soit médié par des mécanismes basés sur l'activation d'un échangeur de sodium/calcium et éventuellement l'ouverture de canaux non-sélectifs aux cations. La

stimulation qu'exercent les Kp sur les cellules POMC a été corroborée par des données de PCR quantitative de la même étude, montrant l'expression des récepteurs GPR54 dans l'ARC. En revanche, la même étude a rapporté que le Kp inhibe les neurones à NPY par un mécanisme indirect médié par le GABA (Figure 19). Chez le mouton, les fibres Kpergiques se trouvent en étroite apposition avec les neurones à POMC et les neurones à NPY. De plus, une administration du Kp a été capable de diminuer l'expression de l'ARNm du gène codant pour la POMC et d'augmenter l'expression du gène codant pour le NPY (Backholer et al., 2010).

3.2 RFRP-3 et la régulation de la balance énergétique

Du fait que les neurones à RFRP-3 sont situés dans le DMH, connu pour son rôle important dans le contrôle du métabolisme énergétique il semble possible que le RFRP-1 et / ou RFRP-3 peuvent jouer un rôle dans la régulation du comportement alimentaire. Chez le mouton, des fibres de RFRP-3 ont des appositions étroites avec les neurones du NPY, de la POMC, de l'orexine, et ceux de l'hormone de concentration de mélanine (MCH) (Qi et al., 2009), qui sont tous connus pour jouer un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire. De plus, une administration de RFRP induit l'expression du c-Fos dans l'ARC chez le rat et le hamster (Yano et al., 2003; Ancel et al., 2012). De même, chez la souris, le GnIH et le NPY ont été localisés dans les axones juxtaposant les neurones à POMC. Il a été proposé que ces derniers soient inhibés par le GnIH et le NPY (Fu and van den Pol, 2010) (Figure 19). De plus, il a été rapporté que le RFRP-3 projettent vers les neurones à NPY et à POMC chez la brebis (Qi et al., 2009), et augmentent l'expression génique du NPY chez le rat (Clarke et al., 2012).

Tout comme le Kp, des études ont visé le rôle de RFRP-3 dans la régulation de la prise alimentaire chez quelques espèces de mammifères. L'administration icv du RFRP-3 induit une augmentation du poids corporel chez les rats (Johnson and Fraley, 2008) et de la prise alimentaire chez les rats, les poussins, les moutons et les singes (Tachibana et al., 2005; Johnson et al., 2007; Murakami et al., 2008; Ubuka et al., 2009; Clarke et al., 2012; Anjum et al., 2016), alors que l'administration icv de RFRP-3 pendant 5 semaines n'a pas eu d'effet ni sur la prise alimentaire ni sur le poids corporel du hamster syrien (Ancel et al., 2012). Cependant, dans une autre étude, une injection centrale du RFRP-1 a entraîné une diminution de la prise alimentaire chez les rats (Kovács et al., 2012). Étant donné que le RFRP-1 appliqué en icv chez des poussins a réduit de manière significative aussi bien la

prise alimentaire que l'apport hydrique (Newmyer and Cline, 2009), on peut suggérer que les RFRP-1 et RFRP-3 pourraient avoir des effets différents chez les vertébrés sur la prise alimentaire.

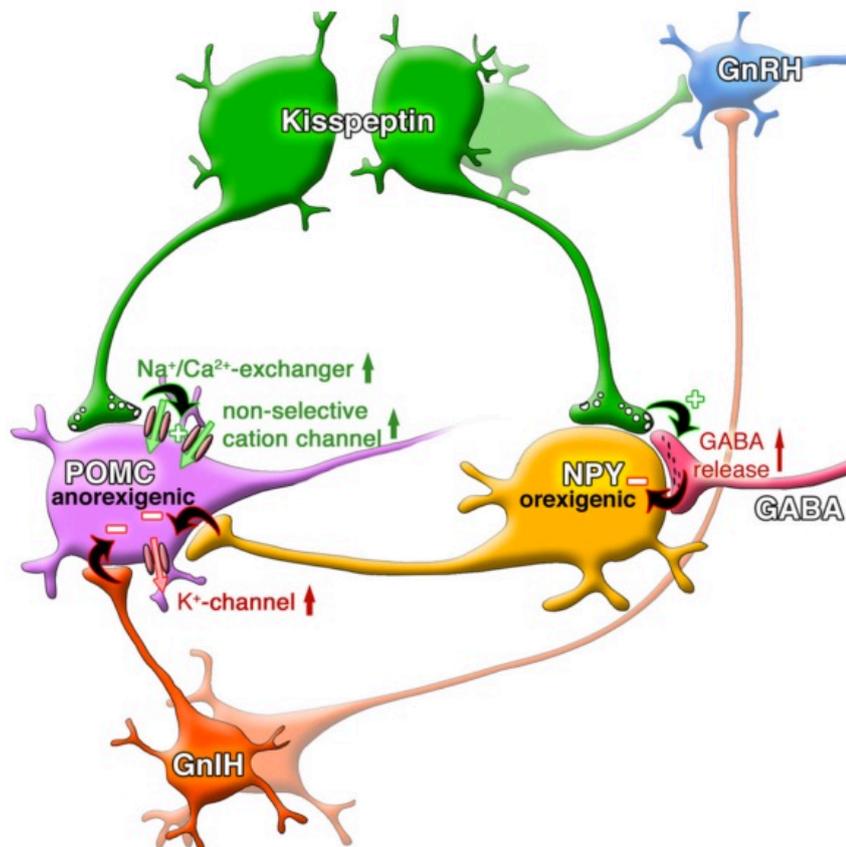


Figure 19 : Modèle schématique représentant les interactions, chez la souris, entre les neurones à Kp et à GnIH, connus comme peptides impliqués principalement dans la régulation centrale de la reproduction et les neurones à POMC et à NPY du noyau arqué, impliqués principalement dans la régulation de la balance énergétique (Fu and Van den Pol, 2010).

OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE

La synchronisation de l'activité de la reproduction avec celle du métabolisme est essentielle chez tous les être vivants, notamment les espèces saisonnières sauvages exposées à des changements marqués de la disponibilité en nourriture dans leur biotope et dont la naissance et la survie des petits sont conditionnées par des saisons où les facteurs environnementaux sont les plus favorables. La reproduction est un processus coûteux en énergie, et une reproduction réussie nécessite donc des ressources énergétiques suffisantes au sein de l'organisme des individus. La capacité de synchroniser la reproduction avec le métabolisme énergétique assure donc simultanément que les petits naissent pendant la saison la plus favorable de l'année où l'environnement est suffisamment approvisionné en énergie pour maintenir la survie de la mère et de la progéniture.

Depuis leur découverte récente, le rôle de Kp et de RFRP-3 a été essentiellement analysé dans le contexte de la régulation de l'axe reproducteur, mais très peu étudié dans la régulation du métabolisme. C'est dans ce cadre que l'objectif principal de ma thèse était de déterminer si les mécanismes centraux régulant la reproduction et la balance énergétique sont corrélés avec les changements saisonniers de l'environnement et si les peptides impliqués dans le contrôle central de la reproduction, notamment le Kp et le RFRP-3, peuvent en partie être impliqués dans le contrôle centrale de la balance énergétique.

Contrairement à la plupart des études qui cherchent à évaluer comment le système nerveux central synchronise les fonctions biologiques en utilisant des modèles animales classiques soumis à des conditions contrôlées de laboratoire, nous avons choisi de mener notre étude chez la gerboise *Jaculus orientalis*, un rongeur sauvage hibernant à reproduction saisonnière, capturé de son propre biotope et soumis à des variations saisonnières importante de son environnement vis à vis duquel il adapte particulièrement ses axes métabolique et reproducteur,

Dans le premier chapitre de ma thèse, suite aux travaux réalisés dans notre laboratoire (Janati et al., 2013) et qui ont montré une forte immuno-expression du Kp et du RFRP-3 au printemps par rapport à l'automne, nous avons analysé par hybridation *in situ* non-radioactive les variations saisonnières de l'expression des gènes hypothalamiques codant pour Kp et RFRP-3 respectivement dans le noyau arqué et dans l'hypothalamus ventro-dorso médian de la gerboise mâle afin de vérifier si l'augmentation de l'expression de Kp et de RFRP-3, coïncidant avec la saison de l'activité sexuelle de l'animal, est due à une

augmentation des taux de synthèse de ces deux peptides au printemps par rapport à l'automne. Par la même occasion, nous nous sommes intéressés aux variations saisonnières de gènes codant pour les peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, notamment la POMC, la somatostatine et le NPY.

Dans une seconde partie de ce travail de thèse nous avons étudié l'effet métabolique du Kp et du RFRP-3, notamment leur effet sur la prise alimentaire en relation avec les saisons. Dans un premier temps, nous avons évalué en fonction du sexe, de la saison et de l'état de la balance énergétique de l'animal, l'effet de l'injection intra-cérébro-ventriculaire du Kp sur la prise alimentaire puis sur l'expression des gènes codant pour la POMC, le NPY et aussi le RFRP-3 ; en tant que régulateur potentiel de la prise alimentaire.

Par ailleurs, compte tenu de la sensibilité du système Kpergique à une balance énergétique négative, nous avons évalué l'effet du Kp sur la prise alimentaire d'abord chez des gerboises nourries *ad-libitum* puis chez des gerboises sous déficit énergétique après 48 heures de privation de nourriture, pour évaluer si l'effet métabolique de Kp dépend de l'état énergétique de la gerboise.

Ensuite, dans une autre série d'expériences, nous avons analysé l'effet des injections centrales de RFRP-3 d'abord sur la prise alimentaire puis sur l'expression des gènes codant les peptides hypothalamiques POMC et NPY, pour comprendre les éventuelles interactions entre le RFRP-3, et ces peptides hypothalamiques classiquement connus pour réguler la prise alimentaire.

Pour comprendre comment la saison pourrait influencer l'effet des injections de Kp et de RFRP-3 sur la balance énergétique, l'ensemble de ces études a été effectué aussi bien en automne qu'au printemps. Ceci avait pour but de proposer un modèle de la circuiterie hypothalamique impliquant le Kp et le RFRP-3 dans la régulation de la balance énergétique en fonction des saisons.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Le modèle animal sur lequel nous avons mené ce projet de thèse est la gerboise *Jaculus orientalis*, appelée également la grande gerboise. C'est un petit rongeur saisonnier du désert Marocain, nocturne, sauteur, hibernant et à reproduction saisonnière. Elle appartient à la classe des Mammifères, ordre des Rodentia, sous-ordre des Simplicidentata et la famille des Jaculidae ou Dipodidae (Erxleben, 1777) (Figure 20).

La gerboise une espèce désertique par excellence, anatomiquement bien équipée à son biotope (Kirmiz, 1962). Ce rongeur semble remonter au pleistocène et serait originaire d'Asie (Ellerman, 1949). En effet, Les rongeurs sont des mammifères vivants avec une grande capacité d'adaptation, du fait que l'étendue de leur distribution et leur adaptation est très large (Romer, 1954). Romer a divisé l'âge des mammifères, ou l'ère cénozoïque, en sept époques s'étendant de l'ère paléocène (55 millions d'années) au quaternaire (20.000 ans). Selon H. et G. Termier (Termier H and Termier G, 1952), parmi les grands mammifères qui existaient autrefois dans les grottes datant de l'oligocène, d'autres formes de vie ont été retrouvées, particulièrement des petits rongeurs tels que les marmottes, les rats et les gerboises, qui étaient anciennement considérées par les Romains et les Grecs comme des rats bipèdes.

Règne : Animalia
Embranchement : Chordata
Classe : Mammalia
Sous-classe : Placentalia
Ordre : Rodentia
Sous-ordre : Sciurognathi
Famille : Dipodidae
Sous-famille : Dipodinae



Jaculus orientalis

Figure 20 : Classification de la grande gerboise, communément connue sous le nom de *Jaculus orientalis* (Erxleben, 1777). © Klaus Rudloff. Berlin

La gerboise est paléarctique dans sa distribution (Ellerman, 1949). Elle a une distribution limitée à l'ouest d'Alexandrie le long de la bande littorale. Elle se trouve en Egypte, Lybie,

Tunisie, Algérie et au Maroc. Dans sa description du désert lybien, Bagnold (1954) mentionne que la gerboise peut se trouver dans des endroits où aucune autre forme de vie n'existe. Au Maroc, son habitat est localisé dans les régions semi-arides et semi-désertiques, et dans les buissons subtropicaux. Elle est également trouvée dans des champs d'orge des tribus bédouines semi-nomades (Kirmiz, 1962).

La gerboise est remarquablement adaptée à la vie désertique. Des taux plasmatiques de l'AVP sont remarquablement plus élevés chez la gerboise par rapport au rat de laboratoire (Baddouri et al., 1984; Lakhdar-Ghazal et al., 1995a). La gerboise possède un corps très compact qui peut atteindre 40 cm de longueur. Ce corps comporte une tête assez grande et une queue longue qui se termine par une touffe de poils noirs et blancs et dont la longueur peut atteindre 23 cm. Les membres de la gerboise sont adaptés à la locomotion saltatoire ; ses membres postérieurs sont presque quatre fois plus longs que les membres antérieurs et sont utilisés comme levier permettant ainsi à l'animal de sauter sur de grandes distances. Les mâles sont généralement plus grands que les femelles et (Kirmiz, 1962; Hooper and El-Hilali, 1972).

Au milieu du désert, la gerboise vit dans des terriers qu'elle creuse et dont elle modifie l'emplacement et la profondeur en fonction des saisons (Hooper and El Hilali, 1972). La profondeur de son terrier varie généralement entre 0,75 m et 1,75 m et sa longueur entre 1 et 2,5 m de long. Les terriers ont une chambre principale (où vit la gerboise) et un tunnel de sortie de secours. Pendant les hivers pluvieux, les gerboises creusent leurs terriers sur les côtés des collines pour éviter les inondations en laissant généralement l'entrée du terrier ouverte ; alors qu'en été les terriers sont généralement creusés sur des zones moins élevées près de la végétation, et le trou d'entrée est branché avec le sol, peut-être pour éviter l'entrée de serpents et de l'air chaud (Kirmiz, 1962).

La gerboise est une espèce nocturne, elle est généralement active en dehors de son terrier entre 21h-6h quand les conditions climatiques sont plus favorables pour la recherche de nourriture. En revanche, la gerboise reste dans son terrier entre 6h-21h ; la période coïncidant avec les heures de la journée connues par de grandes fluctuations de la température ambiante dans le biotope (Kirmiz, 1962).

La gerboise est un animal saisonnier par excellence, qui entre en vie ralentie en hiver lorsque les conditions environnementales contraignantes deviennent une source de

divers types de stress. En effet, pendant cette saison, la gerboise diminue sa température interne, ralentit ses fonctions physiologiques et ses réactions métaboliques, accumule les tissus adipeux brun et blanc (Bennani, 1977) et rentre en hibernation (El Hilali and Veillat, 1975; El Ouezzani et al., 2011a). Plusieurs paramètres caractérisant l'hibernation de la gerboise ont été décrits tel que la durée des torpeurs et les éveilles périodiques (El Ouezzani et al., 2011) . Pendant l'hibernation la température rectale de la gerboise chute de 37°C à environ $9,8 \pm 0,7$ °C et il en est de même pour la fréquence cardiaque qui tombe de 300 battements /min à environ $9,3 \pm 1,5$ battements /min. En sortant de l'hibernation, la gerboise augmente sa consommation d'oxygène qui atteint son maximum (6,44 ml/h /g) à partir de 25°C, et se maintient jusqu'à 30°C (El Hilali et Veillat 1975; Hooper et El Hilali 1972).

Beaucoup de travaux ont été réalisés au sein de notre laboratoire pour comprendre les mécanismes neuroendocriniens qui régissent la saisonnalité chez cette espèce suite aux changements des facteurs environnementaux. Ils ont mis en évidence l'implication des mécanismes neuroendocriniens adaptatifs engageant différents neuropeptides hypothalamiques. En effet, comme la privation de nourriture, l'hibernation chez la gerboise induit dans l'ARC une augmentation importante de l'expression du NPY (El Ouezzani et al., 1999, 2001) et du neuropeptide EM66 (Boutahricht et al., 2005), tous les deux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et/ou la réponse au stress associée à la privation de nourriture.

La masse corporelle de la gerboise est régulée par la photopériode (El Ouezzani, 1988). Elle est sujette à des variations saisonnières entre l'automne et le printemps et semble être associée à l'hibernation de l'animal. En effet, le poids corporel des gerboises hibernantes reste relativement élevé au cours de la période d'hibernation, qui commence en fin d'automne vers le mois de décembre, mais diminue après l'éveil de l'hibernation qui a généralement lieu vers le mois de mars (El Ouezzani et al., 2011).

La gerboise est une espèce à reproduction saisonnière. Elle manifeste un cycle annuel de reproduction qui coordonne son activité reproductrice de façon à ce que les petits soient nés au printemps quand les conditions environnementales sont favorables. Son cycle d'activité sexuelle s'étale du printemps jusqu'au début d'été tandis qu'une phase de quiescence sexuelle s'impose entre la fin de l'été et l'automne (Ghobrial and Hodieb, 1973; El Ouezzani et al., 2000; El Qandil et al., 2004; Lakhdar Ghazal et al., 1995a). L'activité

sexuelle de la gerboise au printemps est accompagnée par une augmentation du poids testiculaire et des taux circulants de testostérone et de LH (Oukouchoud et al., 2003; El Qandil et al., 2004; El Qandil, 1989). En parallèle avec ces mécanismes physiologiques, la gerboise exprime des variations saisonnières dans l'expression hypothalamique de plusieurs neuropeptides tels que l'AVP (Lakhdar-Ghazal et al., 1995a), la GnRH (El Ouezzani et al., 2000; El Qandil et al., 2004), le NPY (Lakhdar-Ghazal et al., 1995b), la β -endorphine (El Ouezzani et al., 2005), et le Kp et le RFRP-3 (Janati et al., 2013).

Les bédouins définissent deux saisons de reproduction chez la gerboise, l'une en mars et l'autre en juillet. Cependant, il est possible qu'il n'y ait qu'une seule longue période de reproduction s'étendant de mars à juillet (Kirmiz, 1962). Les gerboises donnent naissance généralement à 4-7 jeunes dépourvus de poils. Allaités dans le terrier maternel, les jeunes ont généralement une croissance lente. Leurs pattes postérieures commencent à se développer à partir de la 8^{ème} semaine, et ce n'est que vers la 11^{ème} semaine, qu'ils commencent à effectuer leurs premiers bonds.

Par ailleurs, les gerboises ne se reproduisent pas au laboratoire et le problème majeur auquel nous nous sommes confrontés dans notre travail était celui de la difficulté de la reproduction en captivité chez la gerboise, même si l'expression neuronale de la GnRH intracérébrale chez la gerboise en captivité est similaire à celle observée chez la gerboise vivant dans son biotope naturel (El Ouezzani et al., 2000). Néanmoins, en 1962 Kirmiz a rapporté que des gerboises femelles capturées gestantes dans le désert, avaient une gestation normale même en captivité, suggérant donc que le blocage de la reproduction est probablement lié au stress inhibant le comportement copulatoire de l'animal, principalement la fécondation par le mâle et l'ovulation par la femelle.

II. GROUPES EXPERIMENTAUX

1. Animaux

Dans la première partie de notre travail qui concerne l'étude comparée de la régulation saisonnière des neuropeptides hypothalamiques régulant l'activité de la reproduction (Kp et RFRP-3) et de la prise alimentaire (POMC, NPY et somatostatine), nous avons utilisé des gerboises mâles capturées dans les hauts plateaux des montagnes du Moyen Atlas du Maroc (hauts plateaux d'Ifkerne-Boulmane, altitude 1565 m, longitude -4,73, latitude 33, 36). Les animaux ont été transportés à l'Université de Fès, où ils ont été maintenus ensemble dans une seule cage (90 x 60 x 50 cm) dans une pièce avec des fenêtres ouvertes pour maintenir les conditions naturelles de température et de photopériode. La nourriture constituée de grains d'orge et de tournesol et des feuilles de salade a été fournie *ad-libitum*. Les animaux ont été adaptés aux conditions d'animalerie au moins une semaine avant toute expérimentation. Pour cette étude, deux groupes de gerboises mâles ont été considérés, un groupe capturé au printemps (n=4, mois de mai, période d'activité sexuelle) et un groupe capturé en automne (n=4, mois de novembre, période de quiescence sexuelle).

Dans la deuxième partie de ce travail, relative à l'étude de l'effet des injections intracérébro-ventriculaires de Kp et de RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides POMC et NPY, nous avons utilisé des gerboises mâles et femelles (n=94) sexuellement matures pesant entre 100 et 160 g qui ont été capturées dans les montagnes de l'Atlas marocain au printemps (mois de mai) et en automne (mois d'octobre). Les animaux capturés ont été transportés à l'animalerie de la Faculté des Sciences de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah de Fès où ils étaient adaptés pendant une semaine aux conditions du laboratoire. La maturité sexuelle de ces animaux a été déterminée en fonction de leur poids corporel et les paramètres morphologiques de leur organe sexuel. Après la période d'adaptation, les animaux ont été mis dans des cages individuelles (36 × 24 × 19 cm) dans des conditions naturelles de température et de photopériode avec accès *ad-libitum* à la nourriture (graines d'orge et de tournesol en plus des feuilles de salade).

L'effet des injections du Kp10 sur **(1)** la prise alimentaire et sur **(2)** l'expression des gènes codant les peptides hypothalamiques POMC et NPY a été étudié chez des gerboises mâles et femelles d'automne et de printemps, tandis que l'effet du RFRP-3 sur **(1)** la prise alimentaire et sur **(2)** l'expression génique des de la POMC et du NPY a été étudié chez des

femelles de printemps et d'automne (Figure 21). À l'Université de Fès, où les expériences de cannulations et d'injections ont été réalisées, toutes les expériences ont été menées conformément aux lignes directrices internationales pour le soin et l'utilisation des mammifères en *Neurosciences and Behavioral Research (2003)*.

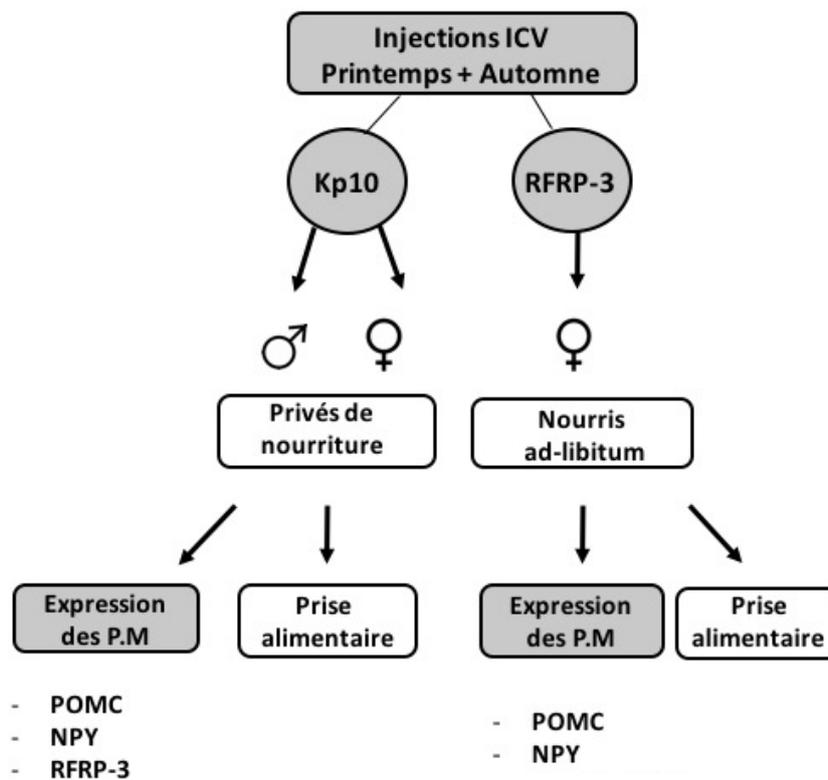


Figure 21 : Schéma illustrant le protocole expérimental suivi dans l'étude de l'effet des injections intra-cérébro-ventriculaires de kisspeptine et de RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression de gènes codant pour les peptides métaboliques (P.M), notamment la POMC et le NPY.

III. HYBRIDATION *IN SITU* NON-RADIOACTIVE

1. Préparation du tissu cérébral et prélèvement sanguin

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'éthyle uréthane à une dose de 1ml/100g (Acros Organics) entre 10h et 12h. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque puis centrifugé pendant 10 min à 4000 tours/min, le plasma a été extrait puis stocké à -20°C. Les animaux ont ensuite été perfusés par voie intracardiaque avec 50 ml de solution saline isotonique (NaCl 9 ‰) suivi de 250 ml de formaldéhyde à 4% (Sigma-Aldrich) préparé dans du tampon phosphate (PB) à un pH de 7,6. La tête de l'animal a été gardée dans du paraformaldéhyde (PAF) à 4% pendant une heure, puis les cerveaux ont été prélevés et post-fixés pendant 24h dans la même solution de fixation. Les cerveaux fixés ont été déshydratés dans des bains d'éthanol à concentration croissante avant d'être inclus d'abord dans du polyéthylène glycol 1000 (PEG, Acros Organics) puis dans un mélange de PEG 1000 / PEG 1500 (Klosen et al., 1993). Des sections coronales d'une épaisseur de 12µm ont été effectuées au microtome (Leica 2055 autocut, Rueil-Malmaison, France) à partir des noyaux suprachiasmatiques jusqu'aux corps mamillaires. Des coupes sériées ont été réalisées selon l'ARN codant analysé : tout au long de l'ARC pour *Kiss1*, *Pomc*, *Npy*, *somatostatin* et tout au long du DMH/VMH pour *Rfrp*. Pour chaque série une coupe sur 12 a été sélectionnée et ceci 12 fois de suite (chaque série contenait 12 coupes, espacées de 144 µm, couvrant ainsi une extension rostro-caudale totale de 1728 µm). Les coupes ont été montées sur des lames Superfrost® ultraplus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) dans des conditions exemptes d'ARNase, puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation pour l'ISH. Pour les gerboises mâles le poids des testicules a été mesuré après fixation pour vérifier leur état d'activité sexuelle.

2. Préparation et validation des ribosondes

Dans un premier temps, les différentes ribosondes de rongeurs disponibles au laboratoire ont été testées sur le tissu hypothalamique de la gerboise. Parmi ces sondes, nous avons validé les hybridations pour le fragment 87-522 du gène *Npy* du rat (Genbank NM_012614.2), le fragment 157-731 du gène *Pomc* du rat (Genbank NM_139326), le fragment 135-465 du gène *somatostatin* du rat (Genbank NM_012659) et le gène *Kiss1* du hamster sibérien, 99% identique aux fragments 187-566 du rat (Genbank AB_666166.1). Par contre, aucune des ribosondes de rongeurs disponibles n'a pu s'hybrider de façon

satisfaisante avec l'ARNm codant pour le *Rfrp* de la gerboise. Nous avons donc procédé au clonage de ce gène chez la gerboise *Jaculus orientalis*. Les ARNm ont été extraits de l'hypothalamus frais de deux gerboises mâles de printemps en utilisant le kit de purification (GeneJet RNA ; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA). Les ARNm ont été soumis à une transcription inverse pour former des ADN complémentaires (Superscript III, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA). Une PCR par essais (Touchdown PCR) a ensuite été réalisée en utilisant des amorces sens (CATCTTGTTGACTTTAGCCACTTC) et antisens (AGAAGATGGCATGAAGCTGT) conçues selon la séquence du gène de *Jaculus jaculus* (NC_005314.1). Un fragment d'ADNc de 614 paires de base, dont la séquence a été vérifiée (LGC Genomics GmbH, Germany), a été cloné dans le vecteur pST Blue1 (Perfectly Blunt Cloning kit, Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Des ribosondes sens et anti-sens contenant les séquences d'intérêt ont été transcrites de plasmides linéarisés en présence de nucléotides marqués à la digoxigénine selon le protocole du fabricant (Dig RNA Labelling Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La longueur des sondes a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose (formaldéhyde-Acide 3-[N-morpholino] propane sulfonique) et par Northern blot.

La spécificité de toutes les ribosondes a été évaluée par **(1)** l'absence du signal avec des sondes sens, **(2)** la résistance au traitement du signal RNase de post-hybridation, **(3)** une post-hybridation dans des conditions de forte stringence (0,1x SSC, 72°C), et **(4)** la localisation neuroanatomique obtenue pour chaque neuropeptide (voir résultats).

3. Hybridation

L'hybridation des ribosondes a été réalisée selon un protocole précédemment validé dans notre laboratoire (Klosen et al., 2013). Des coupes de cerveau incluant l'ARC (pour *Kiss1*, *Pomc*, *Npy* et *somatostatin*), et le DMH/VMH (pour *Rfrp*) ont été post-fixées dans du formaldéhyde à 4% pendant 10 min à température ambiante, puis rincées dans du tampon phosphate salin (PBS, pH 7.6) avant d'être traitées pendant 30 min à 37°C avec 1 µg/ml de Protéinase K (Roche, Meylan, France). Le traitement à la protéinase K a été arrêté avec du formaldéhyde à 2% dans du tampon phosphate. Les coupes ont ensuite été acétylées avec 0.25% d'anhydride acétique dans 100 mM du triéthanolamine, deux fois pendant 10 min, puis rincées deux fois dans du PBS contenant 0.02% de pyrocarbonate de diméthyle (DMPC) et pré-incubées dans une solution contenant 5x du tampon citrate de sodium salin (SSC), 0.05% du Tween-20 et 0.02% du DMPC. L'hybridation a été effectuée pendant 40h à

60°C avec 200 ng/ml de sondes sens ou anti-sens dans une solution contenant 50 % du formamide, du SSC (5x), du Denhart's (5x), 1mg/ml d'ADN du sperme du saumon, 0.1% du Tween-20 et 0.4% du DMPC. Les étapes de la post-hybridation comprenaient 6 rinçages de forte stringence de 10 min chacun dans du SSC (0.1x) et 0.05% du Tween-20 à 72°C, suivis de deux rinçages dans du tampon DIG (Tris (hydroxyméthyl) aminométhane 100 mM ; NaCl 150 mM ; MgCl₂ 2.5 mM ; 0.05% du Tween-20 ; pH 7.5). Les sondes marquées à la digoxigénine ont été détectées à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (1/5000, Roche, Meylan, France). L'activité de la phosphatase alcaline a été détectée par le bromo-chloro-indolyl-phosphate et le nitrobleu de tétrazolium. Les lames ont été mises en incubation dans la solution de détection en obscurité et à température ambiante. Le niveau du marquage a été vérifié périodiquement et le signal de la phosphatase alcaline a été arrêté avant saturation (8 à 10h pour *Rfrp*, *Pomc*, *Npy*, *somatostatin* et 48h pour *Kiss1*).

Finalement, les lames ont été montées d'un milieu de montage aqueux (CC/MountTM, Sigma, St. Quentin Fallavier, France), puis recouvertes d'une lamelle avec l'Eukitt® (Kindler GmbH). Pour chaque gène analysé, les lames issues des animaux d'une même expérience ont été traitées en même temps dans les mêmes conditions expérimentales.

4. Semi-quantification du marquage des ARNm hybridés

Le nombre de neurones marqués et l'intensité du marquage de chaque neurone ont été mesurés dans l'hypothalamus de gerboises soumises aux diverses conditions expérimentales. Le comptage des neurones a été réalisé par deux expérimentateurs ignorant les groupes d'animaux.

Le nombre des neurones à *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* a été estimé par le comptage des cellules marquées dans l'ensemble de l'ARC. Les parties antérieures, médianes et postérieures de l'ARC correspondent respectivement aux coupes localisées entre -2,12 et -2,30 mm/bregma ; -2,8 and -3,14 mm/bregma et -3,6 and -3,8 mm/bregma. Ces coordonnées ont été établies d'après celles du cerveau de rat défini dans l'atlas de Paxinos and Watson (1986). Le nombre de neurones exprimant le *Rfrp* a été estimé en comptant le nombre des cellules marquées dans l'ensemble de la région DMH/VMH. Tous les neurones ont été comptés de part et d'autre du troisième ventricule, au niveau de l'ARC pour *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* et au niveau du DMH/VMH pour *Rfrp* (Figure 22).

Afin d'estimer au plus juste le nombre de neurones exprimant le gène codant pour un neuropeptide dans l'hypothalamus de chaque animal, le nombre de neurones, compté sur les coupes de 12µm espacées de 144 µm, a été recalculé par la correction d'Abercrombie (Abercrombie, 1946).

Le nombre de neurone corrigés est $N_{\text{corr}} = N \cdot 12 \cdot [t/t+d]$ où N= nombre de neurones comptés par coupe ; 12 est le nombre de coupes examinées dans l'étendue rostro-caudale de la structure; t est l'épaisseur de la coupe (12µm) et d est le diamètre moyen du neurone. Le diamètre moyen des neurones marqués a été estimé dans l'étendue rostro-caudale de la structure concernée chez des gerboises de printemps et d'automne pour évaluer un effet possible de la saison sur le diamètre des neurones. Les neurones marqués ont une forme ovoïde ou ronde sans aucune orientation préférentielle. Le diamètre moyen des neurones a été estimé sur 40 cellules marquées pour chaque animal et pour chaque peptide. Le contour de la cellule a d'abord été tracé sur des images de taille calibrée en utilisant le logiciel Image J (W. S. Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Une ellipse a ensuite été ajustée sur le contour de la cellule utilisant la commande 'Fit Ellipse' de Image J. Finalement, le diamètre moyen de chaque cellule a été calculé en utilisant les diamètres maximum et minimum de l'ellipse ajustée. Le diamètre moyen des neurones était : **Kiss1** $d_{\text{automne}}=11.94\mu\text{m}$ et $d_{\text{printemps}}=13.59\mu\text{m}$; **Npy** $d_{\text{automne}}=14,24 \mu\text{m}$ et $d_{\text{printemps}}=15,24 \mu\text{m}$; **Pomc** $d_{\text{automne}}=14,56 \mu\text{m}$ et $d_{\text{printemps}}=15,31 \mu\text{m}$; **Rfrp** $d_{\text{automne}}=15,93\mu\text{m}$ et $d_{\text{printemps}}=16,11 \mu\text{m}$; **somatostatin** $d_{\text{automne}}=12,41 \mu\text{m}$ et $d_{\text{printemps}}=13,61 \mu\text{m}$. Une différence statistiquement significative a été observée dans le diamètre moyen entre les saisons uniquement pour les cellules *Kiss1*.

L'analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage de l'ISH a été effectuée comme précédemment décrite dans Klosen et al., 2013. Des images en niveaux de gris (256 niveaux de gris, au format TIFF) ont été prises en utilisant un microscope Leica DMRB (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) équipé d'un appareil photo numérique Olympus DP50 (Olympus France, Rungis, France). Tous les paramètres d'éclairage du microscope ainsi que les paramètres du logiciel d'acquisition (Viewfinder Lite, Olympus) ont été normalisés pour assurer un éclairage uniforme et stable tout au long de la procédure de capture d'images. Pour chaque peptide analysé, les images des cerveaux de tous les animaux d'une condition expérimentale ont été prises en même temps avec les mêmes paramètres. Les images ont été prises avec un objectif x10 à une résolution de 1392 x 1040

pixels. Une image de fond d'une lame sans coupe de cerveau a été prise pour chaque lame analysée. Cette image de fond a été soustraite de l'échantillon d'image correspondant. Les images ont été ensuite analysées en utilisant le logiciel Image J. Pour l'analyse de *Kiss1*, *Npy*, *Pomc* et *somatostatin* les échantillons ont été pris de part et d'autre du troisième ventricule au niveau antérieur, médian et postérieur de l'ARC, alors que pour l'analyse du *Rfrp* les échantillons ont été pris des deux côtés du DMH/VMH.

Des essais préliminaires ont montré que l'analyse de 60 cellules par cerveau était suffisante pour obtenir une moyenne d'intensité de marquage stable pour chaque peptide hypothalamique analysé. L'intensité de marquage est exprimée par la moyenne de la valeur des niveaux de gris de pixel dans un cercle de taille fixe de 50 μm^2 fixé sur 60 cellules marquées choisies au hasard dans la structure hypothalamique concernée. Pour chaque animal, la moyenne des valeurs de l'intensité de marquage a été calculée à partir de 60 cellules analysées. Et pour chaque peptide, l'intensité de marquage est exprimée par la moyenne des valeurs des niveaux de gris de pixel mesuré chez tous les animaux d'une condition expérimentale.

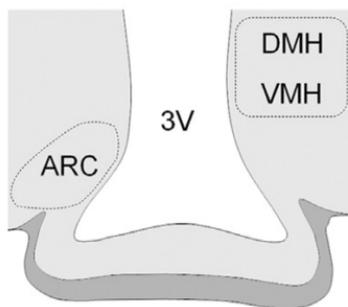


Figure 22 : Représentation schématique d'une section coronale d'hypothalamus représentant les régions où le comptage des neurones a été fait. Le noyau arqué (ARC) pour *Kiss1*, *Npy*, *Pomc* et *somatostatin* et l'hypothalamus dorso-ventro médian (DMH/VMH) pour *Rfrp*. (Saenz de Miera et al., 2014)

En ce qui concerne la quantification des neurones à NPY après les injections icv de Kp et de RFRP-3, face à la difficulté de compter ces neurones dont le nombre est très élevé dans l'ARC et vu leur chevauchement, une analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage des neurones à NPY a été effectuée. Un comptage préliminaire manuel des neurones à NPY dans l'ARC a validé la précision du comptage semi-quantitatif et n'a montré aucune différence significative entre le comptage du nombre des neurones à NPY et la mesure de l'intensité de marquage de ces neurones.

Des images tiff en niveaux de gris, de ce peptide dans l'ARC, ont été prises avec un grossissement x10 à une résolution de 2776 x 2074 pixels. Trois coupes ont été prises pour représenter les régions antérieures, médianes et postérieures de l'ARC. Pour chaque animal, ces coupes ont été photographiées de part et d'autre du ventricule, et pour chaque lame analysée, une image de fond d'une lame sans coupes de cerveau a été prise et soustraite de l'échantillon d'image correspondant. La zone marquée de distribution des neurones à NPY a été délimitée et l'intensité de marquage de l'ARNm du *Npy* a été déterminée par la moyenne de valeur des niveaux de gris de pixel mesuré par image J. Pour chaque animal, la valeur moyenne de l'intensité de marquage a été calculée pour les 3 coupes de l'ARC, et pour chaque condition expérimentale, l'intensité de marquage de l'ARNm du *Npy* a été exprimée par la moyenne \pm SEM des 4 animaux du même groupe.

IV. INJECTION CENTRALE DE NEUROPEPTIDES

1. Poses de canules intra-cérébro-ventriculaires

Une implantation icv de canules a été réalisée chez les gerboises suivant un protocole précédemment établi chez le hamster syrien (Ancel et al., 2012) (Figure 23). Les animaux ont été anesthésiés avec une injection intrapéritonéale d'Imalgène 500 (kétamine 50mg/ml) et de Rompun (xylazine 20mg/kg) puis placés dans le cadre stéréotaxique. Une incision a été réalisée dans le scalp, puis une canule de 22 jauge (Plastics One, Roanoke, VA, USA) en acier inoxydable a été implantée stéréotaxiquement dans le ventricule latéral (les coordonnées stéréotaxiques étaient de 2mm latéralement à la ligne médiane, 0.6 mm postérieur au bregma et 3.5 mm inférieur à la dure mère) et fixée au crâne par des vis à os et du ciment dentaire. Après la chirurgie, les animaux ont été remis dans leurs cages individuelles et laissés pendant une semaine pour une bonne récupération avec accès libre à la nourriture avant l'injection des peptides.

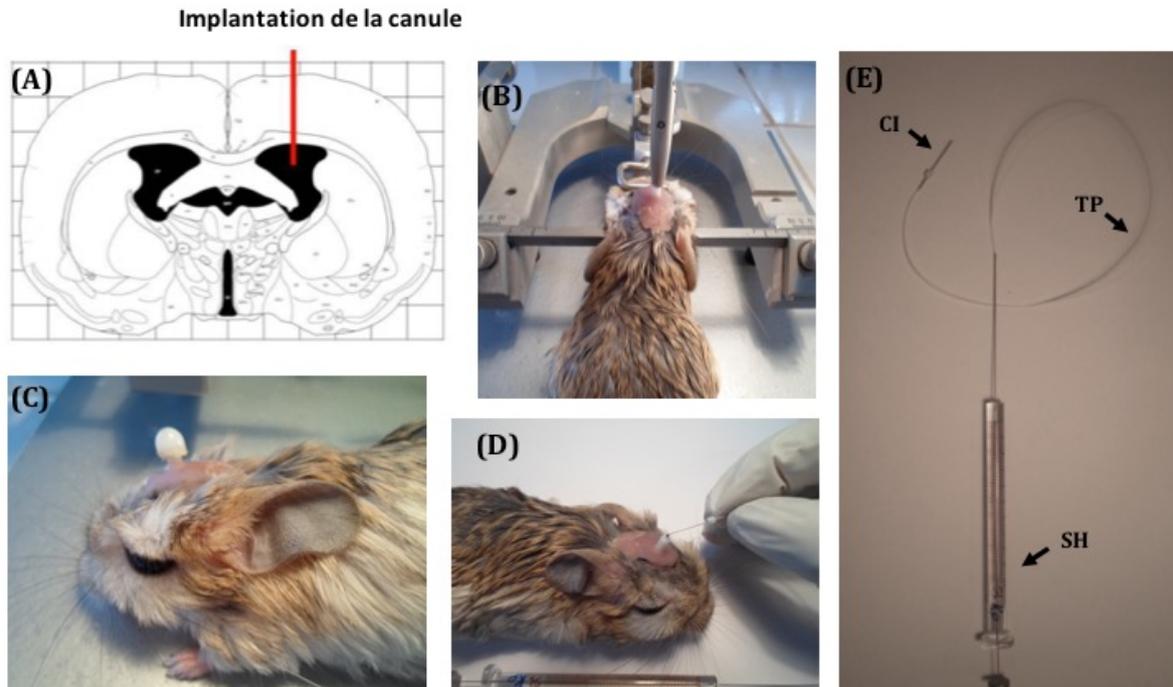


Figure 23 : Schéma illustrant les étapes expérimentales de l'implantation intra-cérébro-ventriculaire des canules, et de l'injection centrale des peptides Kp10 et RFRP-3. (A) Section coronale du cerveau de rat montrant le ventricule latéral où les canules ont été implantées chez la gerboise. **(B)** Gerboise placée dans le cadre stéréotaxique et chez laquelle une canule vient d'être placée. **(C)** Gerboise réveillée de l'anesthésie après implantation de la canule, cette dernière étant couverte par un « plastic gap ». **(D)** Gerboise sous anesthésie gazeuse légère pour injection du peptide à l'aide d'un système d'injection **(E)** constitué d'une canule d'injection (CI), un tube en polyéthylène (TP) et une seringue Hamilton (SH).

2. Administration des peptides

Le Kp10 de la souris (**YNWNSFGLRY-NH₂**, PM : 1300 g) a été synthétisé par GenScript (Piscataway, NJ, USA), et le RFRP-3 (séquence peptidique déduite à partir de la séquence du gène *Rfrp* de *Jaculus orientalis* (cf. paragraphe III.2) : **ILSPIPNLPGRF-NH₂**, PM : 1323 g) a été synthétisé par CASLO (CASLO Laboratory ApS, Lyngby, Denmark). Des doses de peptides de 4 µg pour Kp10 et 5 µg pour RFRP-3 dilué dans 5µL de NaCl 0.9% ont été choisies en se basant sur des expériences antérieures réalisées chez le hamster syrien

(Ancel et al., 2012). Les injections ont été effectuées au début de la phase éclairée (8h-11h). Les animaux ont été soumis à une anesthésie gazeuse, puis dans les 5 min suivantes, 5 μ l de la solution peptidique ou du véhicule (NaCl à 0.9%) ont été injectés en utilisant une canule d'injection de 28 jauge en acier inoxydable fixée d'une part à la canule préalablement montée aux animaux et d'autre part à un tube en polyéthylène, lui-même attaché à une seringue Hamilton de 5 μ l (Hamilton Inc., Reno, NV).

Une expérience préliminaire d'injection de 4 μ g de Kp10 chez des gerboises mâles de printemps a été réalisée pour tester le protocole d'injection icv des neuropeptides. L'injection de Kp10 a induit une augmentation attendue de la production de testostérone (de 1.78 ± 0.61 nmol/L, chez 4 animaux injectés par du NaCl à 6.64 ± 1.35 nmol/L chez 4 gerboises injectés par du Kp10, $p < 0.01$) (Figure 24A) et de l'expression du gène Fos dans l'aire préoptique (Figure 24B).

Dans une première série d'expériences, l'injection des neuropeptides a été réalisée chez les gerboises de printemps ou d'été nourries *ad-libitum*. Dans ces conditions, seul le RFRP-3, pas le Kp10, a altéré la prise alimentaire. Aussi dans une deuxième série d'expériences, l'effet du Kp10 a été testé chez des gerboises privées de nourriture pendant 48h avant l'injection, compte tenu du fait que le Kp pourrait avoir un effet plus prononcé sur la prise alimentaire chez des souris privées de nourriture (Stengel et al., 2011).

3. Etude de l'effet des injections centrales de Kp10 et de RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes hypothalamiques

Après récupération de l'anesthésie, chaque gerboise a été placée dans une cage individuelle. Pour la mesure de la prise alimentaire, une quantité connue de nourriture a été placée dans la cage, puis après avoir remis chaque gerboise injectée, la nourriture restante a été pesée 1h, 2h, 3h, 5h et 24h après l'injection. Pour l'analyse de l'expression des gènes hypothalamiques, les gerboises ont été sacrifiées 1h30 après l'injection et le tissu cérébral a été traité par ISH (comme décrit en III).

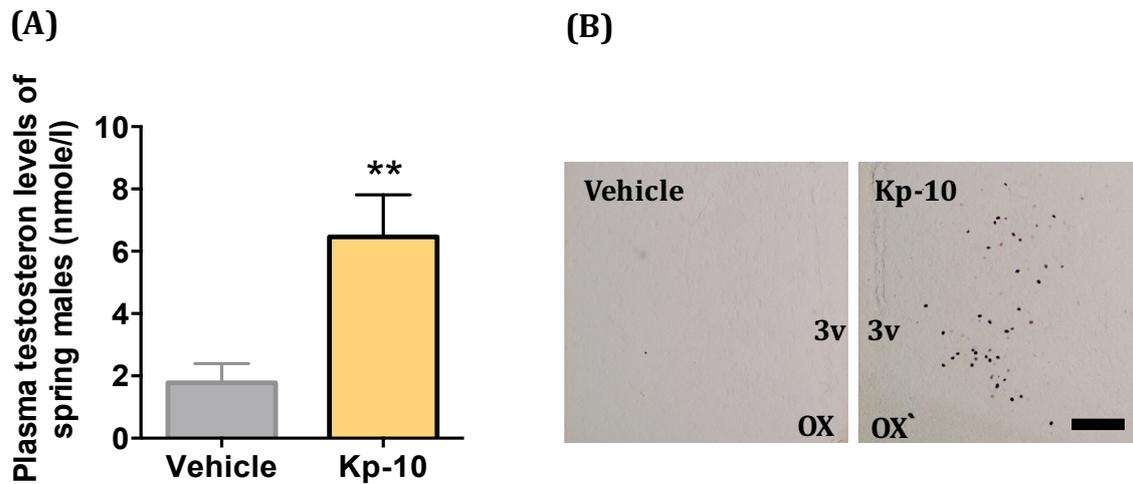


Figure 24 : Effet de l'injection intra-cérébro-ventriculaire de 4 μ g de Kp10 sur **(A)** les taux plasmatiques de testostérone et sur **(B)** l'expression du gène c-Fos, marqueur de l'activation neuronale, dans l'aire préoptique chez des gerboises mâles de printemps sacrifiées 1h30 après l'injection du peptide ou du solvant (NaCl 0.9%). 3v ; troisième ventricule, Ox ; Chiasma optique, Vehicle ; Solvant. Barre d'échelle 100 μ m.

V. MESURE DES VARIATIONS SAISONNIÈRES DE LA PRISE ALIMENTAIRE JOURNALIÈRE

Après leur capture en automne 2012 et transport à la Faculté des sciences de Fès, des gerboises femelles sexuellement matures (n=4) ont été mises dans des cages individuelles avec de la nourriture *ad-libitum* (tournesol, grains d'orges et feuilles de salade) pendant plusieurs jours pour habitude aux conditions de l'animalerie. Ensuite une quantité déterminée de nourriture a été placée dans chaque cage et la prise alimentaire (exprimée en g / 24 h) de chaque animal a été mesurée tous les 3 jours à 9h du matin en pesant la quantité restante de la nourriture dans la cage.

Cette expérience a été menée pendant 15 jours au cours des deux saisons d'automne (Octobre 2012) et du printemps (mai 2013), afin de comparer les variations de la prise alimentaire journalière des gerboises entre les deux saisons marquant les changements des statuts sexuel et métabolique de la gerboise.

VI. DOSAGE DE TESTOSTERONE

La testostérone plasmatique a été mesurée au centre d'exploration médicale, endocrinologie et radio isotopie de Fès au Maroc, en utilisant le kit TESTO-CT2 (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France). Cette mesure est basée sur la compétition entre la testostérone froide et une quantité fixée de testostérone marqué I¹²⁵ pour un nombre limité de sites de fixation sur un anticorps spécifique de testostérone. Les variations intra- et inter-dosages des mesures étaient respectivement de 4.1% et de 5.5%. Pour chaque animal, la quantité de testostérone mesurée est donnée en nmol/l.

VII. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES ET ANALYSES STATISTIQUES

Les valeurs numériques du nombre des neurones et de l'intensité de marquage de chaque neuropeptide représentent la moyenne de 4 gerboises par condition expérimentale (saison ou injection de peptides/solvant). Les comparaisons sont effectuées entre deux groupes d'un effectif égal de n=4 pour chaque groupe. Les variations saisonnières des neuropeptides hypothalamiques, l'effet de la privation de nourriture ainsi que les variations saisonnières de la prise alimentaire ont été tous analysés en utilisant le test-t de Student.

L'effet de l'injection des peptides et du véhicule sur la prise alimentaire a été comparé en utilisant un test d'ANOVA à deux voies à mesures répétées (Two way repeated measure Analysis of Variance (ANOVA)) suivi d'un test de Student-Newman-Keuls. La différence du niveau d'expression des gènes codant pour les neuropeptides entre les groupes injectés avec les peptides et les groupes injectés avec le véhicule a été analysée avec un test ANOVA à deux voies suivi d'un test *post hoc* Holm-Sidak.

Les différences sont considérées comme étant significatives quand $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***). Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) et les graphes ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

RÉSULTATS

I. REGULATION SAISONNIÈRE DES NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES RÉGULANT L'ACTIVITE DE LA REPRODUCTION (KP ET RFRP-3) ET DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE (POMC, NPY ET SOMATOSTATINE) CHEZ LA GERBOISE.

1. Variations saisonnières de l'activité gonadique des gerboises

L'activité gonadique a été mesurée chez des gerboises mâles capturées et sacrifiées au printemps ou en automne. Les animaux de printemps avaient un poids testiculaire significativement plus élevé que ceux d'automne (2.83 ± 0.3 g ; n=4 contre 0.56 ± 0.13 g ; n=4). Les taux de testostérone plasmatique étaient également plus élevés chez les gerboises mâles de printemps par rapport à ceux d'automne (5.11 ± 0.76 ng/L ; n=4 contre 0.71 ± 0.17 ng/L ; n=4). Ces résultats confirment l'activation sexuelle au printemps et la quiescence en automne des gerboises mâles utilisées dans cette étude (Figure 25).

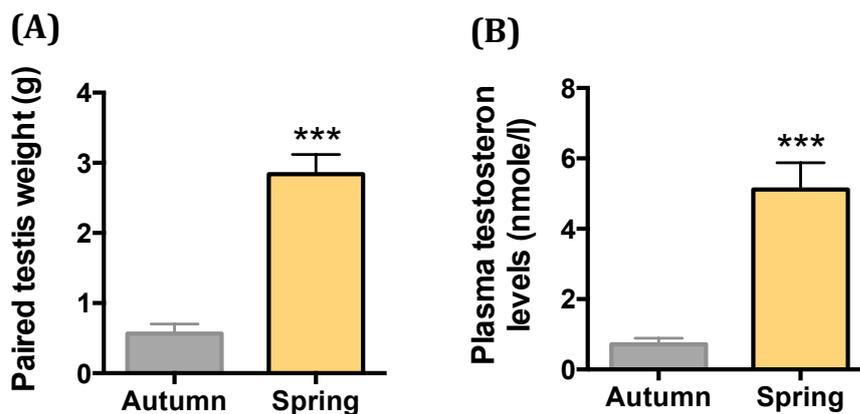


Figure 25 : Variations saisonnières de l'activité testiculaire des gerboises d'automne et de printemps. (A) représente le poids testiculaire (en g) et **(B)** représente les taux plasmatiques de testostérone (en nmol/l) entre des gerboises mâles sexuellement actifs au printemps et des gerboises d'automne sexuellement quiescents. Les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SEM de 4 animaux par saison. *** P <0,001 pour printemps vs automne. Spring ; printemps, Autumn ; automne.

2. Variations saisonnières de la prise alimentaire journalière chez les gerboises femelles

L'existence de variations saisonnières de la prise alimentaire journalière volontaire a été évaluée entre l'automne et le printemps chez des gerboises femelles capturées en automne et maintenues dans des conditions naturelles de température et de photopériode pendant une année.

En automne, les gerboises avaient une prise alimentaire journalière supérieure à celle observées chez les animaux du printemps ($11,59 \pm 0,1134$ g contre $7,452 \pm 0,2210$ g, $P=0,029$). Le test statistique du Mann Whitney a révélé une différence significative entre la prise alimentaire journalière d'automne et celle de printemps ($P < 0.05$) (Figure 26).

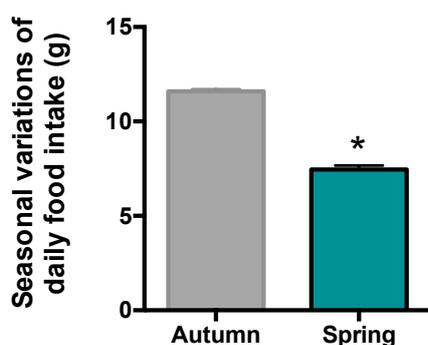


Figure 26 : Variations saisonnières de la prise alimentaire (g/jour/animal). Les valeurs sont représentées par la moyenne de la prise alimentaire des 4 animaux \pm SEM ($n=4$; $*P < 0.05$ pour automne vs printemps).

3. Distribution neuroanatomique des neurones exprimant *Rfrp*, *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* ou *Npy* chez les gerboises mâles

Quelle que soit la saison, les neurones exprimant l'ARNm du *Rfrp* ont été observés seulement dans la zone DMH/VMH, tandis que les neurones exprimant les ARNm des *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* ont été détectés dans les parties antérieures, médianes et postérieures de l'ARC (Figure 27).

Bien que non représentés ici, les neurones *Kiss1* ont également été observés dans la région AVPV et les neurones à *somatostatin* dans la zone hypothalamique périventriculaire antérieure et dans le noyau hypothalamique ventromédian.

La distribution neuroanatomique attendue de ces peptides, ainsi que l'absence du signal avec les sondes sens, confirment la spécificité des sondes hétérologues utilisées pour hybrider ces gènes chez la gerboise.

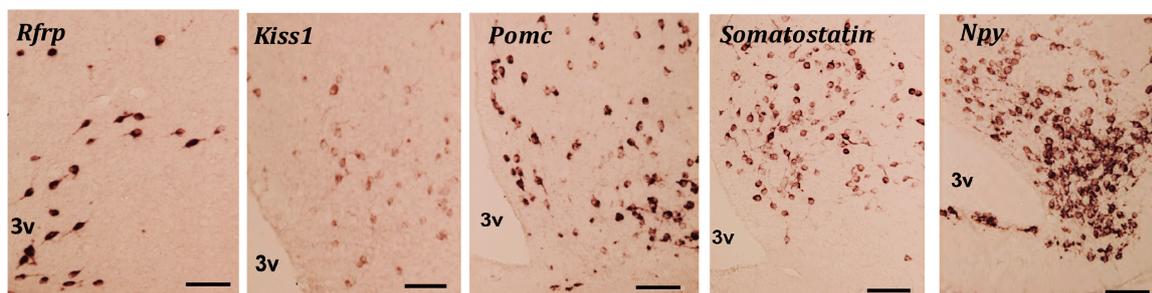


Figure 27 : Distribution des neurones exprimant les ARNm des *Rfrp*, *Kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy*. Les neurones à *Rfrp* ont été détectés exclusivement dans les régions dorso- et ventro- médianes de l'hypothalamus et les neurones à *kiss1*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* ont été détectés tout au long du noyau arqué, dont la région médiane est représentée ici. Grossissement x10. Barre d'échelle 50µm. 3V : troisième ventricule.

4. Variations saisonnières de l'expression des gènes *Rfrp* et *Kiss1* chez les gerboises mâles

Les variations saisonnières de l'expression du *Rfrp* dans le DMH/VMH (Figure 28A), et du *Kiss1* dans l'ARC (Figure 28B) ont été examinées chez des gerboises mâles capturées au printemps ou en automne. Le nombre de neurones exprimant l'ARNm du *Rfrp* était significativement plus élevé chez les gerboises de printemps par rapport aux gerboises d'automne ($p=0.006$; $t= -4,066$; Figure 28C). Par ailleurs, l'analyse de l'intensité de marquage par neurone a indiqué que le niveau d'ARNm du *Rfrp* par neurone était significativement plus élevé au printemps qu'en automne ($p=0.0005$; $t= -6,595$; Figure 28D).

Le nombre de neurones exprimant l'ARNm *Kiss1* dans l'ARC n'était pas significativement différent entre les animaux de printemps et d'automne ($p=0.8$; $t= -0,217$; Figure 28E). Par contre, l'analyse de l'intensité de marquage par neurone a indiqué un niveau significativement élevé de l'ARNm du *Kiss1* au printemps par rapport à l'automne ($p=0.01$; $t= -3,357$; Figure 28F).

5. Variations saisonnières de l'expression des gènes *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* chez les gerboises mâles

L'expression des gènes codant la POMC (Figure 29A), la somatostatine (Figure 29D) et le NPY (Figure 29G) a été analysée dans l'ARC des gerboises de printemps et d'automne.

Le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la *Pomc* ($p=0.004$, $t= -4,346$; Figure 29B) et le nombre de neurones exprimant l'ARNm de la *somatostatin* ($p=0.01$; $t= -3,531$; Figure 29E) étaient nettement plus élevés au printemps par rapport à l'automne. De même, l'intensité du marquage par neurone était plus élevée aussi bien au printemps qu'en automne pour les neurones à *Pomc* ($p=0.0005$, $t= -6,723$; Figure 29C) et à *somatostatin* ($p=0.02$; $t= -3,022$; Figure 29F).

L'analyse des variations saisonnières du nombre des neurones exprimant l'ARNm du *Npy* ($p=0.1$; $t= 1,809$; Figure 29H) ainsi que la moyenne de l'intensité de marquage par neurone ($p=0.1$, $t= 1,648$; Figure 29I) n'a montré aucune variation significative entre les deux saisons.

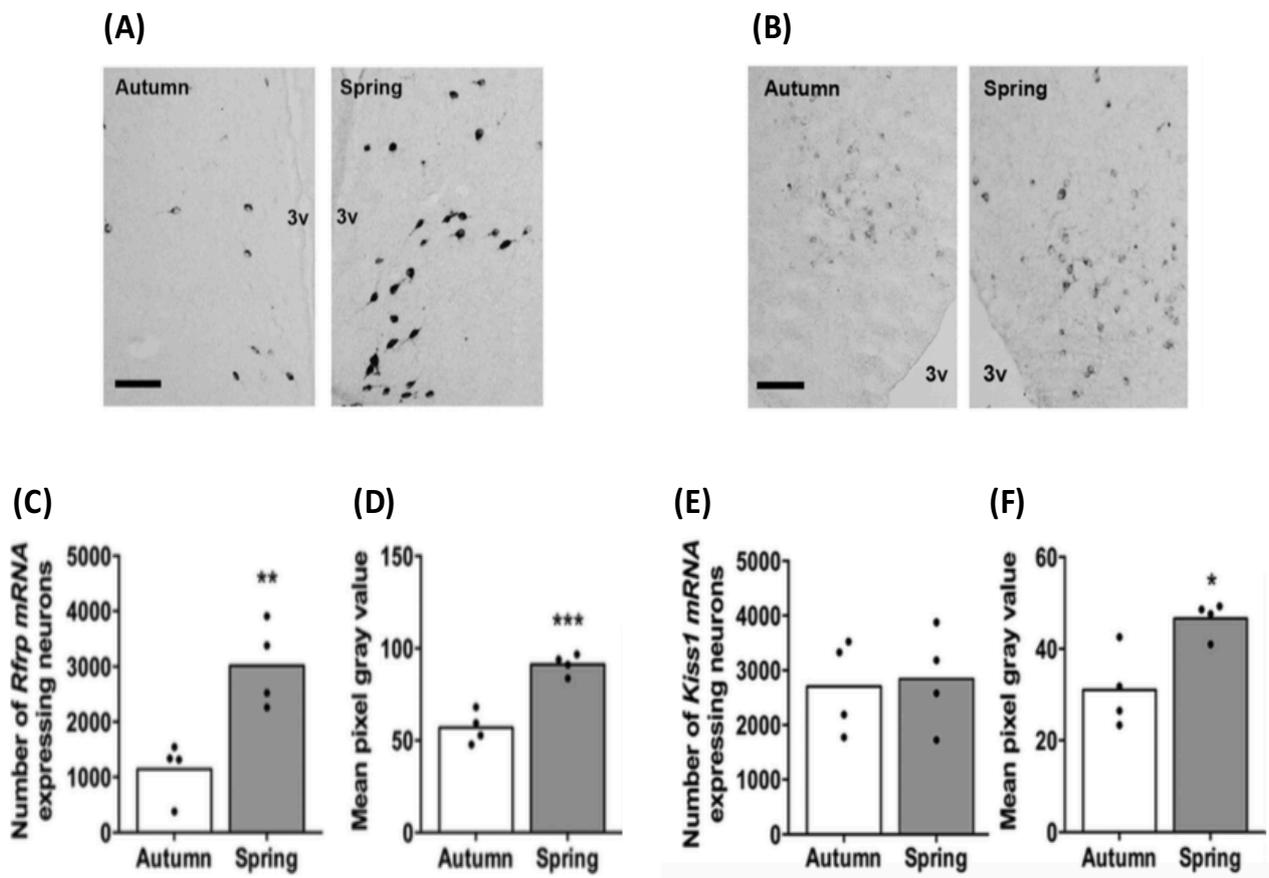


Figure 28 : Variations saisonnières de l'expression des gènes *Rfrp* et *Kiss1* dans l'hypothalamus de gerboises mâles d'automne et de printemps.

(A) et **(B)** : Images représentatives montrant l'hybridation *in situ* non-radioactive des ARNm du *Rfrp* dans les neurones du noyau hypothalamique dorso- et ventro- médian et du *Kiss1* dans les neurones du noyau arqué de gerboises mâles capturées en automne (panneaux de gauche) ou au printemps (panneaux de droite). 3V : troisième ventricule ; Barre d'échelle 50µm. Spring : printemps ; Autumn : automne. **(C)** et **(E)** : Estimation du nombre total par animal de neurones exprimant l'ARNm du *Rfrp* au long de la région dorso- et ventro- médiane et du *Kiss1* tout au long du noyau arqué en automne et au printemps. **(D)** et **(F)** : Semi-quantification de l'intensité de marquage des ARNm du *Rfrp* et du *Kiss1* mesurée dans les neurones individuels dans l'hypothalamus de gerboises de printemps et d'automne (n=4 ; *P < 0.05, ** P < 0,01 et *** P < 0,001 pour printemps vs automne).

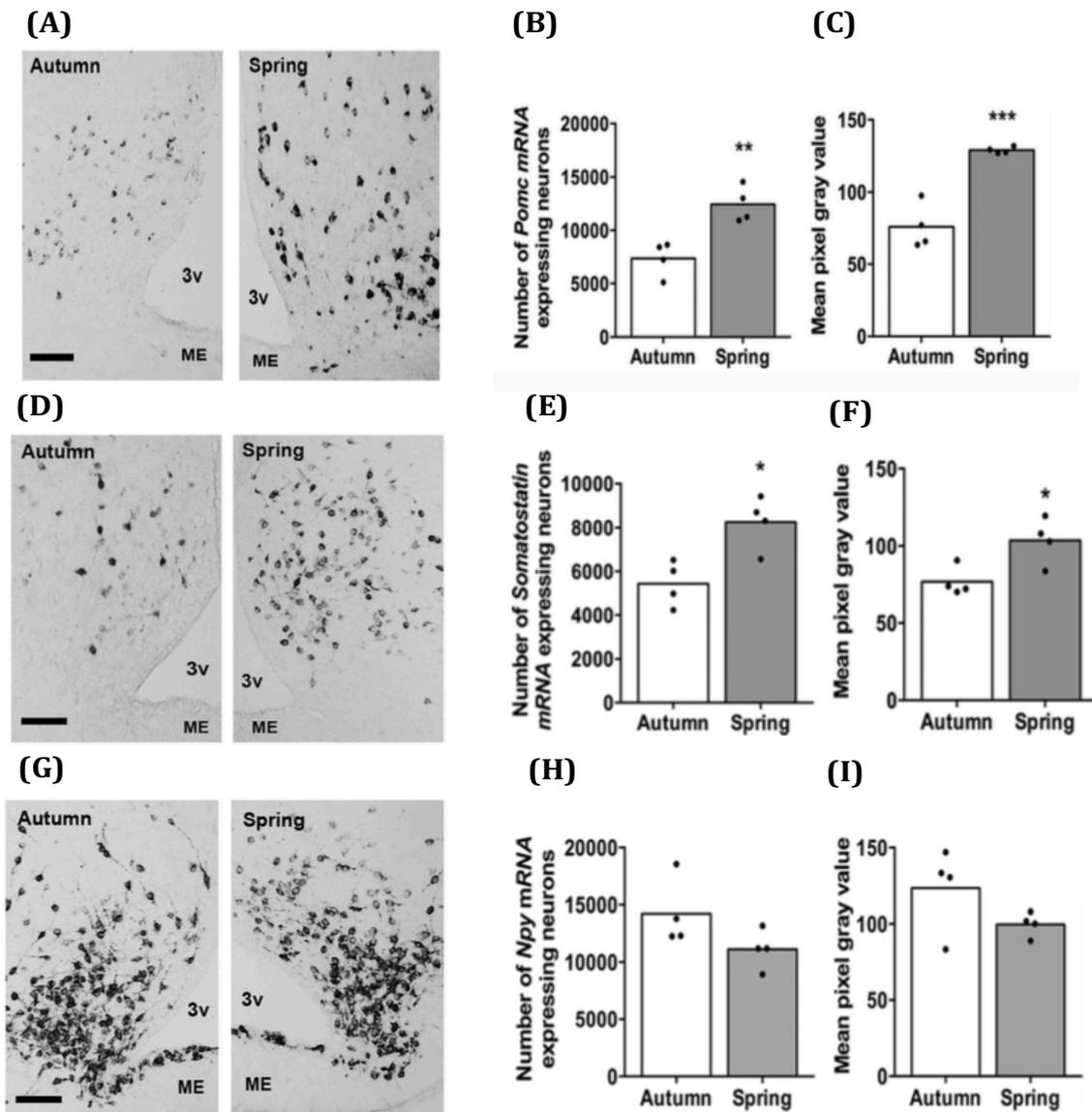


Figure 29 : Variations saisonnières de l'expression de l'ARNm de la *Pomc*, de la *somatostatin* et du *Npy* dans l'hypothalamus des gerboises mâles d'automne et de printemps. (A), (D), (G) : Images représentatives montrant l'hybridation *in situ* non-radioactive des ARNm des gènes *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* dans les neurones du noyau arqué de gerboises mâles capturées en automne (panneaux de gauche) ou au printemps (panneaux de droite), 3V : troisième ventricule ; Barre d'échelle 50µm. ME : Eminence médiane. Spring : printemps ; Autumn : automne. (B), (E), (H) : Estimation du nombre total des neurones par animal exprimant l'ARNm de la *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* dans les neurones de l'ARC en automne et au printemps. (C), (F), (I) : semi-quantification de l'intensité de marquage des ARNm de la *Pomc*, *somatostatin* et *Npy* mesurée dans les neurones individuels dans l'hypothalamus de gerboises de printemps et d'automne (n=4 ; *P < 0,05; ** P < 0,01 et * P < 0,001 pour printemps vs automne).**

II. EFFET DES INJECTIONS CENTRALES DE KISSPEPTINE ET DE RFRP-3 SUR LA PRISE ALIMENTAIRE ET SUR L'EXPRESSION DES GENES CODANT POUR LES PEPTIDES HYPOTHALAMIQUES CHEZ LA GERBOISE

1. Effet de l'injection centrale du Kp10 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides POMC, NPY et RFRP-3 chez les gerboises femelles et mâles d'automne ou de printemps

Bien qu'une dose unique de 4 μ g de Kp ait été suffisante pour augmenter de 5 fois le taux de la testostérone circulante chez les gerboises mâles (cf. section matériel et méthodes), le peptide n'entraîne aucun effet sur la prise alimentaire chez les gerboises mâles et femelles nourries *ad-libitum* (Figure 30).

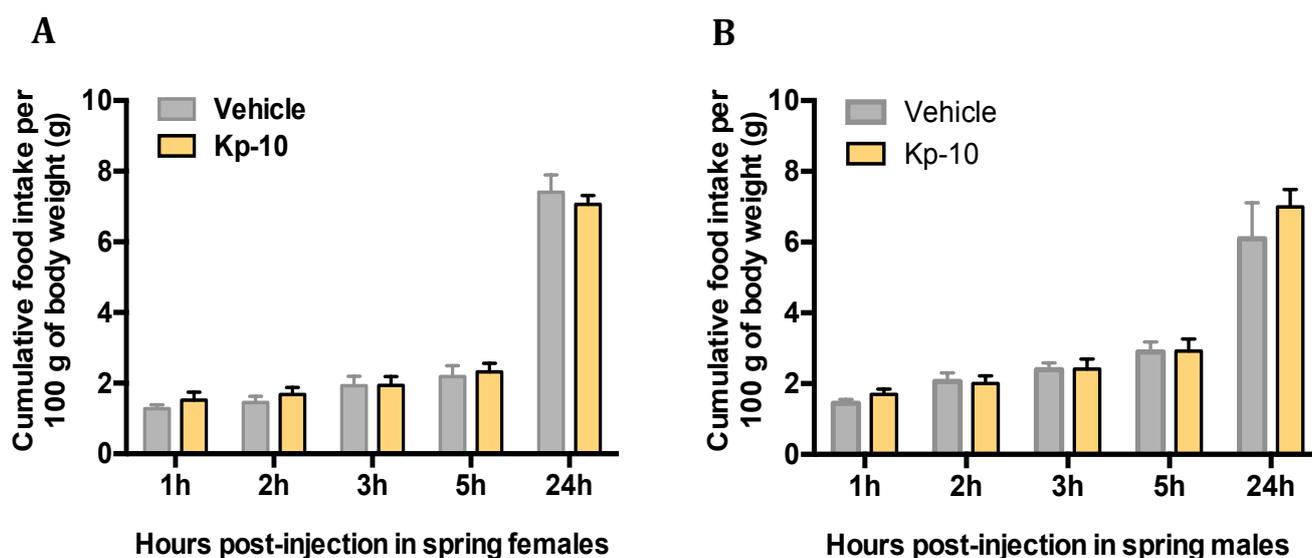


Figure 30 : Prise alimentaire cumulée (g/ 100 g de poids corporel) mesurée 1h, 2h, 3h, 5h, et 24h après l'injection icv du Kp10 ou du solvant (NaCl) chez des gerboises femelles (A) et mâles (B) de printemps nourries *ad-libitum*. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 4 par groupe).

Sur la base des données publiées montrant que le Kp inhibe la prise alimentaire uniquement chez les souris privées de nourriture (Stengel et al., 2011), l'effet de 4 μ g de Kp10 sur la prise alimentaire a été évalué sur les gerboises mâles et femelles capturées au printemps ou en automne et privées de nourriture pendant 48h.

Chez les gerboises femelles capturées au printemps, le Kp10 entraîne une forte diminution de la prise alimentaire (Figure 31A). En effet, l'injection icv de Kp10 a entraîné une diminution significative de la prise alimentaire observée dès la première heure (1h) après l'injection (-50%, $P < 0.05$ comparé aux animaux traités au solvant NaCl 0.9%). Dans l'heure suivante et jusqu'à 5h post-injection, le Kp a inhibé complètement la prise alimentaire (-62%, $P < 0.001$ comparé aux animaux contrôles). Cependant, pendant la phase nocturne du même jour, nous avons noté une augmentation compensatoire de la prise alimentaire chez le groupe traité au Kp, conduisant à des valeurs similaires de la prise alimentaire cumulative 24h après l'injection du peptide ou du solvant. Chez les gerboises femelles capturées en automne, la même dose de Kp10 n'a eu aucun effet sur la prise alimentaire chez le groupe injecté avec du Kp depuis la première heure suivant l'injection et jusqu'à 24h post-injection (Figure 31B).

Afin de vérifier la saisonnalité de l'effet du Kp10, cette expérience a été répétée une deuxième fois l'année suivante chez des gerboises femelles privées de nourriture et les mêmes résultats ont été obtenus, confirmant ainsi l'effet anorexigène du Kp sur la prise alimentaire chez les gerboises femelles de printemps privées de nourriture et non sur les gerboises d'automne.

Chez les gerboises mâles privées de nourriture, qu'ils soient capturées au printemps ou en automne, l'administration centrale du Kp10 n'a eu aucun effet significatif sur la prise alimentaire de la première heure et jusqu'à 24 heures après l'injection (Figure 33A, B). Cette expérience a également été renouvelée l'année suivante et les mêmes résultats ont été obtenus.

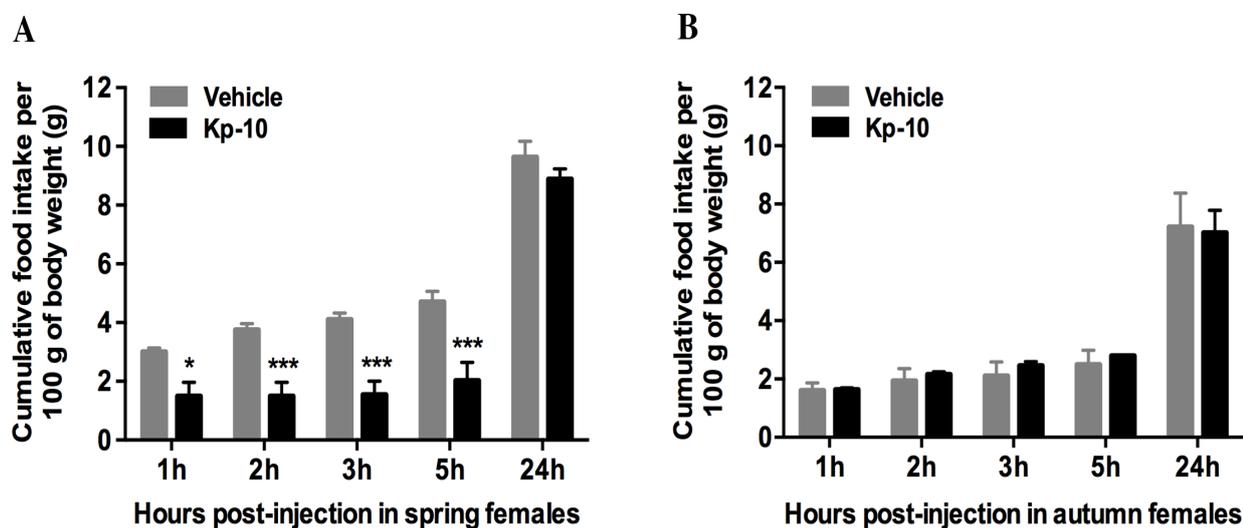


Figure 31 : Effet de l'injection centrale aiguë de Kp10 sur la prise alimentaire chez des gerboises femelles de printemps ou d'automne, privées de nourriture pendant 48 heures. A-B : Prise alimentaire cumulée (g/ 100 g de poids corporel) mesurée 1h, 2h, 3h, 5h, et 24 h après l'injection icv du Kp10 ou de solvant (NaCl) chez des gerboises femelles privées de nourriture 48h au printemps (A) ou en automne (B). Les données sont exprimées sous forme de la moyenne \pm SEM (n = 4 par groupe). * P <0,001 et * p <0,05 pour les différences significatives entre les groupes d'animaux injectés avec du Kp10 ou du solvant.**

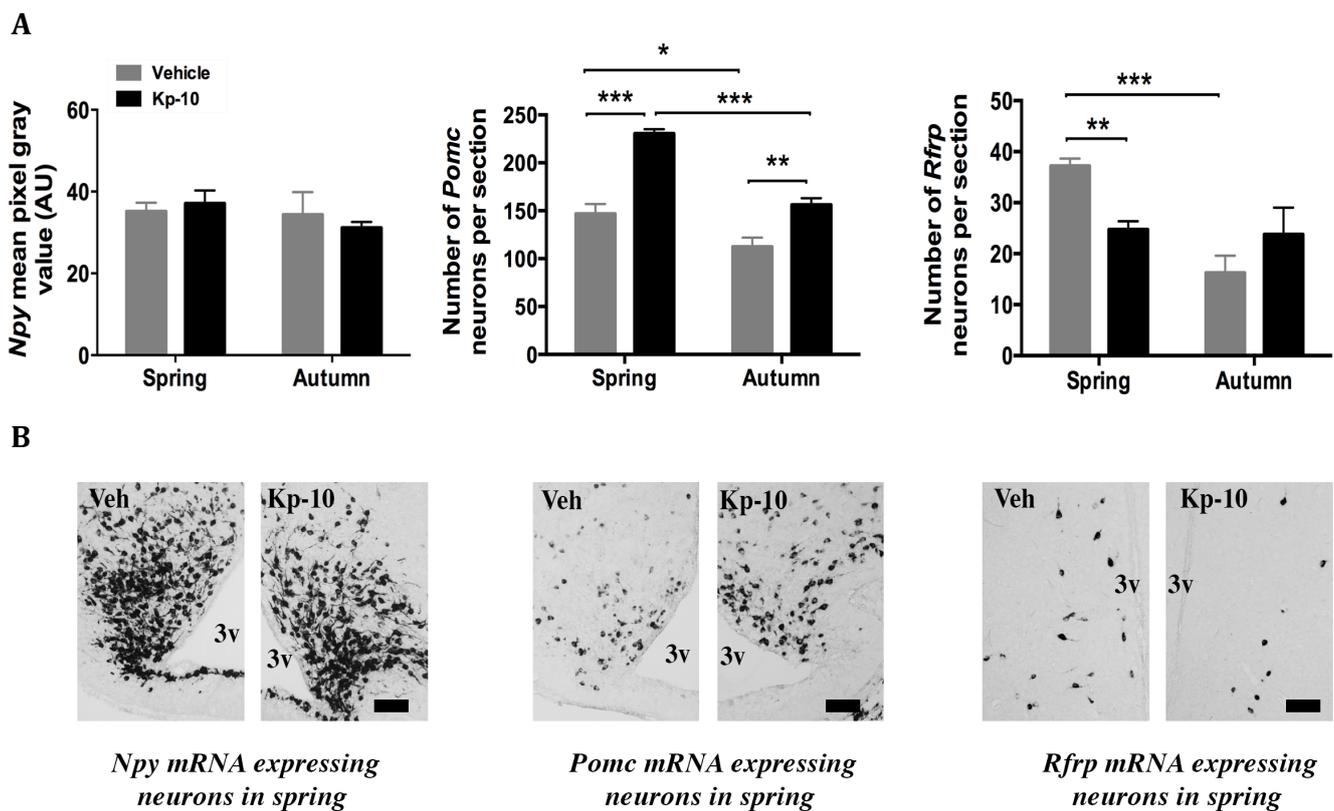


Figure 32 : Effet de l'injection centrale aiguë de Kp10 sur l'expression des gènes codant pour les peptides hypothalamiques NPY, POMC et RFRP-3 chez des gerboises femelles de printemps ou d'automne, privées de nourriture pendant 48 heures. A : Analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage de l'ARNm codant pour le NPY dans le noyau arqué (panneau de gauche), et mesure quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm codant pour la POMC dans le noyau arqué (panneau du milieu) et l'ARNm codant pour le RFRP-3 dans le noyau hypothalamique dorso- et ventro- médian (panneau de droit) 1h30 après injection du Kp10 (barres noires) ou du solvant (barres grises) au printemps et en automne ; les données sont présentées sous forme de la moyenne \pm SEM (n = 4 dans le groupe de printemps, n = 3 dans le groupe d'automne). *** P <0,001 et ** p <0,01 pour les différences significatives entre les groupes injectés avec du Kp10 ou du solvant. *** p <0,001 et * p <0,01 pour les différences significatives entre les groupes de printemps et d'automne. **B :** Images représentatives du marquage de l'ARNm du *Npy* dans le noyau arqué (panneau gauche), de la *Pomc* dans le noyau arqué (panneau du milieu) et du *Rfrp* dans les noyaux hypothalamiques dorso- et ventro- médian (panneau droit) de gerboises sacrifiées au printemps 1h30 après injections icv du Kp10 ou de véhicule. Les barres d'échelle représentent 100 μ m. AU : unités arbitraires, 3v; troisième ventricule; Veh: solvant.

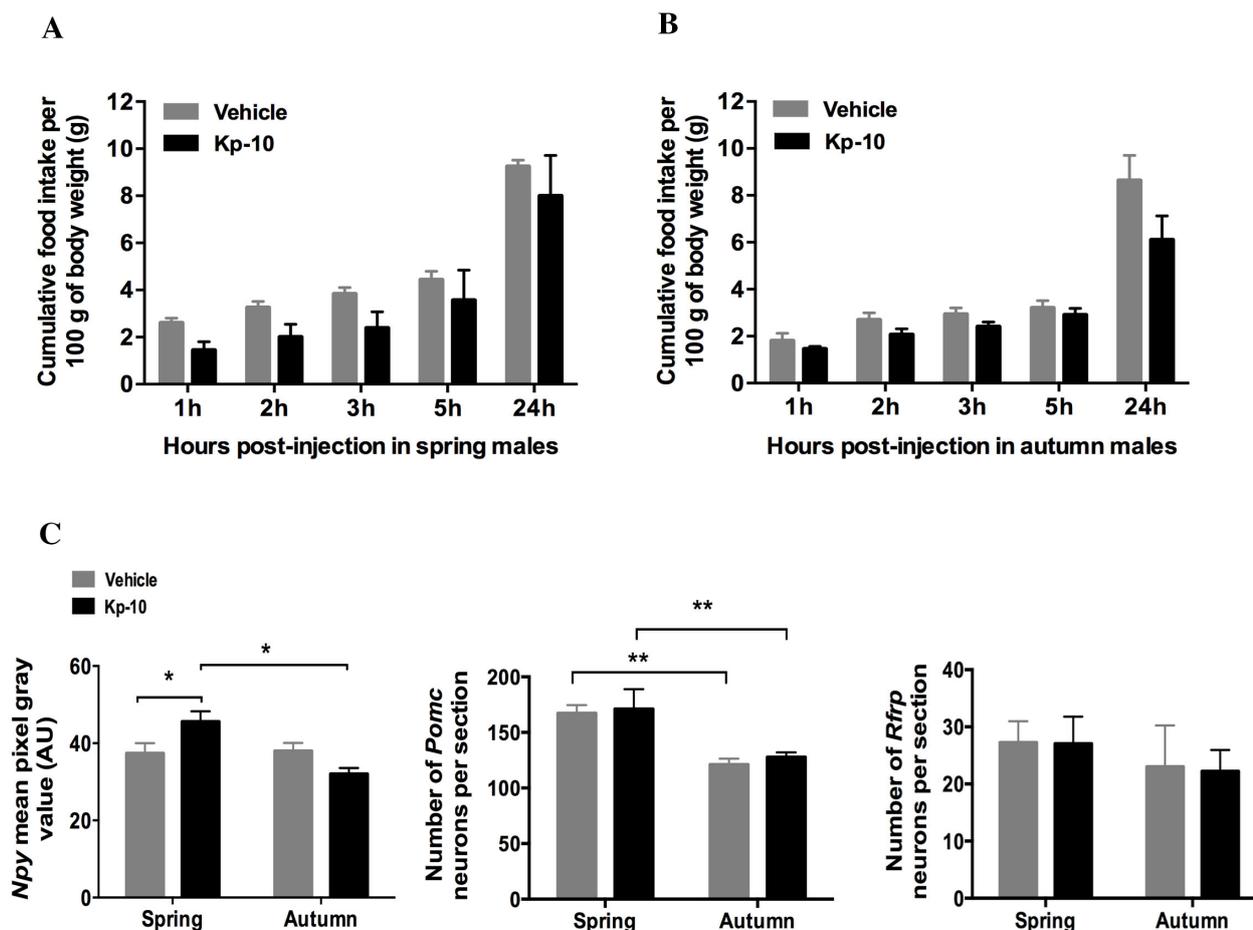


Figure 33 : Effet de l'injection centrale aiguë de Kp10 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour NPY, POMC et RFRP-3 chez des gerboises mâles de printemps ou d'automne, privées de nourriture pendant 48 heures. A-B : Prise alimentaire cumulée (g /100 g de poids corporel) mesurée 1h, 2h, 3h, 5h, et 24 h après l'injections icv de Kp10 ou de solvant (NaCl) chez des gerboises mâle privées de nourriture 48 h en printemps (**A**) ou en automne (**B**). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 4 par groupe). Aucune différence significative n'a été observée entre les gerboises injectés avec Kp10 et ceux injectés avec du solvant. **C :** Analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage de l'ARNm du *Npy* dans le noyau arqué. **D-E :** Mesure quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm de la *Pomc* dans le noyau arqué et du *Rfrp* dans le noyau hypothalamique dorso- et ventro- médian 1h30 après injection du Kp10 (barres noires) ou de solvant (barres grises) au printemps et en automne ; les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 4 par groupe). * P <0,05 pour les différences significatives entre les animaux injectés par du Kp10 et le groupe contrôle et ** p <0,01 pour les différences entre les groupes de printemps et d'automne. A.U: unité arbitraire.

Pour identifier les sites centraux via lesquels le Kp10 pourrait agir pour inhiber la prise alimentaire chez les gerboises femelles de printemps, le niveau d'expression des gènes codant pour des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique a été mesuré 1h30 après injection centrale du Kp10 ou du solvant au printemps ou en automne (Figure 32 C, D).

L'injection du Kp10 n'a montré aucun effet sur l'intensité de marquage de l'ARNm du *Npy* au niveau de l'ARC aussi bien au printemps qu'en automne lorsque les valeurs sont comparées à ceux des animaux traités au solvant ($P > 0.05$). Afin d'examiner d'avantage les différences possibles dans les différentes régions de l'ARC, l'expression du gène *Npy* a été comparée, après injection de Kp10 ou du solvant, entre les parties antérieure, médiane et postérieure de l'ARC des gerboises. Une faible mais significative augmentation ($P = 0,04$) a été observée uniquement dans la partie antérieure de l'ARC des femelles de printemps injectées avec du Kp10 ($36,60 \pm 1,31$ A.U, pour le groupe injecté par du Kp10 contre $33,61 \pm 0,71$ A.U pour le groupe contrôle, $n=4$ dans les deux groupes, $P < 0.05$) (Figure 34). Par ailleurs, l'injection du Kp10 a entraîné une augmentation nette du nombre de neurones exprimant l'ARNm du *Pomc* dans l'ARC aussi bien chez les femelles de printemps (+57%, $P < 0.001$) que celles d'automne (-40%, $P < 0.01$). L'analyse ANOVA à deux voies a révélé que le Kp10 présente un effet significatif différent selon la saison, cet effet étant plus important au printemps par rapport à l'automne ($F=41,883$; $P < 0.001$).

Aussi, en comparant l'expression du gène *Pomc* après injection de Kp10 ou du solvant dans les parties antérieure, médiane et postérieure de l'ARC des gerboises femelles, une augmentation significative a été observée au printemps dans les parties antérieure ($P = 0,01$) et postérieure ($P = 0,0009$) de l'ARC des gerboises de printemps injectées avec du Kp10 comparées aux contrôles. Tandis que chez les gerboises femelles d'automne, l'augmentation a été notée uniquement au niveau de la partie médiane de l'ARC ($P = 0,001$) (Figure 35).

De façon remarquable, l'injection du Kp10 entraîne un effet, saison-dépendant, important sur l'expression du gène *Rfrp*. Chez les gerboises femelles du printemps, le Kp10 a entraîné une diminution significative de 34% ($P < 0.01$) du nombre de neurones exprimant l'ARNm du gène *Rfrp*, tandis que chez les gerboises d'automne, le Kp10 n'a eu aucun effet sur le nombre de ces neurones ($P > 0.05$).

Bien que les gerboises femelles étaient privées de nourriture pendant 48h, il est intéressant de noter que le nombre de neurones exprimant l'ARNm de *Pomc* et de *Rfrp* était plus élevé au printemps qu'en automne chez les animaux contrôles (Figures 32 A, B), $P < 0.05$ pour *Pomc*, et $P < 0.001$ pour *Rfrp*). Par contre, l'intensité moyenne de l'expression du gène *Npy* n'a pas montré de variation saisonnière.

Chez les gerboises mâles privées de nourriture, bien que l'injection du Kp10 n'a pas modifié la prise alimentaire (Figure 33A, B), son effet sur l'expression des gènes codant pour les neuropeptides hypothalamiques a été évalué (Figure 33C). Contrairement aux femelles, le nombre de neurones exprimant l'ARNm de *Pomc* et de *Rfrp* n'a présenté aucun changement 1h30 après l'injection du Kp10 aussi bien au printemps qu'en automne. Par contre, l'injection centrale du Kp10 a entraîné une augmentation modérée de l'intensité moyenne du marquage de l'ARNm du *Npy* au printemps ($P = 0,04$) mais n'a entraîné aucun effet sur son expression en automne (Figure 33). Comme observé chez les femelles, les gerboises mâles traitées au véhicule et privées de nourriture ont présenté une variation saisonnière du nombre de neurones exprimant *Pomc* avec une augmentation importante au printemps par rapport à l'automne ($F = 19,11$, $P < 0,001$). En revanche, le nombre de neurones exprimant *Rfrp* et l'intensité moyenne d'expression du gène *Npy* n'ont pas présenté de variation saisonnière.

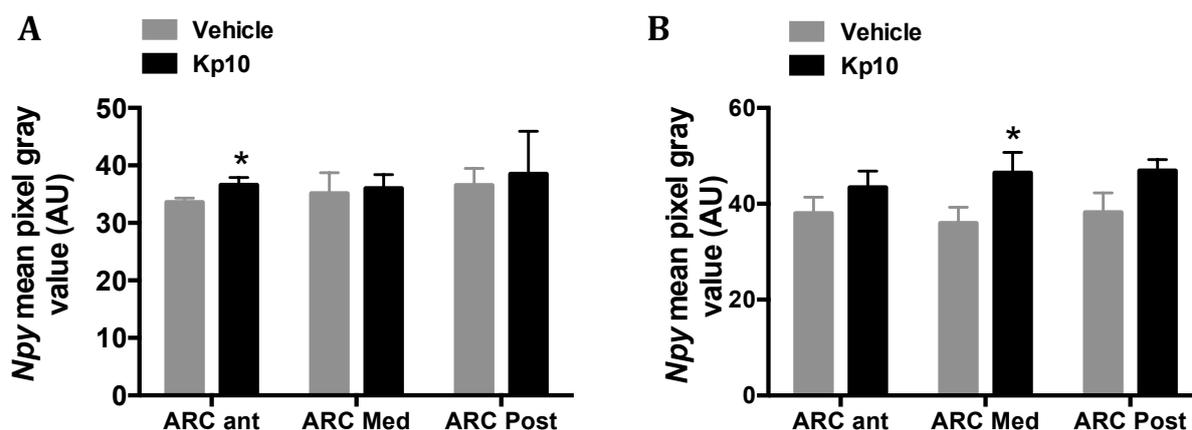


Figure 34 : Analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage de l'ARNm des neurones *Npy* dans le noyau arqué antérieur, médian et postérieur après injection centrale de Kp10 ou de solvant (NaCl) chez des gerboises femelles (A) et mâles (B) de printemps. AU, unité arbitraire ; ARC Ant, noyau arqué antérieur ; ARC Med, noyau arqué médian ; ARC Post, noyau arqué postérieur. * P < 0,05 pour les différences significatives entre les groupes injectés du Kp10 et les contrôles.

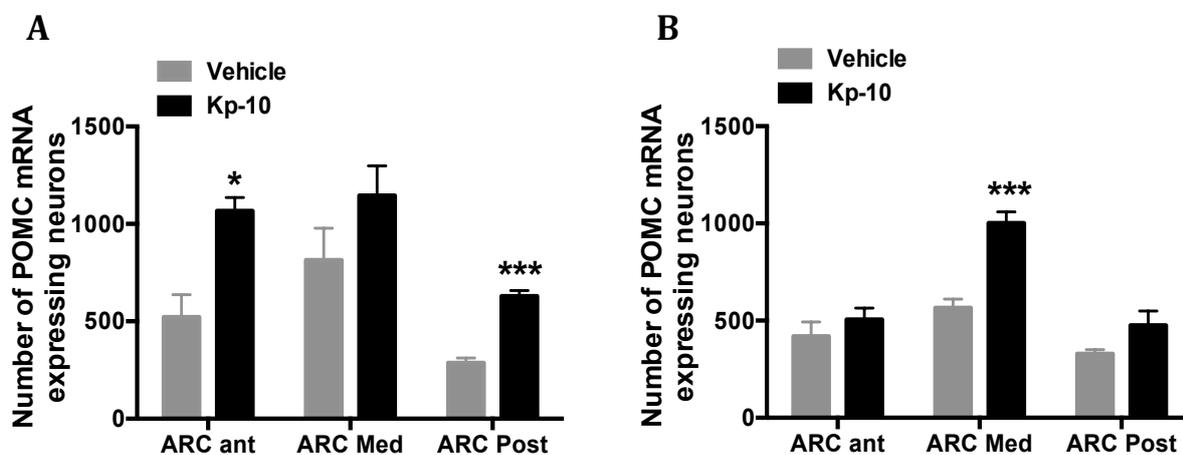


Figure 35 : Analyse quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm de *Pomc* dans le noyau arqué antérieur, médian et postérieur après injection centrale de Kp10 ou de solvant (NaCl) chez les gerboises femelles de printemps (A) et d'automne (B). ARC Ant, noyau arqué antérieur ; ARC Med, noyau arqué médian ; ARC Post, noyau arqué postérieur. * P < 0,05 et *** p < 0,001 pour les différences significatives entre les groupes injectés du Kp10 et les contrôles.

2. Effet de l'injection centrale du RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides hypothalamiques POMC et NPY chez les gerboises femelles d'automne et de printemps

L'effet de l'injection centrale du RFRP-3 sur la prise alimentaire a été analysé chez des gerboises femelles capturées au printemps ou en automne.

Une injection centrale et unique de 5µg de RFRP-3 a entraîné une augmentation importante de la prise alimentaire aussi bien au printemps qu'en automne chez les gerboises femelles nourries *ad-libitum* (Figure 36 A, B). L'effet orexigénique du RFRP-3 était significatif dès la première heure après l'injection (+395% et +236% respectivement pour le printemps et l'automne chez le groupe traité au RFRP-3 par rapport au groupe contrôle ; $P < 0.05$). Cet effet a été prolongé jusqu'à 24h post-injection (+25,12% et +21% respectivement pour le printemps et l'automne chez le groupe traité au RFRP-3 comparé au groupe contrôle ; $P < 0.05$ pour le printemps et $P < 0.01$ pour l'automne). Cette expérience a été répétée une nouvelle fois l'année suivante et des résultats similaires ont été obtenus confirmant l'effet orexigénique puissant du RFRP-3 sur la prise alimentaire des gerboises femelles.

Pour évaluer les sites d'actions hypothalamiques du RFRP-3, le niveau d'expression des gènes *Npy* et *Pomc* a été mesuré 1h30 après l'injection du peptide ou du solvant chez les gerboises femelles de printemps et d'automne (Figure 37). Le RFRP-3 a entraîné une augmentation significative de l'intensité moyenne du marquage de l'ARNm du *Npy* dans l'ARC de façon similaire pendant les deux saisons (+29,54% au printemps et +30,85% en automne, $p < 0.01$, Figure 37 A). Une analyse de l'effet du RFRP-3 dans les différentes régions de l'ARC a montré que l'expression du gène *Npy* a augmenté uniquement dans la région médiane ($P < 0.05$) et postérieure ($p < 0.05$) de l'ARC aussi bien au printemps qu'en automne (Figure 38 A, B).

A l'inverse, le RFRP-3 a entraîné une diminution significative du nombre des neurones exprimant l'ARNm *Pomc* dans l'ARC aussi bien au printemps qu'en automne (-15,58% au printemps et -20,57% en automne, $p < 0.05$, Figure 37 B). En analysant l'effet du RFRP-3 dans les différents niveaux de l'ARC, nous avons trouvé que la diminution du nombre de neurones exprimant l'ARNm de *Pomc* avait lieu seulement dans la partie antérieure de l'ARC dans les deux saisons ($p < 0.05$ entre les animaux injectés et les contrôles) (Figure 39 A, B).

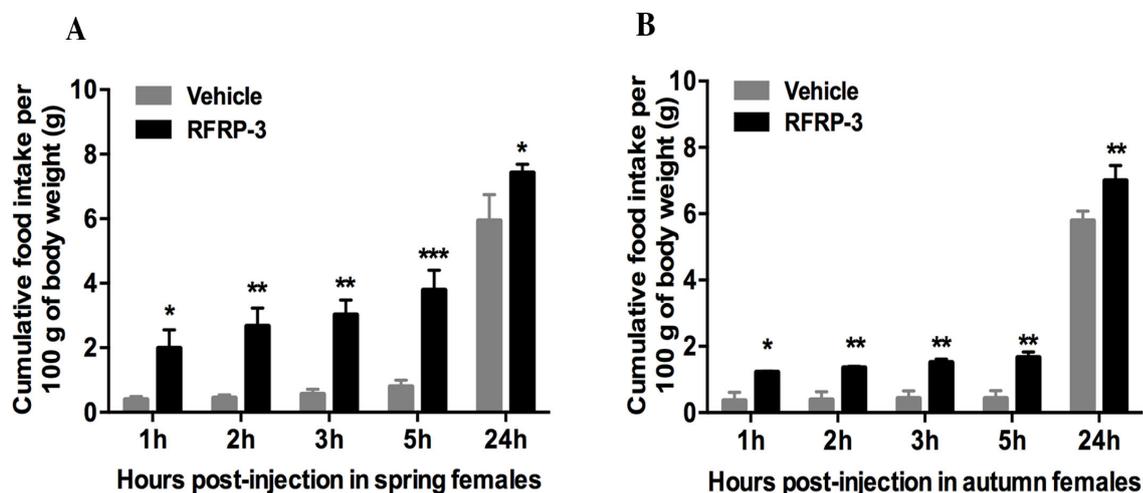


Figure 36 : Effet de l'injection centrale du RFRP-3 sur la prise alimentaire chez des gerboises femelles nourries *ad-libitum* au printemps et en automne. A-B : Prise alimentaire cumulée (g/100 g de poids corporel) mesurée 1h, 2h, 3h, 5h, et 24h après injection icv du RFRP-3 ou de solvant (NaCl) chez des gerboises femelles nourries *ad-libitum* du printemps (A) ou d'automne (B). Les données sont exprimées par la moyenne \pm SEM (n = 4 par groupe). * P <0,001, ** p <0,01 et * p <0,05 pour les différences significatives entre les groupes injectés du RFRP- 3 et les contrôles.**

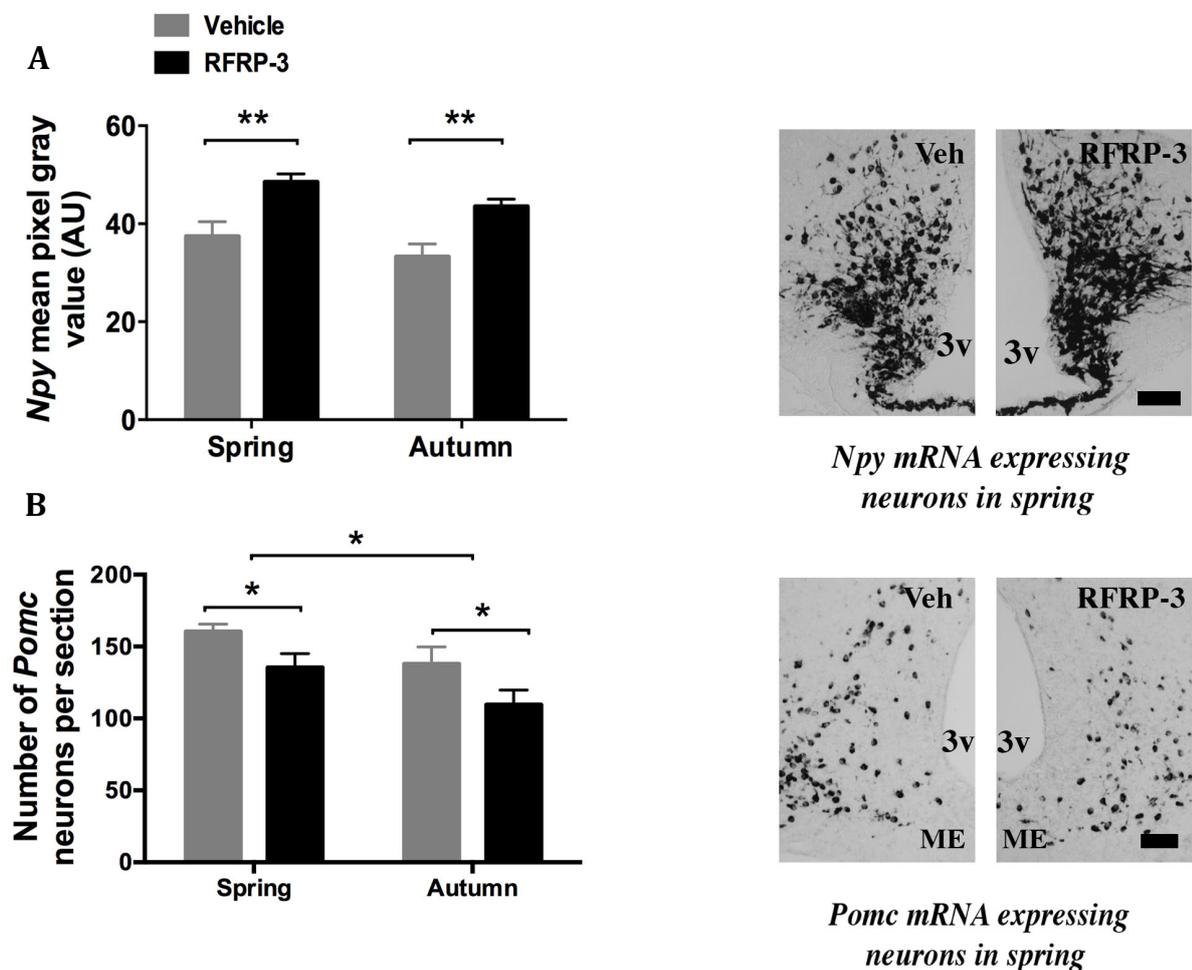


Figure 37 : Effet de l'injection centrale du RFRP-3 sur l'expression des gènes codant pour les peptides NPY et POMC chez des gerboises femelles nourries *ad-libitum* au printemps et en automne. A-B : Analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage de l'ARNm du *Npy* dans le noyau arqué (**A**) et mesure quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm de la *Pomc* dans le noyau arqué (**B**) 1h30 après injection du RFRP-3 (barres noires) ou de solvant (barres grises) au printemps ou en automne. Les données sont présentées sous forme de la moyenne \pm SEM (n = 4 par groupe). ** P <0,01 et * p <0,05 pour les différences significatives entre le groupe RFRP-3 et le véhicule. Des images représentatives du marquage de l'ARNm du *Npy* (**A**) et de la *Pomc* (**B**) dans le noyau arqué de gerboises femelles de printemps sacrifiées 1h30 après injection du RFRP-3 ou de solvant sont présentées. Les barres d'échelle représentent 100 μ m. AU : unités arbitraires ; 3V, troisième ventricule ; Veh, véhicule ; ME, éminence médiane.

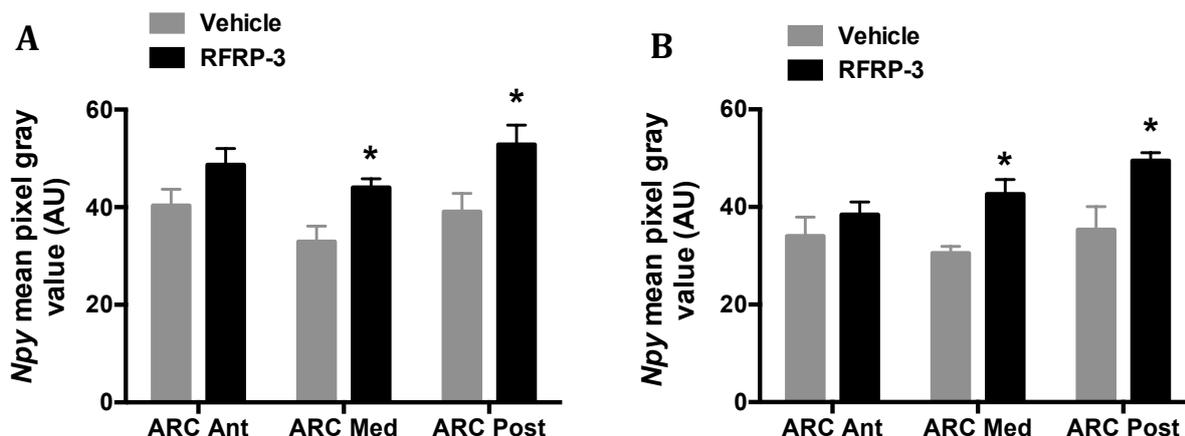


Figure 38 : Analyse semi-quantitative de l'intensité de marquage de l'ARNm des neurones *Npy* dans le noyau arqué antérieur, médian et postérieur après injection centrale du RFRP-3 ou de solvant (NaCl) chez des gerboises femelles de printemps (A) et d'automne (B). AU, unité arbitraire ; ARC Ant, noyau arqué antérieur ; ARC Med, noyau arqué médian ; ARC Post, noyau arqué postérieur. * P < 0,05 pour les différences significatives entre les groupes injectés du RFRP-3 et les contrôles.

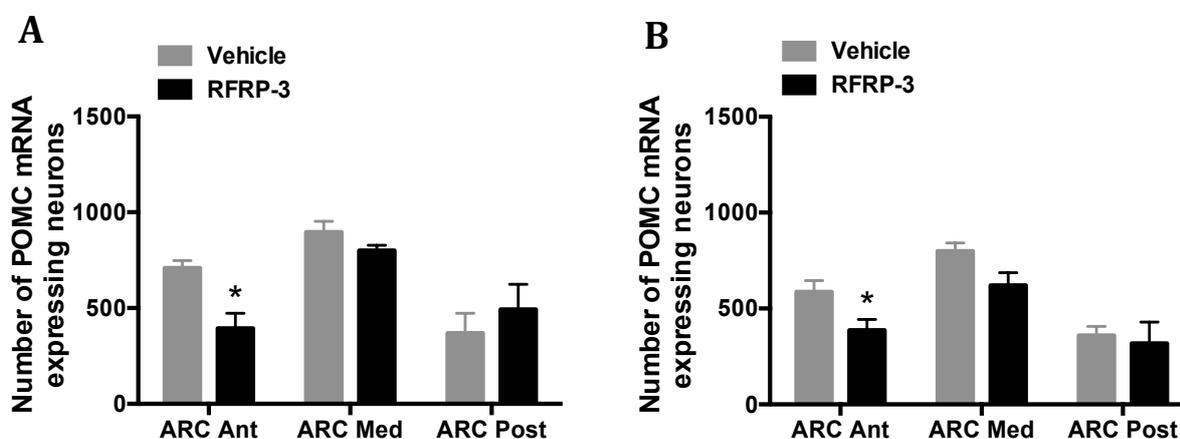


Figure 39 : Analyse quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm de *Pomc* dans le noyau arqué antérieur, médian et postérieur après injection centrale du RFRP-3 ou de solvant (NaCl) chez les gerboises femelles de printemps (A) et d'automne (B). ARC Ant, noyau arqué antérieur ; ARC Med, noyau arqué médian ; ARC Post, noyau arqué postérieur. * P < 0,05 pour les différences significatives entre les groupes injectés du Kp10 et les contrôles.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La majeure partie des études ayant pour but de comprendre la régulation saisonnière des peptides RF-amides, Kp et RFRP-3, ont été réalisées chez des animaux saisonniers soumis à des conditions contrôlées de photopériode, de température et de disponibilité en nourriture. Cependant, comprendre la physiologie de l'adaptation d'un animal à son environnement nécessite un modèle animal sauvage capturé de son propre biotope et soumis à des conditions climatiques saisonnières naturelles. C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude sur la gerboise *Jaculus orientalis*, ce petit rongeur saisonnier connu pour ses mécanismes physiologiques particulièrement adaptés à la vie désertique.

En vue d'étudier l'interaction des deux axes reproducteur et métabolique, la première partie de ce travail de thèse a visé l'étude des variations saisonnières de l'expression des gènes codant des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la reproduction (Kp et RFRP-3) et de l'homéostasie énergétique (POMC, somatostatine et NPY). Ces variations ont été ensuite liées aux changements saisonniers de la prise alimentaire et de l'activité sexuelle de la gerboise pour essayer de comprendre la synchronisation de ces deux systèmes, l'un avec l'autre, chez une espèce saisonnière semi-désertique telle que la gerboise.

La deuxième partie de ce travail de thèse, quant à elle, s'est focalisée sur l'implication des deux peptides Kp et RFRP-3 dans la régulation de la balance énergétique. L'effet des injections icv de Kp et de RFRP-3 a été d'abord étudié sur la prise alimentaire puis sur l'expression des gènes codant pour les peptides hypothalamiques qui la régule en amont, notamment les peptides anorexigène POMC et orexigène NPY.

L'ensemble de ces expériences a été effectué pendant les deux saisons marquant la physiologie de la gerboise, le printemps et l'automne, en vue de comprendre l'effet que pourrait jouer la saison dans la régulation des fonctions reproductrice et métabolique. Ceci avait pour but de proposer un modèle schématique fonctionnel expliquant la régulation saisonnière de la prise alimentaire et de la reproduction par le Kp et le RFRP chez la gerboise.

I. REGULATION SAISONNIÈRE DES NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES REGULANT L'ACTIVITE DE LA REPRODUCTION (KP ET RFRP-3) ET DE LA BALANCE ENERGETIQUE (POMC, NPY ET SOMATOSTATINE) CHEZ LA GERBOISE.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous rapportons pour la première fois une régulation saisonnière coordonnée de gènes codant pour plusieurs peptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle central de la reproduction et de la balance énergétique chez la gerboise. Nous montrons également l'existence de variations saisonnières de la prise alimentaire chez la gerboise, avec une augmentation en automne et une diminution au printemps. Dans leur ensemble, nos résultats montrent une augmentation coordonnée, au printemps, de l'expression de quatre peptides impliqués dans l'activation de la reproduction et l'inhibition de la prise alimentaire et suggèrent que ces variations concordent avec celles de la prise alimentaire et de la reproduction.

En effet, notre objectif était d'examiner par ISH non-radioactive si l'expression des gènes codant pour les peptides impliqués dans la régulation de la reproduction (Kp et RFRP-3) et de la balance énergétique (POMC, somatostatine et NPY) est soumise à des variations saisonnières de l'environnement chez la gerboise mâle. Les résultats obtenus montrent que l'expression des neuropeptides impliqués dans la régulation de la reproduction est influencée par l'environnement saisonnier. Le niveau de l'ARNm du *Rfrp* dans le DMH/VMH est plus élevé au printemps comparé à l'automne, ceci est exprimé à la fois par la moyenne du nombre des neurones exprimant l'ARNm du *Rfrp* ainsi que la moyenne de l'intensité de marquage par neurone. L'analyse du gène *Kiss1* dans l'ARC quant à elle, révèle que l'intensité de marquage par neurone est significativement plus importante au printemps qu'en automne. Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les deux saisons concernant le nombre des neurones exprimant l'ARNm de *Kiss1*.

Nous avons précédemment rapporté que le nombre de neurones immunoréactifs à Kp (Kp-ir) augmente dans l'ARC des gerboises mâles au printemps comparé à l'automne (Janati et al., 2013). Cette divergence entre les variations saisonnières des Kp-ir et les neurones exprimant l'ARNm de *Kiss1* peut être due aux différences dans la sensibilité des approches techniques. Aussi, ceci peut résulter des variations saisonnières dans la modification post-traductionnelle du peptide puisque l'ARNm de *Kiss1* est toujours détecté dans les neurones de l'ARC quelles que soient les saisons, alors que le taux de synthèse exprimé par le niveau de l'ARNm de *Kiss1* par neurone, lui, présente une

variation saisonnière significative. L'augmentation concomitante des niveaux d'ARNm et de l'immunoréactivité au printemps montre clairement que l'augmentation de l'expression du Kp et du RFRP-3 n'est pas due à une accumulation neuronale de ces peptides, mais que la synthèse de ces neuropeptides augmente au printemps et diminue en automne.

En se basant sur ces résultats, il est tentant de spéculer que chez la gerboise, comme chez les rongeurs saisonniers étudiés jusqu'à aujourd'hui, l'augmentation de la production nocturne de la mélatonine en automne et en hiver (Lakhdar-Ghazal et al., 1992) inhibe l'expression des gènes *Rfrp* et *Kiss1* via une diminution de la synthèse de la TSH dans le MBH comme cela a été montré chez d'autres espèces de mammifères tels que les hamsters syrien et sibérien (Revel et al., 2006a, 2006b, 2008; Barrett et al., 2007; Ubuka et al., 2012; Klosen et al., 2013). Cependant cette hypothèse reste à confirmer chez la gerboise et d'autres études doivent être menées afin de comprendre si des variations de la TSH entre le printemps et l'automne seraient à l'origine des changements saisonniers de l'expression de Kp et de RFRP-3 dans l'hypothalamus de cet animal.

Les variations saisonnières de l'expression du gène *Rfrp* dans le DMH/VMH chez la gerboise se sont avérées plus importantes que les variations de l'expression du gène *Kiss1* dans l'ARC. Cette différence dans l'amplitude de ces variations saisonnières entre Kp et RFRP-3 pourrait résulter d'une différence de leurs réponses au feedback des stéroïdes sexuels. En effet, depuis leur découverte, il a bien été mis en évidence que les neurones à Kp de l'ARC sont soumis à un feedback négatif exercé par les stéroïdes sexuels, et ce chez plusieurs espèces étudiées jusqu'à aujourd'hui (Smith et al., 2005; Revel et al., 2006a; Kauffman et al., 2007; Ansel et al., 2010) alors que l'expression des neurones à RFRP-3 n'est pas modulée par les feedbacks des stéroïdes sexuels, au moins chez le hamster syrien (Revel et al., 2008), le hamster sibérien (Ubuka et al., 2012), le rat (Quennell et al., 2010) et le mouton (Smith et al., 2008). Néanmoins il faut rester prudent sur cette hypothèse car il a été montré que les neurones à RFRP-3 expriment le récepteur ER α chez la souris et le hamster syrien femelle (Kriegsfeld et al., 2006; Molnár et al., 2011; Poling et al., 2012) et que la testostérone et l'estradiol, tous les deux diminuent l'expression du *Rfrp* chez la souris (Molnár et al., 2011; Poling et al., 2012).

Les résultats de cette première partie de thèse dans leur ensemble indiquent qu'au printemps, il y a une augmentation de la synthèse aussi bien du RFRP-3 que du Kp dans

l'hypothalamus de la gerboise, cette augmentation étant corrélée avec une activation des gonades pendant cette saison de l'année.

Aujourd'hui il est bien établi que Kp est un activateur puissant de l'axe HPG via une activation de la libération de la GnRH chez plusieurs espèces tels que le hamster, la souris, le rat, le mouton, la chèvre, le porc, la vache, le singe et même chez l'Homme (Gottsch et al., 2004b; Matsui et al., 2004; Thompson et al., 2004; Dhillon et al., 2005; Messenger et al., 2005; Shahab et al., 2005; Lents et al., 2008; Ezzat Ahmed et al., 2009; Hashizume et al., 2010; Ansel et al., 2011b). De même, nos données obtenues chez la gerboise mâle montrent qu'une injection icv aigue de 3 nmol de Kp augmente aussi bien la production de la testostérone que l'expression du gène *c-Fos* dans la POA aussi bien au printemps qu'en automne. Nous pouvons donc supposer que l'augmentation au printemps de l'expression de Kp peut entraîner l'activation saisonnière de la reproduction chez la gerboise comme c'est le cas chez le hamster syrien (Revel et al., 2006a), sibérien (Mason et al., 2007) et le mouton (Caraty et al., 2007). En revanche, l'effet du RFRP-3 sur l'activité de la reproduction est inconnu chez la gerboise et controversé chez les autres espèces de mammifères. Il est inhibiteur chez le mouton (Clarke et al., 2008b), le rat (Johnson et al., 2007) et la souris (Ducret et al., 2009) mais stimulateur chez le hamster syrien mâle (Ansel et al., 2012) et le hamster sibérien adapté à la PC (Ubuka et al., 2012). De façon intéressante, l'augmentation marquée de l'expression du *Rfrp* au printemps chez la gerboise sexuellement active est conforme avec ce qui a été observé chez d'autres espèces saisonnières et suggère un effet potentiellement activateur du RFRP-3 sur l'axe reproducteur de la gerboise mâle, comme nous l'avons préalablement suggéré dans une étude précédente (Janati et al., 2013), mais c'est une hypothèse qui reste à confirmer.

En parallèle avec Kp et RFRP, nous avons également étudié la régulation des gènes codant pour la POMC, la somatostatine et le NPY. L'expression dans l'ARC du gène codant pour le neuropeptide anorexigène POMC, exprimée à la fois par le nombre de neurones marqués et par la moyenne de l'intensité de marquage des neurones à POMC, est nettement plus élevée au printemps comparé à l'automne. Des résultats similaires ont été rapportés chez le hamster sibérien; l'expression du gène *Pomc* dans l'ARC de ces animaux est plus élevée en PL comparé à des animaux de PC (Mercer et al., 2000). De même, des variations saisonnières de l'expression de *Pomc* ont été également rapportées chez la brebis, cependant le nombre de neurones à POMC ainsi que la densité de marquage de ce peptide

par neurones augmentent pendant la saison d'anoestrus (Clarke et al., 2000). L' α -MSH, ce peptide issu à partir du clivage de la POMC, est un peptide inhibiteur puissant de la prise alimentaire chez les mammifères tels que la souris et le rat (Fan et al., 1997b; Brown et al., 1998; McMinn et al., 2000) . Par conséquent, on suppose que la faible expression de *Pomc* en automne obtenue dans nos résultats, pourrait entraîner une synthèse réduite de l' α -MSH, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du poids corporel rapporté chez la gerboise pendant cette période de l'année (El Ouezzani et al., 2011) et l'augmentation de la prise alimentaire pendant cette saison que nous avons obtenus dans les résultats de cette étude.

La somatostatine est un neuropeptide hypothalamique connu pour inhiber la sécrétion de l'hormone de croissance hypophysaire (Vale et al., 1972; Brazeau et al., 1974; Rogers et al., 1988) et la prise alimentaire chez quelques espèces tels que les rats et les babouins (Lotter et al., 1981). De plus, des études récentes ont rapporté son implication dans la régulation saisonnière de la masse corporelle et du métabolisme chez le hamster sibérien. En effet, les hamsters sibériens manifestent une diminution du poids corporel dans des conditions de PC. Récemment il a été montré que cette diminution de la masse corporelle est associée à une augmentation significative de l'expression du gène de la *somatostatin* (Herwig et al., 2012; Dumbell et al., 2015). Dans la présente étude, nous avons observé une augmentation importante de l'expression du gène codant pour la somatostatine au printemps comparée à l'automne. Ces résultats, opposés à ceux obtenus chez le hamster sibérien, concordent avec la baisse du poids corporel rapportée chez la gerboise au printemps et en été (El Ouezzani et al., 2011). Par conséquent, le hamster sibérien et la gerboise semblent présenter des variations saisonnières opposées mais coordonnées concernant l'expression du gène de la *somatostatin* en relation avec le poids corporel.

Les gènes *kiss1*, *Rfrp*, *Pomc* et *somatostatin*, présentent tous une diminution d'expression importante en automne chez la gerboise mâle. Il a été récemment rapporté chez le hamster sibérien que les variations saisonnières de l'expression du gène de la *somatostatin*, de même pour *Kiss1* et *Rfrp*, est médiée par un mécanisme TSH-dépendant de la mélatonine (Klosen et al., 2013).

Des études devraient examiner si la diminution parallèle et coordonnée de l'expression du gène *Kiss1*, *Rfrp*, *somatostatin* et aussi de *Pomc* observée en automne chez la gerboise est liée à des mécanismes similaires dépendant de la mélatonine. De plus, une interaction

entre ces peptides les uns avec les autres ne peut pas être exclue pour expliquer la corrélation de ces variations saisonnières, étant donné qu'en 2010, Fu et van den Pol ont rapporté que les fibres Kpergiques projettent vers les neurones à POMC et ont mis en évidence une excitation directe des neurones à POMC par Kp, suggérant une modulation indirecte possible de la prise alimentaire par Kp à travers les neurones à POMC (Fu and van den Pol, 2010). D'autre part, il existe une communication bidirectionnelle entre les neurones à somatostatine et la POMC étant donné que les récepteurs à somatostatine sont localisés au niveau des neurones POMC dans l'ARC et les neurones à POMC projettent vers la majorité des neurones à somatostatine dans le noyau périventriculaire suggérant que les effets de la somatostatine sur la croissance pourraient être sous l'influence des mélanocortines (Fodor et al., 1998) et suggérant aussi une collaboration entre les neurones à POMC et à somatostatine pour réguler la prise alimentaire, ce qui pourrait expliquer la diminution de la prise alimentaire chez la gerboise au printemps quand l'expression des gènes codant pour ces deux peptides anorexigènes augmente.

En ce qui concerne le NPY, l'expression du niveau de l'ARNm du *Npy* dans l'ARC de la gerboise est très élevée pendant les deux saisons. En effet, aucune variation significative n'est observée entre le printemps et l'automne concernant le nombre des cellules à NPY ou l'intensité de marquage des neurones de ce peptide. Le même profil de variation photopériodique dans l'expression du NPY a été précédemment rapporté chez le hamster sibérien (Mercer et al., 2000). En revanche, il a été rapporté chez la brebis que le nombre des cellules immunoréactives du NPY (Skinner and Herbison, 1997) et le niveau d'expression du gène codant pour ce peptide (Clarke et al., 2000) étaient tous les deux plus élevés en mai comparé à septembre, et comme il a été suggéré cette augmentation peut être liée à la régulation saisonnière de la prise alimentaire chez cet animal. En plus de sa fonction orexigène, des études ont rapporté son implication dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH (Li et al., 1999). Le NPY peut soit activer (Kalra and Crowley, 1984; Khorram et al., 1987) soit inhiber (Khorram et al., 1987; McDonald et al., 1989; Kaynard et al., 1990) l'axe reproducteur d'une manière dépendante de l'espèce mais aussi de l'environnement.

En conclusion de cette première partie concernant l'étude des variations saisonnières de l'expression des gènes *Kiss1*, *Rfrp*, *Pomc*, *somatostatin* et *Npy*, nous avons montré qu'au printemps il y a une activation générale des gènes codant pour les peptides hypothalamiques impliqués dans l'activation de la reproduction et l'inhibition de la prise

alimentaire chez la gerboise mâle. Ces variations sont en concordance avec la physiologie saisonnière de la gerboise, dans la mesure où les gènes codant pour RFRP-3 et Kp sont tous les deux élevés au printemps quand l'animal devient sexuellement actif, de même, les gènes codant pour le neuropeptide anorexigène POMC et la somatostatine présentent aussi une forte expression au printemps lorsque les animaux réduisent leur prise alimentaire et leur poids corporel.

D'après ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que la régulation de la reproduction et de la balance énergétique pourrait être inversement modulée. L'augmentation du poids corporel et de la prise alimentaire durant l'automne pourrait être un processus adaptatif d'anticipation à long terme permettant la préparation des animaux pour l'hibernation et/ou l'activité de la reproduction. La possibilité que les changements saisonniers de la production de la mélatonine chez la gerboise orchestrent cette variation saisonnière coordonnée des neuropeptides ne devrait pas être exclue. Par ailleurs, les interactions possibles entre ces neuropeptides et les projections des uns vers les autres dans l'hypothalamus de la gerboise pour synchroniser l'équilibre entre la reproduction saisonnière et l'activité métabolique devraient également être étudiées (Figure 40).

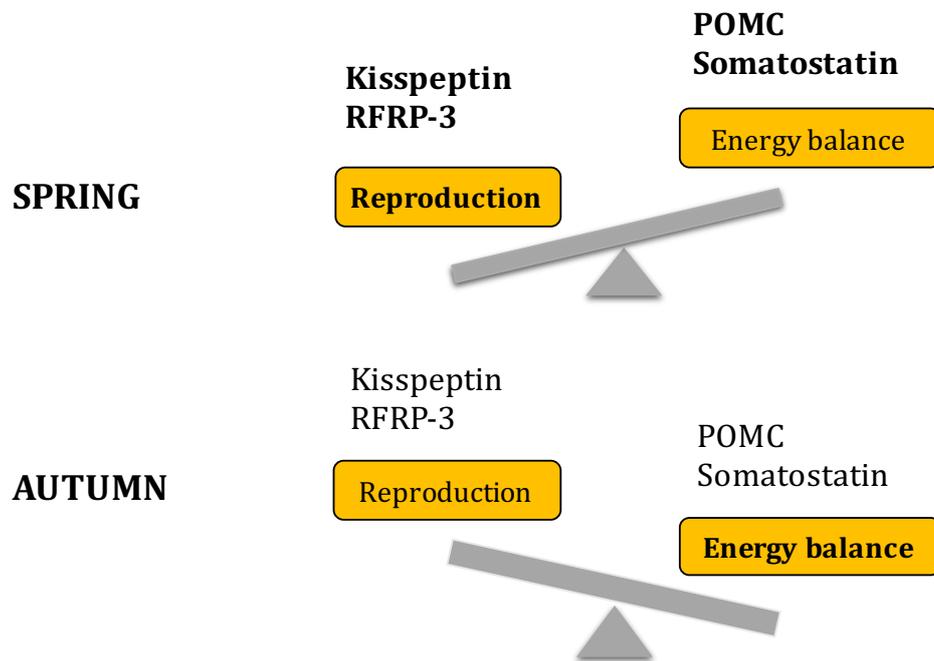


Figure 40 : Représentation schématique des variations saisonnières coordonnées des peptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle central de la reproduction et de la prise alimentaire chez la gerboise mâle *Jaculus orientalis*.

Au printemps, quand l'axe de la reproduction est activé, les animaux sexuellement actifs expriment une augmentation de l'expression des gènes codant pour des peptides impliqués dans le contrôle central de la reproduction, notamment Kp et RFRP-3. De même, les animaux expriment une diminution de leur prise alimentaire pendant cette saison de l'année, et ceci est associé avec une augmentation des deux peptides somatostatine et POMC. En automne par contre, quand les animaux deviennent sexuellement quiescents et mangent plus, une diminution importante de l'expression des gènes *Kiss1*, *Rfrp*, *Pomc* et *somatostatin* est observée.

II. KISSPEPTINE ET RFRP-3 ET LEUR IMPLICATION DANS LA REGULATION SAISONNIÈRE DE LA BALANCE ÉNERGÉTIQUE CHEZ LA GERBOISE FEMELLE

Dans cette deuxième partie de mon projet de thèse, nous rapportons que les peptides hypothalamiques RF-amides, Kp et RFRP-3, en plus de leur régulation de l'activité de la reproduction, ils expriment des effets métaboliques puissants et opposés chez la gerboise femelle. Nos résultats montrent que le RFRP-3 induit un effet orexigénique indépendant de la saison chez la gerboise femelle nourrie *ad-libitum* tandis que le Kp présente un effet anorexigénique dépendant de la saison et du sexe chez la gerboise soumise à une balance énergétique négative. Par ailleurs, nous suggérons que ces deux peptides exercent leurs actions sur la prise alimentaire via une régulation spécifique des peptides hypothalamiques connus pour la régulation de la prise alimentaire, en particulier le NPY et la POMC.

Effet de l'injection centrale aiguë du Kp10 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides NPY, POMC et RFRP-3 chez les gerboises femelles et mâles d'automne et de printemps privées de nourriture

Depuis que les recherches ont commencé à se focaliser sur l'implication de Kp dans la régulation métabolique, des études ont mis en évidence la sensibilité du système Kpergique à une balance énergétique négative. En effet, une diminution de l'expression du gène *Kiss1* a été rapportée dans des conditions de stress métabolique ou de restriction alimentaire chez les rats et les souris (Castellano et al., 2005; Luque et al., 2007; Brown et al., 2008). De plus nos résultats montrent qu'une injection icv de Kp10 exerce un effet anorexigénique rapide et profond chez la gerboise femelle soumise à une privation de nourriture de 48 heures. Cependant, cet effet anorexigénique de Kp10 n'a été observé que chez les femelles capturées au printemps, et non en automne, et n'a jamais été observé chez les mâles privés de nourriture capturés au printemps ou en automne.

Lorsque les gerboises ont été nourries *ad-libitum*, l'injection centrale de Kp10 bien qu'elle induise une augmentation attendue de la production de testostérone et de l'expression du gène c-Fos dans la POA chez la gerboise mâle d'automne et de printemps, elle ne modifie pas la prise alimentaire. Lorsque les gerboises ont été privées de nourriture pendant une courte durée (24h), Kp10 était toujours incapable de modifier la prise alimentaire, ce qui est probablement dû au fait que ces rongeurs sauvages semi-désertiques sont résistants

à des privations de nourriture qui peuvent aller jusqu'à 5 jours (El Ouezzani et al., 2001). En accord avec nos observations, une étude récente a montré que Kp10 réduit la prise alimentaire chez les souris privées de nourriture pendant une nuit mais pas chez les souris nourries *ad-libitum* (Stengel et al., 2011). D'autres travaux antérieurs ont rapporté que Kp ne modifie pas la prise alimentaire ni chez les rats mâles nourris *ad-libitum* ou privés de nourriture pendant 12h (Thompson et al., 2004; Castellano et al., 2005) ni chez le mouton (Clarke et al., 2012). Pris ensemble, ces données appuient l'idée que Kp est anorexigénique seulement sous un état d'équilibre énergétique négatif, et chez la gerboise cet effet semble être dépendant du sexe et de la saison.

Afin d'étudier les sites d'action hypothalamiques sous-jacents via lesquels Kp pourrait exercer son effet anorexigénique chez les gerboises privées de nourriture, nous avons évalué par ISH le niveau d'expression des gènes codant pour des neuropeptides connus pour réguler la prise alimentaire, notamment le NPY et la POMC après des injections centrales de Kp. Ainsi, nous avons évalué également l'effet de ces injections sur l'expression du gène *Rfrp*, d'abord parce que le RFRP-3 exprime des variations dépendantes du sexe (Henningsen et al., 2015) et de la saison (Dardente et al., 2008; Revel et al., 2008; Janati et al., 2013; Saenz de Miera et al., 2014; Talbi et al., 2016) chez plusieurs animaux saisonniers dont la gerboise, et aussi parce que plusieurs évidences suggèrent un rôle important de ce peptide dans la régulation de la prise alimentaire.

Nous avons trouvé que chez les femelles privées de nourriture, l'injection centrale du Kp affecte l'expression de la *Pomc* et du *Rfrp* d'une manière saison-dépendante. En effet, Kp augmente l'expression du gène codant pour la *Pomc*, aussi bien au printemps qu'en automne, cependant cet effet est significativement plus important au printemps. En parallèle, Kp diminue l'expression du gène du *Rfrp* uniquement au printemps, tandis qu'aucun effet n'a été observé en automne.

L'effet anorexigène de Kp, observé uniquement chez les gerboises femelles privées de nourriture, semble résulter d'une augmentation de l'expression du gène codant pour la *Pomc* combinée à une inhibition de l'expression du gène *Rfrp*, et ce uniquement au printemps. L'effet de Kp sur les neurones à POMC de la gerboise est soutenu par l'étude ayant rapporté chez les souris que les neurones à POMC expriment le récepteur Kiss1r (Fu and van den Pol, 2010) et qu'ils sont contactés par des fibres Kpergiques (Backholer et al., 2010) et que le Kp exogène active les neurones à POMC via un mécanisme basé sur

l'activation d'un échangeur sodium/calcium et d'un courant cationique non-sélectif (Fu and van den Pol, 2010). Cependant, l'activation des neurones à POMC n'est probablement pas suffisante pour considérer l'effet anorexigénique de Kp étant donné que l'augmentation de l'expression du gène *Pomc* suite aux injections de Kp est observée dans les deux saisons, alors que l'effet du Kp sur la prise alimentaire se produit uniquement au printemps. Fait intéressant, l'effet accentué qu'exerce le Kp sur l'ARNm du *Rfrp* dépend de la saison et suit le même profil d'effet du Kp sur la prise alimentaire, avec une inhibition au printemps mais sans effet en automne supposant que l'effet saison-dépendant qu'exerce le Kp sur la prise alimentaire pourrait être la résultante de l'action saison-dépendante de Kp sur le RFRP-3.

A notre connaissance, notre étude est la première à rapporter un effet central inhibiteur du Kp sur l'expression du gène *Rfrp*, cependant il est encore difficile d'identifier si cet effet est direct ou non. Une étude récente a rapporté chez les souris mâles que les neurones à RFRP-3 n'expriment pas le *Kiss1r* et ne sont pas en contact avec les fibres Kpergiques (Poling et al., 2013). Néanmoins, des différences interspécifiques ou sexe-dépendantes ne peuvent pas être exclues, étant donné que d'autres études ont montré que l'ARNm du *Kiss1r* est exprimé dans le DMH du rat (Lee et al., 2009) et que des fibres Kp s'expriment dans le DMH des souris femelles (Clarkson et al., 2009).

Chez les mâles privés de nourriture, le Kp ne modifie ni l'expression du gène de la *Pomc* ni celle du gène du *Rfrp*, ceci va dans le sens de l'absence de l'effet du Kp sur la prise alimentaire chez la gerboise mâle. Concernant le gène *Npy*, nos résultats suggèrent une régulation complexe du *Npy* par Kp avec un effet dépendant de la saison chez les mâles. Cet effet pourrait être lié à une modulation complexe des stéroïdes sexuels aux neurones à NPY sous l'action des injections du Kp (Urban et al., 1993). Cependant d'autres études devraient être envisagées pour évaluer l'effet des stéroïdes sexuels sur les neurones à NPY pour confirmer l'hypothèse d'un effet indirect exercé par Kp sur les neurones à NPY via ces hormones stéroïdes.

Il est difficile d'expliquer l'effet sexe-dépendant du Kp sur la prise alimentaire ainsi que sur l'expression des peptides hypothalamiques, mais récemment un dimorphisme sexuel sur la régulation du métabolisme glucidique par le Kp a été rapporté chez la souris (Tolson et al., 2014). Dans cette étude, des souris femelles KO invalidées pour le gène du récepteur *Kiss1r* ont présenté un poids corporel élevé avec un niveau élevé de leptine circulante.

Aussi, une mauvaise tolérance au glucose avec une diminution de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques ont été notées chez ces femelles comparées aux femelles type sauvage de la même portée. Les souris mâles KO Kiss1r contrairement aux femelles, n'ont manifesté aucun changement et ont gardé un poids corporel normal et une régulation normale de glucose.

Pris ensemble, nos résultats sur l'effet métabolique du Kp indiquent que chez les gerboises femelles sous une balance énergétique négative, l'injection centrale de Kp inhibe la prise alimentaire au printemps mais pas en automne. Cet effet pourrait être médié soit via une action inhibitrice unique sur le gène *Rfrp*, ou une action inhibitrice sur le *Rfrp* combinée à une action activatrice sur le gène codant pour la *Pomc*.

En vue de vérifier cette hypothèse et évaluer si l'action saison-dépendante du Kp sur la prise alimentaire est médiée via les neurones à RFRP-3, nous avons évalué l'effet de l'injection icv de RFRP-3 sur la prise alimentaire aussi bien au printemps qu'en automne et nous avons évalué en parallèle son effet sur l'expression des gènes *Pomc* et *Npy* pendant les deux saisons.

Effets de l'injection centrale aiguë du RFRP-3 sur la prise alimentaire et sur l'expression des gènes codant pour les peptides NPY et POMC chez les gerboises femelles d'automne et de printemps nourries ad-libitum

Dans cette étude, nous montrons qu'une injection centrale du RFRP-3 exerce un effet orexigène puissant chez les gerboises femelles nourries *ad-libitum*. En effet, suite à l'injection de RFRP-3 nous avons observé une augmentation importante de la prise alimentaire dès la première heure et jusqu'à 24h après l'injection, sans aucune différence entre le printemps et l'automne.

En parallèle avec ces observations, nous rapportons que cet effet orexigénique puissant qu'exerce le RFRP-3 est associé à une augmentation importante de l'expression du gène orexigénique *Npy* et une diminution concomitante de l'expression du gène anorexigénique *Pomc*. Ce résultat mettant en évidence un rôle orexigénique puissant du RFRP-3 chez la gerboise est en accord avec des résultats antérieurs obtenus chez le rat, la souris, le mouton et les primates non-humains (Johnson et al., 2007; Murakami et al., 2008; Clarke et al., 2012; Anjum et al., 2016), mais nos résultats sont les premiers à démontrer que cet effet métabolique pourrait se produire via une augmentation de l'expression du gène *Npy* associée à une diminution du gène codant la *Pomc* dans l'ARC.

En effet, ces données sont soutenues par des études antérieures indiquant la présence du récepteur RFRP et des terminaisons des fibres RFRP-3 dans l'ARC des rongeurs (Gouardères et al., 2002; Kriegsfeld et al., 2006; Henningsen et al., 2015) avec d'autres évidences montrant que les terminaisons des fibres RFRP-3 sont en étroite juxtaposition avec les neurones à NPY (Qi et al., 2009; Jacobi et al., 2013) et les neurones à POMC (Qi et al., 2009). Toutefois, les études évaluant l'effet du RFRP-3/GnIH sur l'activité neuronale de POMC et du NPY ont rapporté des résultats contradictoires. Le RFRP-3 augmente l'expression de la protéine c-Fos dans les neurones à NPY et à POMC chez le mouton (Clarke et al., 2012), inhibe la fréquence de décharge des neurones à NPY et à POMC chez la souris (Jacobi et al., 2013), mais augmente l'expression du gène *Npy* et non celle de *Pomc* chez le rat (Clarke et al., 2012), suggérant ainsi des cibles hypothalamiques dépendantes des espèces pour l'effet orexigénique de RFRP-3.

Cette étude démontre que chez les gerboises femelles, le RFRP-3 induit une activation de l'expression du NPY associée à une diminution de l'expression de la POMC conduisant ainsi à un effet orexigénique robuste aussi bien en automne qu'au printemps, bien que

l'expression du gène *Rfrp* est inhibée en PC chez les espèces saisonnières, y compris la gerboise (Revel et al., 2008; Ubuka et al., 2012; Saenz de Miera et al., 2014; Talbi et al., 2016) et que l'expression du récepteur RFRP est diminuée dans l'ARC chez les hamsters adaptés à la PC (Henningesen et al., 2015).

Dans le présent travail de thèse, nous mettons en évidence un effet anorexigénique de Kp dépendant de la saison, du sexe et de l'état métabolique de l'animal. Dans les conditions de privation de nourriture au printemps, l'injection centrale de Kp réduit la prise alimentaire seulement chez les gerboises femelles et pas chez les mâles. Cet effet saison et sexe dépendant de Kp sur la prise alimentaire et sur l'expression des neurones à POMC et à RFRP-3 chez la gerboise femelle peut être lié à la différence du statut sexuel et énergétique de ces animaux entre les deux saisons. Aussi, la possibilité que cette différence saisonnière dans l'effet du Kp sur la balance énergétique, soit due à une variation saisonnière de l'expression de son récepteur Kiss1r dont on ignore la localisation et le profil d'expression chez la gerboise, n'est pas à exclure.

Nous avons précédemment rapporté que l'immunoréactivité de Kp (Janati et al., 2013) ainsi que le nombre de neurones et l'intensité du marquage de l'ARNm des neurones à Kp (Talbi et al., 2016) sont plus élevés au printemps par rapport à l'automne. Ce qui pourrait aussi être intéressant c'est de comparer la distribution du récepteur Kiss1r et aussi de la connexion neuronale de Kp aux neurones à POMC et à RFRP-3 entre le printemps et l'automne pour mieux comprendre les différences saisonnières de l'action anorexigène de Kp.

Le fait que l'injection du Kp chez les femelles augmente l'ARNm de *Pomc* au printemps et en automne, renforce l'hypothèse que les neurones à POMC sont directement régulés par le Kp, ce qui est en accord avec les études électrophysiologiques précédentes menées chez la souris (Fu and van den Pol, 2010). De plus, nos résultats montrant que d'une part le Kp inhibe l'ARNm du *Rfrp* au printemps, et d'autre part le RFRP-3 exerce un effet orexigène puissant quelque soit la saison suggérant ainsi qu'au printemps le Kp inhibe la prise alimentaire en inhibant l'expression du gène *Rfrp*, alors qu'en automne quand le Kp est moins exprimé dans l'hypothalamus de la gerboise, l'inhibition de Kp sur les neurones à RFRP-3 est levée permettant ainsi une augmentation de la prise alimentaire pendant cette

saison. Ceci est expliqué par l'absence de l'effet de Kp sur la prise alimentaire et sur les neurones à RFRP-3 en automne.

De plus, nos résultats montrent un effet orexigène robuste de RFRP-3 via une augmentation de l'expression du gène *Npy* combinée à une diminution de l'expression du gène *Pomc* observée sans que les gerboises femelles soient sous un état de métabolisme énergétique négatif, contrairement à Kp, suggérant ainsi que le RFRP-3 est toujours orexigène, tandis que le Kp ne peut exercer son action anorexigène sur la prise alimentaire que quand les animaux de printemps sont sous un état de challenge métabolique. Dans ce cadre, d'autres études doivent être envisagées pour expliquer la sensibilité du système Kpergique à ce challenge métabolique.

En conclusions, les deux peptides, Kp et RFRP-3, présentent des effets opposés sur la prise alimentaire. Un effet anorexigénique induit par le Kp et orexigénique induit par le RFRP-3, à travers l'implication de peptides métaboliques. Par conséquent, nous pourrions supposer que lorsque les gerboises femelles sont soumises à un challenge reproductif et métabolique fort au printemps, le Kp favoriserait l'activation de l'axe de reproduction via l'activation des neurones à GnRH et diminue la prise alimentaire principalement en inhibant les neurones à RFRP-3 au niveau du DMH/VMH et en activant les neurones à POMC de l'ARC.

Il a été rapporté que le Kp et le RFRP-3 manifestent des effets respectivement stimulateurs et inhibiteurs opposés sur la reproduction des rongeurs femelles (Kriegsfeld et al., 2006; Roa et al., 2006; Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2009; Pineda et al., 2010), des études futures devraient être effectuées pour déterminer si c'est le cas aussi chez la gerboise. Ces résultats, en concordance avec notre hypothèse que les activités métaboliques et reproductives sont régulées de manière opposée chez la gerboise sauvage, fournissent maintenant un modèle hypothalamique incluant les rôles différentiels de Kp et de RFRP-3 pour la compréhension de la régulation saisonnière coordonnée de la reproduction et de l'équilibre énergétique (Figure 41).

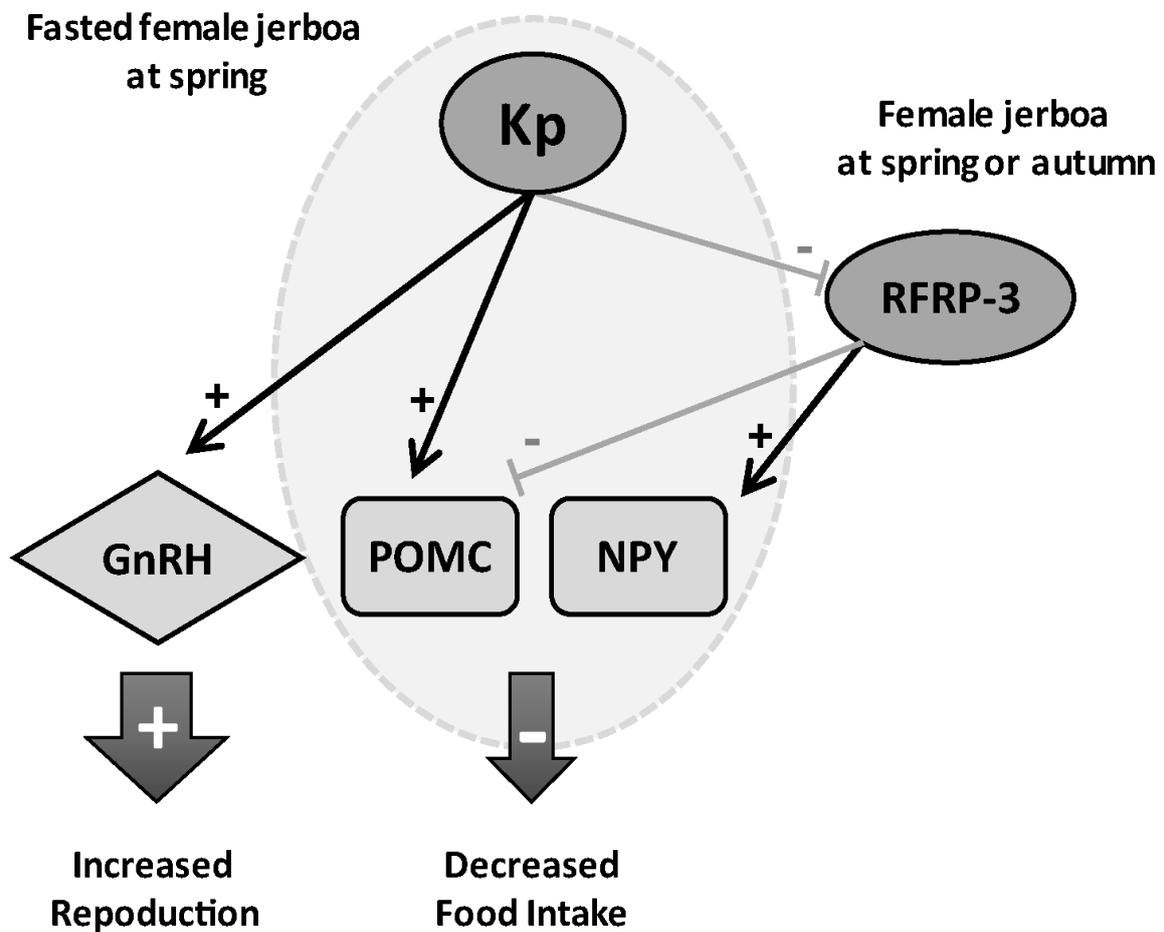


Figure 41 : Modèle schématique du circuit hypothalamique utilisé par le kisspeptine et le RFRP-3 pour réguler la prise alimentaire et la reproduction chez la gerboise femelle. Au printemps, lorsque les gerboises femelles sont sous équilibre énergétique négatif, les niveaux élevés de kisspeptine stimulent la reproduction en activant les neurones à GnRH et inhibent la prise alimentaire via une activation des neurones à POMC et inhibition des neurones à RFRP-3; ce dernier neuropeptide exerce une augmentation de la prise alimentaire via une augmentation du peptide orexigène NPY combinée à une réduction du peptide anorexigène POMC, et ceci quelle que soit la saison.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Mon projet de thèse a permis d'élucider des aspects importants de l'implication du Kp et du RFRP-3 dans la régulation saisonnière de l'axe métabolique chez la gerboise, un rongeur saisonnier hibernant dont les fonctions reproductrice et métabolique présentent des variations saisonnières importantes pour son adaptation à un milieu environnant changeant et difficile.

Les résultats qui découlent du premier chapitre de ma thèse montrent pour la première fois une activation générale au printemps des gènes codant pour les peptides hypothalamiques impliqués dans l'activation de la reproduction et l'inhibition de la prise alimentaire chez la gerboise. Nous supposons que ces variations sont en concordance avec la physiologie de cet animal. En effet, au printemps, l'expression des gènes codant pour Kp et RFRP-3 est plus importante quand les gerboises sont sexuellement actives. De même, l'expression des gènes codant pour les peptides anorexigéniques, POMC et somatostatine, est également plus importante au printemps, quand la prise alimentaire de l'animal ainsi que son poids corporel diminuent. Ces variations s'inversent en automne conduisant à une expression réduite de ces quatre neuropeptides, ce qui pourrait être associé à l'inhibition de l'axe reproducteur de la gerboise et l'augmentation de son poids corporel et sa prise alimentaire pendant cette saison.

La possibilité qu'une interaction entre ces peptides soit à l'origine de la synchronisation saisonnière entre les fonctions de la reproduction et l'activité métabolique est très probable. La localisation du RFRP-3 dans le DMH/VMH et du Kp, POMC et somatostatine dans l'ARC, deux structures clés impliquées dans la régulation de la reproduction et du métabolisme renforce cette hypothèse. Nous pourrions continuer les études neuroanatomiques en localisant les sites de projection des différents peptides étudiés et l'expression des récepteurs de ces neuropeptides (par des multiples marquages combinant des approches d'ISH ou d'immunoréaction).

Par ailleurs, la participation d'hormones telles que la leptine ou la mélatonine, dans la régulation saisonnière coordonnée de ces neuropeptides doit être envisagée. En effet, l'implication de la leptine dans la régulation de ces deux systèmes a été décrite dans des études génétiques, neuroanatomiques et physiologiques. Nous pourrions déterminer si les concentrations circulantes de leptine expriment des variations saisonnières importantes chez la gerboise, qui lors de l'hibernation augmente considérablement sa

masse corporelle puis oxyde lentement ses réserves de graisse pour fournir l'essentiel de l'énergie à sa survie hivernale. Le cas échéant nous pourrions tester l'effet de la leptine sur l'expression des gènes d'intérêts et analyser les variations saisonnières de la signalisation des récepteurs de la leptine (pStat3) dans différentes structures et populations neuronales de l'hypothalamus de la gerboise.

Il a été établi que la production de la mélatonine présente des variations saisonnières chez la gerboise, et nous savons que la mélatonine, via la TSH de la *pars tuberalis*, régule l'expression de Kp et RFRP chez les hamsters syrien et sibérien. Nous pourrions également tester le rôle du signal mélatonine/TSH sur l'expression des gènes d'intérêts chez la gerboise par des expériences de pinéalectomie ou d'injection de TSH en automne/hiver ou d'injections de mélatonine au printemps/été.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a été d'explorer les effets métaboliques saison et sexe-dépendant des Kp et des RFRP-3 chez la gerboise. Les résultats obtenus montrent pour la première fois un effet anorexigène du Kp dépendant du sexe, de la saison et de l'état métabolique de l'animal ; un effet associé à une augmentation de l'expression du gène codant pour la POMC et d'une inhibition de l'expression du gène *Rfrp*. De façon intéressante, le profil d'inhibition du gène *Rfrp* par Kp ressemble au profil de l'inhibition de la prise alimentaire par Kp (seulement au printemps et seulement chez les femelles), suggérant un lien fonctionnel entre ces deux effets. Nous pouvons spéculer que l'effet anorexigène du Kp pourrait être médié directement ou indirectement par les neurones à RFRP-3. Néanmoins, cet effet sélectif du Kp pourrait également avoir lieu via les neurones à POMC, car l'augmentation de l'expression du gène codant pour la POMC suivant l'injection de Kp est plus importante au printemps qu'en automne.

Ces hypothèses nécessitent des analyses approfondies. Cet effet printanier du Kp pourrait être dû soit **i)** à une forte synthèse du Kp pendant cette saison, conduisant donc à une action plus forte des Kp sur le RFRP-3 et sur la POMC au printemps qu'en automne, et/ou **ii)** à une augmentation de l'expression du récepteur du Kp qui serait plus forte au printemps qu'en automne.

L'expression du Kp et de la POMC étant plus importante au printemps, il serait possible d'imaginer un effet stimulateur du Kp sur les neurones à POMC pendant cette saison. Par contre l'expression du RFRP étant également plus élevée au printemps, un effet inhibiteur

direct du Kp sur l'expression des RFRP-3 au printemps est moins probable. Par ailleurs la localisation et la régulation des récepteurs à Kp restent à étudier chez la gerboise. Une éventuelle localisation de ces récepteurs sur les neurones à GnRH est soutenue probable d'après nos résultats montrant une augmentation des niveaux circulants de testostérone après injection centrale du Kp10. Il serait intéressant d'étudier la localisation de ces récepteurs sur les neurones à POMC et les neurones à RFRP-3. Cette hypothèse étant soutenue par l'effet de nos injections de Kp sur ces deux populations neuronales.

Nous avons montré que le peptide RFRP-3, exerce une action orexigénique chez la gerboise femelle. Contrairement au Kp, l'effet du RFRP-3 sur la prise alimentaire s'observe indépendamment de la saison et sous un état métabolique normal. L'augmentation importante de la prise alimentaire après injection de RFRP-3 était combinée à une augmentation de l'expression du gène codant pour le peptide orexigénique NPY et une diminution de l'expression de la POMC. Il serait intéressant d'analyser la présence de fibres à RFRP-3 et de récepteurs des RFRP-3 sur les neurones à NPY et à POMC, ce qui permettrait d'établir s'il s'agit d'un effet direct ou indirect du RFRP-3 sur ces neurones.

Il serait également intéressant d'établir si l'effet métabolique du RFRP-3 s'exerce uniquement chez les femelles, ou présente un dimorphisme sexuel comme nous l'avons montré pour le Kp.

Pris ensemble, nos résultats suggèrent une implication de Kp et de RFRP-3 dans la régulation saisonnière de l'axe métabolique chez la gerboise. L'utilisation de ligands (agonistes/antagonistes) sélectifs pour les récepteurs de ces deux peptides pourrait confirmer la sélectivité des effets observés. Par ailleurs, il est maintenant important de déterminer si les effets métaboliques que nous avons rapportés sont spécifiques à la gerboise, ou sont présents chez d'autres espèces saisonnières et non saisonnières.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats supportent notre hypothèse que la régulation centrale de la reproduction et de la balance énergétique chez la gerboise est coordonnée et inversement modulée. Bien qu'il soit difficile d'imaginer que la régulation de la reproduction, mécanisme coûteux en énergie, soit favorisée au printemps en dépit de la modulation de la balance énergétique, cette hypothèse est supportée par l'ensemble de nos résultats sur la prise alimentaire, le poids corporel, les variations saisonnières des peptides reproducteurs et métaboliques ainsi que l'effet opposé du Kp sur l'axe

reproducteur (activateur, comme attesté par l'augmentation des niveaux de la testostérone après injection de Kp) et sur la prise alimentaire (inhibiteur). Par ailleurs, l'étude de l'effet du RFRP-3 sur l'axe reproducteur de la gerboise est indispensable, cela pourrait nous éclaircir davantage sur les mécanismes sous-jacents la régulation opposée de la reproduction et de la balance énergétique en fonction des saisons. Une telle régulation opposée des deux axes reproducteur et métabolique pourrait être l'un des processus adaptatifs permettant à la gerboise en tant qu'un animal vivant dans des conditions environnementales variables, d'anticiper à long terme les changements climatiques difficiles et se préparer pour l'hibernation en automne et/ou la reproduction au printemps.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239–247.
- Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172–191.
- Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatei MA, Rossor MN, Roberts GW, Crow TJ, Tatemoto K, Polak JM (1983) Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306:584–586.
- Alde S, Celis ME (1980) Influence of alpha-melanotropin on LH release in the rat. *Neuroendocrinology* 31:116–120.
- Allard M, Labrousche S, Nosjean A, Laguzzi R (1995) Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPF in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 274:577–583.
- Amstalden M, Coolen LM, Hemmerle AM, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL, Lehman MN (2010) Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 22:1–12.
- Anand BK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123–140.
- Ancel C, Bentsen AH, Sébert M-E, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2012) Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* 153:1352–1363.
- Anderson GM, Barrell GK (1998) Effects of thyroidectomy and thyroxine replacement on seasonal reproduction in the red deer hind. *J Reprod Fertil* 113:239–250.
- Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL (2003) Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology* 144:2892–2901.
- Anderson GM, Relf H-L, Rizwan MZ, Evans JJ (2009) Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* 150:1834–1840.
- Anjum S, Krishna A, Tsutsui K (2016) Possible Role of GnIH as a Mediator between Adiposity and Impaired Testicular Function. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:1–12.
- Ansel L, Bentsen AH, Ancel C, Bolborea M, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2011) Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GNRH release. *Reproduction* 142:417–425.
- Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2010) Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 25:81–91.
- Atcha Z, Cagampang FR, Stirland JA, Morris ID, Brooks AN, Ebling FJ, Klingenspor M, Loudon AS (2000) Leptin acts on metabolism in a photoperiod-dependent manner, but has no effect on reproductive function in the seasonally breeding Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 141:4128–4135.
- Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ (2010) Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 151:2233–2243.
- Bacon A, Sattler C, Martin JE (1981) Melatonin effect on the hamster pituitary response to LHRH. *Biol Reprod* 24:993–999.

- Baddouri K, Butlen D, Imbert-Teboul M, Le Bouffant F, Marchetti J, Chabardès D, Morel F (1984) Plasma antidiuretic hormone levels and kidney responsiveness to vasopressin in the jerboa, *Jaculus orientalis*. *Gen Comp Endocrinol* 54:203–215.
- Badura LL, Goldman BD (1992) Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res* 598:98–106.
- Bagnara JT, Hadley ME (1970) Endocrinology of the amphibian pineal. *Am Zool* 10:201–216.
- Bagnold R (1954) The physical aspects of dry desert. J L Cloudsley-Thompson (Ed), *Biol desert London Inst Biol*:pp 7-12.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M (1985) An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331:172–175.
- Barrett P, Ebling FJP, Schuhler S, Wilson D, Ross AW, Warner A, Jethwa P, Boelen A, Visser TJ, Ozanne DM, Archer Z a., Mercer JG, Morgan PJ (2007) Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148:3608–3617.
- Barrett P, Ivanova E, Graham ES, Ross AW, Wilson D, Plé H, Mercer JG, Ebling FJ, Schuhler S, Dupré SM, Loudon A, Morgan PJ (2006) Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol* 191:687–698.
- Bartness TJ, Demas GE, Song CK (2002) Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:363–376.
- Bartness TJ, Goldman BD, Bittman EL (1991) SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 260:R102-12.
- Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD (1993) The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses ?. *J Pineal Res* 15:161–190.
- Bartzen-Sprauer J, Klosen P, Ciofi P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2014) Photoperiodic co-regulation of kisseptin, neurokinin B and dynorphin in the hypothalamus of a seasonal rodent. *J Neuroendocr* 26:510–520.
- Batailler M, Mullier A, Sidibe A, Delagrangé P, Prévot V, Jockers R, Migaud M (2012) Neuroanatomical distribution of the orphan GPR50 receptor in adult sheep and rodent brains. *J Neuroendocrinol* 24:798–808.
- Bennani (1977) Effet du froid et de la neuradrénaline sur le métabolisme énergétique de deux espèces de rongeurs désertiques : *Jaculus orientalis* et *Jaculus deserti*. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle. Université Mohamed V, Maroc.
- Benoit J (1936) Role of the thyroid in the gonado-stimulation by artificial light in the domestic duck. *Comptes rendus de la Société de Biologie, Paris*, 123, 243–246. Bockmann.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC (2002) The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22:9048–9052.
- Bertolucci C, Leorati M, Innocenti A, Foà A (1999) Circannual variations of lizard circadian activity rhythms in constant darkness. *Behav Ecol Sociobiol* 46:200–209.
- Bertrand PP, Polglaze KE, Bertrand RL, Sandow SL, Pozo MJ (2014) Detection of melatonin production from the intestinal epithelium using electrochemical methods. *Curr Pharm Des*

- 20:4802–4806.
- Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS (1994) Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266:R1765-70.
- Bittman EL (1978) Hamster refractoriness: the role of insensitivity of pineal target tissues. *Science* 202:648–650.
- Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ (1983) Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to day length in the ewe. *Endocrinology* 113:2276–2283.
- Bittman EL, Zucker I (1981) Photoperiodic termination of hamster refractoriness: participation of the pineal gland. *Biol Reprod* 24:568–572.
- Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS (2010) GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol* 31:322–340.
- Bloch B, Bugnon C, Fellman D, Lenys D (1978) Immunocytochemical evidence that the same neurons in the human infundibular nucleus are stained with anti-endorphins and antisera of other related peptides. *Neurosci Lett* 10:147–152.
- Bockmann J, Böckers TM, Vennemann B, Niklowitz P, Müller J, Wittkowski W, Sabel B, Kreutz MR (1996) Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* 137:1804–1813.
- Bolborea M (2010) Seasonal cerebral plasticity in two hamster species: the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) and the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Bolborea M, Dale N (2013) Hypothalamic tanycytes: Potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci* 36:91–100.
- Bolborea M, Helfer G, Ebling FJP, Barrett P (2015) Dual signal transduction pathways activated by TSH receptors in rat primary tanycyte cultures. *J Mol Endocrinol* 54:241–250.
- Bolborea M, Laran-Chich MP, Rasri K, Hildebrandt H, Govitrapong P, Simonneaux VR, Pévet P, Steinlechner S, Klosen P (2011) Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 152:3871–3883.
- Boston BA (2001) Pro-opiomelanocortin and weight regulation: from mice to men. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 Suppl 6:1409–1416.
- Boutahricht M, Guillemot J, Montero-Hadjadje M, Bellafqih S, El Ouezzani S, Alaoui A, Yon L, Vaudry H, Anouar Y, Magoul R (2005) Biochemical characterisation and immunohistochemical localisation of the secretogranin II-derived peptide EM66 in the hypothalamus of the jerboa (*Jaculus orientalis*): modulation by food deprivation. *J Neuroendocrinol* 17:372–378.
- Bouhaddou N (2016) Contrôle par les saisons et la photopériode de la fonction de reproduction chez la gerboise (*Jaculus orientalis*) : Rôle et mécanisme d'action du 5-Méthoxytryptophol. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de Rabat. Université Mohamed V.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM (2007) Evolution of animal photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38: 1-25
- Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M (1990) Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52:441–447.
- Brazeau P, Rivier J, Vale W, Guillemin R (1974) Inhibition of growth hormone secretion in the rat

- by synthetic somatostatin. *Endocrinology* 94:184–187.
- Bronson FH (1985) Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod* 32:1–26.
- Brown DI, Garyfallou VT, Urbanski HF (2001) Photoperiodic modulation of GnRH mRNA in the male Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res* 89:119–125.
- Brown KS, Gentry RM, Rowland NE (1998) Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. *Regul Pept* 78:89–94.
- Brown RE, Imran SA, Ur E, Wilkinson M (2008) KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol* 281:64–72.
- Brown SA, Schibler U (1999) The ins and outs of circadian timekeeping. *Curr Opin Genet Dev* 9:588–594.
- Budhiraja S, Chugh A (2009) Neuromedin U: physiology, pharmacology and therapeutic potential. *Fundam Clin Pharmacol* 23:149–157.
- Cahill GM, Besharse JC (1989) Retinal melatonin is metabolized within the eye of *xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1098–1102.
- Canguilhem B (1989) External and endogenous control of body weight rhythm in the European hamster, *Cricetus cricetus*. In: Malan A, Canguilhem B (eds) *Living in the cold II*. John Libbey Eurotext, pp 25–32.
- Canguilhem B, Vivien-Roels B, Demeneix B, Miro JL, Masson-Pevet M, Pevet P (1986) Seasonal and endogenous variations of plasma testosterone (T), thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) in the European hamster. In: Assenmacher I, Boissin J (eds) *Endocrine regulations as adaptive mechanisms to environment*. Editions du CNRS, Paris, pp 291–295
- Caraty A, Blumenröhr M, Vogel GMT, Lomet D, Briant C, Beltramo M (2012) RF9 powerfully stimulates gonadotrophin secretion in the ewe: evidence for a seasonal threshold of sensitivity. *J Neuroendocrinol* 24:725–736.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C and Clarke IJ (2007) Kisspeptin Synchronizes Preovulatory Surges in Cyclical Ewes and Causes Ovulation in Seasonally Acyclic Ewes. *Endocrinology*. 148(11):5258-67.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M (2005) Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146:3917–3925.
- Celis ME (1985) Release of LH in response to alpha-MSH administration. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 35:281–290.
- Chalivoix S, Bagnolini A, Caraty A, Cognié J, Malpoux B, Dufourny L (2010) Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol* 22:110–118.
- Chakir J (2001) Etude du cycle de reproduction chez la gerboise (*Jaculus orientalis*): Implication de 5-METHOXYTRYPTOPHOLE. Mémoire de DESA. Faculté des Sciences de Rabat. Université Mohamed V, Maroc.
- Cheng JT, Liu IM, Kuo DH, Lin MT (2001) Stimulatory effect of phenylephrine on the secretion of beta-endorphin from rat adrenal medulla in vitro. *Auton Neurosci* 93:31–35.
- Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL (1985) The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15:1159–1181.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984) Neuropeptide Y and human pancreatic

- polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427–429.
- Clarke IJ, Cummins JT, de Kreiser DM (1983) Pituitary gland function after disconnection from direct hypothalamic influences in the sheep. *Neuroendocrinology* 36:376–384.
- Clarke IJ, Pompolo S (2005) Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci* 88:29–55.
- Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT (2009) Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 30:371–378.
- Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE (2008) Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149:5811–5821.
- Clarke IJ, Scott CJ, Rao A, Pompolo S, Barker-Gibb ML (2000) Seasonal changes in the expression of neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA in the arcuate nucleus of the ovariectomized ewe: Relationship to the seasonal appetite and breeding cycles. *J Neuroendocrinol* 12:1105–1111.
- Clarke IJ, Smith JT, Henry BA, Oldfield BJ, Stefanidis A, Millar RP, Sari IP, Chng K, Fabre-Nys C, Caraty A, Ang BT, Chan L, Fraley GS (2012) Gonadotropin-inhibitory hormone is a hypothalamic peptide that provides a molecular switch between reproduction and feeding. *Neuroendocrinology* 95:305–316.
- Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE (2009) Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21:673–682.
- Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 28:8691–8697.
- Clarkson J, Herbison AE (2006) Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817–5825.
- Cogburn LA, Wilson-Placentra S, Letcher LR (1987) Influence of pinealectomy on plasma and extrapineal melatonin rhythms in young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 68:343–356.
- Coppola A, Liu Z-W, Andrews ZB, Paradis E, Roy M-C, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao X-B, Diano S (2007) A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5:21–33.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480–484.
- Crowley WR, Kalra SP (1987) Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. *Neuroendocrinology* 46:97–103.
- Czyba JC, Girod C, Durand N (1964) [on epiphyso-hypophysial antagonism and seasonal spermatogenesis variations in the gold hamster (*Mesocricetus auratus*)]. *C R Seances Soc Biol Fil* 158:742–745.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MBL, Colledge WH (2008) Kisspeptin Can Stimulate Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Release by a Direct Action at GnRH Nerve Terminals. *Endocrinology* 149:3926–3932.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JPC, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D,

- Franceschini I, Caraty A, Carlton MBL, Aparicio SAJR, Colledge WH (2007) Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10714–10719.
- Dardente H (2012) Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. *J Neuroendocrinol* 24:249–266.
- Dardente H, Birnie M, Lincoln GA, Hazlerigg DG (2008) RFamide-Related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* 20:1252–1259.
- Dardente H, Cermakian N (2005) How many pieces to build a circadian clock?. *Med Sci (Paris)* 21:66–72.
- Dardente H, Hazlerigg DG, Ebling FJP (2014) Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:1–11.
- Dardente H, Klosen P, Pévet P, Masson-Pévet M (2003) MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* 15:778–786.
- Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, Dupré SM, Loudon ASI, Lincoln GA, Hazlerigg DG (2010) A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* 20:2193–2198.
- Dark J, Zucker I (1985) Circannual rhythms of ground squirrels: role of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Biol Rhythms* 1:17–23.
- Dausmann KH, Glos J, Ganzhorn JU, Heldmaier G (2004) Physiology: hibernation in a tropical primate. *Nature* 429:825–826.
- de Quidt ME, Emson PC (1986) Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 18:545–618.
- de Reviers MM, Ravault JP, Tillet Y, Pelletier J (1989) Melatonin binding sites in the sheep pars tuberalis. *Neurosci Lett* 100:89–93.
- de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10972–10976.
- Decourt C, Anger K, Robert V, Lomet D, Bartzen-Sprauer J, Caraty A, Dufourny L, Anderson G, Beltramo M (2016) No Evidence That RFamide-Related Peptide 3 Directly Modulates LH Secretion in the Ewe. *Endocrinology* 157:1566–1575.
- Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6609–6615.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266:1713–1717.
- Dockray GJ (2004) The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 89:229–235.
- Dodd GT, Luckman SM (2013) Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:4:20.
- Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ (2001) A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106:619–632.
- Drew JE, Barrett P, Williams LM, Conway S, Morgan PJ (1998) The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol*

- 10:651–661.
- Dubocovich ML, Hudson RL, Sumaya IC, Masana MI, Manna E (2005) Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* 39:113–120.
- Ducret E, Anderson GM, Herbison AE (2009) RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 150:2799–2804.
- Duffield GE (2003) DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol* 15:991–1002.
- Dufourny L, Levasseur A, Migaud M, Callebaut I, Pontarotti P, Malpoux B, Monget P (2008) GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol* 8:105.
- Dumbell RA, Scherbarth F, Diedrich V, Schmid HA., Steinlechner S, Barrett P (2015) Somatostatin Agonist Pasireotide Promotes a Physiological State Resembling Short-Day Acclimation in the Photoperiodic Male Siberian Hamster (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol* 27:588–599.
- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271–290.
- Dutia R, Meece K, Dighe S, Kim AJ, Wardlaw SL (2012) β -endorphin antagonizes the effects of α -MSH on food intake and body weight. *Endocrinology* 153:4246–4255.
- Ebling FJP, Barrett P (2008) The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *J Neuroendocrinol* 20:827–833.
- Ebling FJP, Luckman SM (2008) RFamide-related peptide: another sexy peptide? *Endocrinology* 149:899–901.
- El Hilali M, Veillat P (1975) *Jaculus orientalis*: a true hibernator. *Mamm* 39:402–404.
- El Ouezzani S (1988) Variations saisonnières de la masse corporelle et du métabolisme énergétique de la gerboise (*Jaculus orientalis*): Implication de la glande pinéale dans les effets de la photopériode. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, Maroc.
- El Ouezzani S, Janati I, Magoul R, Pévet P, Saboureau M (2011) Overwinter body temperature patterns in captive jerboas (*Jaculus orientalis*): influence of sex and group. *J Comp Physiol B* 181:299–309.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R (2000) The Gonadotropin-Releasing Hormone Neurosecretory System of the Jerboa (*Jaculus orientalis*) and its Seasonal Variations. *J Neuroendocrinol* 12:1205–12.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R (1999) Neuronal activity in the mediobasal hypothalamus of hibernating jerboas (*Jaculus orientalis*). *Neurosci Lett* 260:13–16.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R (2005) Seasonal variations of the beta-endorphin neuronal system in the mediobasal hypothalamus of the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Neurosci Lett* 376:107–110.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R, Lafonb P (2001) Neuropeptide Y gene expression in the jerboa arcuate nucleus: modulation by food deprivation and relationship with hibernation. *Neurosci Lett* 305:127–30.
- El Qandil S, Chakir J, Moussaouiti R, El Oukouchoud R, Rami N, Benjelloun W., Lakhdar-Ghazal N (2004) Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull* 64:371–80.

- EL Qandil S, Oukouchoud R, Belhouari A, Lakhdar-ghazal N (2002) Effets de La photopériode sur l'activité gonadique et sur le système à LHRH chez la gerboise mâle (*Jaculus orientalis*): Implication de la glande pinéale et de la mélatonine. *Biologie & Santé* vol. 2, n°1.
- El Qandil S (1989) Effet de la photopériode sur la fonction de reproduction et sur le métabolisme énergétique basal chez la gerboise (*Jaculus orientalis*). Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, Maroc.
- Elhabazi K, Humbert J-P, Bertin I, Schmitt M, Bihel F, Bourguignon J-J, Bucher B, Becker JA, Sorg T, Meziane H, Petit-Demoulière B, Ilien B, Simonin F (2013) Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPPF receptors. *Neuropharmacology* 75:164–171.
- Ellerman JA (1949) The families and genera of living [Notes on the rodents from Madagascar in the British Museum, and on a collection from the island obtained by Mr. C. S. Webb]. London: British Museum (Natural History). Vol.3, App:210 pp.
- Ezzat Ahmed A, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Yamashita T, Hirata T, Sawai K, Hashizume T (2009) Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *J Reprod Dev* 55:650–654.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165–168.
- Fodor M, Csaba Z, Epelbaum J, Vaudry H, Jegou S (1998) Interrelations between hypothalamic somatostatin and proopiomelanocortin neurons. *J Neuroendocrinol* 10:75–78.
- Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401:225–230.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, Foster R (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284:502–504.
- Fu LY, Van den Pol AN (2010) Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci* 30:10205–10219.
- Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357–1363.
- Lincoln GA, Maeda KI (1992) Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J Endocrinol* 132:201–215.
- Gali Ramamoorthy T, Begum G, Harno E, White A (2015) Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. *Front Neurosci* 9:126.
- García-Galiano D, Navarro VM, Roa J, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Romero M, Aguilar E, Gaytán F, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2010) The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J Neurosci* 30:7783–7792.
- Garidou M-L, Gauer F, Vivien-Roels B, Sicard B, Pévet P, Simonneaux V (2002) Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *Eur J Neurosci* 15:1632–1640.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358–

1360.

- Gauer F, Masson-Pevet M, Stehle J, Pevet P (1994) Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res* 641:92–98.
- Gehlert DR et al. (1999) Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides* 33:329–338.
- Geiser F (2004) Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66:239–274.
- Ghobrial LI, Hodieb AS (1973) Climate and seasonal variations in the breeding of the desert jerboa, *Jaculus jaculus*, in the Sudan. *J Reprod Fertil Suppl* 19:221–233.
- Gibbs FP, Vriend J (1981) The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 109:1796–1798.
- Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16:283–301.
- Gonzalez MI, Baker BI, Wilson CA (1997) Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. *Neuroendocrinology* 66:254–262.
- Goodman RL, Maltby MJ, Millar RP, Hileman SM, Nestor CC, Whited B, Tseng AS, Coolen LM, Lehman MN (2012) Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrous ewes. *Endocrinology* 153:5918–5927.
- Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 23:7093–7106.
- Gorman MR, Goldman B, Zucker I (2001) Mammalian Photoperiodism. In *Circadian clocks, handbook of behavioral neurobiology*, volume 12 (eds Takahashi J. S., Turek F. W., Moore R. Y., editors), pp. 481–508 New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Goss RJ (1980) Photoperiodic control of antler cycles in deer. V. Reversed seasons. *J Exp Zool* 211:101–111.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido B V., Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner R a. (2004a) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073–4077.
- Gouardères C, Puget A, Zajac J-M (2004) Detailed distribution of neuropeptide FF receptors (NPFF1 and NPFF2) in the rat, mouse, octodon, rabbit, guinea pig, and marmoset monkey brains: a comparative autoradiographic study. *Synapse* 51:249–269.
- Gouardères C, Quelven I, Mollereau C, Mazarguil H, Rice SQJ, Zajac JM (2002) Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [125I]YVP and [125I]EYF as selective radioligands. *Neuroscience* 115:349–361.
- Göz D, Studholme K, Lappi DA, Rollag MD, Provencio I, Morin LP (2008) Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS One* 3:e3153.
- Graham ES, Turnbull Y, Fotheringham P, Nilaweera K, Mercer JG, Morgan PJ, Barrett P (2003) Neuromedin U and Neuromedin U receptor-2 expression in the mouse and rat hypothalamus: effects of nutritional status. *J Neurochem* 87:1165–1173.
- Greives TJ, Kriegsfeld LJ, Bentley GE, Tsutsui K, Demas GE (2008) Recent advances in reproductive neuroendocrinology: a role for RFamide peptides in seasonal reproduction? *Proc Biol Sci* 275:1943–1951.

- Grinspoon SK, Askari H, Landt ML, Nathan DM, Schoenfeld DA, Hayden DL, Laposata M, Hubbard J, Klibanski A (1997) Effects of fasting and glucose infusion on basal and overnight leptin concentrations in normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 66:1352–1356.
- Groos G, Hendriks J (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* 34:283–288.
- Gross DS (1984) The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 56:283–298.
- Guerra M, Blázquez JL, Peruzzo B, Peláez B, Rodríguez S, Toranzo D, Pastor F, Rodríguez EM (2010) Cell organization of the rat pars tuberalis. Evidence for open communication between pars tuberalis cells, cerebrospinal fluid and tanycytes. *Cell Tissue Res* 339:359–381.
- Guillemin R, Gerich JE (1976) Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu Rev Med* 27:379–388.
- Güler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, Liao H-W, Barnard AR, Cahill H, Badea TC, Zhao H, Hankins MW, Berson DM, Lucas RJ, Yau KW, Hattar S (2008) Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453:102–105.
- Guy J, Li S, Pelletier G (1988) Studies on the physiological role and mechanism of action of neuropeptide Y in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Regul Pept* 23:209–216.
- Gwinner E (1986) Circannual rhythms. Berlin: Springer-Verlag, pp 164.
- Gwinner E (2003) Circannual rhythms in birds. *Curr Opin Neurobiol* 13:770–778.
- Gwinner E, and Wozniak J (1982) Circannual rhythms in European starlings: why do they stop under long photoperiods? *J. Comp. Physiol.* 146, 419–421.
- Halford S, Pires SS, Turton M, Zheng L, González-Menéndez I, Davies WL, Peirson SN, García-Fernández JM, Hankins MW, Foster RG (2009) VA opsin-based photoreceptors in the hypothalamus of birds. *Curr Biol* 19:1396–1402.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349–11356.
- Han SY, McLennan T, Czielesky K, Herbison AE (2015) Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13109–13114.
- Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 17:2637–2644.
- Hanon EA, Lincoln GA, Fustin JM, Dardente H, Masson-Pévet M, Morgan PJ, Hazlerigg DG (2008) Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol* 18:1147–1152.
- Hanon EA, Routledge K, Dardente H, Masson-Pévet M, Morgan PJ, Hazlerigg DG (2010) Effect of photoperiod on the thyroid-stimulating hormone neuroendocrine system in the European hamster (*Cricetus cricetus*). *J Neuroendocrinol* 22:51–55.
- Hashizume T, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Ezzat AA, Sawai K, Yamashita T (2010) Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim Reprod Sci* 118:37–41.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065–1070.

- Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau K-W (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424:76–81.
- Hazlerigg D, Loudon A (2008) New insights into ancient seasonal life timers. *Curr Biol* 18:R795–R804.
- Hazlerigg D, Simonneaux V (2014) Seasonal regulation of reproduction in Mammals. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 4th ed. Amsterdam, Academic Press, Elsevier. Chapter 34, pp 1575–1604.
- Heisler LK, Cowley MA, Kishi T, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, Rubinstein M, Tatro JB, Zigman JM, Cone RD, Elmquist JK (2003) Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 994:169–174.
- Helfer G, Ross AW, Russell L, Thomson LM, Shearer KD, Goodman TH, McCaffery PJ, Morgan PJ (2012) Photoperiod Regulates Vitamin A and Wnt/ β -Catenin Signaling in F344 Rats. *Endocrinology* 153:815–824.
- Helm B (2009) Geographically distinct reproductive schedules in a changing world: Costly implications in captive Stonechats. *Integr Comp Biol* 49:563–579.
- Helm B, Ben-Shlomo R, Sheriff MJ, Hut RA, Foster R, Barnes BM, Dominoni D (2013) Annual rhythms that underlie phenology: biological time-keeping meets environmental change. *Proc Biol Sci* 280:20130016.
- Henningsen JB (2016) The roles of RFRP in the central control of reproduction: photoperiodic and sex-specific differences. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Henningsen JB, Poirel VJ, Mikkelsen JD, Tsutsui K, Simonneaux V, Gauer F (2015) Sex differences in the photoperiodic regulation of RF-amide related peptide (RFRP) and its receptor GPR147 in the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 524:1825–38.
- Herbison AE, de Tassigny X d'Anglemont, Doran J, Colledge WH (2010) Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 151:312–321.
- Herbison AE, Moenter SM (2011) Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus. *J Neuroendocrinol* 23:557–569.
- Hermes ML, Coderre EM, Buijs RM, Renaud LP (1996) GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol* 496:749–757.
- Herwig A et al. (2013) Hypothalamic Ventricular Ependymal Thyroid Hormone Deiodinases Are an Important Element of Circannual Timing in the Siberian Hamster (*Phodopus sungorus*). *PLoS One* 8:e62003.
- Herwig A, Petri I, Barrett P (2012) Hypothalamic Gene Expression Rapidly Changes in Response to Photoperiod in Juvenile Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol* 24:991–998.
- Herwig A, Wilson D, Logie TJ, Boelen A, Morgan PJ, Mercer JG, Barrett P (2009) Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R1307-15.
- Hetherington A., Ranson S. (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat.Rec.*, 78, 149-172.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF (2008) Hypothalamic pathways linking energy balance and

- reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E827-32.
- Hinuma S et al. (2000) New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2:703-708.
- Hoffman RA, Reiter RJ (1965) Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. *Science* 148:1609-1611.
- Hoffmann K (1973) The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage colour in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol* 85:267-282.
- Hoffmann K (1979) Photoperiod, pineal, melatonin and reproduction in hamsters. *Prog Brain Res* 52:397-415.
- Hooper ET, El Hilali M (1972) Temperature regulation and habits in two species of jerboa, genus *Jaculus*. *J Mammal* 53:574-593.
- Horton TH, Buxton OM, Losee-Olson S, Turek FW (2000) Twenty-Four-Hour Profiles of Serum Leptin in Siberian and Golden Hamsters: Photoperiodic and Diurnal Variations. *Horm Behav* 37:388-398.
- Inouye ST, Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5962-5966.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido B V, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264-272.
- Iuvone PM (1990) Development of melatonin synthesis in chicken retina: regulation of serotonin N-acetyltransferase activity by light, circadian oscillators, and cyclic AMP. *J Neurochem* 54:1562-1568.
- Ivanova EA, Bechtold DA, Dupré SM, Brennand J, Barrett P, Luckman SM, Loudon ASI (2008) Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E176-82.
- Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Osugi T, Gereltsetseg G, Yoshida S, Irahara M, Tsutsui K (2012) Developmental changes in the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) ortholog RFamide-related peptide (RFRP) and its cognate receptor GPR147 in the rat hypothalamus. *Int J Dev Neurosci* 30:31-37.
- Jacobi JS, Coleman HA, Enriori PJ, Parkington HC, Li Q, Pereira A, Cowley MA, Clarke IJ (2013) Paradoxical Effect of Gonadotrophin-Inhibiting Hormone to Negatively Regulate Neuropeptide Y Neurones in Mouse Arcuate Nucleus. *J Neuroendocrinol* 25:1308-1317.
- Jacquet J, Coutant C, Maurel D, Boissin -Agasse L, Boissin J (1986) Influence de la thyroïdectomie sur les variations au cours du printemps et de l'été, de l'activité testiculaire et de la prolactinémie chez le vison. *Comptes Rendus de l'Académie des Sci. Série III*, 367-370.
- Janati A, Talbi R, Klosen P, Mikkelsen JD, Magoul R, Simonneaux V, El Ouezzani S (2013) Distribution and seasonal variation in hypothalamic RF-amide peptides in a semi-desert rodent, the jerboa. *J Neuroendocrinol* 25:402-411.
- Jansen HT, Jackson GL (1993) Circannual rhythms in the ewe: patterns of ovarian cycles and prolactin secretion under two different constant photoperiods. *Biol Reprod* 49:627-634.
- Jhamandas JH, Goncharuk V (2013) Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:8.
- Jilg A, Moek J, Weaver DR, Korf HW, Stehle JH, von Gall C (2005) Rhythms in clock proteins in the mouse *pars tuberalis* depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur J Neurosci* 22:2845-

2854.

- Johnson MA, Fraley GS (2008) Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology* 88:305–315.
- Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS (2007) Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51:171–180.
- Jørgensen SR, Andersen MD, Overgaard A, Mikkelsen JD (2014) Changes in RFamide-related peptide-1 (RFRP-1)-immunoreactivity during postnatal development and the estrous cycle. *Endocrinology* 155:4402–4410.
- Kako K, Ishida N (1998) The role of transcription factors in circadian gene expression. *Neurosci Res* 31:257–264.
- Kalra SP, Crowley WR (1984) Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci* 35:1173–1176.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68–100.
- Kalsbeek A, Buijs RM (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309:109–118.
- Kalsbeek A, Cutrera RA, Van Heerikhuize JJ, Van Der Vliet J, Buijs RM (1999) GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 91:453–461.
- Kameda Y, Arai Y, Nishimaki T (2003) Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res* 314:251–262.
- Kanematsu N, Mori Y, Hayashi S, Hoshino K (1989) Presence of a distinct 24-hour melatonin rhythm in the ventricular cerebrospinal fluid of the goat. *J Pineal Res* 7:143–152.
- Karatsoreos IN, Yan L, LeSauter J, Silver R (2004) Phenotype matters: identification of light-responsive cells in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 24:68–75.
- Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJ, Brown MB (1989) Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod* 41:1034–1046.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M (2007) Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148:1774–1783.
- Kaynard AH, Pau KYF, Hess DL, Spies HG (1990) Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology* 127:2437–2444.
- Kerkerian L, Guy J, Lefèvre G, Pelletier G (1985) Effects of neuropeptide Y (NPY) on the release of anterior pituitary hormones in the rat. *Peptides* 6:1201–1204.
- Khachaturian H, Lewis M, Tsou K, Watson S (1985) Beta-endorphin alpha-MSH, ACTH and related peptides. In: Björklund A, Hökfelt T (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy, vol 4, GABA and neuropeptides in the CNS, part 1*. Elsevier, Amsterdam, pp 216–272.
- Khorram O, Pau KY, Spies HG (1987) Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology* 45:290–297.

- King JC, Rubin BS (1994) Dynamic changes in LHRH neurovascular terminals with various endocrine conditions in adults. *Horm Behav* 28:349–356.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda KI (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146:4431–4436.
- Kirmiz J (1962) Jerboa as a desert species adaptation to desert environment. A study of the jerboa, rat and man. Butterworths, London. :14–31.
- Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 117:38–56.
- Klein DC (2007) Arylalkylamine N-acetyltransferase: “the Timezyme”. *J Biol Chem* 282:4233–4237.
- Klein DC, Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174:245–262.
- Klein DC, Weller JL (1970) Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1093–1095.
- Klosen P, Maessen X, van den Bosch de Aguilar P (1993) PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem* 41:455–463.
- Klosen P, Sebert ME, Rasri K, Laran-Chich MP, Simonneaux V (2013) TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J* 27:2677–2686.
- Knobil E (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36:53–88.
- Knopper LD, Boily P (2015) The energy budget of captive Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*, exposed to photoperiod changes: mass loss is caused by a voluntary decrease in food intake. *Physiol Biochem Zool* 73:517–522.
- Köhrle J (1999) Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* 151:103–119.
- Kolaczynski JW, Considine R V, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, Myint M, Caro JF (1996) Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45:1511–1515.
- Kondo N, Sekijima T, Kondo J, Takamatsu N, Tohya K, Ohtsu T (2006) Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* 125:161–172.
- Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M (2001) The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631–34636.
- Kovács A, László K, Gálosi R, Tóth K, Ollmann T, Péczely L, Lénárd L (2012) Microinjection of RFRP-1 in the central nucleus of amygdala decreases food intake in the rat. *Brain Res Bull* 88:589–595.
- Kriegsfeld LJ, Gibson EM, Williams WP, Zhao S, Mason AO, Bentley GE, Tsutsui K (2010) The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. *J Neuroendocrinol* 22:692–700.

- Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R (2006) Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2410–2415.
- Kumar V, Singh BP, Rani S (2004) The bird clock: A complex, multi-oscillatory and highly diversified system. *Biological Rhythm Research* 35:121-144.
- Lakhdar-Ghazal N, Dubois-Dauphin M, Hermes ML, Buijs RM, Bengelloun WA, Pévet P (1995a) Vasopressin in the brain of a desert hibernator, the jerboa (*Jaculus orientalis*): presence of sexual dimorphism and seasonal variation. *J Comp Neurol* 358:499–517.
- Lakhdar-Ghazal N, Pévet P, Oukouchoud R (1995b) Seasonal variation in NPY immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert hibernator. *Neurosci Lett* 193: 49-52.
- Lakhdar-Ghazal N, Vivien-Roels B, Pevet P (1992) Seasonal variations in pineal 5-methoxytryptophol (5-ML) concentrations and in the daily pattern of pineal 5-ML and melatonin in the desert rodent *Jaculus orientalis*: Effect of prolonged illumination during the night. *J Pineal Res* 13:28–35.
- Laudet V (2011) The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr Biol* 21: R726-37.
- Lectez B, Jeandel L, El-Yamani FZ, Arthaud S, Alexandre D, Mardargent A, Jegou S, Mounien L, Bizet P, Magoul R, Anouar Y, Chartrel N (2009) The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26Rfa is mediated by the neuropeptide y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 150:2342–2350.
- Lee B, Kim SG, Kim J, Choi KY, Lee S, Lee SK, Lee JW (2013) Brain-Specific Homeobox Factor as a Target Selector for Glucocorticoid Receptor in Energy Balance. *Mol Cell Biol* 33:2650–2658.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103–107.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731–1737.
- Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, Osugi T, Otaki N, Sunakawa Y, Kim K, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY, Tsutsui K (2009) Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* 150:2837–2846.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL (2010a) Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479–3489.
- Lehman MN, Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL (2010b) Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res* 1364:90–102.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* 7:1626–1638.
- Leibowitz SF (1991) Brain neuropeptide Y: An integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull* 27:333–337.
- Leibowitz SF, Hor L (1982) Endorphinergic and alpha-noradrenergic systems in the paraventricular nucleus: effects on eating behavior. *Peptides* 3:421–428.
- Lents CA, Heidorn NL, Barb CR, Ford JJ (2008) Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 135:879–887.

- Levin BE, Magnan C, Dunn-Meynell A, Le Foll C (2011) Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology* 152:2552–2557.
- Levine AS, Morley JE (1984) Neuropeptide Y: A potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5:1025–1029.
- Levine J (2015) Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. USA. Elsevier Press, 1199–1257.
- Li C, Chen P, Smith MS (1999) Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140:5382–5390.
- Lincoln GA, Andersson H, Loudon A (2003) Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals - a unifying hypothesis. *J Endocrinol* 179:1–13.
- Lincoln GA, Clarke IJ, Hut RA, Hazlerigg DG (2006) Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science* 314:1941–1944.
- Lincoln GA, Hazlerigg DG (2010) Mammalian circannual pacemakers. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67:171–186.
- Lincoln GA, Johnston JD, Andersson H, Wagner G, Hazlerigg DG (2005) Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology* 146:3782–3790.
- Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U (1997) The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J* 16:6762–6771.
- Lotter EC, Krinsky R, McKay JM, Treneer CM, Porter D, Woods SC (1981) Somatostatin decreases food intake of rats and baboons. *J Comp Physiol Psychol* 95:278–287.
- Lucas RJ, Foster RG (1999) Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinology* 140:1520–1524.
- Lucas RJ, Freedman MS, Muñoz M, Garcia-Fernández JM, Foster RG (1999) Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284:505–507.
- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299:245–247.
- Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M (2007) Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 148:4601–4611.
- Maeda KI, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, Okamura H (2010) Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res* 1364:103–115.
- Magee C, Foradori CD, Bruemmer JE, Arreguin-Arevalo JA, McCue PM, Handa RJ, Squires EL, Clay CM (2009) Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology* 150:2813–2821.
- Malpaux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P (1998) Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139:1508–1516.
- Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V, Thiery JC (1993) Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 48:752–760.

- Malpaux B, Robinson JE, Brown MB, Karsch FJ (1987) Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biol Reprod* 36:1333–1341.
- Malpaux B, Skinner D, Maurice F (1995) The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J Neuroendocrinol* 7:199–206.
- Mann DR, Plant TM (2010) The role and potential sites of action of thyroid hormone in timing the onset of puberty in male primates. *Brain Res* 1364:175–185.
- Marks JL, Porte D, Stahl WL, Baskin DG (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127:3234–3236.
- Mashiko S, Moriya R, Ishihara A, Gomori A, Matsushita H, Egashira S, Iwaasa H, Takahashi T, Haga Y, Fukami T, Kanatani A (2009) Synergistic interaction between neuropeptide Y1 and Y5 receptor pathways in regulation of energy homeostasis. *Eur J Pharmacol* 615:113–117.
- Mason AO, Duffy S, Zhao S, Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K, Silver R, Kriegsfeld LJ (2010) Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms* 25:176–185.
- Mason AO, Greives TJ, Scotti M-AL, Levine J, Frommeyer S, Ketterson ED, Demas GE, Kriegsfeld LJ (2007) Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. *Horm Behav* 52:492–498.
- Masson-Pévet M, Gauer F (1994) Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals* 3:63–70.
- Masumoto KH, Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Nagano M, Uno KD, Tsujino K, Horikawa K, Shigeyoshi Y, Ueda HR (2010) Acute induction of *Eya3* by late-night light stimulation triggers TSH β expression in photoperiodism. *Curr Biol* 20:2199–2206.
- Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T (2004) Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320:383–388.
- Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Levine JE (2010) Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22693–22698.
- Maywood ES, Bittman EL, Hastings MH (1996) Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* 54:470–477.
- Maywood ES, Hastings MH (1995) Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 136:144–153.
- McDonald JK, Lumpkin MD, DePaolo L V. (1989) Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: Possible site of action. *Endocrinology* 125:186–191.
- McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW (2000) Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R695–R703.
- Mercer JG, Moar KM, Logie TJ, Findlay PA, Adam CL, Morgan PJ (2001) Seasonally inappropriate body weight induced by food restriction: effect on hypothalamic gene expression in male Siberian hamsters. *Endocrinology* 142:4173–4181.

- Mercer JG, Moar KM, Ross AW, Hoggard N, Morgan PJ (2000) Photoperiod regulates arcuate nucleus POMC, AGRP, and leptin receptor mRNA in Siberian hamster hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R271-81.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1761–1766.
- Mintz EM, Marvel CL, Gillespie CF, Price KM, Albers HE (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci* 19:5124–5130.
- Misaki N, Higuchi H, Yamagata K, Miki N (1992) Identification of glucocorticoid responsive elements (GREs) at far upstream of rat NPY gene. *Neurochem Int* 21:185–189.
- Molnár CS, Kalló I, Liposits Z, Hrabovszky E (2011) Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 152:1684–1690.
- Monecke S, Wollnik F (2004) European hamsters (*Cricetus cricetus*) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression. *Biol Repro* 70:1438–1443.
- Moore CB, Siopes TD, Steele CT, Underwood H (2002) Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 126:352–358.
- Moore RY (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res* 111:103–119.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201–206.
- Moore RY, Leak RK (2001) Suprachiasmatic nucleus. In: *Circadian Clocks* (Takahashi JS, Turek FW and Moore RY, eds). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.141-179.
- Moore RY, Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150:112–116.
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24:101–146.
- Morgan PJ, Mercer JG (1994) Control of seasonality by melatonin. *Proc Nutr Soc* 53:483–493.
- Morgan PJ, Williams LM (1989) Central melatonin receptors: implications for a mode of action. *Experientia* 45:955–965.
- Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, Kneip J, Grace M (1987) Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol* 252: R599-609.
- Mrosovsky N (1986) Thermal effects on the periodicity, phasing, and persistence of circannual cycles. In HC. Heller, XJ. Musacchia, and L. C. H. Wang, eds. *Living in the cold: physiological biochemical adaptations*. New York, Elsevier. Pages 403-410
- Mrosovsky N, Lucas RJ, Foster RG (2001) Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones. *J Biol Rhythms* 16:585–588.
- Muir AI et al. (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276:28969–28975.
- Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, Tsutsui K (2008) Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* 199:105–112.

- Murphy B, Nunes CN, Ronan JJ, Harper CM, Beall MJ, Hanaway M, Fairhurst AM, Van der Ploeg LH, MacIntyre DE, Mellin TN (1998) Melanocortin mediated inhibition of feeding behavior in rats. *Neuropeptides* 32:491–497.
- Murphy M, Jethwa PH, Warner A, Barrett P, Nilaweera KN, Brameld JM, Ebling FJP (2012) Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in Siberian hamsters. *Endocrinology* 153:101–112.
- Nader N, Chrousos GP, Kino T (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab* 21:277–286.
- Nakane Y, Yoshimura T (2010) Deep brain photoreceptors and a seasonal signal transduction cascade in birds. *Cell Tissue Res* 342:341–344.
- Nakane Y, Yoshimura T (2014) Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. *Front Neurosci* 8:1–7.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2004) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565–4574.
- Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Vigo E, Tovar S, Chartrel N, Le Marec O, Leprince J, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Vaudry H, Tena-Sempere M (2006) Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol* 573:237–249.
- Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, García-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK, Braun RE, Palmiter RD, Tena-Sempere M, Alreja M, Steiner RA (2011) Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 152:4265–4275.
- Newmyer BA, Cline MA (2009) Neuropeptide SF is associated with reduced food intake in chicks. *Behav Brain Res* 205:311–314.
- Nicholls TJ, Follett BK, Goldsmith AR, Pearson H (1988) Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reprod Nutr développement* 28:375–385.
- Nicholls TJ, Goldsmith AR, Dawson A (1984) Photorefractoriness in European starlings: Associated hypothalamic changes and the involvement of thyroid hormones and prolactin. *J Exp Zool* 232:567–572.
- Nisimura T, Numata H (2001) Endogenous timing mechanism controlling the circannual pupation rhythm of the varied carpet beetle *Anthrenus verbasci*. *J Comp Physiol A* 187:433–440.
- Ohtaki T et al. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613–617.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent A-S, Matagne V, Mungenast AE (2006) Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 147:1166–1174.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau U, Matagne V (2010) New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr Dev* 17:44–51.
- Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, Watanabe M, Nakane Y, Murai A, Ebihara S, Korf H-W, Yoshimura T (2008) Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18238–18242.

- Oukouchoud R, Vivien-Roels B, Pévet P, Lakhdar-Ghazal N (2003) Testosterone-dependent and -independent mechanisms involved in the photoperiodic control of neuropeptide levels in the brain of the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Brain Res* 967:63–72.
- Overgaard A, Tena-Sempere M, Franceschini I, Desrozières E, Simonneaux V, Mikkelsen JD (2013) Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice. *Peptides* 45:85–90.
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301:525–527.
- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298:2213–2216.
- Panula P, Kalso E, Nieminen M, Kontinen VK, Brandt A, Pertovaara A (1999) Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain Res* 848:191–196.
- Parkinson T, Douthwaite J, Follet BK (1995) Responses of prepubertal and mature rams to thyroidectomy. *J Reprod Fertil* 104: 51-56.
- Paul MJ, Zucker I, Schwartz WJ (2008) Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:341–361.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. edn 5, London: Academic Press.
- Pengelly ET, Asmundson SJ (1975) Female gestation and lactation as zeitgebers for circannual rhythmicity in the hibernating ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol* 50:621–625.
- Pénicaud L, Meillon S, Brondel L (2012) Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* 94:2069–2074.
- Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Pévet P, Buijs RM (2004) Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci* 19:318–324.
- Pickard GE, Silverman AJ (1979) Effects of photoperiod on hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone in the male hamster. *J Endocrinol* 83:421–428.
- Pierce ME, Besharse JC (1985) Circadian regulation of retinomotor movements. I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. *J Gen Physiol* 86:671–689.
- Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Romero M, Ruiz-Pino F, Aguilar E, Dijcks FA, Blumenröhr M, Pinilla L, van Noort PI, Tena-Sempere M (2010) Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E39-46.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M (2012) Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 92:1235–1316.
- Pitrosky B, Kirsch R, Vivien-Roels B, Georg-Bentz I, Canguilhem B, Pevet P (1995) The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* 7:889–895.
- Plant TM (2006) The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *Eur J Endocrinol* 1:S11-6.
- Plum L et al. (2006) Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116:1761–1766.

- Poling MC, Kim J, Dhamija S, Kauffman AS (2012) Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 153:1827–1840.
- Poling MC, Quennell JH, Greg M. Anderson and ASK (2013) Kisspeptin neurons do not directly signal to RFRP-3 neurons but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. *J Neuroendocr* 15:1203–1214.
- Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ (2006) Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 147:804–810.
- Pralong FP (2010) Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol* 324:82–86.
- Prendergast BJ (2005) Internalization of seasonal time. *Horm Behav* 48:503–511.
- Prendergast BJ, Gorman MR, Zucker I (2000) Establishment and persistence of photoperiodic memory in hamsters. *Proc Natl Acad Sci* 97:5586–5591.
- Prendergast BJ, Pyter LM (2009) Photoperiod history differentially impacts reproduction and immune function in adult Siberian hamsters. *J Biol Rhythms* 24:509–522.
- Prevot V (2002) Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 14:247–255.
- Prevot V, Bouret S, Croix D, Alonso G, Jennes L, Mitchell V, Routtenberg A, Beauvillain JC (2000) Growth-associated protein-43 messenger ribonucleic acid expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 141:1648–1657.
- Prevot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain JC (1999) Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94:809–819.
- Prosser RA, McArthur AJ, Gillette MU (1989) cGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to cAMP effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6812–6815.
- Qi Y, Oldfield BJ, Clarke IJ (2009) Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 21:690–697.
- Quennell JH, Rizwan MZ, Relf H-L, Anderson GM (2010) Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 22:309–316.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975–978.
- Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM (2008) 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.
- Reddy AB, Cronin AS, Ford H, Ebling FJ (1999) Seasonal regulation of food intake and body weight in the male Siberian hamster: studies of hypothalamic orexin (hypocretin), neuropeptide Y (NPY) and pro-opiomelanocortin (POMC). *Eur J Neurosci* 11:3255–3264.
- Reiter RJ, Richardson BA, Matthews SA, Lane SJ, Ferguson BN (1983) Rhythms in immunoreactive melatonin in the retina and Harderian gland of rats: persistence after pinealectomy. *Life Sci* 32:1229–1236.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995) Molecular

- characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8734–8738.
- Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC (1979) A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104:295–301.
- Reppert SM, Sagar SM (1983) Characterization of the day-night variation of retinal melatonin content in the chick. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:294–300.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177–1185.
- Revel FG (2006) In Search for Seasonal Genes Implication of the KiSS-1 / GPR54 System in the Seasonal Control of Reproduction. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2006a) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16:1730–1735.
- Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2006b) Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology* 147:4680–4687.
- Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD (2008) RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149:902–912.
- Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V (1999a) Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms* 14:105–115.
- Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V (1999b) Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140:1375–1384.
- Ripperger JA, Brown SA (2010) Transcriptional regulation of circadian clocks. In *The Circadian Clock*, (Albrecht, Urs), pp. 37–78.
- Rizwan MZ, Poling MC, Corr M, Cornes PA, Augustine RA, Quennell JH, Kauffman AS, Anderson GM (2012) RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* 153:3770–3779.
- Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2006) Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology* 147:2864–2878.
- Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS (2009) Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150:3664–3671.
- Robson AJ, Rousseau K, Loudon ASI, Ebling FJP (2002) Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents. *J Neuroendocrinol* 14:697–709.
- Rogers K V, Vician L, Steiner RA, Clifton DK (1988) The effect of hypophysectomy and growth hormone administration on pre-prosomatostatin messenger ribonucleic acid in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinology* 122:586–591.
- Rollag MD, Berson DM, Provencio I (2003) Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 18:227–234.
- Romer AS (1954) *Man and the Vertebrates*. Vol. I. Penguin Books, Harmondsworth: 198.

- Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko M, Lou R, Rance NE (2007) Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2744–2750.
- Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP (2009) Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 29:3920–3929.
- Rousseau K, Atcha Z, Cagampang FRA, Le Rouzic P, Stirland JA, Ivanov TR, Ebling FJP, Klingenspor M, Loudon ASI (2002) Photoperiodic regulation of leptin resistance in the seasonally breeding Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 143:3083–3095.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298:2211–2213.
- Ruby NF, Dark J, Heller HC, Zucker I (1998) Suprachiasmatic nucleus: role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Res* 782:63–72.
- Saboureau M, Masson-Pévet M, Canguilhem B, Pévet P (1999) Circannual reproductive rhythm in the European hamster (*Cricetus cricetus*): demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod. *J Pineal Res* 26:9–16.
- Saenz de Miera C, Monecke S, Bartzen-Sprauer J, Laran-Chich MP, Pévet P, Hazlerigg DG, Simonneaux V (2014) A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr Biol* 24:1500–1506.
- Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1988) Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides* 9:83–86.
- Scalera G, Tarozzi G (1998) Somatostatin administration modifies food intake, body weight, and gut motility in rat. *Peptides* 19:991–997.
- Schulz C, Paulus K, Lobmann R, Dallman M, Lehnert H (2010) Endogenous ACTH, not only alpha-melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E237–E244.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP (1992) Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608–3616.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671.
- Schwartz WJ, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197:1089–1091.
- Scimonelli T, Celis ME (1990) A central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone on serum levels of LH and prolactin in rats. *J Endocrinol* 124:127–132.
- Seminara SB et al. (2003) The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med* 349:1614–1627.
- Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2129–2134.
- Shibata M, Friedman RL, Ramaswamy S, Plant TM (2007) Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol* 19:432–438.

- Shirogane T, Jin J, Ang XL, Harper JW (2005) SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. *J Biol Chem* 280:26863–26872.
- Sidibe A, Mullier A, Chen P, Baroncini M, Boutin JA, Delagrangre P, Prevot V, Jockers R (2010) Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *J Pineal Res* 48:263–269.
- Siepkka SM, Yoo SH, Park J, Lee C, Takahashi JS (2007) Genetics and neurobiology of circadian clocks in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:251–259.
- Silva RM, Hadjimarkou MM, Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ (2001) Beta-endorphin-induced feeding: pharmacological characterization using selective opioid antagonists and antisense probes in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 297:590–596.
- Simonneaux V, Ancel C (2012) RFRP neurons are critical gatekeepers for the photoperiodic control of reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:1–9.
- Simonneaux V, Ancel C, Poirel VJ, Gauer F (2013) Kisspeptins and RFRP-3 Act in Concert to Synchronize Rodent Reproduction with Seasons. *Front Neurosci* 7:22.
- Simonneaux V, Ribelayga C (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55:325–395.
- Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44:147–151.
- Skene DJ, Papagiannidou E, Hashemi E, Snelling J, Lewis DF, Fernandez M, Ioannides C (2001) Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *J Pineal Res* 31:333–342.
- Skinner DC, Herbison AE (1997) Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and beta-endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology* 138:2585–2595.
- Skinner DC, Malpoux B (1999) High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140:4399–4405.
- Smith JT, Clarke IJ (2010) Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol Metab* 21:255–260.
- Smith JT, Clifton DK, Steiner RA (2006) Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131:623–630.
- Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN (2008) Variation in Kisspeptin and RFamide-Related Peptide (RFRP) Expression and Terminal Connections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Brain: A Novel Medium for Seasonal Breeding in the Sheep. *Endocrinology* 149: 5770-82.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA (2005a) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686–3692.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA (2005b) Differential Regulation of KiSS-1 mRNA Expression by Sex Steroids in the Brain of the Male Mouse. *Endocrinology* 146:2976–2984.
- Stanley BG, Leibowitz SF (1984) Neuropeptide Y: Stimulation of feeding and drinking by injection

- into the paraventricular nucleus. *Life Sci* 35:2635–2642.
- Stanley BG, Leibowitz SF (1985) Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3940–3943.
- Steger RW, Bartke A, Goldman BD, Soares MJ, Talamantes F (1983) Effects of short photoperiod on the ability of golden hamster pituitaries to secrete prolactin and gonadotropins in vitro. *Biol Reprod* 29:872–878.
- Steger RW, Gay-Primel E (1990) Effects of melatonin injections on the ability of golden hamster pituitaries to secrete prolactin and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 42:217–221.
- Steinlechner S, And GH, Becker H (1983) The Seasonal Cycle of Body Weight in the Djungarian Hamster: Photoperiodic Control and the Influence of Starvation and Melatonin. *Oecologia*, Vol. 60, No. 3, pp. 401-405.
- Steinlechner S, Heldmaier G (1982) Role of photoperiod and melatonin in seasonal acclimatization of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Int J Biometeorol* 26:329–337.
- Stengel A, Wang L, Goebel-Stengel M, Tache Y (2011) Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport* 22:253–257.
- Stephan FK, Zucker I (1972) 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.
- Tachibana T, Sato M, Takahashi H, Ukena K, Tsutsui K, Furuse M (2005) Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Res* 1050:94–100.
- Talbi R, Klosien P, Laran-Chich M-P, El Ouezzani S, Simonneaux V (2016) Coordinated seasonal regulation of metabolic and reproductive hypothalamic peptides in the desert jerboa. *J Comp Neurol* 524: 3717-3728.
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V (1982) Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296:659–660.
- Teboul M, Gréchez-Cassiau A, Guillaumond F, Delaunay F (2009) How nuclear receptors tell time. *J Appl Physiol* 107:1965–1971.
- Terasawa E, Kurian JR, Guerriero KA, Kenealy BP, Hutz ED, Keen KL (2010) Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J Neuroendocrinol* 22:630–638.
- Termier G, Termier H (1952) Classe des gastéropodes, dans Jean Piveteau (ed.), *Traité de Paléontologie*, V 2. Masson et Cie., Paris, p. 365-460.
- Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillo WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16:850–858.
- Tolson KP, Garcia C, Yen S, Simonds S, Stefanidis A, Lawrence A, Smith JT, Kauffman AS (2014) Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *J Clin Invest* 124:3075–3079.
- Tominaga K, Shinohara K, Otori Y, Fukuhara C, Inouye ST (1992) Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 3:809–812.
- Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B (2002) Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143:84–90.
- Tricoire H, Møller M, Chemineau P, Malpoux B (2003) Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl* 61:311–321.
- Tsuruo Y, Kawano H, Kagotani Y, Hisano S, Daikoku S, Chihara K, Zhang T, Yanaihara N (1990)

- Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septo-preoptic area. *Neurosci Lett* 110:261–266.
- Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ (2000) A Novel Avian Hypothalamic Peptide Inhibiting Gonadotropin Release. *Biochem Biophys Res Commun* 275:661–667.
- Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K (2012) Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153:373–385.
- Ubuka T, Lai H, Kitani M, Suzuuchi A, Pham V, Cadigan PA, Wang A, Chowdhury VS, Tsutsui K, Bentley GE (2009) Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *J Comp Neurol* 517:841–855.
- Ubuka T, Tsutsui K (2014) Evolution of gonadotropin-inhibitory hormone receptor and its ligand. *Gen Comp Endocrinol* 209:148–161.
- Ubuka T, Ueno M, Ukena K, Tsutsui K (2003) Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) hypothalamo-hypophysial system. *J Endocrinol* 178:311–318.
- Ukena K, Tsutsui K (2001) Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system. *Neurosci Lett* 300:153–156.
- Urban J, Bauer-Dantoin A, Levine J (1993) Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology* 132: 139–45.
- Urbanski HF, Doan A, Pierce M (1991) Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol Reprod* 44:687–692.
- Vakkuri O, Rintamäki H, Leppäluoto J (1985) Presence of immunoreactive melatonin in different tissues of the pigeon (*Columba livia*). *Gen Comp Endocrinol* 58:69–75.
- Vale W, Brazeau P, Grant G, Nussey A, Burgus R, Rivier J, Ling N, Guillemin R (1972) [Preliminary observations on the mechanism of action of somatostatin, a hypothalamic factor inhibiting the secretion of growth hormone]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 275:2913–2916.
- Vanecek J (1998) Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 78:687–721.
- Vaughan GM, Reiter RJ (1986) Pineal dependence of the Syrian hamster's nocturnal serum melatonin surge. *J Pineal Res* 3:9–14.
- Viguié C, Battaglia DF, Krasa HB, Thrun LA, Karsch FJ (1999) Thyroid hormones act primarily within the brain to promote the seasonal inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology* 140:1111–1117.
- Vivien-Roels B, Pévet P, Zarazaga L, Malpoux B, Chemineau P (1999) Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-ML) in ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. *J Pineal Res* 27:230–236.
- Volosin M, Celis ME (1984) Evidence for the role of alpha-MSH in the induction of pseudopregnancy in the rat. *Neuroendocrinology* 39:13–18.
- Wada M (1993) Low temperature and short days together induce thyroid activation and suppression of LH release in Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* 90:355–363.
- Wada M, Hatanaka F, Tsuyoshi H, Sonoda Y (1990) Temperature modulation of photoperiodically induced LH secretion and its termination in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 80:465–472.

- Wade GN, Bartness TJ (1984) Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight, and body composition in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 246: R26-30.
- Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG (2008) Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology* 149:32-39.
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, Steiner RA, Okamura H (2010) 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.
- Wayne NL, Malpoux B, Karsch FJ (1990) Photoperiodic requirements for timing onset and duration of the breeding season of the ewe: synchronization of an endogenous rhythm of reproduction. *J Comp Physiol A* 166:835-842.
- Weaver DR, Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17:100-102.
- Weaver DR, Reppert SM (1990) Melatonin receptors are present in the ferret pars tuberalis and pars distalis, but not in brain. *Endocrinology* 127:2607-2609.
- Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM (1989) Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J Neurosci* 9:2581-2590.
- Webster JR, Moenter SM, Woodfil CJ, Karsch FJ, KARSCH FJ (1991) Role of the Thyroid Gland in Seasonal Reproduction. II. Thyroxine Allows a Season-Specific Suppression of Gonadotropin Secretion in Sheep. *Endocrinology* 129:176-183.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14:697-706.
- Williams LM (1989) Melatonin-binding sites in the rat brain and pituitary mapped by in-vitro autoradiography. *J Mol Endocrinol* 3:71-75.
- Woitkewitsch AA (1940) Dependence of seasonal periodicity in gonadal changes on the thyroid gland in *Sturnus vulgaris* L. *Dokl. Acad Sci URSS* 27: 741-5.
- Woller MJ, McDonald JK, Reboussin DM, Terasawa E (1992) Neuropeptide Y is a neuromodulator of pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone release in the gonadectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 130:2333-2342.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Xu J, Kirigiti MA, Cowley MA, Grove KL, Smith MS (2009) Suppression of basal spontaneous gonadotropin-releasing hormone neuronal activity during lactation: role of inhibitory effects of neuropeptide Y. *Endocrinology* 150:333-340.
- Xu Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi S, Sakai T, Inoue K, Adachi AA (2012) Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. *Endocr J* 59:161-171.
- Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H (2007) Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 148:2226-2232.
- Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S, Yoshimura T (2004) Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology* 145:4264-4267.

- Yang HY, Fratta W, Majane EA, Costa E (1985) Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7757-7761.
- Yano T, Iijima N, Kakihara K, Hinuma S, Tanaka M, Ibata Y (2003) Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain Res* 982:156-167.
- Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Nakamura TJ, Watanabe T, Takagi T, Ono H, Ebihara S, Yoshimura T (2007) Differential response of type 2 deiodinase gene expression to photoperiod between photoperiodic Fischer 344 and nonphotoperiodic Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1315-9.
- Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW (2009) Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci* 29: 2885-2889.
- Yoshida H, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S (2003) Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim Biophys Acta* 1593:151-157.
- Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S (2003) Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426:178-181.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zucker I (2001) Circannual rhythms: mammals. In *Circadian Clocks: Handbook of Behavioral Neurobiology*, Volume 12, Takahashi, J., ed. (New York: Academic Press), pp. 509-528.

ANNEXE

Annexe 1

Effet d'une privation de nourriture de 48 heures sur l'expression des neuropeptides hypothalamiques chez les gerboises femelles de printemps ou d'automne

En vue d'analyser le niveau de base des neuropeptides hypothalamiques avant la privation de nourriture (dans l'expérience de l'injection icv de Kp10) et de vérifier que les effets observés sur l'expression des gènes codant pour les peptides hypothalamiques après injection du kp10 sont les effets du peptide injecté et non pas les effets de la privation de nourriture, nous avons évalué l'effet de la privation de nourriture de 48 heures sur l'expression des gènes *Kiss1*, *Rfrp*, *Pomc*, *Npy* et *somatostatin* chez des gerboises femelles (n=4) de printemps et d'automne. Ces gerboises ont été privées de nourriture puis sacrifiées 48h après. Par hybridation *in situ* non-radioactive, l'expression de l'ARNm du *Rfrp* a été analysée au niveau du DMH/VMH, quant aux ARNm de *Kiss1*, *Pomc*, et *somatostatin* ont été quantifiés dans l'ARC. Le niveau d'expression du *Npy* dans l'ARC a été mesuré par analyse semi-quantitative chez les groupes nourris *ad-libitum* et privés de nourriture.

Les résultats montrent que seule l'expression des gènes *Rfrp* et *Npy* a été altérée par 48 heures de privation de nourriture. En effet, la privation de nourriture a induit une augmentation significative de l'expression du gène *Rfrp* dans le VMH/DMH ($P < 0,05$) et *Npy* dans l'ARC ($P < 0,01$), et ce uniquement chez les gerboises femelles d'automne. Tandis que l'expression des gènes *Kiss1*, *Pomc* et *somatostatin* n'a pas été affectée par la privation de nourriture. Aucune différence significative n'a été observée entre les gerboises nourries *ad-libitum* et les gerboises privées de nourriture 48h (Figure 42).

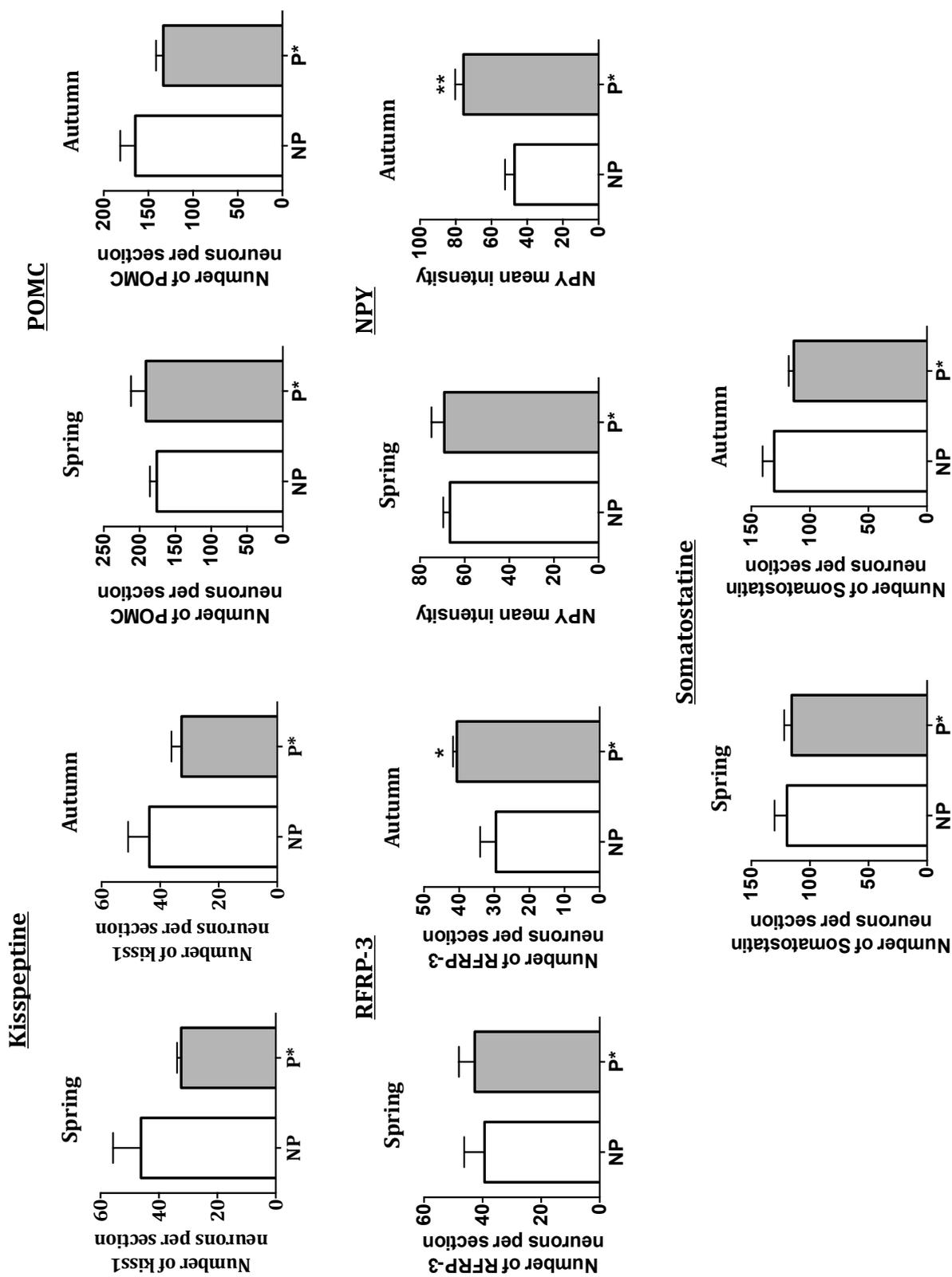


Figure 42 : Effet d'une privation de nourriture de 48h sur l'expression du *Kiss1*, *Pomc*, *Rfrp*, *Npy* et *somatostatin* chez les gerboises femelles de printemps et d'automne. Spring, printemps ; Autumn, automne ; NP, non privé de nourriture ; P*, privé de nourriture. *P < 0.05 et ** P < 0,01 pour les différences entre les groupes en utilisant le t-test de Student.

Annexe 2

Effet de l'injection centrale de Kp10 sur l'expression du gène *somatostatin* chez des gerboises mâles et femelles de printemps et d'automne privées de nourriture pendant 48 heures

L'expression du gène codant pour la somatostatine a été analysée dans l'ARC des gerboises femelles et mâles de printemps et d'automne privées de nourriture 48h, 1h30 après l'injection centrale de Kp10 ou de solvant. Chez les gerboises femelles, le Kp10 a entraîné une augmentation significative du nombre de neurones exprimant l'ARNm de la *somatostatin* uniquement en automne ($p < 0,05$) alors qu'aucun effet n'a été détecté au printemps ($p = 0,1$, Figure 43, A). En revanche, chez les gerboises mâles le Kp10 n'a eu aucun effet sur l'expression de l'ARNm *somatostatin* ni au printemps ni en automne ($P > 0,05$) (Figure 43, B).

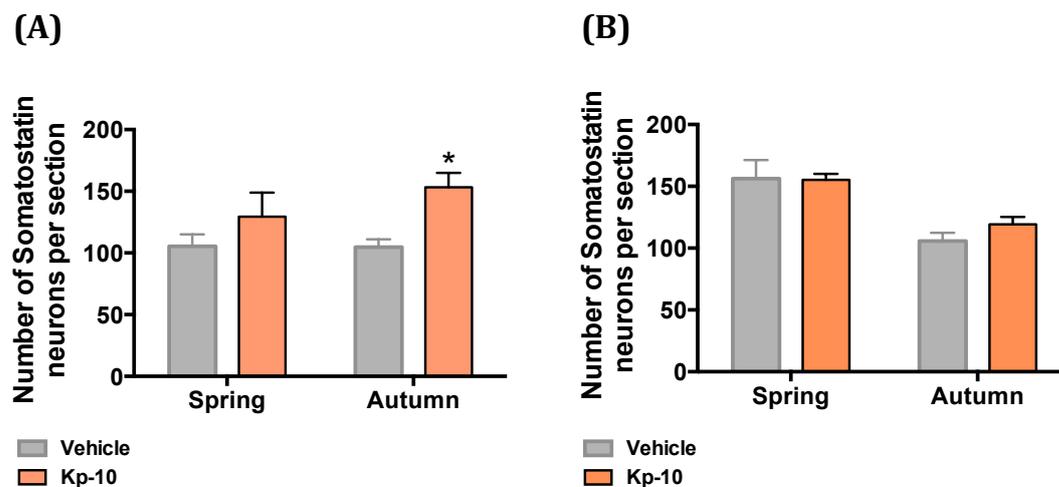


Figure 43 : Effet de l'injection centrale aiguë de Kp10 sur l'expression de l'ARNm de la *somatostatin* chez des gerboises mâles et femelles de printemps et d'automne privées de nourriture pendant 48 heures. A-B : Mesure quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm du gène *somatostatin* dans le noyau arqué des gerboises femelles (A) et mâles (B) ; sacrifiées 1h30 après injection du Kp10 (barres oranges) ou de solvant (barres grises) au printemps et en automne ; les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 4$ dans le groupe de printemps, $n = 3$ dans le groupe d'automne). * $P < 0,05$. A.U: unité arbitraire.

Annexe 3

Effet de l'injection centrale de RFRP-3 sur l'expression du gène *somatostatin* chez des gerboises femelles de printemps et d'automne nourries *ad-libitum*.

L'expression du gène codant pour la somatostatine a également été analysée 1h30 après l'injection centrale du RFRP-3. Chez les gerboises femelles nourries *ad-libitum*, le RFRP-3 a entraîné une diminution du nombre des neurones exprimant l'ARNm de la *somatostatin* dans l'ARC uniquement au printemps ($p=0,04$). Cependant, aucun effet de RFRP-3 sur la somatostatine n'a été détecté en automne ($p=0,1$) (Figure 44).

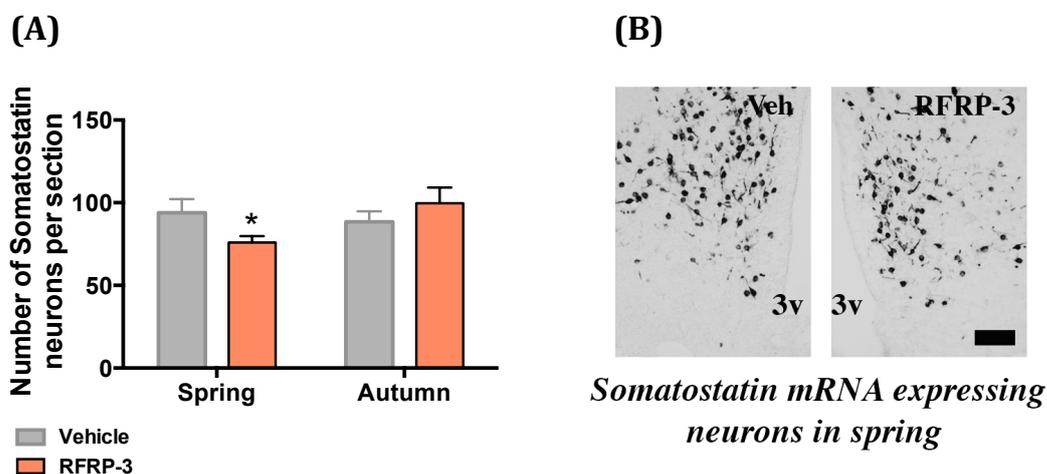


Figure 44 : Effet de l'injection centrale aiguë de RFRP-3 sur l'expression de l'ARNm de la *somatostatin* chez des gerboises femelles de printemps et d'automne nourries *ad-libitum*.

A : Mesure quantitative du nombre de neurones exprimant l'ARNm de la *somatostatin* dans le noyau arqué des gerboises femelles sacrifiées 1h30 après injection du RFRP-3 (barres oranges) ou de solvant (barres grises) au printemps ou en automne. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 4$ par groupe, * $p < 0,05$). **B :** Images représentatives du marquage de l'ARNm de la *somatostatin* dans le noyau arqué de gerboises femelles du printemps sacrifiées 1h30 après injection du RFRP-3 ou de solvant. Les barres d'échelle représentent 100 μ m. AU : unités arbitraires ; 3V, troisième ventricule ; Veh, véhicule, * $p < 0,05$ pour les différences significatives entre les groupes injectés du RFRP-3 et les contrôles.

ANNEXE 4 : PUBLICATIONS

Coordinated Seasonal Regulation of Metabolic and Reproductive Hypothalamic Peptides in the Desert Jerboa

Rajae Talbi,^{1,2} Paul Klosen,¹ Marie-Pierre Laran-Chich,¹ Seloua El Ouezzani,² and Valérie Simonneaux^{1*}

¹Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, Department of Neurobiology of Rhythms, CNRS UPR 3212, University of Strasbourg, Strasbourg, France

²Laboratory of Neuroendocrinology and Nutritional and Climatic Environment, Faculty of Sciences, University of Sidi Mohammed Ben Abdellah, BP 1796-ATLAS, FES, Morocco

ABSTRACT

Jerboa (*Jaculus orientalis*) is a semi-desert rodent displaying strong seasonal variations in biological functions in order to survive harsh conditions. When environmental conditions become unfavorable in early autumn, it shuts down its reproductive axis, increases its body weight, and finally hibernates. In spring, the jerboa displays opposite regulations, with a reactivation of reproduction and reduction in body weight. This study investigated how genes coding for different hypothalamic peptides involved in the central control of reproduction (*Rfrp* and *Kiss1*) and energy homeostasis (*Pomc*, *Npy*, and *Somatostatin*) are regulated according to seasons in male jerboas captured in the wild in spring or autumn. Remarkably, a coordinated increase

in the mRNA level of *Rfrp* in the dorso/ventromedial hypothalamus and *Kiss1*, *Pomc*, and *Somatostatin* in the arcuate nucleus was observed in jerboas captured in spring as compared to autumn animals. Only *Npy* gene expression in the arcuate nucleus displayed no significant variations between the two seasons. These variations appear in line with the jerboa's seasonal physiology, since the spring increase in *Rfrp* and *Kiss1* expression might be related to sexual reactivation, while the spring increase in genes encoding anorexigenic peptides, POMC, and somatostatin may account for the reduced body weight reported at this time of the year. *J. Comp. Neurol.* 000:000–000, 2016.

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

INDEXING TERMS: RFRP-3; kisspeptin; POMC; somatostatin; NPY; jerboa

Species in their natural environment have to adapt their biological functions to seasonal changes in food resources. In mammals, the nocturnal production of the pineal hormone melatonin is critical for seasonal cue integration and adaptation (Reiter, 1993). Melatonin has been demonstrated to synchronize physiological functions with seasonal changes in order to guarantee species survival and maintain adequate body homeostasis. Reproduction and metabolic activity are crucial melatonin-regulated physiological functions (Barrett and Bolborea, 2012; Dardente, 2012; Hazlerigg and Simonneaux, 2014). Furthermore, considering that reproduction is an energetically demanding process, it is critical that both seasonal reproductive and metabolic activities are synchronized. It is therefore expected that the neuronal mechanisms controlling these functions display seasonal correlations and interact with each other. In fact, in the last decade evidence has suggested that

“reproductive” neuropeptides are also involved in the control of feeding behavior, while “metabolic” neuropeptides can communicate with the reproductive axis (Schneider, 2004; Fernandez-Fernandez et al., 2006; Hill et al., 2008; Garcia-Garcia, 2012; Evans and Anderson, 2012).

Key hypothalamic peptides are known to regulate reproductive activity and metabolism in mammalian species. Kisspeptin (Kp) and RFRP-3 (also named GnIH, for gonadotropin inhibitory hormone) are two RF-amide peptides recently shown to be regulators of

Grant sponsor: ANR Repramide; Grant number: 13-BSV1-0001.

*CORRESPONDENCE TO: Valérie Simonneaux, INCI CNRS 321, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. E-mail: simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr

Received August 28, 2015; Revised December 3, 2016;

Accepted April 20, 2016.

DOI 10.1002/cne.24026

Published online Month 00, 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

reproduction in a wide range of mammals (Kriegsfeld et al., 2010; Pinilla et al., 2012). Kp is expressed in neurons located in two hypothalamic regions, the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and the arcuate nucleus (ARC) (Gottsch et al., 2004; Smith et al., 2005; Mikkelsen and Simonneaux, 2009). Kp is a potent activator of GnRH neurons and gonadotropin release in all mammalian species, including humans (Gottsch et al., 2004; Thompson et al., 2004; Dhillon et al., 2005; Messenger et al., 2005). RFRP-3 is expressed in neurons exclusively located in the dorso (DMH) and ventro (VMH)-medial hypothalamus (Kriegsfeld et al., 2006; Revel et al., 2008). Its role in the regulation of reproductive activity appears to depend on species and sex, exhibiting either stimulatory (Ancel et al., 2012; Ubuka et al., 2012) or inhibitory effects (Kriegsfeld et al., 2006; Clarke et al., 2008; Johnson et al., 2007; Pineda et al., 2010). On the other hand, pro-opiomelanocortin (POMC), neuropeptide Y (NPY), and somatostatin are hypothalamic peptides well known to regulate feeding behavior. NPY, synthesized in ARC neurons, is one of the most powerful orexigenic neuropeptides regulating food intake and body weight (Bai et al., 1985; Morley, 1987; Leibowitz, 1991). POMC is a precursor polypeptide synthesized in the ARC, the nucleus tractus solitarius of the brainstem, and the pituitary. POMC produces several biologically active peptides known to play a pivotal role in the regulation of energy balance, among which β -endorphin, ACTH, and α -MSH display strong effects on food intake (Fan et al., 1997; Murphy et al., 1998; Schulz et al., 2010). Somatostatin is a multifunctional neuropeptide produced by the periventricular nucleus of the hypothalamus, the ARC, and other neuronal populations (Guillemin and Gerich, 1976). It binds to receptors located in various brain nuclei involved in feeding regulation, notably the ARC, and it regulates food intake in various mammalian species (Lotter et al., 1981; Danguir, 1988; Fehlmann et al., 2000; Stengel et al., 2010, 2015). Interestingly, independent studies have reported that Kp (Revel et al., 2006a; Smith et al., 2008), RFRP-3 (Revel et al., 2008; Smith et al., 2008), NPY (Lakhdar-Ghazal et al., 1995; Reuss and Olcese, 1995; Skinner and Herbison, 1997), β -endorphin (Roberts et al., 1985; Ebling and Lincoln, 1987), and somatostatin (Webb et al., 1985; Herwig et al., 2012; Klosen et al., 2013; Dumbell et al., 2015) display significant variations in the brain of different mammalian species placed in artificial long or short photoperiods.

In this study we chose the jerboa (*Jaculus orientalis*) as a wild animal model for analyzing the neuronal mechanisms involved in the anticipatory adaptation to harsh environmental cues. The jerboa is a semi-desert

rodent whose reproductive and metabolic activities are well adapted to marked environmental changes. This species is sexually active in spring and early summer (Ghobrial and Hodieb, 1973; El Ouezzani et al., 2000; El Qandil et al., 2004) and hibernates at low ambient temperatures (Andjus et al., 1974; El Ouezzani et al., 2011). It displays seasonal variations in the nocturnal production of melatonin (Lakhdar-Ghazal et al., 1992) and melatonin inhibits testicular activity in male jerboas (El Qandil et al., 2004). Additionally, previous studies reported that jerboas display seasonal variations in body weight and food intake (El Ouezzani et al., 2011; Talbi et al., unpublished data). The seasonal changes in reproductive activity are accompanied by variations in the content of hypothalamic peptides involved in the central control of reproductive activity. Thus, gonadotropin releasing hormone (GnRH) displays seasonal variations and melatonin appears to regulate GnRH immunoreactivity in both neurons of the preoptic area and fibers in the median eminence (El Ouezzani et al., 2000; El Qandil et al., 2004). Kp and RFRP-3 immunoreactivity is higher in the hypothalamus of sexually active male jerboas captured in spring as compared to sexually inactive animals of autumn (Janati et al., 2013). Alternatively, β -endorphin displays lower levels in the rostral ARC of jerboas sacrificed during spring-summer as compared to those sacrificed in autumn (El Ouezzani et al., 2005).

In the present study, we investigated seasonal variations in the expression of genes coding for Kp, RFRP-3, POMC, somatostatin, and NPY by comparing their mRNA levels in the hypothalamus of male jerboas captured from the wild in spring or autumn, and correlated these values to the reproductive and metabolic status of the animals.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sexually mature male jerboas weighing 139.4 ± 5.4 g ($n = 8$) were captured in the field of the middle Atlas Mountains of Morocco (sub-desert high plateaus of Ifkerne-Boulmane; altitude 1,565 m, longitude $-4,73$, latitude 33,36) in spring (May, $n = 4$) when they are sexually active and autumn (November, $n = 4$) when they are sexually inactive. Males rather than females were chosen in this study because sexual maturation and status are difficult to assess in female jerboa captured in the wild and this could interfere with the seasonal parameters under investigation. The animals were transported to the University of Fes, where they were maintained together in a single cage ($90 \times 60 \times 50$ cm) in a room with open windows and kept under

natural conditions of temperature and photoperiod. Food (sunflower and barley seeds and vegetables) was provided ad-libitum. Animal experimentation was performed in accordance with the international guidelines for the Care and Use of Mammals in Neurosciences and Behavioral Research (2003).

Brain tissue preparation

After 1 week of adaptation, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ethyl urethane (1 ml/100g, Acros Organics, Morris Plains, NJ) between 10–12 AM. The blood was taken by cardiac puncture, centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes and the plasma was extracted and stored at -20°C for testosterone assay. Animals were transcardially perfused with 50 ml of isotonic saline solution (NaCl 9‰) followed by 250 ml of 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.6 (PB). Perfused testes were dissected out and weighed. The animals' head was first kept in 4% paraformaldehyde for 1 hour, then the brains were removed, postfixed for 24 hours in the same fixative solution, dehydrated in ethanol baths of increasing concentrations, and then included first in polyethylene glycol 1000 (PEG, Acros Organics) followed by a mixture of PEG 1000/PEG 1500 according to Klosen et al. (1993). Twelve μm coronal brain sections were cut from the suprachiasmatic nucleus to the mammillary bodies using a microtome (Leica 2055 autotome, Rueil-Malmaison, France), mounted on Superfrost ultraplus slides (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) under RNase free conditions, and stored at -80°C until use for in situ hybridization.

Nonradioactive in situ hybridization

Riboprobe preparation and validation

Since none of the available rodent *Rfrp* riboprobes hybridized to the jerboa *Rfrp* mRNA, we cloned the jerboa's *Rfrp* gene. Total RNA was extracted from two fresh jerboa hypothalami (GeneJet RNA purification kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and reverse transcribed into cDNA (Superscript III, Thermo Fisher Scientific). Touchdown polymerase chain reaction (PCR) was then conducted using forward (CATCTGTGACTT-TAGCCACTTC) and reverse (AGAAGATGGCAT-GAAGCTGT) primers designed according to the *Jaculus jaculus* gene sequence (NC_005314.1). The 614 bp cDNA fragment obtained was cloned into the pST Blue1 vector (Perfectly Blunt Cloning Kit, Novagen, Merck, Darmstadt, Germany). Sequencing of the cDNA fragment confirmed that it contained the jerboa's *Rfrp* sequence (LGC Genomics, Germany). Sense and anti-sense jerboa *Rfrp*, Siberian hamster *Kiss1* (380 bp, 99% identical to 187–566 of *Mus musculus*, Genbank

AB_666166.1), rat *Npy* (87–522 of Genbank NM_012614.2), rat *Pomc* (157–731 of Genbank NM_139326) and rat *Somatostatin* (135–465 of Genbank NM_012659) riboprobes were transcribed from linearized plasmids in the presence of digoxigenin-labeled nucleotides according to manufacturer protocol (Dig RNA Labelling Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The length of all probes was confirmed by formaldehyde-3-[*N*-morpholino]propanesulfonic acid agarose gel electrophoresis and northern blotting. The specificity of all riboprobes was assessed by the absence of signal with sense probes, resistance of signal to posthybridization RNase treatment, posthybridization under high stringency conditions (SSC 0.1 \times , 72°C), and expected neuroanatomical localization (see Results).

Hybridization

Riboprobe hybridization was performed according to a protocol previously validated in our laboratory (Klosen et al., 2013). Brain sections including ARC (for *Kiss1*, *Pomc*, *Npy*, and *Somatostatin*) and DMH/VMH (for *Rfrp*) were postfixed for 10 minutes at room temperature in 4% formaldehyde, rinsed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.6), and then treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K (Roche, Meylan, France) for 30 minutes at 37°C . Proteinase K digestion was stopped with 2% phosphate-buffered formaldehyde. Sections were then acetylated twice for 10 minutes with 0.25% acetic anhydride in 100 mM triethanolamine, rinsed twice in PBS containing 0.02% dimethyl-pyrocabonate (DMPC), and preincubated in a solution containing 5 \times saline sodium citrate buffer (SSC), 0.05% Tween-20, and 0.02% DMPC. Hybridization was performed for 40 hours at 60°C with 200 ng/ml of antisense or sense probe in a solution containing 50% formamide, SSC 5 \times , Denhardt's solution 5 \times , 1 mg/ml salmon sperm DNA, 0.1% Tween-20, and 0.04% DMPC. Posthybridization steps included six rinses of high stringency each for 10 minutes in SSC 0.1 \times , 0.05% Tween-20 at 72°C followed by two rinses in A-Dig buffer (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 100 mM; NaCl 150 mM; MgCl₂ 2.5 mM; 0.05% Tween-20; pH 7.5). Digoxigenin-labeled probes were detected with an alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin antibody (1/5,000, Roche, Meylan, France). Alkaline phosphatase activity was detected with bromo-chloro-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium. The slides were incubated with the detection solution in the dark at room temperature. The signal level was checked periodically and the development of the alkaline phosphatase signal was stopped before a too strong signal developed in order to avoid saturation of the signal (8 to 10 hours for *Rfrp*, *Pomc*, *Npy*, and *Somatostatin*, and

48 hours for *Kiss1*). All sections and slides to be analyzed for one experiment were processed and developed together under identical conditions. Finally, the slides were mounted with an aqueous mounting medium (CC/MountTM, Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and coverslipped with Eukitt (Kindler). For each peptide mRNA, we prepared serial sections throughout the ARC for *Kiss1*, *Pomc*, *Npy*, and *Somatostatin* and the DMH/VMH for *Rfrp*. For these serial sections, we selected 1 section every 12 sections with each series containing 12 sections, thus covering a total rostrocaudal extent of 1,728 μm (12 sections of 12 μm sections of a 1 in 12 series). All spring and autumn animal sections were treated together.

Semi-quantification of hybridized peptide mRNA

Both the number of labeled neurons and the intensity of labeling per neuron were measured in the jerboa's hypothalamus. Neuron counts were performed by two observers unaware of the animal groups. There was no significant difference between either observers; therefore, the data given is the one obtained by the first author. The number of *Kiss1*, *Pomc*, *Somatostatin*, and *Npy* neurons was estimated by counting the labeled cells throughout the entire ARC. The rostral, middle, and caudal parts of the ARC correspond to sections localized between -2,12 and -2,30 mm/bregma, -2,8 and -3,14 mm/bregma, and -3,6 and -3,8 mm/bregma, respectively. These levels are the corresponding levels of the rat brain as defined in the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2005). The number of *Rfrp* neurons was also estimated by counting the number of labeled cells throughout the entire the DMH/VMH area. All neurons were counted on both sides of the ventricle at the level of the ARC for *Kiss1*, *Pomc*, *Somatostatin*, and *Npy*, and of the DMH/VMH for *Rfrp*. For each peptide, the total number of neurons was calculated by first multiplying the total number of counted neurons by 12 (1 in 12 sections sampled per series). This gross number of counted neurons was then corrected using Abercrombie's correction factor for split-cell counting errors where $N_{\text{corr}} = N \times [t/t+d]$ (N_{corr} = Total corrected number of neurons; N = counted number of neurons \times 12; t = section thickness; and d = mean neuron diameter) (Abercrombie, 1946). We used the mean diameter of the labeled neurons as an estimate of their rostrocaudal extent. The labeled neurons mostly appeared ovoid or round with no preferential orientation. The mean diameter of the neurons was estimated on 40 labeled cells for each animal and each peptide. The cell contour first was drawn on size-calibrated images in ImageJ (NIH, Bethesda, MD). An ellipse was then fitted on the cell contour using the "Fit

Ellipse" command of ImageJ. Finally, the mean diameter of each cell was then calculated using the maximal and minimal diameters of the fitted ellipse. This mean diameter was then used to calculate Abercrombie's correction factor for each animal and each peptide. The mean diameter for *Kiss1* neurons was: $d_{\text{autmun}} = 11.94 \mu\text{m}$ and $d_{\text{spring}} = 13.59 \mu\text{m}$; *Npy* neurons: $d_{\text{autmun}} = 14.24 \mu\text{m}$ and $d_{\text{spring}} = 15.24 \mu\text{m}$; *Pomc* neurons: $d_{\text{autmun}} = 14.56 \mu\text{m}$ and $d_{\text{spring}} = 15.31 \mu\text{m}$; *Rfrp* neurons: $d_{\text{autmun}} = 15.93 \mu\text{m}$ and $d_{\text{spring}} = 16.11 \mu\text{m}$; and *Somatostatin* neurons: $d_{\text{autmun}} = 12.41 \mu\text{m}$ and $d_{\text{spring}} = 13.61 \mu\text{m}$. A statistically significant difference in mean diameter between seasons was observed only for *Kiss1* cells. The final value given in the figures is the mean number of labeled neurons generated by the Abercrombie's correction in four animals per season.

semi-quantitative analysis of the in situ hybridization labeling intensity was performed as described previously (Klosen et al., 2013). Gray scale images (256 gray level tiff images) were taken on a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) equipped with an Olympus DP50 digital camera (Olympus France, Rungis, France). All lighting parameters on the microscope and the settings of the Viewfinder Lite (Olympus) acquisition software were standardized to ensure consistent stable lighting throughout the image capture procedure. For each analyzed peptide, images of all autumn and spring animal brains were taken at the same time with the same settings. Images were taken with a 10 \times objective at a resolution of 1392 \times 1040 pixels. A background image of the slide without a brain section was taken for each slide. This background image was subtracted from the corresponding sample image. The images were then analyzed using the ImageJ software. For *Kiss1*, *Npy*, *Pomc*, and *Somatostatin* analysis, both sides of the ventricle at the levels of the rostral, middle, and caudal ARC were sampled, while for *Rfrp* analysis the sampling concerned both sides of the DMH/VMH. Preliminary tests showed that analysis of 60 cells per brain was enough to provide a stable mean labeling intensity for each of the hypothalamic peptides analyzed. Labeling intensity was determined as the mean pixel gray value within a fixed-size circle of 50 μm^2 laid over 60 labeled cells randomly selected throughout the hypothalamic structure. For each animal, a mean value of labeling intensity was calculated from the 60 cells analyzed. For each peptide, labeling intensity was calculated as the mean pixel gray value of the four animals per season.

Hormone assays

Serum plasma testosterone was assayed at the Centre of Radioisotopes and Nuclear Medicine of Fes,

Morocco, using a TESTO-CT2 Kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France). This assay is based on the competition between testosterone and a fixed quantity of ^{125}I -labeled testosterone for a limited number of binding sites on testosterone-specific antibody, and provides the quantitative in vitro determination of testosterone. The intra- and interassay values were 4.1% and 5.5%, respectively.

Methodological considerations and statistical analysis

Values of cell count and labeling intensity for each neuropeptide were given as the mean of four jerboas per season. Comparisons were made between two groups of equal size, $n = 4$. According to Zar (1999), when groups are equal then the t -test is fairly robust for moderate to large sample sizes. Thus, all comparisons were made with two-tailed t -tests with $n = 6$ degrees of freedom and $P < 0.05$ being considered statistically significant.

RESULTS

Seasonal variations in male jerboa's testicular activity

Male jerboas captured in spring had significantly larger testes (2.83 ± 0.3 g; $n = 4$) and higher plasma testosterone levels (5.11 ± 0.76 ng/L; $n = 4$) than animals captured in autumn (testes weight was 0.56 ± 0.13 g; plasma testosterone was 0.71 ± 0.17 ng/L; $n = 4$). These results confirm the sexual spring activation and autumn quiescence of the captured male jerboas.

Neuroanatomical distribution of neurons expressing *Rfrp*, *Kiss1*, *Pomc*, *Somatostatin*, or *Npy*

Whatever the season, neurons expressing *Rfrp* mRNA were found only in the DMH/VMH area (Fig. 1A). Neurons expressing *Kiss1* (Fig. 2A), *Pomc* (Fig. 3A), *Somatostatin* (Fig. 4A), and *Npy* (Fig. 5A) mRNA were detected along the rostral, middle, and caudal ARC. Although not shown here, *Kiss1* neurons were also observed in the AVPV and *Somatostatin* neurons in the anterior periventricular hypothalamic area and ventromedial hypothalamic nucleus. The expected neuroanatomical distribution of these neuropeptides, as well as the absence of signal with the sense probes, confirms the specificity of the heterologous probes used to hybridize jerboa's ARC genes.

Seasonal variations in *Rfrp* and *Kiss1* gene expression

Seasonal variations of *Rfrp* expression in the DMH/VMH (Fig. 1A) and *Kiss1* in the ARC (Fig. 2A) were

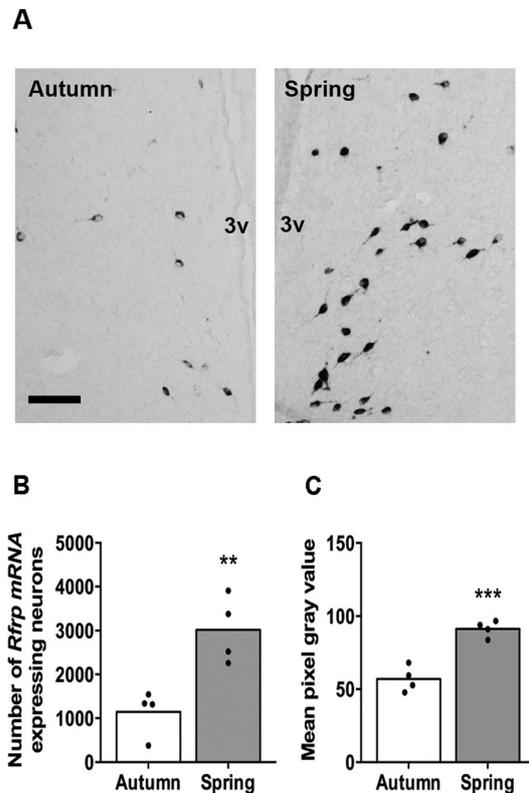


Figure 1. Seasonal variation in *Rfrp* gene expression in the hypothalamus of male jerboas. **A:** Representative pictures showing nonradioactive in situ hybridization of *Rfrp* mRNA in neurons of the dorso/ventromedial hypothalamus of jerboas captured in autumn (left panel) or spring (right panel), 3v: third ventricle. **B:** Estimation of the total number of *Rfrp* mRNA-expressing neurons per animal throughout the dorso/ventromedial hypothalamus in autumn and spring jerboas. **C:** semi-quantification of labeling intensity of *Rfrp* mRNA measured in individual neurons in the hypothalamus of spring and autumn jerboas; for each animal, a mean pixel gray value is calculated from 60 neurons. Dots show the individual values for each animal and bars the mean value for each group ($n = 4$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ as compared to autumn value). Scale bar = 50 μm .

examined in jerboas captured in May or November. The number of *Rfrp* mRNA-expressing neurons was significantly higher in spring compared to autumn animals ($P = 0.006$; $t = -4,066$; Fig. 1B). Furthermore, analysis of the labeling intensity per neuron indicated that the level of *Rfrp* mRNA per neuron is significantly higher in spring compared to autumn animals ($P = 0.0005$; $t = -6,595$; Fig. 1C). The number of ARC *Kiss1* mRNA-expressing neurons was not significantly different between spring and autumn animals ($P = 0.8$; $t = -0,217$; Fig. 2B). However, analysis of labeling intensity per neuron indicated a significantly higher level of *Kiss1*

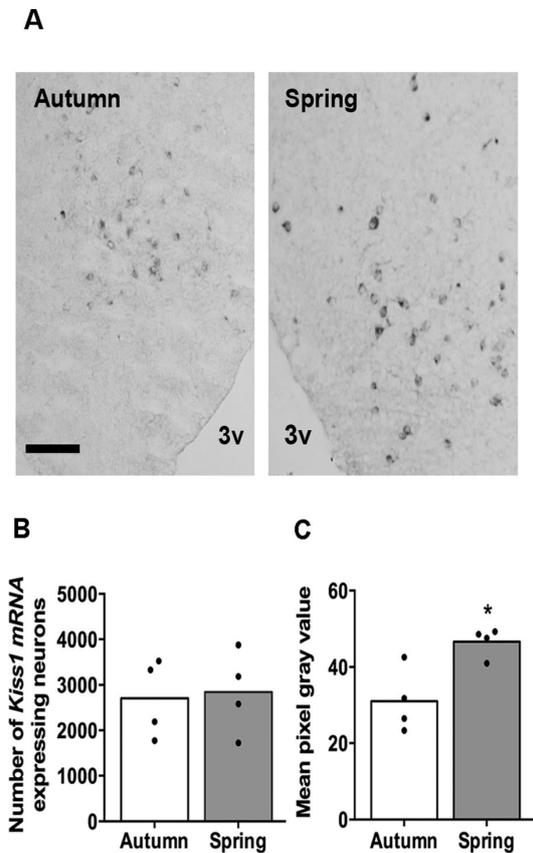


Figure 2. Seasonal variation in *Kiss1* gene expression in the hypothalamus of male jerboas. **A:** Representative pictures showing nonradioactive in situ hybridization of *Kiss1* mRNA in neurons of arcuate nucleus (ARC) of jerboas captured in autumn (left panel) or spring (right panel), 3v: third ventricle. **B:** Estimation of the total number of *Kiss1* mRNA-expressing neurons per animal throughout the ARC in autumn and spring jerboas. **C:** semi-quantification of the labeling intensity of *Kiss1* mRNA measured in individual neurons in the ARC of spring and autumn jerboas; for each animal, a mean pixel gray value is calculated from 60 neurons. Dots show the individual values for each animal and bars the mean value for each group ($n = 4$; * $P < 0.05$ as compared to autumn value). Scale bar = 50 μ M.

mRNA in spring as compared to autumn animals ($P = 0.01$; $t = -3,357$; Fig. 2C).

Seasonal variations in *Pomc*, *Somatostatin*, and *Npy* gene expression

Expression of genes coding for the anorexigenic POMC (Fig. 3A) and somatostatin (Fig. 4A) and the orexigenic NPY (Fig. 5A) was analyzed in the ARC of spring and autumn jerboas. The number of neurons expressing *Pomc* mRNA ($P = 0.004$, $t = -4,346$; Fig. 3B) or *Somatostatin* mRNA ($P = 0.01$; $t = -3,531$; Fig.

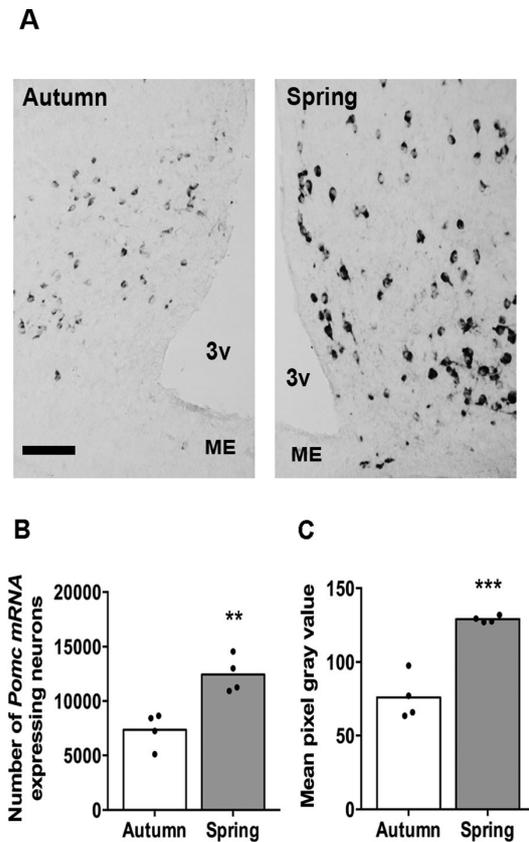


Figure 3. Seasonal variation in *Pomc* gene expression in the hypothalamus of male jerboas. **A:** Representative pictures showing nonradioactive in situ hybridization of *pomc* mRNA in neurons of arcuate nucleus (ARC) of jerboas captured in autumn (left panel) or spring (right panel), 3v: third ventricle, ME: median eminence. **B:** Estimation of the total number of *Pomc* mRNA-expressing neurons per animal throughout the ARC in autumn and spring jerboas. **C:** semi-quantification of the labeling intensity of *Pomc* mRNA measured in individual neurons in the ARC of spring and autumn jerboas; for each animal, a mean pixel gray value is calculated from 60 neurons. Dots show the individual values for each animal and bars the mean value for each group ($n = 4$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ as compared to autumn value). Scale bar = 50 μ M.

4B) was markedly higher in spring as compared to autumn. Similarly, the intensity of hybridization signal per neuron was higher in spring as compared to autumn for both *Pomc* ($P = 0.0005$, $t = -6,723$; Fig. 3C) and *Somatostatin* ($P = 0.02$; $t = -3,022$; Fig. 4C) neurons. Analysis of seasonal variations of the mean number of *Npy* mRNA-expressing neurons ($P = 0.1$; $t = 1,809$; Fig. 5B) as well as the mean staining intensity per neuron ($P = 0.1$, $t = 1,648$; Fig. 5C) indicates no significant variations between either season.

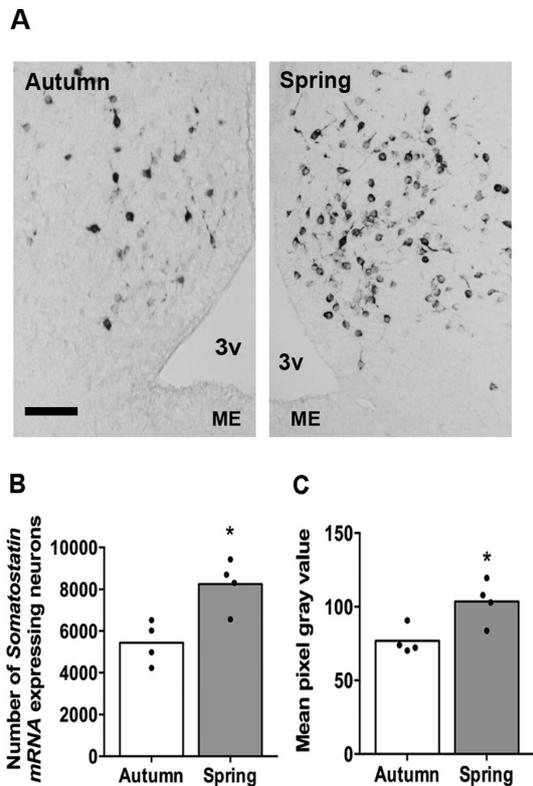


Figure 4. Seasonal variation in *Somatostatin* gene expression in the hypothalamus of male jerboas. **A:** Representative pictures showing nonradioactive in situ hybridization of *Somatostatin* mRNA in neurons of arcuate nucleus (ARC) of jerboas captured in autumn (left panel) or spring (right panel), 3v: third ventricle, ME: median eminence. **B:** Estimation of the total number of *Somatostatin* mRNA-expressing neurons per animal throughout the ARC in autumn and spring jerboas. **C:** semi-quantification of the labeling intensity of *Somatostatin* mRNA labeling measured in individual neurons in the ARC of spring and autumn jerboas; for each animal, a mean pixel gray value is calculated from 60 neurons. Dots show the individual values for each animal and bars the mean value for each group ($n = 4$; * $P < 0.05$ as compared to autumn value). Scale bar = 50 μ M.

DISCUSSION

This study is the first to report seasonal regulation of genes encoding several hypothalamic peptides involved in the central control of reproduction and energy balance in a wild rodent species. Notably, our results indicate a coordinated springtime increase in the expression of four peptides involved in activation of reproduction and food intake inhibition in the desert jerboa.

The jerboa is a desert rodent of the family of North African Dipodidae. It is a wild animal that lives in an environment characterized by large fluctuations in

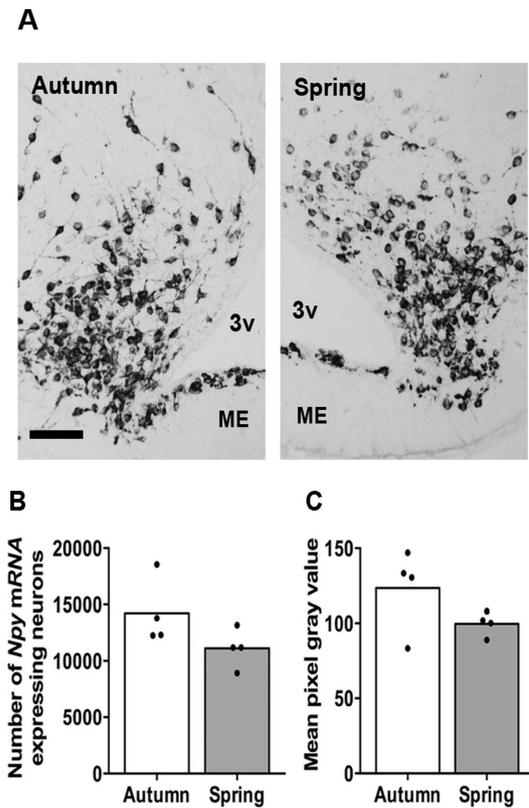


Figure 5. Seasonal variation in *Npy* gene expression in the hypothalamus of male jerboas. **A:** Representative pictures showing nonradioactive in situ hybridization of *Npy* mRNA in neurons of arcuate nucleus (ARC) of jerboas captured in autumn (left panel) or spring (right panel), 3v: third ventricle, ME: median eminence. **B:** Estimation of the total number of *Npy* mRNA-expressing neurons per animal throughout the ARC in autumn and spring jerboas. **C:** semi-quantification of the labeling intensity of *Npy* mRNA labeling measured in individual neurons in the ARC of spring and autumn jerboas; for each animal, a mean pixel gray value is calculated from 60 neurons. Dots show the individual values for each animal and bars the mean value for each group ($n = 4$). Scale bar = 50 μ M.

external temperature, food, and water supply. Therefore, it appears to be a better model compared to other laboratory animals to assess the possible link between the seasonal regulation of hypothalamic peptides involved in the central control of reproduction and metabolism. The jerboa is a species known to develop interesting strategies to ensure its adaptation to seasonal changes. In its natural environment, it anticipates seasonal stressors and adjusts its reproductive and metabolic axes accordingly. In autumn, the male jerboa shuts down its reproduction, as seen by lower GnRH immunoreactivity (El Ouezzani et al., 2000) and reduced testicular activity (El Qandil et al., 2004; this study). In

the female jerboa, body weight (El Ouezzani et al., 2011) and food intake (Talbi et al., unpublished data) increase in autumn–winter in order to anticipate the upcoming winter hibernation, a state accompanied by hypothermia and low metabolism (El Hilali and Veillat, 1975; El Ouezzani et al., 2001; Malan, 2014). In contrast, when favorable conditions return in spring, these physiological states are reversed, with the reactivation of the reproductive axis (El Ouezzani et al., 2000; El Qandil et al., 2004; this study) and a decrease in body weight and food intake (El Ouezzani et al., 2011; Talbi et al., unpublished data). The present work investigated whether expression of genes encoding peptides regulating reproduction (Kp and RFRP-3) and energy balance (POMC, somatostatin, and NPY) are altered by seasonal changes of the environment in the male jerboa.

Expression of neuropeptides regulating reproduction is influenced by the seasonal environment. The *Rfrp* mRNA level in the DMH/VMH was higher in spring as compared to autumn, seen in both the mean number of *Rfrp* mRNA-expressing neurons and the mean staining intensity of individual neurons. *Kiss1* gene analysis in the ARC revealed that the labeling intensity per neuron was significantly increased in spring compared to autumn; however, no apparent significant difference in the number of *Kiss1* mRNA-expressing neurons was observed between the two seasons. We previously reported that the number of Kp-immunoreactive (ir) neurons in the ARC of male jerboas is increased in spring as compared to autumn (Janati et al., 2013). This discrepancy between the seasonal variation in Kp-ir and *Kiss1* mRNA-expressing neurons may be caused by differences in the sensitivity of the technical approaches. Alternatively, it may result from seasonal variation in post-transcriptional processing since *Kiss1* mRNA is always detected in ARC neurons whatever the season, but the synthesis rate reflected by the level of *Kiss1* mRNA per neuron displays seasonal variation. The coincident upregulation of mRNA levels and immunostaining clearly shows that the increase in Kp and RFRP-3 immunostaining is not due to lack of secretion and neuronal accumulation of these peptides, but the synthesis of these neuropeptides is increased in spring. Based on these findings, it is tempting to speculate that in the jerboa, like in other seasonal rodents, the autumn and winter increases nighttime melatonin production (Lakhdar-Ghazal et al., 1992) and inhibits *Rfrp* and *Kiss1* gene expression via a reduction of thyroid hormone synthesis in the basal hypothalamus (Revel et al., 2006a,b, 2008; Barrett et al., 2007; Ubuka et al., 2012; Klosen et al., 2013). The difference in the amplitude of the seasonal variations between *Rfrp* and *Kiss1* gene expression could result from a differential peptide

response to the sex steroid feedback. Indeed, the negative feedback exerted by sex steroids on ARC Kp neurons is well documented in many species (Smith et al., 2005; Revel et al., 2006; Kauffman et al., 2007; Ansel et al., 2010), whereas the sex steroid feedback on RFRP-3 neurons is absent in rat (Quennell et al., 2010), sheep (Smith et al., 2008), Syrian (Revel et al., 2008) and Siberian (Ubuka et al., 2012) hamsters, or moderate in mice (Molnár et al., 2011; Poling et al., 2012).

Altogether, our results indicate that in spring there is an increased synthesis of both RFRP-3 and Kp in the jerboa's hypothalamus that correlates with a gonadal activation. Kp is well established as a potent activator of GnRH release in mammalian species (Pinilla et al., 2012, for review) and its increase in spring may drive the seasonal activation of jerboa's reproduction, as already demonstrated for other seasonal species like the Syrian (Revel et al., 2006a) and Siberian (Mason et al., 2007) hamsters and sheep (Caraty et al., 2007). Preliminary data obtained in the male jerboa indeed confirm that a single icv injection of 3 nmole of Kp increases testosterone production in both spring and autumn (Talbi et al., in preparation). In contrast, the effect of RFRP-3 on reproductive activity is controversial, being inhibitory in sheep (Clarke et al., 2008), rat (Johnson et al., 2007), and mice (Ducret et al., 2009) but stimulatory in the male Syrian (Ancel et al., 2012) and short-day-adapted Siberian hamsters (Ubuka et al., 2012). The marked springtime increase in *Rfrp* expression in sexually active jerboas is in line with what has been observed in other seasonal species (Simonneau and Ancel, 2012) and suggests a potential activatory effect of RFRP-3 on the reproductive axis of male jerboa.

The seasonal regulation of genes encoding peptides considered as key molecules in the control of feeding behavior was also investigated in the male jerboa. Expression of the gene coding for the anorexigenic POMC, seen in both the number of labeled neurons and the mean staining intensity of individual POMC neurons in the hypothalamus, was markedly increased in spring as compared to autumn. In the Siberian hamster, ARC *Pomc* gene expression was also reported higher in long-day as compared to short-day-adapted animals (Mercer et al., 2000). Seasonal variation in *Pomc* expression was also reported in the ewe, where the number of POMC cells and the density of grains per cell increased during the anestrus season (Clarke et al., 2000). α -MSH, one of the peptides processed from POMC, is a strong inhibitor of food intake (Fan et al., 1997; Brown et al., 1998; McMinn et al., 2000). Therefore, our observation of lower *Pomc* expression in autumn jerboas could lead to a reduced synthesis in α -MSH, which

could account for the increase in body weight observed at this time of the year. Somatostatin is a hypothalamic neuropeptide known for inhibiting the secretion of the pituitary growth hormone (Vale et al., 1972; Brazeau et al., 1974; Rogers et al., 1988) and food intake in rats and baboons (Lotter et al., 1981). Recent studies have reported its involvement in the seasonal regulation of body mass and metabolism. Indeed, Siberian hamsters adapted to a short photoperiod display a decrease in body weight associated with an increase in *Somatostatin* gene expression (Herwig et al., 2012; Dumbell et al., 2015). In the present study, we observed a significant increase in *Somatostatin* gene expression in spring as compared to autumn, which is in line with the reported decrease in the jerboa's body weight in spring and summer (El Ouezzani et al., 2011). Therefore, Siberian hamster and jerboa appear to display opposite but coordinated seasonal variations in both *Somatostatin* gene expression and body weight. Regarding NPY expression in the jerboa's ARC, the level of *Npy* mRNA was found very strong in both seasons. No significant variation between spring and autumn in the number of NPY cells or the staining intensity of individual NPY neurons was observed. A similar lack of photoperiodic variation in NPY expression was previously reported in the Siberian hamster (Mercer et al., 2000). By contrast in the ewe, both the number of NPY-ir cells (Skinner and Herbison, 1997) and the level of *Npy* gene expression in the ARC (Clarke et al., 2000) were reported to be higher in May as compared to September, and were suggested to be related to a seasonal regulation of food intake. Besides its strong orexigenic function, studies have reported its involvement in the regulation of GnRH neurons activity (Li et al., 1999). NPY can either activate (Kalra and Crowley, 1984; Khorram et al., 1987) or inhibit (Khorram et al., 1987; McDonald et al., 1989; Kaynard et al., 1990) the reproductive axis, with possible environment and species dependence.

Two genes encoding neuropeptides involved in food intake and body weight regulation, *Pomc* and *Somatostatin*, thus display a strong reduction of expression in autumn. We recently reported in the Siberian hamster that the seasonal variation in *Somatostatin* gene expression, like *Kiss1* and *Rfrp*, is driven by a melatonin-dependent TSH mechanism (Klosen et al., 2013). Further studies should examine whether the parallel reduction in *Kiss1*, *Rfrp*, *Somatostatin* but also *Pomc* gene expression observed in autumn in jerboa is related to similar melatonin-dependent mechanisms. Additionally, peptide interaction cannot be excluded to explain such correlated seasonal variations. Fu and van den Pol (2010) reported Kp fiber projection to POMC neurons

and showed a direct excitation of POMC neurons by Kp, suggesting a possible indirect modulation of food intake by Kp through POMC neurons, while a direct role of Kp in the regulation of metabolism has also been suggested (De Bond and Smith, 2014, for review). On the other hand, there is a bidirectional communication between somatostatin and POMC neurons since somatostatin receptors are located on POMC ARC neurons and POMC neurons project to a majority of somatostatin neurons in the periventricular nucleus, indicating that somatostatin effects on growth could be under the influence of melanocortins (Fodor et al., 1998).

In conclusion, this study reports a general springtime activation of genes encoding hypothalamic peptides involved in the activation of reproduction and inhibition of food intake in the male jerboa. These variations are in line with the seasonal physiology of the jerboa, since genes encoding RFRP and Kp are both increased in spring when the animals become sexually active and similarly genes encoding the anorexigenic POMC and somatostatin are also increased in spring when the animals reduce their body weight. Based on these results, it is hypothesized that reproduction and energy balance are modulated oppositely in the jerboa. The increase in body weight during autumn could be a long-term anticipatory adaptive process allowing the animal's preparation for the upcoming reproductive activity in early spring. The possibility that the seasonal changes in melatonin production orchestrate this coordinated seasonal variation in neuropeptides should be considered. Furthermore, the possible interactions among these neuropeptides to synchronize the balance between the seasonal reproduction and the metabolic activity should also be investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Dr. Matthew Beymer for English proof-reading and Dr. Andre Malan for assistance with statistical analysis. Rajae Talbi's stays in Strasbourg were supported by the PICS (CNRST-Maroc / CNRS-France) Volubilis # 5631 and the French-Moroccan GDRI NeurO and Neuromed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ROLE OF AUTHORS

All authors had full access to the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: RT, VS, SEO. Acquisition of data: RT, PK, MP.

Analysis and interpretation of data: RT, VS, PK, SEO. Drafting of article: RT, VS, SEO. Revision of the article for important intellectual content: RT, VS, PK, SEO. Statistical analysis: RT, PK. Obtained funding: VS, SEO. Technical and material support: RT, PK, MP. Study supervision: VS, SEO.

LITERATURE CITED

- Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239–247.
- Ancel C, Bentsen AH, Sébert M-E, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2012. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* 153:1352–1363.
- Andjus RK, El Hilali M, Veillat JP, Baddouri K. 1974. Tolerance of one species of jerboa (*Jaculus orientalis*) to prolonged exposure to deep hypothermia. *J Physiol (Paris)* 68:531–542.
- Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2010. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 25:81–91.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M. 1985. An arcuate-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331:172–175.
- Barrett P, Bolborea M. 2012. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J Pineal Res* 52:376–388.
- Barrett P, Ebling FJP, Schuhler S, Wilson D, Ross AW, Warner A, Jethwa P, Boelen A, Visser TJ, Ozanne DM, Archer ZA, Mercer JG, Morgan PJ. 2007. Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148:3608–3617.
- Brazeau P, Rivier J, Vale W, Guillemin R. 1974. Inhibition of growth hormone secretion in the rat by synthetic somatostatin. *Endocrinology* 94:184–187.
- Brown KS, Gentry RM, Rowland NE. 1998. Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. *Reg Peptides* 78:89–94.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C and IJC. 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148:5258–5267.
- Clarke IJ, Scott CJ, Rao A, Pompolo S, Barker-Gibb ML. 2000. Seasonal changes in the expression of neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA in the arcuate nucleus of the ovariectomized ewe: Relationship to the seasonal appetite and breeding cycles. *J Neuroendocrinol* 12:1105–1111.
- Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE. 2008. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149:5811–5821.
- Danguir J. 1988. Food intake in rats is increased by intracerebroventricular infusion of the somatostatin analogue SMS 201-995 and is decreased by somatostatin antiserum. *Peptides* 9:211–213.
- Dardente H. 2012. Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. *J Neuroendocrinol* 24:249–66.
- De Bond JAP, Smith JT. 2014. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction* 147:R53–R63.
- Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatgei MA, Bloom SR. 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endo Metab* 90:6609–6615.
- Ducret E, Anderson GM, Herbison AE. 2009. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 150:2799–2804.
- Dumbell R, Scherbarth F, Diedrich V, Schmid H, Steinlechner S, Barrett P. 2015. Somatostatin agonist pasireotide promotes a physiological state resembling short-day acclimation in the photoperiodic male Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol* 27:588–599.
- Ebling FJ, Lincoln GA. 1987. Beta-endorphin secretion in rams related to season and photoperiod. *Endocrinology* 120:809–818.
- El Hilali M VJP. 1975. *Jaculus orientalis*: a true hibernator. *Mammalia* 39:402–404.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R. 2000. The Gonadotropin-Releasing Hormone neurosecretory system of the Jerboa (*Jaculus orientalis*) and its seasonal variations. *J Neuroendocrinol* 12:1205–1212.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R, Lafon P. 2001. Neuropeptide Y gene expression in the jerboa arcuate nucleus: modulation by food deprivation and relationship with hibernation. *Neurosci Lett* 305:21–24.
- El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R. 2005. Seasonal variations of the beta-endorphin neuronal system in the mediobasal hypothalamus of the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Neurosci Lett* 376:107–110.
- El Ouezzani S, Janati IA, Magoul R, Pévet P, Saboureau M. 2011. Overwinter body temperature patterns in captive jerboas (*Jaculus orientalis*): influence of sex and group. *J Comp Physiol* 181:299–309.
- El Qandil S, Chakir J, Moussaoui R, El Oukouchoud R, Rami N, Benjelloun W, Lakhdar-Ghazal N. 2004. Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull* 64:371–380.
- Evans JJ, Anderson GM. 2012. Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod* 18:313–332.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165–168.
- Fang Y, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. 1998. Pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA-expression: distribution and region-specific down-regulation by chronic morphine in female guinea pig hypothalamus. *Mol Brain Res* 55:1–8.
- Fehlmann D, Langenegger D, Schuepbach E, Siehler S, Feuerbach D, Hoyer D. 2000. Distribution and characterisation of somatostatin receptor mRNA and binding sites in the brain and periphery. *J Physiol (Paris)* 94:265–281.
- Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 254:127–132.
- Fodor M, Csaba Z, Epelbaum J, Vaudry H, Jegou S. 1998. Interrelations between hypothalamic somatostatin and pro-opiomelanocortin neurons. *J Neuroendocrinol* 10:75–78.

- Fu LY, van den Pol AN. 2010. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci* 30:10205–10219.
- Garcia-Garcia RM. 2012. Integrative Control of Energy Balance and Reproduction in Females. *ISRN Vet Sci* 2012: 121389.
- Ghobrial LI, Hodiab AS. 1973. Climate and seasonal variations in the breeding of the desert jerboa, *Jaculus jaculus*, in the Sudan. *J Reprod Fertil* 19:221–233.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido B V, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner R. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073–4077.
- Guillemin R, Gerich JE. 1976. Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu Rev Med* 27:379–388.
- Hazlerigg D, Simonneaux V. 2014. Seasonal regulation of reproduction in Mammals. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 4th ed. Amsterdam, Academic Press, Elsevier. Chapter 34, pp 1575–1604.
- Herwig A, Petri I, Barrett P. 2012. Hypothalamic gene expression rapidly changes in response to photoperiod in juvenile Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol* 24:991–998.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. 2008. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol* 294:E827–E832.
- Janati A, Talbi R, Klosen P, Mikkelsen JD, Magoul R, Simonneaux V, El Ouezzani S. 2013. Distribution and seasonal variation in hypothalamic RF-amide peptides in a semi-desert rodent, the jerboa. *J Neuroendocrinol* 25: 402–411.
- Johansson O, Hokfelt T, Elde RP. 1984. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13:265–339.
- Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS. 2007. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51:171–180.
- Kalra SP, Crowley WR. 1984. Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci* 35: 1173–1176.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. 2007. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148:1774–1783.
- Kaynard AH, Pau KYF, Hess DL, Spies HG. 1990. Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology* 127:2437–2444.
- Khorram O, Pau KY, Spies HG. 1987. Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology* 45:290–297.
- Klosen P, Maessen X, van den Bosch de Aguilar P. 1993. PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem* 41:455–463.
- Klosen P, Sebert ME, Rasri K, Laran-Chich MP, Simonneaux V. 2013. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J* 27:2677–2686.
- Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2410–2415.
- Kriegsfeld LJ, Gibson EM, Williams WP, Zhao S, Mason AO, Bentley GE, Tsutsui K. 2010. The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. *J Neuroendocrinol* 22:692–700.
- Lakhdar-Ghazal N, Vivien-Roels B, Pevet P. 1992. Seasonal variations in pineal 5-methoxytryptophol (5-ML) concentrations and in the daily pattern of pineal 5-ML and melatonin in the desert rodent *Jaculus orientalis*: Effect of prolonged illumination during the night. *J Pineal Res* 13: 28–35.
- Lakhdar-Ghazal N, Pévet P, Oukouchoud R. 1995. Seasonal variation in NPY immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert hibernator. *Neurosci Lett* 193:49–52.
- Leibowitz SF. 1991. Brain neuropeptide Y: An integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull* 27:333–337.
- Li C, Chen P, Smith MS. 1999. Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140:5382–5390.
- Lotter EC, Krinsky R, McKay JM, Treneer CM, Porter D, Woods SC. 1981. Somatostatin decreases food intake of rats and baboons. *J Comp Physiol Psychol* 95:278–287.
- Malan A. 2014. The evolution of mammalian hibernation: lessons from comparative acid-base physiology. *Integr Comp Biol* 54:484–496.
- Mason AO, Greives TJ, Scotti M-AL, Levine J, Frommeyer S, Ketterson ED, Demas GE, Kriegsfeld LJ. 2007. Suppression of kisspeptin expression and gonadotropin axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. *Horm Behav* 52:492–498.
- McDonald JK, Lumpkin MD, DePaolo LV. 1989. Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: Possible site of action. *Endocrinology* 125:186–191.
- McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW. 2000. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol* 279:R695–R703.
- Mercer JG, Moar KM, Ross AW, Hoggard N, Morgan PJ. 2000. Photoperiod regulates arcuate nucleus POMC, AGRP, and leptin receptor mRNA in Siberian hamster hypothalamus. *Am J Physiol* 278:R271–R281.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SJR. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1761–1766.
- Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2009. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* 30: 26–33.
- Molnár CS, Kalló I, Liposits Z, Hrabovszky E. 2011. Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 152:1684–1690.
- Morley JE. 1987. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocrine Rev* 8:256–287.
- Murphy B, Nunes CN, Ronan JJ, Harper CM, Beall MJ, Hanaway M, Fairhurst AM, Van Der Ploeg LHT, MacIntyre DE, Mellin TN. 1998. Melanocortin mediated inhibition of feeding behavior in rats. *Neuropeptides* 32:491–497.
- Paxinos G, Watson C. 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 5th ed. New York: Elsevier Academic Press.

- Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Romero M, Ruiz-Pino F, Aguilar E, Dijcks FA, Blumenröhr M, Pinilla L, van Noort PI, Tena-Sempere M. 2010. Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol* 299:E39–E46.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 92:1235–1316.
- Poling MC, Kim J, Dhamija S, Kauffman AS. 2012. Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 153:1827–1840.
- Quenell JH, Rizwan MZ, Relf H-L, Anderson GM. 2010. Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 22:309–316.
- Reiter RJ. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654–664.
- Reuss S, Olcese J. 1995. Neuropeptide Y: distribution of immunoreactivity and quantitative analysis in diencephalic structures and cerebral cortex of dwarf hamsters under different photoperiods. *Neuroendocrinology* 61:337–347.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2006a. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16:1730–1750.
- Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2006b. Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology* 147:4680–4687.
- Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149:902–912.
- Roberts AC, Martensz ND, Hastings MH, Herbert J. 1985. Changes in photoperiod alter the daily rhythms of pineal melatonin content and hypothalamic beta-endorphin content and the luteinizing hormone response to naloxone in the male Syrian hamster. *Endocrinology* 117:141–148.
- Rogers KV, Vician L, Steiner RA, Clifton DK. 1988. The effect of hypophysectomy and growth hormone administration on pre-prosomatostatin messenger ribonucleic acid in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinology* 122:586–591.
- Schneider JE. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81:289–317.
- Schulz C, Paulus K, Lobmann R, Dallman M, Lehnert H. 2010. Endogenous ACTH, not only alpha-melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *Am J Physiol* 298:E237–E244.
- Simonneaux V, Ancel C. 2012. RFRP neurons are critical gatekeepers for the photoperiodic control of reproduction. *Front Endocrinol* 3:1–9.
- Skinner DC, Herbison E. 1997. Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and beta-endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology* 138:2585–2595.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686–3692.
- Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN. 2008. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149:5770–5782.
- Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Monnikes H, Tache Y. 2010. Selective central activation of somatostatin receptor 2 increases food intake, grooming behavior and rectal temperature in rats. *J Physiol Pharmacol* 61:399–407.
- Stengel A, Karasawa H, Taché Y. 2015. The role of brain somatostatin receptor 2 in the regulation of feeding and drinking behavior. *Horm Behav* 73:15–22.
- Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16:850–858.
- Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K. 2012. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153:373–385.
- Vale W, Brazeau P, Grant G, Nussey A, Burgus R, Rivier J, Ling N, Guillemin R. 1972. Preliminary observations on the mechanism of action of somatostatin, a hypothalamic factor inhibiting the secretion of growth hormone. *C R Hebdomadaire Acad Sci* 275:2913–2916.
- Webb SM, Champney TH, Vaughan MK, Reiter RJ. 1985. Effect of long and short photoperiod and/or pinealectomy on immunoreactive somatostatin in the Syrian hamster. *Horm Metab Res* 17:107–108.
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa

Received: 25 July 2016

Accepted: 11 October 2016

Published: 02 November 2016

Rajae Talbi^{1,2}, Marie-Pierre Laran-Chich², Rabia Magoul¹, Seloua El Ouezzani^{1,*} & Valérie Simonneaux^{2,*}

Jerboas are wild rodents exhibiting exceptional adaptation to their desert environment. Under harsh autumn conditions, they shut down reproduction, increase body weight and hibernate, while during spring they become sexually active even under negative energy-balance. We recently reported that these rhythms are associated with synchronized changes in genes expressing reproductive (*Kiss1*, *Rfrp*) and metabolic (*Npy* and *Pomc*) peptides, raising the hypothesis of coordinated seasonal regulation of both functions. Here we analyzed whether kisspeptin and RFRP-3 regulate food-intake in parallel to their established reproductive functions. Intracerebroventricular administration of kisspeptin inhibited food intake by 1.5-fold in fasted, but not *ad-libitum* fed, female jerboas captured in spring, an effect associated with an increase in *Pomc* and decrease in *Rfrp* mRNA levels. By contrast, intracerebroventricular injection of RFRP-3 induced a 4-fold increase in food-intake in *ad-libitum* female jerboas, together with a decrease in *Pomc* and increase in *Npy* mRNA levels. This orexigenic effect of RFRP-3 was observed in both spring and autumn, whereas kisspeptin's anorexigenic effect was only observed in spring. Altogether, this study reports opposite metabolic effects of kisspeptin and RFRP-3 in the female jerboa and strengthens our hypothesis of a coordinated, season-dependent, regulation of reproductive activity and food intake through interactions of these hypothalamic peptides.

An increasing number of studies support that the regulation of reproduction is intimately linked to energy homeostasis, especially in wild species exposed to marked seasonal changes in environmental light, temperature and food availability. Major progress has been made recently in the understanding of central mechanisms governing reproductive activity with the finding that two hypothalamic peptides, kisspeptin (Kp) and RF amide-related peptide 3 (RFRP-3, also known as gonadotropin inhibitory hormone) regulate GnRH neuronal activity and gonadotropin secretion^{1,2}. In this study, we examine whether these two reproductive neuropeptides alter metabolism by investigating their effect on food intake and the metabolic neuropeptides proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) in a wild hibernating seasonal rodent captured from its natural biotope, the jerboa (*Jaculus orientalis*).

Kp and RFRP-3, expressed in neurons localized either in the arcuate (ARC) and anteroventral periventricular (AVPV) nuclei or the medial hypothalamus, respectively, are now recognized to play pivotal roles in the central control of reproduction. Since the milestone finding that mutations in the gene encoding the Kp receptor result in disruption of reproductive function in both humans and mice^{3,4}, this neuropeptide has been reported to potently activate GnRH release and the downstream pituitary-gonadal axis in a large number of mammals including rodents, sheep, primates and humans⁵⁻⁷. RFRP-3 was first shown to inhibit GnRH neuronal activity and gonadotropin secretion in mammals⁸⁻¹² until two recent studies reported that it can also activate the gonadotropic axis in male Syrian and Siberian hamsters^{13,14}. Notably, Kp and RFRP-3 content display marked photoperiodic variation

¹Laboratory of Neuroendocrinology and Nutritional and Climatic Environment, Faculty of Sciences, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, BP 1796-ATLAS, FES, Morocco. ²Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR CNRS 3212, Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. *These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.S. (email: simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr)

in seasonal species^{15–19} suggesting a pivotal role of both neuropeptides in the synchronization of reproductive activity with the seasons²⁰.

Furthermore, several studies indicate that both peptides may also alter food intake. RFRP-3 increases food intake in rodents, sheep and non-human primates^{21–24} while Kp displays an anorexigenic effect in overnight fasted mice²⁵. In line with these feeding behaviors, other studies indicate that both peptides may regulate POMC or NPY arcuate neurons. POMC is an anorexigenic precursor polypeptide that inhibits food intake, a process mainly mediated by α -MSH²⁶. NPY on the other hand displays a strong orexigenic effect²⁷. In sheep, Kp fibers are in close apposition to POMC and NPY neurons and Kp treatment decreases POMC and increases NPY gene expression²⁸, while in mice, Kp activates POMC and inhibits NPY neurons²⁹. On the other hand, RFRP-3 projects to NPY and POMC neurons in the ewe³⁰, attenuates the action of Kp on POMC neurons in mice²⁹ and increases NPY gene expression in the rat²³.

We recently reported a unique coordinated springtime activation of genes encoding peptides involved in reproduction (*Kiss1* and *Rfrp*) and metabolism (*Pomc* and *somatostatin*) in the wild jerboa³¹. The jerboa is a particularly interesting animal model living in a semi-desert milieu characterized by large annual variations in environmental temperature, water and food supply. In autumn/winter, when the natural conditions are unfavorable, jerboas shut down their reproductive activity^{32,33}, increase their food intake and body weight and hibernate^{34,35}, while in spring/summer when favorable conditions return, the animals display opposite regulations with a reactivation of reproduction and reduction in body weight and food intake^{32,33,35,36}.

Altogether, these observations suggest that the jerboa's reproduction and energy homeostasis may be strictly coordinated in order to ensure optimal synchronization between reproduction and offspring survival in a marked seasonal environment. Therefore, the aim of this study was to assess whether the reproductive neuropeptides Kp and RFRP-3 regulate food intake and metabolic neuropeptides, taking into account putative sex differences and seasonal effects.

Results

Effect of central injection of Kp10 on food intake and hypothalamic peptide gene expression in fasted female and male jerboa in spring or autumn.

Although a single dose of 4 μ g Kp10 was enough to increase by 5 fold the circulating testosterone in male jerboas (see material and methods section), the peptide displayed no effect on food intake when compared to control *ad-libitum* fed male and female jerboas (data not shown). Based on published data where Kp10 inhibited food intake in fasted mice²⁵, the effect of the peptide was next evaluated on 48 h fasted jerboas captured in spring or autumn. Kp10 strongly decreased food intake in fasted female jerboas captured in spring (Fig. 1A) with a significant reduction of food intake as early as 1 hour post-injection (-50% , $P < 0.05$ compared with vehicle treated animals). In the next 1 h to 5 h post-injection, food intake was inhibited but during the following nocturnal phase, equal values of cumulative food intake were observed 24 h after either peptide or vehicle injections, indicating a late compensatory increase of food intake in the Kp10-treated group. The same dose of Kp10 failed to alter food intake from 1 h up to 24 h post-injection in fasted sexually quiescent females captured in autumn (Fig. 1B). This experiment was repeated once the following year with similar results, confirming a seasonally-dependent anorexigenic effect of Kp10 on food intake in fasted female jerboas. In fasted male jerboas, captured in either spring or autumn, central administration of Kp10 had no significant effect on food intake from 1 h to 24 h post-injection (Fig. 2A,B).

To reveal central sites where Kp10 could act to regulate the female jerboa's food intake, the level of expression of genes encoding hypothalamic peptides involved in the regulation of food intake was measured 1 h30 post-injection (Fig. 1C). Kp10 injection displayed no effect on the ARC *Npy* mRNA expression in both spring and autumn ($P > 0.05$). On the other hand, Kp10 injection markedly increased the number of ARC *Pomc* expressing neurons 1 h30 after injection in females in both spring ($+57\%$, $P < 0.001$) and autumn ($+40\%$, $P < 0.01$). A two-way ANOVA analysis further revealed a significant season-dependent effect of Kp10 on the number of *Pomc* expressing neurons with a stronger effect in spring than in autumn ($F = 41.883$; $P < 0.001$). Furthermore, Kp10 injection induced a season-dependent effect on *Rfrp* gene expression with a decrease in the number of *Rfrp* mRNA expressing neurons at spring ($+34\%$ ($P < 0.01$)) and no significant effect in autumn ($P > 0.05$). Although female jerboas were fasted for 48 h, it is interesting to note that the number of *Pomc* and *Rfrp* expressing neurons was higher in spring than in autumn in vehicle-injected animals (Fig. 1C, $P < 0.05$ for *Pomc*, $P < 0.001$ for *Rfrp*). By contrast, the mean intensity of *Npy* mRNA labeling showed no seasonal variation.

In fasted male jerboas, central injection of Kp10 did not change the number of *Pomc* and *Rfrp* expressing neurons in both spring and autumn but moderately increased *Npy* mRNA expression in spring ($p < 0.05$) and had no effect in autumn (Fig. 2C). As in females, fasted male jerboas treated with vehicle or Kp10 displayed a higher number of *Pomc* expressing neurons in spring as compared to autumn ($F = 19.11$, $P < 0.01$). In contrast, the number of *Rfrp* neurons did not show seasonal variation in fasted control males.

Effect of central injection of RFRP-3 on food intake and hypothalamic peptide gene expression in ad libitum fed female jerboas at spring or autumn.

The effect of central RFRP-3 on food intake was analyzed in females, not male jerboas because only the females were responsive to Kp10 in term of food intake and *Rfrp* gene expression. A single central injection of 5 μ g RFRP-3 strongly increased food intake in *ad libitum* fed females in both spring and autumn (Fig. 3A,B). This orexigenic effect of RFRP-3 was strong and significant as early as 1 h post-injection ($+395\%$ and $+236\%$ for spring and autumn, respectively, in the RFRP-3 treated group as compared to vehicle; $P < 0.05$) and lasted up to 24 hours post-injection ($+25\%$, $P < 0.05$, and $+21\%$, $P < 0.01$, in RFRP-3 compared to vehicle treated animals in spring and autumn respectively). The two-way RM ANOVA revealed a significant effect of treatment ($P = 0.003$ for spring and $P = 0.002$ for autumn) and time ($P < 0.001$ for both seasons), with no dependence of treatment on time. This experiment was repeated once the following year and similar results were obtained, confirming the potent orexigenic effect of RFRP-3 in the female jerboa.

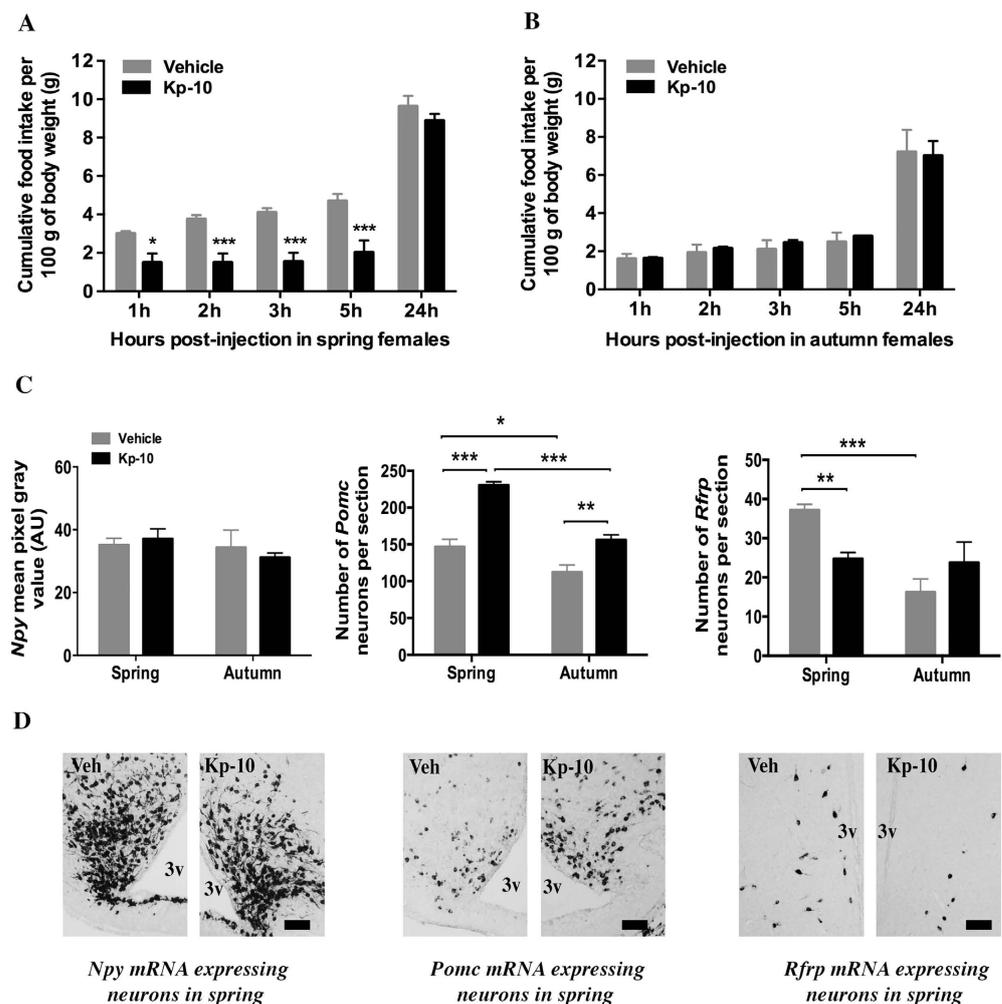


Figure 1. Effect of acute central injection of Kp10 on food intake and expression of genes encoding hypothalamic peptides NPY, POMC and RFRP-3 in 48 hours fasted female jerboas at spring and autumn. (A,B) Cumulative food intake (g food intake/100 g body weight) measured 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, and 24 h following icv injection of 4 μ g Kp10 or vehicle (0.9% NaCl) in 48 h-food deprived female jerboas captured in spring (A) or autumn (B). Statistical evaluation was performed using two-way repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test; data are expressed as mean \pm SEM (n = 4 per group). ***p < 0.001 and *p < 0.05 for significant differences between Kp10 and vehicle injected groups. (C) Semi-quantitative analysis of the labeling intensity of *Npy* mRNA in the arcuate nucleus (upper left panel), and quantitative measure of the number of neurons expressing *Pomc* mRNA in the arcuate nucleus (upper middle panel) and *Rfrp* mRNA in the dorso/ventro medial hypothalamus (upper right panel) 1h30 after 4 μ g Kp10 (black bars) or vehicle (grey bars) icv injections in spring and autumn female jerboas. Statistical evaluation was performed using two-way ANOVA followed by a post hoc Holm-Sidak test; data are presented as mean \pm SEM (n = 4 in the spring group; n = 3 in the autumn group). ***p < 0.001 and **p < 0.01 for significant differences between Kp10 and vehicle injected groups and ***p < 0.001 and *p < 0.01 for differences between spring and autumn groups. (D) Representative images of *Npy* mRNA labeling in the arcuate nucleus (lower left panel), *Pomc* mRNA labeling in the arcuate nucleus (lower middle panel) and *Rfrp* mRNA labeling in the DMH/VMH (lower right panel) of jerboas sacrificed in spring 1h30 after Kp10 or vehicle icv injections. Scale bars represent 100 μ m. AU: arbitrary units, 3v; third ventricle; Veh: vehicle.

To evaluate the hypothalamic sites of action of RFRP-3, the level of *Npy* and *Pomc* mRNA was measured 1h30 after the injection of peptide or vehicle in spring and autumn female jerboas (Fig. 3C,D). RFRP-3 induced a significant increase in mean ARC *Npy* labeling intensity (+30%, p < 0.01, Fig. 3C) and decrease in the number of ARC *Pomc* expressing neurons (-20%, p < 0.05, Fig. 3D) with no difference between spring and autumn. Notably, in agreement with the previous experiment, the number of *Pomc* expressing neurons is higher in spring as compared to autumn whether jerboas were treated with vehicle or peptide (F = 10.56, P < 0.05).

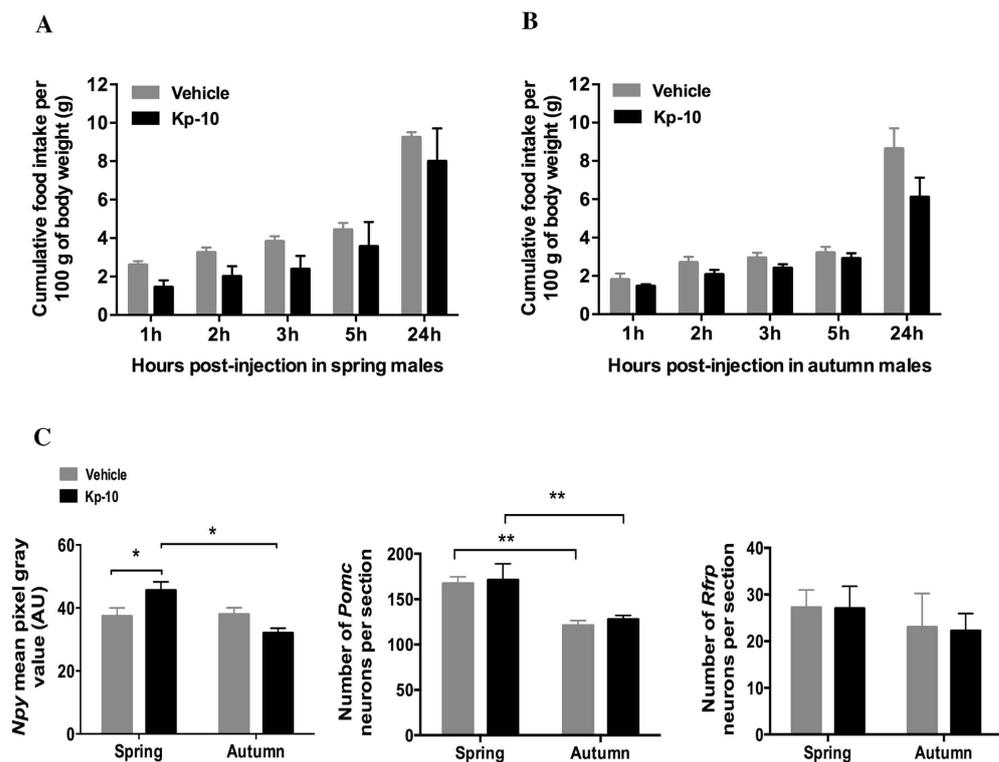


Figure 2. Effect of acute central injection of Kp10 on food intake and expression of genes encoding hypothalamic peptides NPY, POMC and RFRP-3, in 48 hours fasted male jerboas at spring and autumn. (A,B) Cumulative food intake (g food intake/100 g body weight) measured 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, and 24 h following icv injection of 4 μ g Kp10 or vehicle (NaCl 0.9%) in 48 h-food deprived male jerboas captured in spring (A) or autumn (B). Statistical evaluation was performed using two-way repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test; data are expressed as mean \pm SEM (n = 4 per group). No significant difference was observed between Kp10 and vehicle injected jerboas. (C) Semi-quantitative analysis of the labeling intensity of *Npy* mRNA in the arcuate nucleus (upper left panel), and quantitative measure of the number of neurons expressing *Pomc* mRNA in the arcuate nucleus (upper middle panel) and *Rfrp* mRNA in the dorso/ventro medial hypothalamus (upper right panel) 1h30 after 4 μ g Kp10 (black bars) or vehicle (grey bars) icv injections in spring and autumn female jerboas. Statistical evaluation was performed using two-way ANOVA followed by a post hoc Holm-Sidak test; data are presented as mean \pm SEM (n = 4 per group). *p < 0.05 for significant differences between Kp10 and vehicle injected group and **p < 0.01 for differences between spring and autumn groups. A.U: arbitrary unit.

Discussion

This study reports that in addition to regulating the reproductive activity, the hypothalamic RF-amide peptides, Kp and RFRP-3, exhibit differential metabolic effects in jerboas. RFRP-3 induces a strong season-independent orexigenic effect in *ad libitum* fed female jerboas while Kp displays a season-dependent anorexigenic effect in female jerboas under negative metabolic state. Furthermore, our data indicate that both peptides may exert their actions via a specific regulation of hypothalamic peptides known to regulate food intake, particularly POMC and NPY.

Recent evidence has pointed the sensitivity of the kisspeptinergic system to negative energy balance states as a decline in the hypothalamic *Kiss1* expression has been reported under conditions of metabolic stress or food restriction in rats and mice^{37–39}. Our data show that Kp10 also exerts a rapid and profound anorexigenic effect in female jerboas challenged with 48 h food deprivation. This anorexigenic effect of Kp10 however was observed only in females captured in spring, but not autumn, and was not found when jerboas were fed *ad-libitum*. Of note, when jerboas were food restricted for a shorter time (24 h), Kp10 was still unable to alter food intake (data not shown) probably because these wild semi-desertic rodents are resistant to food deprivation for up to 5 days⁴⁰. In line with these observations, earlier works have reported that Kp10 did not alter food intake in *ad libitum* fed or 12 h-fasted male rats^{5,37} or sheep²³ while a recent study showed that Kp10 reduced food intake in overnight fasted, but not *ad libitum* fed, mice²⁵. When Kp10 was injected in male jerboas, whether *ad libitum* fed or fasted, the food intake was similar to vehicle treated animals. Such a sexual dimorphism regarding Kp regulation of metabolism was recently reported in mice⁴¹. In this study, female KO for the Kp receptor encoding gene (*Kiss1r*) displayed higher body weight and circulating leptin, and impaired glucose tolerance along with lower food intake

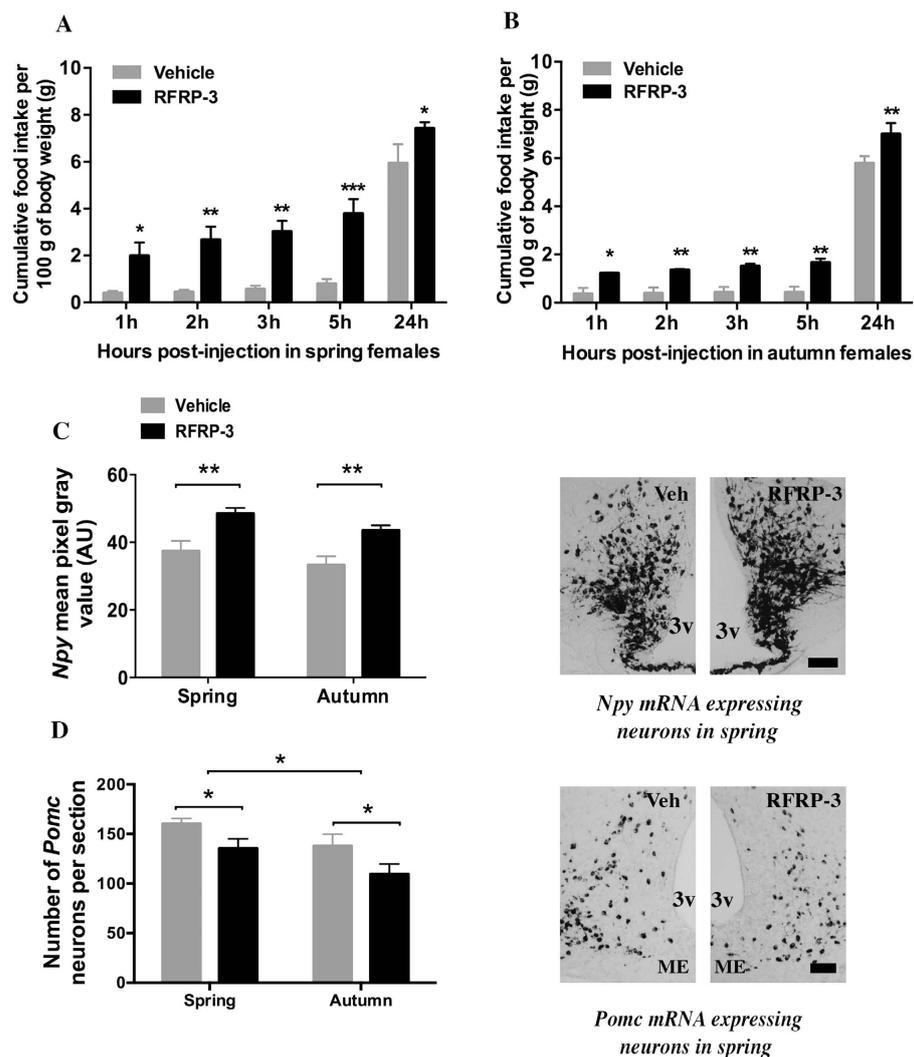


Figure 3. Effect of acute central injection of RFRP-3 on food intake and expression of genes encoding hypothalamic peptides NPY and POMC in ad-libitum fed female jerboas at spring and autumn. (A,B) Cumulative food intake (g food intake/100 g body weight) was measured 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, and 24 hours following icv injection of 5 μ g RFRP-3 or vehicle (0.9% NaCl) in ad-libitum fed female jerboas captured in spring (A) or autumn (B). Statistical evaluation was performed using two-way repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test; data are expressed as mean \pm SEM (n = 4 per group). ***p < 0.001, **p < 0.01 and *p < 0.05 for significant differences between RFRP-3 and vehicle injected groups; (C,D) Semi-quantitative analysis of the labeling intensity of *Npy* mRNA in the arcuate nucleus (C) and quantitative measure of the number of neurons expressing *Pomc* mRNA in the arcuate nucleus (D) 1h30 after 5 μ g RFRP-3 (black bars) or vehicle (grey bars) icv injections in spring and autumn female jerboas. Statistical evaluation was performed using two-way ANOVA followed by a post hoc Holm-Sidak test; data are presented as mean \pm SEM (n = 4 per group). **p < 0.01 and *p < 0.05 for significant differences between RFRP-3 and vehicle injected group. Representative images of *Npy* (C) and *Pomc* (D) mRNA labeling in the arcuate nucleus of female jerboas of spring sacrificed 1h30 after RFRP-3 or vehicle icv injections are shown. Scale bars represent 100 μ m. AU: arbitrary units; 3v, third ventricle; Veh, vehicle; ME, median eminence.

and energy expenditure, as compared to wild type littermates, while male *Kiss1r* KO mice preserved normal body weight and glucose regulation. Altogether these data support the idea that Kp is anorexigenic under negative energy balance, and in the jerboa this effect appears to be sex- and season-dependent.

In order to further investigate the hypothalamic sites underlying the anorexigenic effect of Kp10 in fasted jerboas, we measured the expression level of genes coding for peptides well known to regulate food intake, NPY and POMC, as well as RFRP-3 because this later peptide displays marked sex-⁴² and season-^{16,18,19,31,43} dependent variations in seasonal mammals, including the jerboa. In fasted females, central Kp increased *Pomc* mRNA, with a stronger effect in spring as compared to autumn, which is in agreement with the observed anorexigenic effect

of the Kp10 injection. Central Kp also decreased the number of *Rfrp* mRNA expressing neurons in spring, not in autumn. In fasted males, Kp did not alter *Pomc* and *Rfrp* mRNA levels in agreement with the lack of Kp effect on their food intake. Regarding *Npy* gene, Kp displayed a complex regulation with no effect in females and a season-dependent effect in males which might be related to complex sex steroid modulation of Kp action towards NPY neurons⁴⁴.

The anorexigenic effect of Kp observed in fasted spring female jerboas appears to result from an increase in *Pomc* gene expression combined with an inhibition of *Rfrp* gene expression. The Kp effect on jerboa's POMC neurons is supported by earlier studies reporting in mice that POMC neurons express Kiss1r²⁹, are contacted by Kp fibers²⁸ and that exogenous Kp activates POMC neurons via a mechanism based on a sodium/calcium exchanger activation and non-selective cation current²⁹. However, activation of POMC neurons alone is probably not sufficient to account for the anorexigenic effect of Kp because the increase in *Pomc* mRNA level after Kp injection is observed in both seasons whereas the decrease in food intake only occurs in spring. Remarkably, Kp exhibited a marked season-dependent effect on *Rfrp* mRNA, with an inhibition in spring and no effect in autumn. As far as we know, this is the first report of an inhibitory effect of central Kp on *Rfrp* mRNA, but it is still unclear whether this effect is direct or indirect. A recent study reported that RFRP neurons in male mice do not express Kiss1r and are devoid of Kp fiber projections⁴⁵. However, species or sex differences cannot be excluded since other studies showed that *Kiss1r* mRNA is expressed in the rat DMH⁴⁶ and Kp fiber projections are found in the DMH of female mice⁴⁷. Altogether our data indicate that in fasted female jerboas, central injection of Kp inhibits food intake in spring, but not in autumn, possibly resulting from an increase in *Pomc* gene expression combined with an inhibition of *Rfrp* gene expression.

The *Rfrp* gene encodes different RFRPs among which RFRP-3 regulates reproduction in various mammalian species (for review see refs 2,48). Here, we reveal that RFRP-3 exerts a potent orexigenic effect in the female jerboa as central injection of the peptide induced a marked increase in food intake as early as 1 h and up to 24 h post-injection, with no difference between spring and autumn. We also report that this robust orexigenic effect is associated with an increase in the mRNA level of the orexigenic *Npy* together with a concomitant decrease in the mRNA level of the anorexigenic *Pomc*. Our finding of an orexigenic role of RFRP-3 in the jerboa is in agreement with previous results obtained in rats, mice, sheep and non-human primates^{21–24}, but our data are the first to demonstrate that this metabolic effect might involve an increase in *Npy* and decrease in *Pomc* gene regulation. This finding is supported by earlier reports of the presence of the RFRP receptor and RFRP fiber terminals in the ARC of rodents^{8,42,49} with some studies showing that RFRP terminals are in close apposition to NPY^{30,50} and POMC³⁰ neurons. However, studies investigating the effect of RFRP-3/GnIH on POMC and NPY neuronal activity reported paradoxical results since the peptide increased FOS protein in both NPY and POMC neurons in the sheep²³, inhibited the firing rate of both POMC and NPY neurons in mice⁵⁰ and increased *Npy* but not *Pomc* gene expression in the rat²³ suggesting species-dependent hypothalamic targets of RFRP-3. In the female jerboa, our study demonstrates that RFRP-3 induces activation of NPY and inhibition of POMC neurons resulting in a robust orexigenic effect. Even though *Rfrp* expression is inhibited by short days in seasonal species, including the jerboa^{14,16,19,31}, and RFRP receptor expression is reduced in the ARC of short-day adapted hamsters⁴², we observed no difference in the effect of RFRP-3 on food intake in spring compared to autumn.

In conclusion, our study demonstrates a sexually dimorphic and season-dependent anorexigenic effect of Kp in jerboas under negative metabolic state possibly via a combined increase in *Pomc* and decrease in *Rfrp* gene expression. The differential effect of Kp on females' food intake may be related to their different sexual and energy status between both seasons. Indeed at spring, when coming out of hibernation, female jerboas are sexually active with reduced body weight³⁵ and express higher ARC Kp immunoreactivity¹⁸ as compared to autumn. It might be interesting to compare Kiss1r distribution and Kp neuronal connection to POMC and RFRP neurons between spring and autumn to help understand the seasonal differences in the metabolic action of Kp. The observation that Kp injection increases *Pomc* mRNA in females in both spring and autumn is in agreement with previous electrophysiological studies in mice which shows that POMC neurons are directly regulated by Kp²⁹. Furthermore, our findings that Kp inhibits *Rfrp* mRNA in spring, point to RFRP neurons as a target through which Kp transmits its season-dependent inhibition of food intake. Indeed, our data show a marked orexigenic effect of RFRP-3 via a combined increase in *Npy* and decrease in *Pomc* gene expression observed in both spring and autumn even in *ad libitum* fed female jerboas. Therefore, one might hypothesize that when female jerboas are submitted to strong reproductive and metabolic challenge in spring, Kp increases reproduction via the activation of GnRH neurons and reduces food intake by activating POMC and inhibiting RFRP neurons (Fig. 4).

It has been reported that Kp and RFRP-3 exhibit opposite stimulatory and inhibitory effects, respectively, on female rodent reproduction^{8,12,47,51,52} and whether this is also true in female jerboas should be investigated. Additionally, this study reveals that both peptides also display opposite anorexigenic, induced by Kp, and orexigenic, induced by RFRP-3, effects through the recruitment of different metabolic hypothalamic peptides. These findings strengthen our hypothesis that reproductive activity and food intake are coordinated in wild jerboas³¹, and here we provide a hypothalamic model including differential roles of Kp and RFRP-3 for the understanding of synchronized seasonal regulation of reproduction and energy balance.

Methods

Animals. Male and female sexually mature jerboas (*Jaculus orientalis*), weighing 100–160 g (n = 94) were captured from the Atlas Mountains of Morocco (altitude 1565 m) in spring (May) when they were sexually active, and autumn (October) when their reproductive activity was shut down. The captured animals were transported to the animal facility at the University of Fes where they were allowed to adapt to captivity for one week. Sexual maturity was estimated based on the morphological parameters of their sexual organs. After acclimatization, animals were put in individual cages under natural conditions of temperature and photoperiod with *ad libitum* access to food (vegetables, sunflower and barley seeds). At the University of Fes, where the experiments were performed,

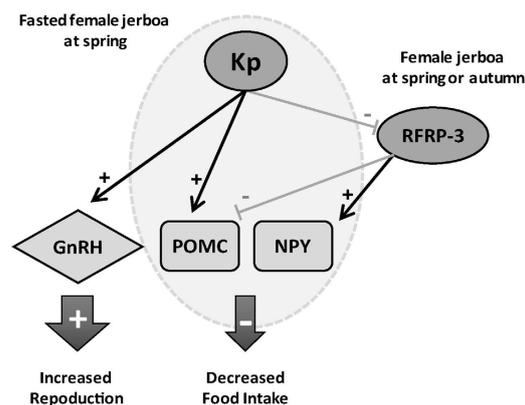


Figure 4. Working model showing a hypothalamic pathway used by kisspeptin and RFRP-3 to regulate food intake and reproduction in the female jerboa. In spring when female jerboas are under negative energetic balance, elevated level of kisspeptin (Kp) stimulates the reproductive axis by activating GnRH neurons and inhibits food intake via activation of POMC neurons and inhibition of RFRP-3 neurons, the latter exerting an increase in orexigenic *Npy* and a decrease in anorexigenic *Pomc*. Of note, the orexigenic effect of RFRP-3 is found independent of season.

experimental protocols do not require approval by an institutional and/or licensing committee. However, the experimental protocols had been approved by a French ethics committee for a previous study on a similar animal model, the Syrian hamster. Further, all experiments were conducted in accordance with the international guidelines for the Care and Use of Mammals in Neurosciences and Behavioral Research (2003).

Intracerebroventricular cannulation. Intracerebroventricular (icv) cannula implantation was performed according to a protocol previously established in rodents¹³. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of Imalgene 500 (ketamine 50 mg/ml) and Rompun (xylazine 20 mg/kg) and positioned in a stereotaxic frame. An incision was made in the scalp along the midline of the animal's head, and a hole was drilled through the skull over the implantation coordinates. Then a stainless steel 22-gauge cannula (Plastics One, Roanoke, VA, USA) was stereotaxically implanted in the lateral ventricle (stereotaxic coordinates were 2 mm lateral to the midline, 0.6 mm posterior to the Bregma and 3.5 mm inferior to the dura mater) and fixed to the skull by bone screws and dental cement. The cannula was sealed with a metallic wire protected with a plastic cap. After surgery, the animals were put back in their individual cages and checked for proper recovery for one week with free access to food before peptide injection.

Peptide administration. Mouse Kp10 (YNWNSFGLRY-NH₂, MW: 1300 g) was synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA) and Jerboa RFRP-3 (peptide sequence deduced from *Jaculus orientalis Rfrp* gene sequence³¹: ILSPINLPGRF-NH₂, MW: 1323 g) was synthesized by CASLO (CASLO Laboratory ApS, Lyngby, Denmark). Due to limitation in the number of jerboas captured in the wild, we could not perform a proper dose-response curve to test the peptide effects. Therefore, the doses of the peptide to be injected were first chosen according to the doses reported to be used in various rodent species, including ours done in Syrian hamster¹³. The dose chosen for Kp (4 µg in 5 µl 0.9% NaCl) was validated by measuring another biological parameter, the production of testosterone, well known to be increased by an efficient dose of Kp. For RFRP-3, we tested 2 doses (1.5 µg and 5 µg in 5 µl 0.9% NaCl) and only 5 µg/µl was sufficient to alter food intake. Injections were carried out in the early light phase (8 h–11 h). The animals were submitted to a light gaseous anesthesia, then 5 µl of peptide solution or vehicle (0.9% NaCl) were injected during 5 minutes using a 28-gauge stainless steel cannula attached to polyethylene tubing and a 5 µl Hamilton syringe (Hamilton Inc., Reno, NV). After recovery from anesthesia, each jerboa was placed in an individual cage and challenged for food intake or brain peptide gene expression.

Experimental designs. *Effect of central injection of Kp10 or RFRP-3 on food intake.* In a first set of experiments, central injection of 4 µg Kp10 was tested in *ad libitum* fed male and female jerboas and was found to display no effect on food intake (data not shown). This dose however induced an expected increase in testosterone production in spring male jerboas sacrificed 1h30 post-injection (from 1.78 ± 0.61 nmol/L, in 4 vehicle injected animals to 6.46 ± 1.35 nmol/L in 4 Kp10 injected animals, $p < 0.01$). As it has been reported that Kp10 alters food intake in fasted mice²⁵, male and female jerboas were fasted for 48 h before Kp10 or vehicle injections in either spring (May/June) or autumn (October/November) with 4 animals per experimental group ($n = 4$). In a second set of experiments, the effect of central injection of either 1.5 µg or 5 µg RFRP-3 or vehicle was tested on *ad libitum* fed female jerboas either in spring or autumn with 4 animals per experimental group, and only the group injected with 5 µg RFRP-3/µl showed an altered food intake.

In both experiments, jerboas were put back in their individual home cages with a preweighed amount of food immediately after icv injection. Food intake was thereafter measured 1 h, 2 h, 3 h, 5 h and 24 h post-injection.

Effect of central injection of Kp10 or RFRP-3 on hypothalamic peptide gene expression. To identify the putative central sites of Kp10 or RFRP-3 action for their metabolic effects, expression of genes encoding hypothalamic peptides involved in food intake and/or metabolic regulation was analyzed after the peptide injections. Kp10 (4 µg) or vehicle was injected in 48 h fasted male and female jerboas, in either spring or autumn (n = 4/group, except for the autumn female group with n = 3) and RFRP-3 (5 µg) or vehicle was injected in *ad libitum* fed female jerboas in either spring or autumn (n = 4/group). The central injections were performed as described above, except that 1h30 post-injection, animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of ethyl urethane (1 ml/100 g, Acros Organics) and were transcardially perfused with 50 ml isotonic saline solution (NaCl 0.9%) followed by 250 ml of a fixative solution containing 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.6. In male spring jerboas, blood was taken by cardiac puncture for further testosterone measurement. In order to avoid early mechanical stimulation of neuronal or glial cells when taking out skull bones, animal's skulls (devoid of skin, eyes, ears and neck) were first kept in 4% PAF for 1 h, then the brains were removed from the skull, post-fixed at 4 °C in the same fixative solution for 24 h, dehydrated in ethanol baths of increasing concentrations and stored in butanol until embedded in polyethylene glycol (PEG, Acros Organics) as described previously^{31,53}. Serial 12 µm microtome sections were cut throughout the hypothalamus using a Leica microtome, mounted on Superfrost[®] ultraplus slides under RNase free conditions and stored at -80 °C until processed for *in situ* hybridization.

In situ hybridization. Non-radioactive *in situ* hybridization for *Npy*, *Pomc* and *Rfrp* mRNA was performed according to a protocol previously validated³¹. Briefly, sense and antisense riboprobes containing a 87–522 rat *Npy* (Genbank NM_012614.2), a 157–731 rat *Pomc* (Genbank NM_139326), and a 614 bp *Jaculus orientalis Rfrp*, were transcribed from linearized plasmids in the presence of digoxigenin-labeled nucleotides according to the manufacturer's protocol (Dig RNA Labelling Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For each animal, one brain section every 144 µm was selected throughout the rostral, middle and caudal ARC for *Npy* and *Pomc*, and DMH/VMH for *Rfrp*. Sections of all peptide and vehicle treated spring and autumn animals were treated together under identical conditions. Brain sections were post-fixed in 4% PAF for 10 min, treated with 0.5 µg/ml proteinase K (Roche, Meylan, France) for 30 min at 37 °C, and acetylated twice in triethanolamine buffer for 10 min. Hybridization was performed for 40 hours at 60 °C with 200 ng/ml labeled antisense probes in 50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.1% Tween20 and 1 mg/ml salmon sperm DNA. Six stringency rinses were performed at 72 °C with 0.1X SSC and 0.05% Tween20 for 10 min each. Digoxigenin-labeled bound probes were detected with an alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin antibody (1/5000, Roche, Meylan, France). After detection, the slides were mounted using Crystal mount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and coverslipped with Eukitt (Sigma-Aldrich, Lyon, France).

Cell counting and semi-quantitative analysis. In a previous study³¹, we reported that quantification of RFRP, POMC and NPY encoding gene expression in the jerboa's hypothalamus gave similar seasonal variation when analyzing the number of labeled neurons or the intensity of labeling per neuron. Therefore for quantification of *Pomc* and *Rfrp* mRNA expression, labeled neurons were manually counted on a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems). For each animal, *Pomc* and *Rfrp* expressing neurons were counted on both sides of the ventricle throughout the rostro-caudal levels of ARC for *Pomc* and DMH/VMH for *Rfrp*. For each experimental condition, the value given is the number of labeled neurons per section ± SEM counted in the 4 animals/group. Due to the high density and close proximity of NPY neurons in the ARC, a semi-quantitative analysis of the *Npy* labeling intensity was performed as described previously³¹. Gray scale (256 levels) tiff images were taken at 10X magnification at 2776 × 2074 pixel using a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems) with an Olympus DP50 digital camera (Olympus France). For analysis of ARC *Npy* expression, three sections were taken to represent rostral, middle, and caudal regions of the ARC. For each animal, a rostral, middle and caudal ARC section was photographed on both sides of the ventricle and for each slide a background image without a brain section was measured and subtracted from the sample images. The labeled area of NPY neurons distribution was delineated and the mean pixel gray value of the *Npy* mRNA labeling was determined using Image J software (NIH Image, Bethesda MD, USA). For each animal, the 3 measured mean pixel gray values from the 3 sections were used to calculate the mean pixel gray value per animal. These individual values were then used to calculate the mean ± SEM intensity of *Npy* mRNA staining for each experimental condition (n = 4 for each group).

Statistical analysis. All data are given as mean ± SEM. Significance of peptide versus vehicle injection on food intake was analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test when appropriate. Difference in the level of neuropeptide gene expression between vehicle- and peptide-injected groups in the two seasons was analyzed using two-way ANOVA followed by post hoc Holm-Sidak test. The threshold for statistical significance was set at p < 0.05. All analyses were performed using SigmaPlot version 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) and all graphs were designed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

References

1. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P. & Tena-Sempere, M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **92**, 1235–1316 (2012).
2. Leon, S. & Tena-Sempere, M. Dissecting the Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Mammals: Studies Using Pharmacological Tools and Genetically Modified Mouse Models. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, 189 (2015).
3. de Roux, N. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10972–10976 (2003).
4. Seminara, S. B. *et al.* The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1614–1627 (2003).
5. Thompson, E. L. *et al.* Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J. Neuroendocrinol.* **16**, 850–858 (2004).

6. Dhillon, W. S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6609–6615 (2005).
7. Messenger, S. *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1761–1766 (2005).
8. Kriegsfeld, L. J. *et al.* Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2410–2415 (2006).
9. Clarke, I. J. *et al.* Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* **149**, 5811–5821 (2008).
10. Ducret, E., Anderson, G. M. & Herbison, A. E. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* **150**, 2799–2804 (2009).
11. Anderson, G. M., Relf, H.-L., Rizwan, M. Z. & Evans, J. J. Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology* **150**, 1834–1840 (2009).
12. Pineda, R. *et al.* Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: *in vivo* and *in vitro* studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E39–E46 (2010).
13. Ancel, C. *et al.* Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* **153**, 1352–1363 (2012).
14. Ubuka, T. *et al.* Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* **153**, 373–385 (2012).
15. Revel, F. G. *et al.* Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr. Biol.* **16**, 1730–1735 (2006).
16. Revel, F. G., Saboureau, M., Pévet, P., Simonneaux, V. & Mikkelsen, J. D. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* **149**, 902–912 (2008).
17. Smith, J. T. *et al.* Variation in Kisspeptin and RFamide-Related Peptide (RFRP) Expression and Terminal Connections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Brain: A Novel Medium for Seasonal Breeding in the Sheep. *Endocrinology* **149**, 5770–5782 (2008).
18. Janati, A. *et al.* Distribution and seasonal variation in hypothalamic RF-amide peptides in a semi-desert rodent, the jerboa. *J. Neuroendocr.* **25**, 402–411 (2013).
19. Saenz de Miera, C. *et al.* A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr Biol* **24**, 1500–1506 (2014).
20. Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V. J. & Gauer, F. Kisspeptins and RFRP-3 Act in Concert to Synchronize Rodent Reproduction with Seasons. *Front Neurosci* **7**, 22 (2013).
21. Johnson, M. A., Tsutsui, K. & Fraley, G. S. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav.* **51**, 171–180 (2007).
22. Murakami, M. *et al.* Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J. Endocrinol* **199**, 105–112 (2008).
23. Clarke, I. J. *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone is a hypothalamic peptide that provides a molecular switch between reproduction and feeding. *Neuroendocrinology* **95**, 305–316 (2012).
24. Anjum, S., Krishna, A. & Tsutsui, K. Possible Role of GnIH as a Mediator between Adiposity and Impaired Testicular Function. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **7**, 1–12 (2016).
25. Stengel, A., Wang, L., Goebel-Stengel, M. & Tache, Y. Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport* **22**, 253–257 (2011).
26. Brown, K. S., Gentry, R. M. & Rowland, N. E. Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. *Regul. Pept.* **78**, 89–94 (1998).
27. Wang, Q. *et al.* Interactions Between Leptin and Hypothalamic Neuropeptide Y Neurons in the Control of Food Intake and Energy Homeostasis in the Rat. *Diabetes* **46**, 335–341 (1997).
28. Backholer, K. *et al.* Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* **151**, 2233–2243 (2010).
29. Fu, L.-Y. & van den Pol, A. N. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J. Neurosci.* **30**, 10205–10219 (2010).
30. Qi, Y., Oldfield, B. J. & Clarke, I. J. Projections of RFamide-related peptide-3 neurons in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J. Neuroendocrinol.* **21**, 690–697 (2009).
31. Talbi, R., Klosen, P., Laran-Chich, M.-P., El Ouezzani, S. & Simonneaux, V. Coordinated seasonal regulation of metabolic and reproductive hypothalamic peptides in the desert jerboa. *J. Comp. Neurol.* **524**, 3717–3728 (2016).
32. El Ouezzani, S., Tramu, G. & Magoul, R. The Gonadotropin-Releasing Hormone Neurosecretory System of the Jerboa (*Jaculus orientalis*) and its Seasonal Variations. *J. Neuroendocrinol.* **12**, 1205–1212 (2000).
33. El Qandil, S. *et al.* Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull.* **64**, 371–380 (2004).
34. Andjus, R. K., El Hilali, M., Veillat, J. P. & Baddouri, K. Tolerance of one species of jerboa (*Jaculus orientalis*) to prolonged exposure to deep hypothermia. *J. Physiol. (Paris)* **68**, 531–542 (1974).
35. El Ouezzani, S., Janati, I. A., Magoul, R., Pévet, P. & Saboureau, M. Overwinter body temperature patterns in captive jerboas (*Jaculus orientalis*): influence of sex and group. *J. Comp. Physiol. B* **181**, 299–309 (2011).
36. Ghobrial, L. I. & Hodiab, A. S. Climate and seasonal variations in the breeding of the desert jerboa, *Jaculus jaculus*, in the Sudan. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **19**, 221–233 (1973).
37. Castellano, J. M. *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146**, 3917–3925 (2005).
38. Brown, R. E., Imran, S. a., Ur, E. & Wilkinson, M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol. Cell. Endocrinol.* **281**, 64–72 (2008).
39. Luque, R. M., Kineman, R. D. & Tena-Sempere, M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* **148**, 4601–4611 (2007).
40. El Ouezzani, S., Tramu, G., Magoul, R. & Lafon, P. Neuropeptide Y gene expression in the jerboa arcuate nucleus: modulation by food deprivation and relationship with hibernation. *Neurosci Lett.* **305**, 127–130 (2001).
41. Tolson, K. P. *et al.* Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *J. Clin. Invest.* **124**, 3075–3079 (2014).
42. Henningsen, J. B. *et al.* Sex differences in the photoperiodic regulation of RF-amide related peptide (RFRP) and its receptor GPR147 in the Syrian hamster. *J. Comp. Neurol.* **524**, 1825–1838 (2015).
43. Dardente, H., Birnie, M., Lincoln, G. A. & Hazlerigg, D. G. RFamide-Related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 1252–1259 (2008).
44. Urban, J., Bauer-Dantoin, A. & Levine, J. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology* **132**, 139–145 (1993).
45. Poling, M. C., Quennell, J. H. & Greg, M. Anderson and A. S. K. Kisspeptin neurons do not directly signal to RFRP-3 neurons but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. *J. Neuroendocr.* **15**, 1203–1214 (2013).

46. Lee, Y. R. *et al.* Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* **150**, 2837–2846 (2009).
47. Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W. H., Caraty, A. & Herbison, A. E. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J. Neuroendocrinol.* **21**, 673–682 (2009).
48. Henningsen, J. B., Gauer, F. & Simonneaux, V. RFRP neurons - the doorway to understanding seasonal reproduction in mammals. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 1–10 (2016).
49. Gouardères, C. *et al.* Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [125I]YVP and [125I]EYF as selective radioligands. *Neuroscience* **115**, 349–361 (2002).
50. Jacobi, J. S. *et al.* Paradoxical Effect of Gonadotrophin-Inhibiting Hormone to Negatively Regulate Neuropeptide Y Neurones in Mouse Arcuate Nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **25**, 1308–1317 (2013).
51. Roa, J. *et al.* Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology* **147**, 2864–2878 (2006).
52. Smith, J. T., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* **131**, 623–630 (2006).
53. Klosien, P., Maessen, X. & van den Bosch de Aguilar, P. PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 455–463 (1993).

Acknowledgements

Authors thank Béatrice Bothorel for her help with statistical analysis, Paul Klosien for scientific and technical assistance and advices, and Matthew Beymer for English correction of the manuscript. This work was supported by the PICS (CNRST-Maroc / CNRS-France), Volubilis # 5631 and the French-Moroccan GDRI Neurosciences and Neuromed and ANR Repramide; Grant number: 13-BSV1-0001.

Author Contributions

R.T., V.S. and S.E.O. designed research; R.T. performed animal experiments; R.T. and M.-P.L.-C. performed the gene expression experiments; R.T. analyzed data and made figures; R.T., V.S. and S.E.O. discussed the data and wrote the manuscript; R.T., V.S., S.E.O. and R.M reviewed the manuscript; S.E.O. and V.S. supervised this study.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Talbi, R. *et al.* Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa. *Sci. Rep.* **6**, 36057; doi: 10.1038/srep36057 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Distribution and Seasonal Variation in Hypothalamic RF-amide Peptides in a Semi-Desert Rodent, the Jerboa

A. Janati*, R. Talbi*, P. Klosen†, J. D. Mikkelsen‡, R. Magoul*, V. Simonneaux† and S. EL Ouezzani*

*Laboratory of Neuroendocrinology and Nutritional and Climatic Environment, Faculty of Sciences, ATLAS-FES, Morocco.

†Department of Neurobiology of Rhythms, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 and University of Strasbourg, Strasbourg, France.

‡Neurobiology Research Unit, Copenhagen University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

Journal of Neuroendocrinology

The jerboa is a semi-desert rodent, in which reproductive activity depends on the seasons, being sexually active in the spring–summer. The present study aimed to determine whether the expression of two RF-amide peptides recently described to regulate gonadotrophin-releasing hormone neurone activity, kisspeptin (Kp) and RF-amide-related peptide (RFRP)-3, displays seasonal variation in jerboa. Kp and/or RFRP-3 immunoreactivity was investigated in the hypothalamus of jerboas captured in the field of the Middle Atlas mountain (Morocco), either in the spring or autumn. As in other rodents, the Kp-immunoreactive (-IR) neurones were found in the anteroventro-periventricular and arcuate nuclei. RFRP-3 neurones were noted within the dorso/ventromedial hypothalamus. A marked sexual dimorphism in the expression of Kp (but not RFRP-3) was observed. The number of Kp-IR neurones was nine-fold higher, and the density of Kp-IR fibres and terminal-like elements in the median eminence was two-fold higher in females than in males. Furthermore, a significant seasonal variation in peptide expression was obtained with an increase in both Kp- and RFRP-3-IR cell bodies in sexually active male jerboas captured in the spring compared to sexually inactive autumn animals. In the arcuate nucleus, the level of Kp-IR cells and fibres was significant higher during the sexually active period in the spring than during the autumnal sexual quiescence. Similarly, the number of RFRP-3-IR neurones in the ventro/dorsomedial hypothalamus was approximately three-fold higher in sexually active jerboa captured in the spring compared to sexually inactive autumn animals. Altogether, the present study reports the distribution of Kp and RFRP-3 neurones in the hypothalamus of a desert species and reveals a seasonal difference in their expression that correlates with sexual activity. These findings suggest that these two RF-amide peptides may act in concert to synchronise the gonadotrophic activity of jerboas with the seasons.

Correspondence to:

EL Ouezzani Seloua, Laboratory of Neuroendocrinology and Nutritional and Climatic Environment, Faculty of Sciences, BP 1796, ATLAS-FES, Morocco (e-mail: elouezzani@yahoo.com).

Key words: kisspeptin, RFRP-3, season, reproduction, jerboa (*Jaculus orientalis*)

doi: 10.1111/jne.12015

The understanding of the neuroendocrine mechanisms involved in the control of reproductive function increased dramatically with the discovery that hypothalamic neuropeptides belonging to the same family of RF(Arg-Phe)-amides, kisspeptin (Kp) and RF-amide-related peptides (RFRP-1 and RFRP-3), regulate gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurone activity and gonadotrophin secretion in mammals (1–4).

Kp plays an important role in the development and regulation of the reproductive system in a large number of mammals. In rodents, Kp neurones are found in two discrete locations, the anteroventral periventricular (AVPV) and arcuate (ARC) nuclei. Several studies have suggested that Kp acts directly on GnRH

neurones to stimulate the release of GnRH. Indeed, a majority of GnRH neurones express Kiss1R, the Kp receptor, and Kp activates GnRH neurones in slices (5). However, Kp may also regulate GnRH activity via intermediate neurones (6), or at the GnRH nerve endings within the median eminence (7). Central or peripheral Kp activation of GnRH neurones lead to a potent increase in gonadotrophin secretion (8).

In mammals, a *rfrp* gene homologous to the avian gonadotrophin-inhibiting hormone (*GnIH*) has been identified and reported to code for two peptides RFRP1 and RFRP-3 (9). In the brain, the *rfrp* gene is exclusively expressed in neurones scattered within the dorsomedial and ventromedial areas of the hypothalamus

(DMH/VMH). RFRP-3-immunoreactive (-IR) fibres have been reported close to the GnRH neurones in the rat and in sheep (10,11), as well as in the outer zone of the median eminence in sheep (12). Although initial studies indicated an inhibitory effect of RFRP-3 on gonadotrophin secretion (10,12–14), more recent studies indicate that the peptide may also have a stimulatory effect on the gonadotrophic axis under certain conditions (15,16). These observations raised questions on possible species- and sex- dependent differences with respect to the role of the RFRP-3 in the regulation of reproductive function.

Photoperiodic variations in the expression level of these peptides were observed in seasonal breeders, the Syrian and Siberian hamsters and the sheep. In the sheep and Syrian hamster, higher levels of the ARC Kp expression and a larger number of contacts between the Kp terminals and GnRH neurones have been measured during the breeding season (long photoperiod in hamsters and short photoperiod in sheep) (11,17). By contrast, in the Siberian hamster, ARC Kp expression is higher in short day compared to long day conditions (18), although both Syrian and Siberian hamsters have their reproductive axis inhibited under short day conditions. The reason why Kp expression in the ARC is differently regulated between the two hamster species is unclear. It has been suggested that the putative central sites for melatonin effect on seasonal reproduction are different between the two species: the dorsomedial hypothalamus in the Syrian hamster and the suprachiasmatic nuclei in the Siberian hamster (19,20). RFRP-3 expression is markedly lower in short photoperiod both in Syrian and Siberian hamsters and sheep. In the Syrian hamster, the down-regulation of RFRP-3 expression is driven by melatonin and the peptide stimulates GnRH neurones and gonadotrophin secretion (15). Taken together, these findings indicate that both RF-amide peptides act in concert to regulate GnRH neurone activity across the seasons, leading to the annual change in fertility.

In addition to photoperiod and melatonin, Kp and RFRP-3 may be regulated by several other factors, including nutritional status and sex steroids levels (11,13). Previous hamster and sheep studies have been performed in animal facilities where only photoperiod was changed, with temperature and food quality being kept constant. However, a more complex central control of reproductive activity probably occurs in mammalian species living in the wild.

The jerboa (*Jaculus orientalis*) is a rodent adapted to the semi-desert environment of Morocco that displays a strong seasonal physiology. To survive harsh winter conditions, it hibernates (21) and reproductive activity is inhibited in the autumn and activated in the spring–early summer. Previous studies have demonstrated seasonal variations in the level of GnRH immunoreactivity and the expression of neuropeptides such as β -endorphin and neuropeptide Y, which regulate gonadotrophic activity (22–25). In the present study, we investigated whether Kp and RFRP-3 expression displays seasonal variation in the hypothalamus of jerboas taken from their natural environment aiming to assess the involvement of these neuropeptides in the regulation of the seasonal cycle of reproduction in a desert species.

Materials and methods

Animals

Male and female jerboas (*J. orientalis*) were captured in the desert high plateau (altitude 1565 m) of the Ifkern-Boulemane region in Morocco, during two seasons (spring and autumn) that characterise the reproductive cycle of the jerboa. The jerboas were transferred to the University of Fes and maintained in rooms of the animal facility with open windows under natural conditions of temperature and photoperiod. The animals were fed *ad lib.* on barley grain for an adaptation period of 1 week. In each season of the two successive years, three males and three females were killed between 10.00 and 13.00 h. During the spring, some females were pregnant and aggressive. The vaginal smear tests of females sacrificed in early spring were in pro-oestrus or oestrus, whereas those killed during the inactive period were in anoestrus (di- or meta-oestrus). Because of susceptible changes in the oestrous cycle of female jerboas, only male jerboas were considered to analysis the seasonal variation. Animal manipulations were performed in accordance with the recommendations of the local ethic committee, the approval of which is in accordance with international guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (2003).

Immunocytochemistry

Animals were anaesthetised with an i.p. injection of sodium pentobarbital (35 mg/kg) and perfused intracardially first with 50 ml of saline solution followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PAF; pH 7.6). The animal's head was kept in the 8% PAF for 1 h, then the brain was removed, post-fixed for 24 h in the same fixative, dehydrated in ethanol and included first in polyethylene glycol (PEG) 1000 and finally in PEG 1000/PEG 1500 mix (26). Brain coronal sections (20 μ m thick) were performed throughout the hypothalamus using a microtome. One of the five sets of sections from each animal was used for immunocytochemistry. Two series were considered both for Kp and RFRP-3. For each peptide, series were processed together to standardise the experimental conditions.

Brain slices were incubated overnight at 4 °C with the primary polyclonal rabbit anti-Kp (code JLV1 at a dilution of 1 : 2000) (27) or with the primary polyclonal rabbit anti-RFRP-3 (code GA197; dilution 1 : 2000) (28) diluted in phosphate-buffered saline containing 0.2% Triton-100; incubated for 2 h at room temperature with a biotinylated goat anti-rabbit antiserum (dilution 1 : 400; Vector Laboratories, Paris, France) and then processed in accordance with the avidin-biotin immunohistochemical procedure as described previously (23,25). Finally, brain sections were mounted on gelatine-coated slides, air-dried, dehydrated in graded alcohol and mounted. Labelled sections were examined and photomicrographs were taken with a Nikon Microphot-FX microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Quantitative analysis of kisspeptin or RFRP-3 immunoreactivity

The number of Kp or RFRP-3-IR cells was counted manually in each section of the jerboa hypothalamus by an experimenter who was blind to the experimental groups. The results are expressed as the mean number of Kp-neurones counted on four sections of AVPV per animal or as the mean number of RFRP-3 neurones counted on four sections through the DMH/VMH. Kisspeptin neurones within the ARC were hidden by the high density of immunoreactive fibres, which made counting difficult.

The density of Kp-IR nerve fibres was measured by the optical density (OD) using IMAGEJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) in each treated section throughout the rostrocaudal extent of the ARC and the median eminence. For each animal, measurements were performed on eight different slides throughout four hypothalamic zones. To calculate the OD in a given

structure, the background OD measured in hypothalamus area devoid of Kp fibres was subtracted, and the OD value was expressed in arbitrary units relative to grey levels. The data obtained from each section of each hypothalamus were pooled to represent different groups and a mean value was calculated for each animal.

The distribution of the regions examined was determined with reference to the rat brain in stereotaxic coordinates taking into account the differences between rat and jerboa brains (23,25).

Testosterone assay and gonad measurement

The reproductive status of the male jerboa was verified by testis weight and by a testosterone assay in the blood samples collected by intracardiac puncture. Plasma samples for testosterone were stored at -20°C before testosterone analysis. Serum testosterone levels were measured by radioimmunoassay performed at the Centre of Radioisotopes and Nuclear Medicine (Fes, Morocco) using a TESTO-CT2 Kit supplied by Cis Bio International (Gif-sur-Yvette, France).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. Data were analysed using Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Distribution and sexual dimorphism of kisspeptin immunoreactivity in the jerboa hypothalamus

Kp-IR elements were observed in the preoptic area and ARC of both male and female jerboas. In sexually active males sacrificed in the spring (Fig. 1). Kp-IR varicose fibres and terminals were observed in the AVPV (Fig. 1A) and at a high density throughout the rostrocaudal ARC (Fig. 1b–d). Some cell bodies were observed, notably in the posterior ARC. In addition, discrete Kp-IR fibres were also observed

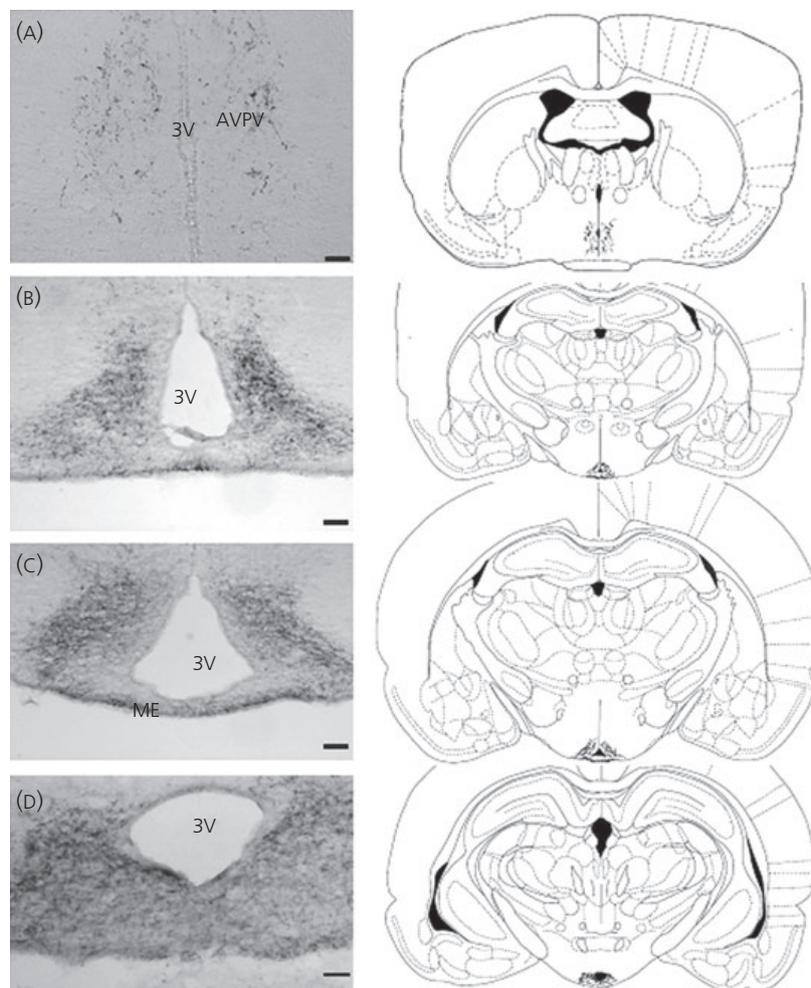


Fig. 1. Distribution of kisspeptin immunoreactivity in the male jerboa hypothalamus. Representative photomicrographs (left) and schematic frontal sections (right) depict the neuroanatomical distribution of kisspeptin neurones in the hypothalamus of sexually active male jerboa. Kisspeptin immunoreactive varicose fibres and terminals are mainly observed in the anteroventral periventricular nucleus (A; AVPV), the anterior (B), medial (C) and posterior (D) arcuate nucleus. The neuroanatomical identification of the hypothalamic structures is based on the atlas of the rat brain of Paxinos and Watson (29), taking into account the differences between rat and jerboa brains. 3V, third ventricle. Scale bars = $50\ \mu\text{m}$.

in the external and internal zones of the median eminence. Although the overall distribution of Kp-IR appeared to be similar between males and females, the number of Kp-IR cell body in the AVPV was markedly greater in female (Fig. 2A) compared to male (Fig. 2E) jerboas captured at the same time of the year (early spring). In addition, a dense horizontal path of Kp-IR fibres was observed in the median eminence of female jerboas (Fig. 2B),

whereas few fibres were noted in males (Fig. 2F). Kp-IR fibres were also localised in the internal zone of median eminence (Fig. 2C) and, more caudally, a dense plexus of Kp-IR was observed around the pituitary stalk in females (Fig. 2D). Quantification of the Kp cell bodies (Fig. 3A) and fibres (Fig. 3B) revealed significant sexual differences. The number of Kp cells was nine-fold higher in females compared to males, and the density of Kp-IR in fibres and

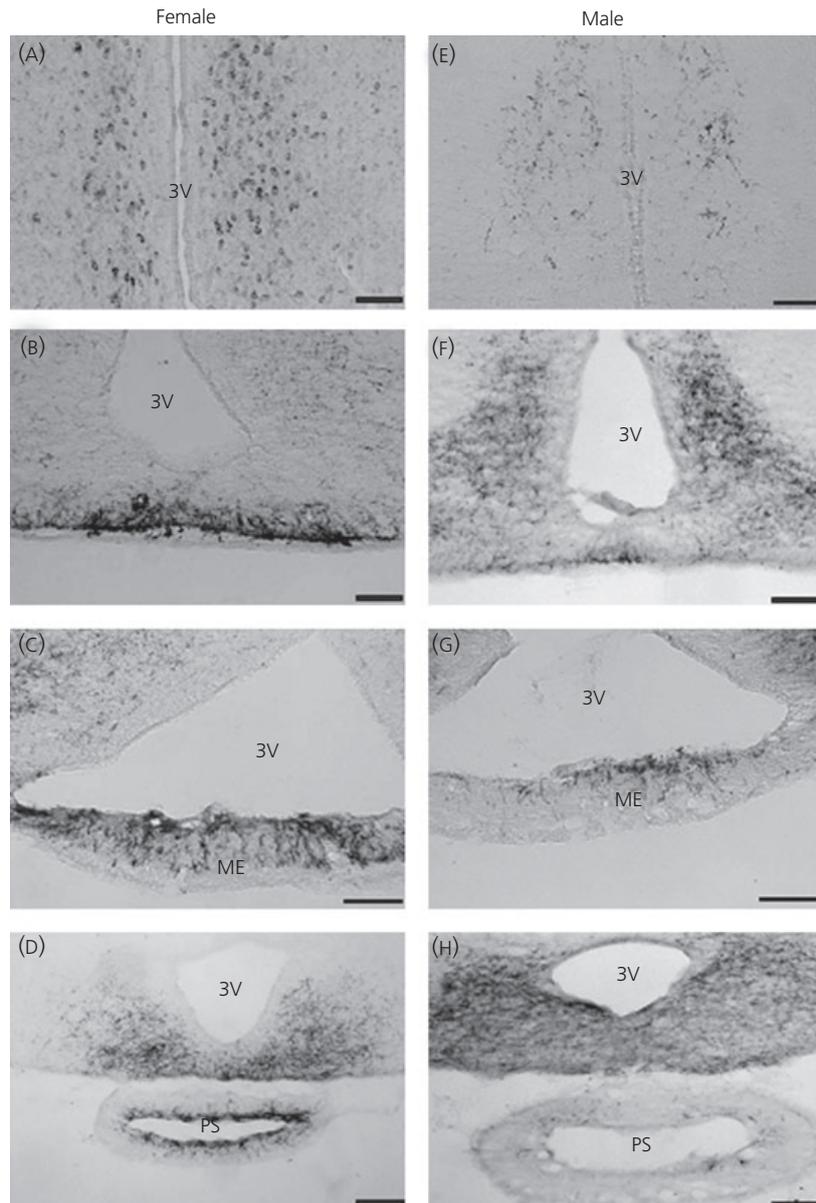


Fig. 2. Sexual dimorphism in kisspeptin immunoreactivity in the jerboa hypothalamus. Representative photomicrographs depict the neuroanatomical distribution of kisspeptin neurones in the hypothalamus of female (A–D) and male (E–H) jerboas. The number of kisspeptin-immunopositive cell bodies is higher in the female (A) than the male (E) anteroventral periventricular nucleus (AVPV). A denser plexus of kisspeptin-immunopositive fibres is observed ventrally to the arcuate nucleus in the female (B) compared to male (F) jerboa captured in the early spring. The density of kisspeptin fibres is higher in the female median eminence (ME) (C) and around the pituitary stalk (PS) (D) compared to male (G, H) jerboas. Scale bars = 50 μm . 3V, third ventricle.

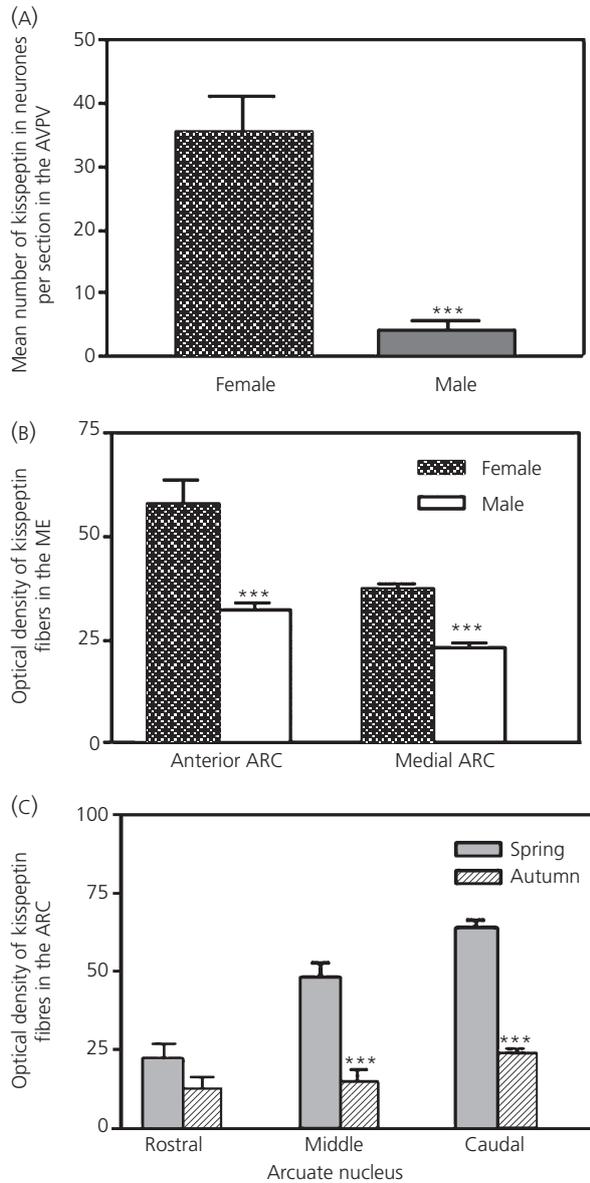


Fig. 3. Quantification of kisspeptin immunoreactivity in the hypothalamus of jerboas. The number of kisspeptin cell bodies in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) is significantly higher in females compared to males (A). The relative optical density (OD) of kisspeptin-immunoreactive fibres in the median eminence (ME) at two levels of the arcuate nucleus (ARC) is higher in females compared to males (B). Quantification of kisspeptin immunoreactivity measured throughout the rostrocaudal parts of the arcuate nucleus of male jerboas captured in the spring or autumn (C). The relative OD of kisspeptin immunoreactive fibres is significantly higher in the middle and caudal ARC of sexually active jerboas examined in the spring. Values are the mean \pm SEM of six animals. *** $P < 0,001$.

terminal-like elements in the median eminence was also significantly ($P < 0,001$) higher in females than in males. By contrast, although fibre density appeared to be higher in males than in

females in the ARC, quantification did not reveal significant differences between male and female jerboas.

Seasonal variation in Kp-IR in the hypothalamus of male jerboas

Male jerboas captured in the spring were sexually active compared to those captured in the autumn, as assessed by levels of circulating testosterone (Fig. 4A) and testis size (Fig. 4B).

Seasonal changes in the profile of Kp-IR were observed in the ARC of male jerboas (Fig. 5). Notably, the density of Kp-IR was significantly higher in the middle and caudal ARC of sexually active jerboas captured in the spring compared to sexually inactive jerboas captured in the autumn (Fig. 3C). The few cells that were observed in the ARC during the spring season disappeared later in the autumn.

Distribution and seasonal variation of RFRP-3 immunoreactivity in the hypothalamus of jerboas

In sexually active animals, RFRP-3-IR cell bodies were found in the periventricular nucleus (Fig. 6A) and between the VMH and DMH extending laterally to the lateral hypothalamic area (Fig. 6B). The

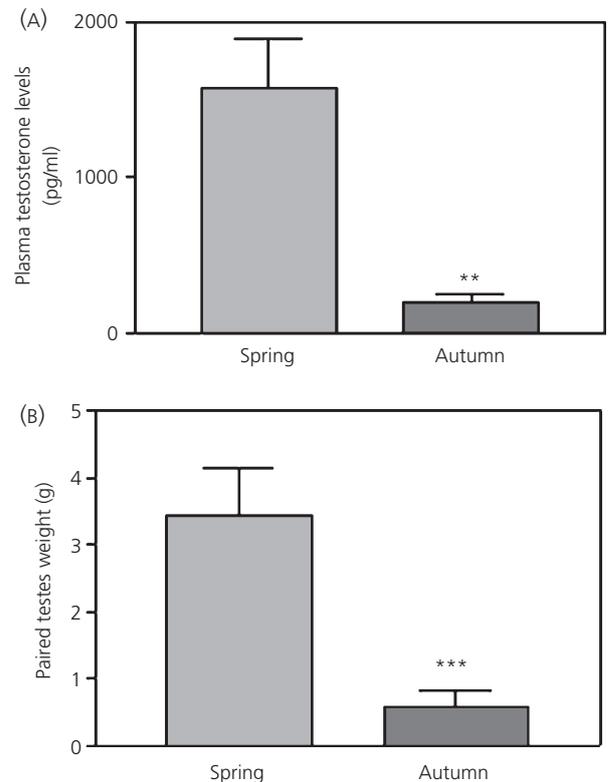


Fig. 4. Reproductive status of adult male jerboas captured in the spring or autumn. Plasma testosterone measured by radioimmunoassay (A) and testicular weight (B) are significantly higher in the spring compared to autumn. Values are the mean \pm SEM of six animals. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

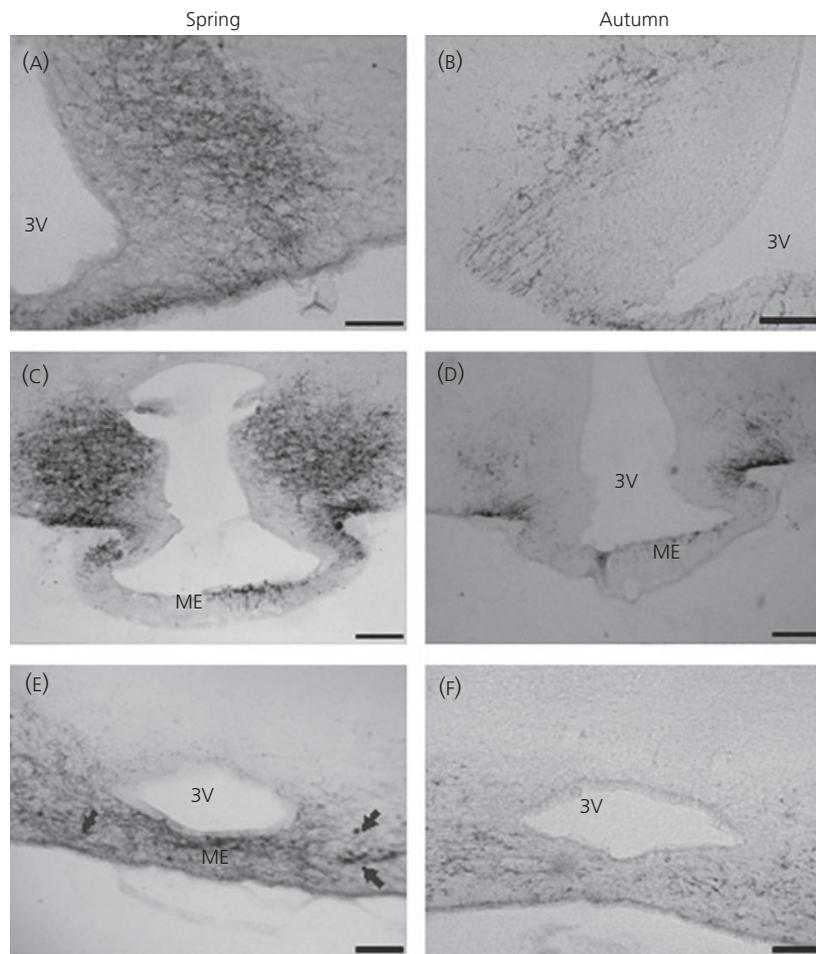


Fig. 5. Kisspeptin immunoreactivity in the arcuate nucleus of male jerboas captured in the spring or autumn. Representative photomicrographs show a higher density of kisspeptin immunoreactivity throughout the arcuate nucleus of jerboas examined in the spring (left) compared to autumn (right). 3V, third ventricle; ME, median eminence. Scale bars = 50 μm .

cell bodies were mainly concentrated within the DMH (Fig. 6c). In jerboas killed during the autumn, the density of RFRP-3-IR cell bodies was markedly diminished in the DMH (Fig. 6d). The number of RFRP-3 IR cells was three-fold higher in the spring than in the autumn, and no significant sex difference was reported (Fig. 6). No IR-fibres could be observed with this antibody raised against the peptide precursor (28).

Discussion

The present study reports that Kp and RFRP-3, two RF-amides peptides involved in the control of reproductive activity, are contained in the hypothalamus of a desert rodent, the jerboa. Kp-IR neurones are present in the AVPV and ARC, whereas RFRP-IR cells are distributed between the VMH and DMH. A marked sexual dimorphism in the expression of Kp (but not RFRP-3) is observed, with a higher level of Kp-IR in females, notably within the AVPV and median eminence. Furthermore, a significant seasonal variation in peptide

expression is measured, with an increase in both Kp-IR and RFRP-3-IR in sexually active male jerboas captured in the spring compared to sexually inactive autumn animals.

Kp-IR fibres are observed in the external zone of the median eminence, and this was particularly striking at the mid-tuberal level. The occurrence of these fibres in the external zone of the median eminence and around blood vessels, notably in the female jerboas, suggests that Kp could be released into the capillaries of the pituitary portal plexus and may have local effects on terminal contacts to GnRH neurones or as a hypophysiotrophic factor. In the female mouse, Kp-IR fibres were found in the ARC and the internal (but not external) zone of the median eminence, indicating that, in this species, Kp is not likely to be secreted into the hypophysial portal vasculature as a hypophysiotrophic hormone (30). In the sheep, Kp-IR fibres were described in the external zone of the median eminence (31), raising the possibility that Kp may be released into the portal circulation to regulate pituitary hormone secretion. Although Kiss1R was found expressed in pituitary and Kp was reported to

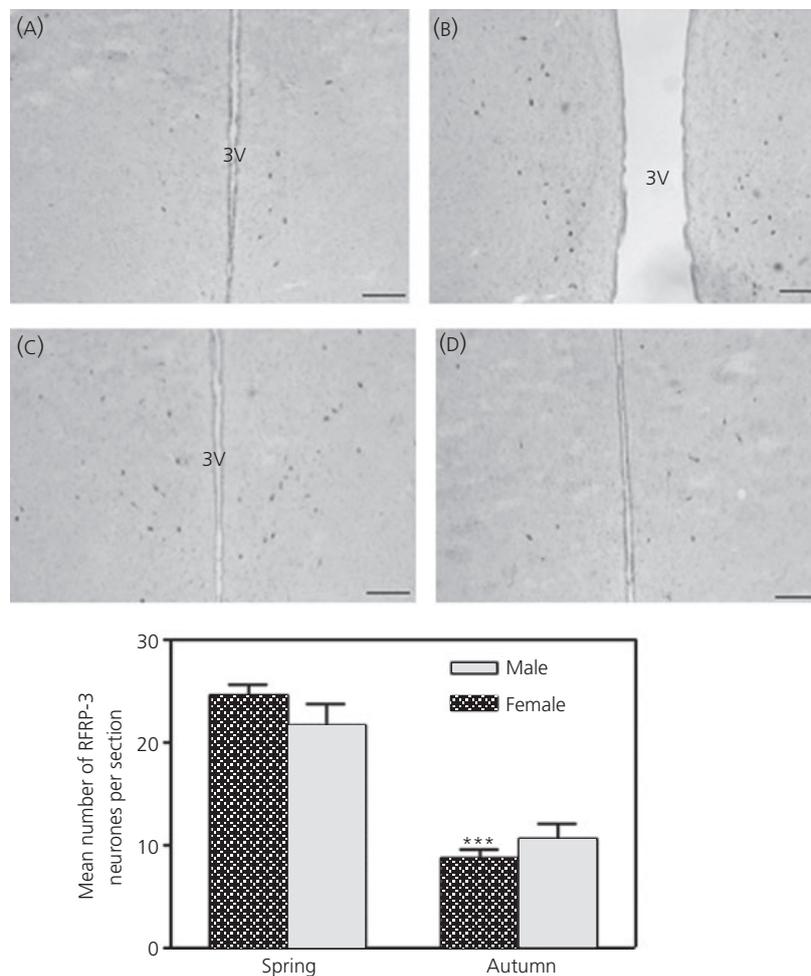


Fig. 6. Distribution and seasonal variation of RF-amide-related peptide (RFRP)-3 immunoreactivity in the hypothalamus of a male jerboa. (1) Representative photomicrographs show the localisation of RFRP-3 immunoreactive perikarya in the periventricular nucleus (A), between the ventromedial and dorsomedial (DMH) areas of the hypothalamus (B) extending laterally to the lateral hypothalamic area. Seasonal variation was noted in the DMH between the jerboas in the spring (C) compared to autumn (D). 3V, third ventricle. (2) Quantification of RFRP-3 immunopositive cells in the hypothalamus of the jerboa reveals that the number of RFRP-3 cell bodies is significantly higher in sexually active jerboas examined in the spring compared to sexually inactive autumn animals. Values are the mean \pm SEM of four animals. *** $P < 0,001$. Scale bars = 50 μ m.

stimulate the release of luteinising hormone (LH) and growth hormone from cultured rat pituitaries (32,33), the hypophysiotrophic effect of Kp is still a matter of debate.

The observation that Kp neurones in the AVPV and Kp-IR fibres in the median eminence display a much higher density in female compared to male jerboas is not surprising because AVPV is known to be critical for the LH surge generating mechanism (4). Lesion of the AVPV was reported to block spontaneous and steroid-induced preovulatory surges (34) and oestrogens exert their positive-feedback specifically on the AVPV Kp-neurones expressing oestrogen receptor α (35). Indeed, sexual differentiation of Kp expression has also been reported in other species (30,36–39). By contrast, in the ARC, the density of Kp-IR fibres was similar between female and male jerboas, suggesting that the ARC population of Kp neurones is

sexually undifferentiated in jerboas. Indeed, several studies show that Kp neurones in the ARC mediate the negative-feedback effect of sex steroids on gonadotrophin secretion that occurs in both sexes (36–38).

As previously reported, jerboas are seasonal rodents where the shortening photoperiod in the autumn induces gonadal regression with a concomitant decrease in sex steroid concentration (40). In the present study, we observed that seasonal variation in reproductive activity of male jerboa is associated with large changes in Kp expression. In the ARC, the level of Kp-IR cells and fibres is significantly lower during the autumnal sexual quiescence than during the sexually active period in the spring. Because ARC Kp expression is negatively regulated by sex steroids (36–38), we would have expected a higher level of Kp-IR in the autumn if the peptide were

exclusively regulated by testosterone. By contrast, we report a reduced content of ARC Kp in sexually inactive male jerboas, indicating that other factors must be involved in the seasonal regulation of the peptide. In the male Syrian hamster, a similar photoperiodic variation of ARC Kp expression was reported to be driven by melatonin (17,39). Seasonal regulation of kisspeptin expression has also been reported in the ARC of the sheep, with an increase during the breeding season compared to the nonbreeding season (11). Recent evidence suggests that kisspeptin neurones in the ARC may act as potent mediators of seasonal changes, and the expression of kisspeptin that is regulated by photoperiod may function as gateway to the seasonal awakening of the neuroendocrine reproductive axis.

Similar to Kp, we report that RFRP-3-IR in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus of male jerboa displays significant seasonal variation. In sexually active jerboa captured in the spring, the number of RFRP-3-IR neurones is approximately three-fold higher compared to sexually inactive autumn animals. Interestingly, a similar higher expression of RFRP-3 has been reported previously in the mediobasal hypothalamus of sexually active Syrian and Siberian hamsters raised under a long photoperiod (16,18). Regulation of RFRP-3 expression by sex steroids is a matter of debate (13,41) but, in the male Syrian and Siberian hamsters, the lower expression of RFRP-3 in short photoperiod was reported to be driven by melatonin and not by testosterone (16,18).

In all mammalian species studied to date, Kp was reported to be a strong activator of the gonadotrophic axis (1). Although such effect has to be confirmed in the jerboa, it is not surprising that hypothalamic Kp content is increased in the spring when jerboas become sexually active. By contrast, controversial effects of RFRP-3 on the reproductive axis have been reported. It was shown to inhibit LH secretion in rat, sheep and female Syrian hamsters (10, 13, 42) and to increase LH and follicle-stimulating hormone secretion in the male Syrian hamster and the short-day adapted Siberian hamster (15,16). This indicates that the effect of RFRP-3 on reproductive activity displays differences according to species, sex and physiological state. Further investigations are required to determine whether and how RFRP-3 regulates the reproductive activity of jerboa. However, the higher level of RFRP-3-IR in sexually active spring animals suggests that the peptide might stimulate reproduction in this desert seasonal rodent.

The neural circuits and neurochemical systems that monitor energetic status are intimately linked to those that control reproductive function, providing a means of optimising reproductive success in fluctuating environments (43). As a result, it is likely that the RFRP-3 and/or Kp systems play a role in monitoring energy balance and relaying this information to the gonadotrophic axis to modulate reproductive behaviour and physiology. Indeed, it has been demonstrated that Kp activates anorexigenic proopiomelanocortin neurones and inhibits orexigenic neuropeptide Y (NPY) cells by an indirect synaptic mechanism (44). More recently, RFRP-3 neurones were reported project to neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, orexin and melanin concentrating cells in the ovine brain (45), consistent with the concept that RFRP-3 cells provide a neural locus for balancing reproductive effort and energy intake. Accordingly, it is of interest that β -endorphin in

the ARC (25) and NPY in the suprachiasmatic nuclei (24) display strong seasonal variation in the jerboa.

In conclusion, the present study reveals the occurrence and distribution of Kp and RFRP-3, two neuropeptides critical for reproductive function, in the jerboa hypothalamus. Furthermore, quantitative analysis demonstrated a higher content of Kp and RFRP-3-IR concurrent with the breeding season. These findings suggest that these two RFamide peptides may act in concert to regulate the gonadotrophic activity of the jerboa, and raise exciting perspectives for an understanding of the mechanisms underlying reproduction in this species, notably in relation to the harsh climatic conditions of its habitat.

Acknowledgements

The present study was supported by the Programme International de Coopération Scientifique (PICS N° 18/2010; CNRST-Maroc/CNRS- France) between the University Sidi Mohammed Ben Abdellah (Fes, Morocco) and the University of Strasbourg (Strasbourg, France). This work was also supported by the GDRI Neuro' Groupement de Recherche International de Neurosciences', the NOVO Nordisk Foundation and by the NeuroMed program. We specifically thank Dr Berrada Rachid for radioimmunoassay of testosterone and Dr Greg Anderson for his kind gift of RFRP antibody.

Received 29 July 2012,
revised 19 November 2012,
accepted 20 December 2012

References

- 1 Navarro VM, Tena-Sempere M. Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; **3**: 267–275.
- 2 Clarke IJ. Control of GnRH secretion: one step back. *Front Neuroendocrinol* 2011; **32**: 367–375.
- 3 Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen Comp Endocrinol* 2012; **177**: 305–314.
- 4 Khan AR, Kauffman AS. The role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 neurones in the circadian-timed preovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol* 2012; **24**: 131–143.
- 5 Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005; **25**: 11349–11356.
- 6 Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* 2008; **149**: 1979–1986.
- 7 d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 2008; **149**: 3926–3932.
- 8 Gottsch ML, Cunningham MJ, 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* 2004; **145**: 4073–4077.
- 9 Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 2006; **27**: 1073–1086.

- 10 Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 2007; **51**: 171–180.
- 11 Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 2008; **149**: 5770–5782.
- 12 Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2008; **149**: 5811–5821.
- 13 Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2410–2415.
- 14 Pineda R, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Romero M, Ruiz-Pino F, Aguilar E, Dijkers FA, Blomenröhr M, Pinilla L, Van Noord PI, Tena-Sempere M. Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **299**: E39–E46.
- 15 Ancel C, Bentsen AH, Sébert ME, 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**: 1352–1363.
- 16 Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 2012; **153**: 373–385.
- 17 Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 2008; **149**: 902–912.
- 18 Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 2006; **16**: 1730–1735.
- 19 Maywood ES, Bittman EL, Ebling FJ, Barrett P, Morgan P, Hastings MH. Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster. *J Neuroendocrinol* 1995; **7**: 215–223.
- 20 Maywood ES, Bittman EL, Hastings MH. Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* 1996; **54**: 470–477.
- 21 El Ouezzani S, Janati IA, Magoul R, Pévet P, Saboureau M. Overwinter body temperature patterns in captive jerboas (*Jaculus orientalis*): influence of sex and group. *J Comp Physiol B* 2011; **181**: 299–309.
- 22 El Qandil S, Chakir J, El Moussaouiti R, Oukouchoud R, Rami N, Benjeloun WA, Lakhdar-Ghazal N. Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull* 2005; **64**: 371–380.
- 23 El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R. The GnRH neurosecretory system in the jerboa brain and its seasonal variations. *J Neuroendocrinol* 2000; **12**: 1205–1212.
- 24 Lakhdar-Ghazal N, Oukouchoud R, Pévet P. Seasonal variation in NPY immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert hibernator. *Neurosci Lett* 1995; **193**: 49–52.
- 25 El Ouezzani S, Tramu G, Magoul R. Seasonal variations of the beta-endorphin neuronal system in the mediobasal hypothalamus of the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Neurosci Lett* 2005; **376**: 107–110.
- 26 Klosen P, Maessen X, van den Bosch de Aguilar PH. PEG embedding for immunocytochemistry application to analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 455–463.
- 27 Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, Franceschini I. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol* 2010; **22**: 1101–1112.
- 28 Rizwan MZ, Porteous R, Herbison AE, Anderson GM. Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 2009; **150**: 1413–1420.
- 29 Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Vol. Edn 4. Academic Press, San diego: 1998.
- 30 Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; **147**: 5817–5825.
- 31 Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express receptor α . *Neurosci Lett* 2006; **401**: 225–230.
- 32 Gutiérrez-Pascual E, Martínez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena Sempere M, Malagon MM, Castano JP. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2007; **19**: 521–530.
- 33 Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. Kiss-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; **20**: 381–393.
- 34 Terasawa E, Wiegand SJ, Bridson WE. A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats. *Am J Physiol* 1980; **238**: E533–E539.
- 35 Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 2007; **53**: 367–378.
- 36 Kauffman AS, Gottsch ML, 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* 2007; **148**: 1774–1783.
- 37 Kauffman AS. Sexual differentiation and the Kiss1 system: hormonal and developmental considerations. *Peptides* 2009; **30**: 83–93.
- 38 Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss 1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005; **146**: 3686–3692.
- 39 Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 2010; **25**: 81–91.
- 40 Oukouchoud R, Vivien-Roels B, Pévet P, Lakhdar-Ghazal N. Testosterone-dependent and -independent mechanisms involved in the photoperiodic control of neuropeptide levels in the brain of the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Brain Res* 2003; **967**: 63–72.
- 41 Quennell JH, Rizwan MZ, Relf HL, Anderson GM. Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 2010; **22**: 309–316.
- 42 Sari IP, Rao A, Smith JT, Tilbrook AJ, Clarke IJ. Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 2009; **150**: 5549–5556.

- 43 Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 2004; **81**: 289–317.
- 44 Fu LY, van den Pol AN. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci* 2010; **30**: 10205–10219.
- 45 Qi Y, Oldfield BJ, Clarke IJ. Projections of RF-amide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 2009; **21**: 690–697.

Régulation saisonnière et rôles des neuropeptides Kisspeptine et RFRP-3 dans l'homéostasie énergétique chez la gerboise (*Jaculus orientalis*)

Seasonal regulation and role of neuropeptides Kisspeptin and RFRP-3 in energy homeostasis in the jerboa (*Jaculus orientalis*)

Résumé

La reproduction est intimement liée à la balance énergétique, particulièrement chez les espèces sauvages exposées à des variations larges de leur environnement. L'objectif de cette thèse était d'étudier les mécanismes centraux qui régissent la régulation saisonnière de ces deux fonctions chez la gerboise. Nos résultats montrent une augmentation coordonnée au printemps de l'expression des gènes codant pour les neuropeptides impliqués dans la régulation de la reproduction et de la prise alimentaire, et rapportent des effets opposés de deux peptides classiquement considérés comme régulant la reproduction, Kisspeptine et RFRP-3, sur la prise alimentaire de la gerboise femelle ; un effet inhibiteur de Kisspeptine ayant lieu uniquement au printemps, et un effet activateur de RFRP-3 s'observant pendant les deux saisons. De plus, nous proposons que Kisspeptine et RFRP-3 exercent leurs effets sur la prise alimentaire via des actions sur des structures cérébrales dédiées au contrôle métabolique, notamment POMC et NPY. Dans l'ensemble, ces résultats renforcent notre hypothèse d'une coordination centrale de l'activité de la reproduction et de la prise alimentaire chez la gerboise et suggèrent une modulation de cette coordination en fonction du sexe et de l'environnement saisonnier.

Mots clés : Gerboise, Kisspeptine, RFRP-3, POMC, NPY, reproduction, balance énergétique, saison.

Summary

Reproduction is intimately related to energy balance, especially in wild species exposed to marked seasonal changes in their environment. The aim of this thesis was to study the central mechanisms governing the seasonal regulation of these two functions in the jerboa. Our results reveal a spring coordinated increase in the expression of genes encoding neuropeptides involved in the regulation of reproduction and food intake, and report opposite effects of two central regulators of reproduction, Kisspeptin and RFRP-3, on food intake in the female jerboa; an inhibitory effect of Kisspeptin that occurs only in spring, and activatory effect of RFRP-3 observed in both seasons. Moreover, we propose that Kisspeptin and RFRP-3 display their effects on food intake via actions on brain structures dedicated to metabolic regulation, mainly POMC and NPY. Overall, these results strengthen our hypothesis of a central coordination of the jerboa's reproductive activity and food intake and suggest a modulation of this coordination that depends on sex and seasonal environment.

Keywords: Jerboa, Kisspeptin, RFRP-3, POMC, NPY, reproduction, energy balance, season.