

Université Pierre et Marie Curie  
Ecole doctorale ED3C 158 : Cerveau - Cognition - Comportement  
Institut de Biologie Paris Seine

Dans le but d'obtenir le titre de  
**Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie**  
Spécialité NEUROSCIENCES

**Plasticité moléculaire de l'aire pré-optique  
médiane de l'hypothalamus induite par  
l'expérience sexuelle chez la souris mâle**

Thèse de doctorat soutenue le 16 juin 2017 par Arnaud Jean

**Devant le jury composé de :**

Matthieu KELLER	Directeur de recherche (INRA/CNRS)	Rapporteur
Claire-Marie VACHER	Maître de conférences (Université Paris-sud)	Rapporteur
Laurence BODINEAU	Professeur (UPMC)	Examineur
Isabelle FRANCESCHINI	Chargé de recherche (INRA/CNRS)	Examineur
Emmanuel MOYSE	Professeur (Université de Tours)	Examineur
Peter VANHOUTTE	Directeur de recherche (CNRS/UPMC)	Examineur
Stéphane CHARPIER	Professeur (UPMC)	Président du jury
Hélène POUZET	Professeur (UPMC)	Directeur de thèse



« Quand la seule échéance des prochaines semaines sera d'écrire les remerciements, j'aurais quand même bien avancé ! ». Telle est la phrase qui a jalonné les derniers mois de cette thèse, et je peux le dire à présent, ça y est, ce jour est arrivé. Alors premier réflexe, Google « remerciements de thèse ». Un des premiers sites propose de commencer par la formule suivante : « La thèse de doctorat représente un travail s'inscrivant dans la durée, et pour cette raison, constitue le fil conducteur d'une tranche de vie, parfois au crépuscule de la candeur étudiante, mais souvent à l'aube de la maturité scientifique... ». C'est un peu pompeux... Mais au fait, quelle est la définition exacte de candeur ? - caractère d'une personne candide. Des synonymes ? - pureté d'âme, ingénuité. Des exemples d'emploi ? « La petite, qui roulait sur ses vingt ans, était aguichante au possible, mince et rembourrée, les yeux clairs, mouillés de candeur vicieuse » (Victor Méric, Les Compagnons de l'Escopette). Heu...là je ne suis plus tout à fait certain que cela corresponde à l'idée que je me fais de cette thèse.

Beaucoup de personnes ont contribué directement et indirectement à la réussite de ce doctorat. Je voudrais chacune les remercier pour tout ce qu'elles ont pu m'apporter. Alors si on commençait par ordre chronologique, toutes les personnes, les générations et les rencontres qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail. Il faudrait commencer il y a très longtemps, bien avant la rencontre de deux gamètes qui ont réussi à former ma cellule œuf (je crois que c'est de la déformation professionnelle là). Mais il y aussi les mitochondries maternelles, faudrait-il aller jusqu'à l'Eve mitochondriale ? LUCA ? Quid de la nébuleuse à l'origine de notre système solaire ? Ça commence à devenir angoissant. Je comprends enfin pourquoi cet exercice est si délicat. Il ne faut oublier personne mais surtout éviter les longueurs inutiles en racontant sa vie et des anecdotes personnelles sans intérêt ! Oups, mais c'est exactement ce que je suis en train de faire... Alors je me lance :

Tout d'abord, un immense merci à Hélène de m'avoir laissé la liberté intellectuelle et la liberté de rater. Cette possibilité pour moi d'évoluer, de devenir rapidement autonome a largement contribué à mon appropriation du sujet. Merci d'avoir toujours été à l'écoute de mes idées, de mes intuitions et de mes envies d'expériences, tout en me recadrant quand il le fallait. Merci pour ton accompagnement administratif et logistique, tu as toujours fait le maximum de façon réactive et efficace pour que je puisse disposer des outils nécessaires aux expériences tout en me préservant des interférences qui auraient pu influencées négativement mon travail. J'ai particulièrement apprécié nos nombreux échanges sur l'enseignement secondaire et universitaire ainsi que tes conseils et retours sur les enseignements que j'ai pu dispenser. Au-delà de tes qualités humaines, tu as toujours été compréhensive et à l'écoute de mes attentes aussi bien au niveau du labo qu'à l'extérieur sans jamais remettre en cause (bien au contraire) mon projet professionnel qui s'éloigne de la recherche académique. Merci donc de m'avoir permis de mener à bien MA thèse.

Un grand merci aux autres membres de l'équipe, à Valérie pour tes anecdotes croustillantes et tes nombreux conseils pour l'accompagnement des étudiants, à Caroline pour avoir participé à ma formation lors de mon arrivée au labo ainsi que pour les discussions de botanique, de cuisine (merci pour les confitures et les gâteaux) et même parfois de géologie normande. Merci à Sakina pour ton avis scientifique avisé et pertinent notamment lors de la relecture des articles.

Je voudrais particulièrement remercier les oubliés de la recherche académique en ce sens que leur statut est parfois autant discuté que leur utilité immédiate : je voudrais rendre ici hommage à tous les stagiaires qui ont pu travailler avec moi. Alice (la première), Andry (une rigueur et une propreté toujours imitées mais jamais égalées), Pauline (bon ok j'arrête d'acheter des Kinders pour chaque expérience réussie), Raphaël (j'espère que ton kiné va toujours aussi bien), Mathilde (oui, les souris sont mignonnes mais on en a quand même besoin pour les Western blots) ainsi que tous les stagiaires de troisième (vous m'avez appris les dernières modes et tendances en me faisant bien remarquer que j'étais devenu ringard – comme l'emploi de ce mot d'ailleurs). Vous avez tous participé à la bonne ambiance et à l'avancée (plus ou moins importante) de mes recherches. Ayant souvent réalisé des tâches ingrates, peu épanouissantes et chronophages, vous m'avez permis de faire le lien entre plusieurs éléments de ma pensée en me forçant parfois à reformuler ou à expliciter plus clairement certaines idées (je dois tout de même reconnaître à cet exercice le fait de m'avoir fait perdre un bon nombre d'illusions sur l'enseignement de la démarche scientifique à l'Université). Ce fut un grand plaisir de partager les bons mais aussi les mauvais moments de cette thèse avec vous. Merci également à tous les autres stagiaires avec qui je n'ai pas directement travaillé mais qui ont été là pour insuffler un vent de fraîcheur et de nouveauté dans un environnement parfois routinier.

Un grand merci à tous les collègues qui ont, à un moment donné, partagé mon quotidien de travail. Merci à Nida pour ton initiation à la culture palestinienne (je crois que malgré tes efforts, je ne sais ni écrire mon prénom en arabe ni dire autre chose que « merci » et « bonjour ») bien qu'Afnan y ait aussi mis tout son cœur quelques mois auparavant. Merci à Anne-Charlotte pour tous ces très bons moments, #laTAC, les performances vocales toujours plus incroyables les unes que les autres (surtout lors des karaokés rue Mouffetard ou le matin après des nuits courtes) ou encore les séances improvisées d'histologie. Ce fut (presque) toujours intéressant d'avoir ton avis pertinent sur cette si noble discipline qu'est la neuroendocrinologie #70ans. Merci à Carlos, présent dès mes premiers mois au labo, pour ta bonne humeur, pour m'avoir formé sur plusieurs techniques mais surtout pour toutes les escapades extra-scolaires diurnes et nocturnes (je n'ai pas trouvé de meilleur euphémisme). Quel plaisir d'avoir trouvé quelqu'un avec qui partager des lasagnes industrielles Picard de 2 kg avant d'aller faire un futsal. Un grand merci aux autres vétérans, présents dès le début, Nicolas pour avoir toujours été « devant moi » dans les discussions étymologiques et zététiques toujours très intéressantes, Daniel pour ta gentillesse et ta lucidité au moment d'aborder les très légers dysfonctionnements de la recherche académique française. Merci pour ce super moment estival partagé avec toi dans un cadre qui était tout sauf « garulesque ». Merci à Emma pour les prélèvements originaux et pour avoir entretenu ma condition physique lors des démarrages de sa moto. Mais surtout, merci à tous d'avoir su réinventé la pléiade 2.0 par des discussions toujours très pertinentes et éclairées dans un groupe de discussion très sélect qui n'a rien à envier au café de Flore.

Je tiens également à remercier les soutiens de grande qualité dont j'ai pu bénéficier lors des derniers instants de rédaction (moments qui sont bien évidemment les plus agréables de la thèse). Un grand merci à Guillaume pour la Cristalline, les courbatures et les ampoules aux mains. Merci à Raphaële pour son soutien logistique, émotionnel et pour les virées en vélo électrique. Bravo à vous pour avoir réussi à m'écouter râler 15 minutes toutes les 3 heures pendant plusieurs semaines.

Merci à Fabrice d'avoir souvent été très arrangeant et coopératif pour la logistique de l'animalerie mais surtout, merci de m'avoir fait décharger plusieurs tonnes de nourritures et porter des centaines de cages : c'est important de rester actif durant la rédaction. Enfin, un grand merci à toutes les autres personnes des différentes équipes avec qui j'ai pu me lier d'amitié et qui m'ont beaucoup apporté à tous les niveaux.

L'environnement au sein du laboratoire est important, mais celui à l'extérieur l'est d'autant plus. Bien heureusement (pour ma santé physique et mentale), j'ai pu profiter de très nombreux moments de joie et de bonheur en dehors du travail quotidien souvent ingrat et besogneux.

L'ensemble des enseignements dispensés pendant ces 3 années a été à l'origine de beaucoup de fierté et de plaisir grâce à l'implication de nombreuses personnes avec qui j'ai grandement apprécié travailler.

Un grand merci à Yann pour m'avoir permis d'encadrer des sorties géologiques et naturalistes en Auvergne, une des expériences d'enseignement des plus enrichissantes et une vraie bouffée d'oxygène directement prélevée sous forme de grêle et de rafales de vent au sommet du Puy-de-Dôme. Merci au personnel de la prépa Agreg, Corinne et Tahar, pour leur patience, leur bienveillance et leur bonne humeur. Merci beaucoup à François F., quel plaisir de travailler à tes côtés de façon efficace et rigoureuse pour former notre binôme de choc. Merci beaucoup à Frances pour les asticots de pêche (c'est bien comme ça que ça s'appelle non ?), m'ayant permis de bidouiller allègrement tous les protocoles de TP pendant plusieurs années. Merci aussi à François R. pour cette intervention en Picardie, il est toujours agréable de sortir de son quotidien pour montrer des vidéos de souris en accouplement à des lycéens médusés.

Merci à tous les amis qui m'ont accompagné durant ces dernières années, je me suis toujours senti soutenu avec la possibilité de pouvoir décrocher lors de très appréciés moments de détente. Merci au Pandémonium pour les parties de Nerf (ça n'a rien à voir avec l'électrophysiologie), les barbecues et les sorties au Museum. Mention spéciale pour Constant, acolyte de longue date, qui veille sur moi des cimes volcaniques aux fosses abyssales indonésiennes. Merci à Thibault pour les Baskets endiablés du samedi matin, merci à Jérémy pour les « Fontanelles », les défaites à Mario Kart et les Volley-Piscines lors des retours en Occitanie. Merci à Simon V. et Sara pour avoir partagé avec moi le plaisir de se faufiler au milieu de ruelles malfamées pour atterrir dans des restaurants sans nom où l'on s'assoit à la place du chien avec interdiction de rire entre nous.

Un grand merci à Simon C. pour toutes les discussions passionnantes de Hussard noir de la République sur l'état de l'éducation nationale et de la société. Merci pour ton aide lors des expériences et lors de la préparation des enseignements de géologie. Je garde d'excellents souvenirs de nos échantillonnages et de nos prospections même après une nuit au camping international de la Raviège à manger du Melsat et de la Bougnette. Merci pour tous ces moments fantastiques passés en Afrique du Sud, même si rien ne pourra jamais surpasser la montagne Noire. Merci également à tous les copains de la Butte-aux-Cailles, véritable soupape de décompression (c'est vrai que la Chouffe aide bien aussi). Merci à Elsa pour ta gentillesse et ton écoute, Louis pour ton expertise sur Sylvain Wiltord et Stéphane Guivarc'h. Merci à Vincent pour avoir toujours été une oreille attentive, scientifiquement curieux et doté d'un sens critique toujours pertinent.

Tous ces éléments expliquent les très bons moments passés à Copenhague en votre présence – assurément un des meilleurs moments de cette thèse – vivement qu'on refasse du bateau.

Je voudrais également exprimer mon immense gratitude à tous les enseignants qui ont compté pour moi et qui ont grandement participé à ma construction personnelle par leur engagement, leur pédagogie et leur implication. Cette thèse est aussi la leur, véritables travailleurs de l'ombre, dont la reconnaissance sociale et salariale ne correspond en rien à leur véritable rôle et à leur utilité. Je voudrais également remercier tous les élèves à qui j'ai pu enseigner, notamment grâce à la confiance de Pierre Thomas lors de mes toutes premières expériences professionnelles. Ces rencontres ont largement participé à mon choix de carrière et à la réussite universitaire qui a suivi. Un merci particulier à Noémie pour son soutien indéfectible depuis de très nombreuses années, une personne rare dont l'avis, la réussite et le bonheur m'importeront toujours.

Enfin, parmi les personnes qui ont majoritairement contribué à ma réussite, ma famille occupe une place éminemment particulière : famille réduite certes, mais soudée et bienveillante. Merci à Cyril pour les moments de « convivialité » partagés durant cette thèse. Merci de m'avoir toujours tiré vers le haut et d'avoir été un exemple de réussite. Merci à Aymeric pour sa jovialité et tous les moments de complicité notamment ceux partagés autour d'un Rock Shandy. Un grand merci à Jean-Marie, Christine, Simon V, Julien, Marianne et depuis peu, Rose, pour ces bons moments de détente passés « loin » de la capitale.

Je voudrais également exprimer ma grande reconnaissance à mes parents, ayant toujours fait le maximum pour mon bonheur. J'ai toujours eu la liberté de faire mes propres choix et de réaliser les études qui m'intéressaient sans que le côté financier ne rentre en compte. Je réalise à présent la chance immense que cela représente. Merci à ma mère pour son ouverture d'esprit, sa volonté de nous rendre autonome et indépendant toujours avec bienveillance et gentillesse. Merci à mon père pour m'avoir transmis son goût de l'efficacité, du dépassement de soi et du travail bien fait.

À tous ceux qui ont déjà travaillé avec moi, imaginez un peu l'exploit suivant : partager mon quotidien et me supporter - dans tous les sens du terme - pendant une année d'Agrégation, une année de M2, et enchaîner avec 3 années de thèse, tout en enseignant en REP, au cas où il reste un peu de patience et d'énergie à distiller. Toujours de bonne humeur, patiente, attentionnée, d'une gentillesse à toute épreuve, c'est une élévation au rang de maître Yoga que tu mérites. Tu as même pris le temps de t'infliger, pour ultime torture, la relecture de mon manuscrit en 24h : on frôle le masochisme là. Merci du fond du cœur Emelyne pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces années difficiles et pour tous ces bons moments que tu as su m'apporter. Cette stabilité et cet apaisement quotidien m'ont grandement aidé à surmonter les difficultés inhérentes aux contraintes du doctorat.

Je voudrais également rendre un hommage sincère aux milliers de souris sacrifiées pour ce travail de thèse. Peut-être est-ce là encore une lubie de « futur jeune vieux » prof de sciences naturelles ?

Je conclurais en précisant ce que la majorité des personnes sus-citées connaissent déjà : cette période a été difficile, à cause d'un quotidien répétitif voire abrutissant et frustrant. Très loin des idéaux de recherche auxquels je croyais naïvement. C'est sans aucun regret que je quitte le monde de la recherche académique et de l'enseignement universitaire (de façon provisoire ?), dans lesquelles la précarisation est le mot d'ordre et où le recrutement actuel est effectué selon des critères obsolètes qui impliquent des sacrifices démesurés. Malgré ces ombres au tableau, cette expérience a été très riche d'enseignements et accompagnée de rencontres formidables (et d'autres moins) qui font de cette période quelque chose d'unique. Merci à tous de m'avoir permis de réussir cette épreuve. À tous ceux qui continuent dans ce domaine, vous avez toute mon admiration : bon courage à tous !

*« Il n'est pas de satiété dans l'étude », Erasme*

*« On se lasse de tout, sauf de comprendre », Virgile*





# Table des matières

<b>PREAMBULE</b> .....	15
<i>La reproduction sexuée à la lumière de l'évolution</i>	
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	33
<b>Chapitre 1 : Le comportement sexuel de la souris mâle</b> .....	35
I) Une séquence comportementale stéréotypée	
II) Etude expérimentale du comportement sexuel	
<b>Chapitre 2 : Régulations nerveuses et endocrines du comportement sexuel mâle</b> .....	49
I) Circuits cérébraux impliqués dans le contrôle du comportement sexuel mâle	
II) Neuromédiateurs impliqués dans le contrôle du comportement sexuel mâle	
III) Contrôle endocrine du comportement sexuel mâle	
<b>Chapitre 3 : Améliorations comportementales et modifications cérébrales et endocrines induites par l'expérience sexuelle</b> .....	101
I) Améliorations comportementales associées à l'expérience sexuelle	
II) Modifications cérébrales induites par l'expérience sexuelle	
III) Modifications endocrines induites par l'expérience sexuelle	
<b>OBJECTIFS DE THESE</b> .....	125
<b>RESULTATS</b> .....	127
<b>Premier article</b> .....	129
<b>Deuxième article</b> .....	161
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	179
<b>REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	189
<b>ANNEXES</b> .....	213

# Table des figures

- Figure 1 : Illustration du coût du mâle
- Figure 2 : Temps nécessaire pour obtenir un génotype avantageux ABC dans des populations sexuées et asexuées
- Figure 3 : Principe de fonctionnement du cliquet de Muller
- Figure 4 : Illustration de l'hypothèse de la loterie
- Figure 5 : Comparaison de la phylogénie d'espèces sexuées et asexuées
- Figure 6 : Diagramme de Venn illustrant les quatre questions de Tinbergen adaptées à l'étude du comportement sexuel
- Figure 7 : Succession des 3 phases du comportement sexuel de la souris mâle
- Figure 8 : Modèle psycho-hydraulique de Lorenz illustrant la transition entre phase motivationnelle et phase copulatoire
- Figure 9 : Premières analyses vidéo du comportement sexuel du rat réalisées avec une caméra haute vitesse
- Figure 10 : Première étude du comportement sexuel du lapin réalisée en utilisant un accéléromètre
- Figure 11 : Détermination du temps de contact génital lors de l'accouplement de lapins grâce à l'implantation d'électrodes sous-cutanées
- Figure 12 : Etude de la copulation d'un rat par l'utilisation simultanée de trois techniques différentes
- Figure 13 : Pattern copulatoire de la souris mâle obtenu par accéléromètre
- Figure 14 : Localisation de l'aire pré-optique médiane (mPOA) chez la souris
- Figure 15 : Activation de la mPOA estimée par détection de c-Fos dans la mPOA de rat
- Figure 16 : Activité électrique de la mPOA de rat enregistrée durant un accouplement
- Figure 17 : Afférences sensorielles projetant sur la mPOA
- Figure 18 : Efférences en provenance de la mPOA
- Figure 19 : Participation de trois voies dopaminergiques à la régulation du comportement sexuel mâle
- Figure 20 : Evolution de la concentration en dopamine dans la mPOA de rat au cours du comportement sexuel mâle
- Figure 21 : Implication des différents récepteurs de la dopamine de la mPOA dans la régulation des réponses génitales durant l'accouplement du rat
- Figure 22 : Evolution de la concentration en glutamate dans la mPOA de rat au cours du comportement sexuel mâle

- Figure 23 : Modèle de Hull présentant les interactions moléculaires entre le glutamate, le monoxyde d'azote (NO) et la dopamine dans la mPOA de rat au cours du comportement sexuel mâle
- Figure 24 : Evolution de la concentration en sérotonine dans l'aire hypothalamique latérale de rat durant le comportement sexuel mâle
- Figure 25 : Différents systèmes de neurotransmission de la mPOA de rat impliqués dans la régulation du comportement sexuel mâle
- Figure 26 : Sécrétion pulsatile de LH et de testostérone chez la souris mâle
- Figure 27 : La castration altère la libération de la dopamine dans la mPOA de rat
- Figure 28 : La testostérone régule positivement l'activité de la nNOS dans la mPOA de rat
- Figure 29 : Modèle explicatif du double rôle de la testostérone dans le contrôle du comportement sexuel mâle
- Figure 30 : La testostérone est convertie dans les tissus cibles en deux métabolites actifs : l'œstradiol et la dihydrotestostérone
- Figure 31 : Voies classique et non-classique de l'action cellulaire des récepteurs des androgènes (AR)
- Figure 32 : Voies classique et non-classique de l'action cellulaire des récepteurs des œstrogènes (ER)
- Figure 33 : Effet de la progestérone sur la restauration de la copulation après castration chez le rat
- Figure 34 : Effet de la progestérone sur la restauration de la copulation après castration chez le hamster
- Figure 35 : Propriétés hédoniques du comportement sexuel estimées par un protocole de conditionnement de place
- Figure 36 : Conversion d'un stimulus aversif en stimulus attractif suite à l'induction de l'expérience sexuelle
- Figure 37 : Les souris mâles sexuellement expérimentées possèdent davantage de cellules exprimant l'AR dans la mPOA
- Figure 38 : Les souris mâles sexuellement expérimentées possèdent davantage de cellules c-Fos dans le circuit de contrôle du comportement sexuel
- Figure 39 : Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs de l'ocytocine dans la mPOA
- Figure 40 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules nNOS ainsi que des niveaux d'expression plus élevés de nNOS dans la mPOA
- Figure 41 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules D2 immuno-réactives dans la mPOA
- Figure 42 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellule c-Fos immuno-réactives dans la mPOA

- Figure 43 : Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression de HO-1 et HO-2 dans la mPOA
- Figure 44 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent des niveaux plus importants de p-DARP32 dans la mPOA
- Figure 45 : L'expérience sexuelle stimule la neurogenèse hippocampique chez le rat
- Figure 46 : L'expérience sexuelle augmente la densité d'épines dendritiques des neurones gyrus denté et des neurones pyramidaux de cortex préfrontal chez le rat
- Figure 47 : L'expérience sexuelle augmente le nombre de dendrites et la densité dendritique des neurones du noyau accumbens chez le rat
- Figure 48 : L'expérience sexuelle augmente la réponse NMDA des neurones épineux du noyau accumbens chez le rat
- Figure 49 : Effet de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques de testostérone et de corticostérone lors de différentes phases du comportement sexuel mâle chez le rat
- Figure 50 : Effet de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques basales de testostérone et d'œstradiol et sur l'expression des récepteurs AR et ER $\alpha$  dans la mPOA de rat
- Figure 51 : Effet de l'expérience sexuelle sur la concentration plasmatique basale de testostérone chez le rat
- Figure 52 : Amélioration du comportement sexuel lors du deuxième accouplement
- Figure 53 : Classification des épines dendritiques selon leur morphologie
- Figure 54 : Dimorphisme de la densité d'épines dendritiques observé dans la mPOA de rat
- Figure 55 : Protocole expérimental utilisé pour analyser l'effet de l'accouplement et de l'expérience sexuelle sur l'arborisation dendritique de la mPOA de souris
- Figure 56 : L'expérience sexuelle induit une augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom » dans la mPOA de souris
- Figure 57 : Expression dimorphique de la spinophiline dans la mPOA de rat
- Figure 58 : Corrélation entre la latence de première montée et les niveaux de spinophiline dans la mPOA de rat
- Figure 59 : L'expérience sexuelle induit une augmentation des niveaux de PSD-95 dans la mPOA de souris
- Figure 60 : Effets de l'éjaculation et de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques et hypothalamiques de stéroïdes chez la souris
- Figure 61 : L'expérience sexuelle ne modifie ni les niveaux de récepteurs des androgènes (AR) ni les niveaux de récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ ) dans la mPOA de souris
- Figure 62 : L'expérience sexuelle ne modifie pas le nombre de cellules, les niveaux d'expression et l'activité enzymatique de la nNOS dans la mPOA de souris
- Figure 63 : Effet de l'expérience sexuelle sur la neurotransmission glutamatergique dans la mPOA de souris

- Figure 64 : Expression dimorphique de la calbindine dans la mPOA de souris
- Figure 65 : L'expérience sexuelle augmente les niveaux de calbindine dans la mPOA de souris
- Figure 66 : Morphologie dimorphique des astrocytes dans la mPOA de rats âgés de 2 jours
- Figure 67 : Effet de l'expérience sexuelle sur la morphologie des astrocytes et sur l'expression de GFAP dans la mPOA de souris
- Figure 68 : La morphologie et le nombre de cellules microgliales sont dimorphiques dans la mPOA de rats âgés de 2 jours
- Figure 69 : Effets de l'expérience sexuelle sur la morphologie de la microglie et sur l'expression d'Iba-1 dans la mPOA de souris
- Figure 70 : L'expérience sexuelle induit des modifications épigénétiques dans la mPOA de souris
- Figure 71 : Corrélation entre les concentrations hypothalamiques et plasmatiques de testostérone chez la souris
- Figure 72 : La variabilité individuelle ne permet pas de conclure quant à une modification des niveaux de pNOS dans la mPOA par l'expérience sexuelle
- Figure 73 : Répartition de l'immuno-réactivité nNOS dans l'aire pré-optique de rat et de souris
- Figure 74 : Mécanismes périnataux impliqués dans la mise en place du dimorphisme de la mPOA chez le rat
- Figure 75 : La copulation induit la phosphorylation de ERK1/2 dans la mPOA de souris mâles sexuellement expérimentées
- Figure 76 : Protocole expérimental utilisé pour étudier les effets de l'expérience sexuelle sur l'activation de la voie ERK1/2
- Figure 77 : Amélioration du comportement sexuel chez les souris mâles sexuellement expérimentées
- Figure 78 : L'expérience sexuelle augmente l'activation de ERK1/2 induite par l'accouplement
- Figure 79 : Protocole expérimental utilisé pour étudier le rôle de la voie ERK1/2 dans l'induction de l'expérience sexuelle
- Figure 80 : Choix de la dose et du timing d'injection du SL-327
- Figure 81 : Inhibition de la voie ERK1/2 et induction de l'expérience sexuelle
- Figure 82 : Activation de la voie ERK1/2 dans la mPOA par la testostérone et ses métabolites
- Figure 83 : Effets de la testostérone sur l'activation de la voie ERK1/2 chez trois lignées mutantes
- Figure 84 : Critères de classification du comportement sexuel mâle
- Figure 85 : Phylogénie et comportement sexuel mâle

# Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des paramètres du comportement sexuel mâle de différentes souches de souris

Tableau 2 : Améliorations du comportement sexuel associées à l'expérience sexuelle chez la souris mâle

Tableau 3 : Effet de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques de testostérone en condition basale et après accouplement chez le rat

# Abréviations

AR : Récepteur des androgènes

ER $\alpha$  : Récepteur des œstrogènes alpha

ER $\beta$  : Récepteur des œstrogènes bêta

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1 et 2

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

H3K4me : Histone H3 méthylée sur la lysine 4

H3K27me3 : Histone H3 tri-méthylée sur la lysine 27

IHC : Immunohistochimie

LH : Hormone lutéinisante

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

mPOA : Aire pré-optique médiane

NO : Oxyde nitrique = monoxyde d'azote

nNOS : Isoforme neuronale de l'oxyde nitrique synthase

pERK : Forme phosphorylée de ERK1/2

PSD-95 : Post-Synaptic Density 95

PVN : Noyau para-ventriculaire

SDN : Noyau sexuellement dimorphique





*La reproduction sexuée est le mode de reproduction le plus répandu chez les Eucaryotes. Etant donné les importants coûts développementaux, morphologiques et comportementaux qu'elle engendre, il est légitime de s'interroger quant au maintien évolutif de ce mode de reproduction notamment au sein des Mammifères et a fortiori, chez les Rongeurs. Cet aspect sera abordé dans le préambule qui traite des aspects évolutifs de la reproduction sexuée.*

*Chez les Mammifères, la reproduction sexuée est assurée par un processus de fécondation interne qui permet la rencontre des gamètes dans le tractus génital femelle. Cette modalité de fécondation, nécessitant un contact physique entre les deux partenaires, est rendue possible par une succession d'actes moteurs qui constituent le comportement sexuel. La description de ce comportement ainsi que les modalités de son étude expérimentale seront présentés dans le premier chapitre de la revue bibliographique.*

*La réalisation de ce comportement complexe nécessite l'action conjointe de systèmes cérébraux et endocrines qui participent à son contrôle. Ces aspects seront développés dans le deuxième chapitre.*

*Bien que le comportement sexuel de la souris soit stéréotypé et largement conservé au sein de l'espèce, certains paramètres comportementaux peuvent être modifiés au cours de la vie de l'individu, notamment par l'expérience sexuelle. Les modifications comportementales, cérébrales et endocrines induites par l'expérience sexuelle seront développées dans le troisième chapitre.*

*Cette revue bibliographique est suivie de deux articles, chacun accompagné d'une discussion et de perspectives. Le premier article s'intéresse aux modifications à long terme de l'aire pré-optique médiane de l'hypothalamus (mPOA) induites par l'expérience sexuelle. Le deuxième article s'intéresse aux modifications transitoires de la mPOA associées à l'accouplement et potentialisées par l'expérience sexuelle.*

*La fin de ce manuscrit est composée d'une discussion générale permettant de contextualiser les différents résultats obtenus à la lumière des données de la littérature.*



# **Préambule**

*La reproduction sexuée à la lumière de l'évolution*



Il n'y a pas de meilleur exemple pour illustrer le paradoxe de la reproduction sexuée que de commencer par l'analyse de sa propre formulation. Le terme reproduction laisse entrevoir la possibilité de former des individus semblables tandis que le terme sexué se réfère à un échange de matériel génétique entre deux individus différents. Est-il possible de mélanger ainsi son patrimoine génétique tout en enfantant une copie conforme de soi ?

## **I. Avantages, inconvénients et paradoxes évolutifs de la reproduction sexuée**

La fécondation des gamètes émis par les parents aboutit très généralement à la formation d'un descendant de la même espèce. Néanmoins, le terme de reproduction est impropre. En effet, le descendant présentera un sexe différent de celui du père ou de la mère, ainsi seul un des partenaires se sera « reproduit ». Bien avant que Gregor Mendel théorise ses fameuses lois de disjonction des allèles et de ségrégation indépendantes des caractères, de nombreuses observations ont corroboré le fait que chaque parent fournit la moitié de l'information génétique à sa descendance. Nul besoin de génétique formelle pour affirmer qu'il a « les yeux de sa mère » ou encore « le nez de son père ». La reproduction sexuée est donc tout sauf de la reproduction.

Cet enfantement non conforme est doté de caractéristiques très avantageuses, tant la nature regorge de nombreux déploiement d'artifices très coûteux qui favorisent la reproduction sexuée. Cette idée du coût de la reproduction sexuée est déjà soulevée par Charles Darwin dès 1860 dans une de ses lettres envoyée à son mentor, le botaniste John Steven Henslow : « Il n'y a pas de plus grand mystère au monde me semble-t-il que l'existence des sexes, particulièrement depuis la découverte de la parthénogenèse » (mode de reproduction asexué dans lequel une femelle peut donner naissance à des femelles sans fécondation par un mâle). Les Punaises de lit, *Cimex lectularius*, se révèlent être un excellent exemple pour illustrer le coût du sexe grâce à leur copulation dite « traumatique ». En effet, la femelle ne possède pas d'orifice sexuel ce qui oblige le mâle à transpercer la cuticule de sa partenaire avec son aiguillon spécialisé afin d'injecter sa semence de façon aléatoire dans la tête, le ventre ou encore directement dans le cœur. Les spermatozoïdes se déplacent ensuite dans l'hémolymphe pour atteindre les gamètes à féconder. Il n'est pas rare que les femelles succombent à leurs multiples perforations.

Dans ces conditions, il est légitime de se demander pourquoi la reproduction sexuée s'est maintenue face à une reproduction asexuée parthénogénétique qui permettrait d'une part, de ne pas croiser la route de mâles indécidés, et d'autre part, d'assurer une reproduction réellement conforme. Pourtant, près de 95% des Eucaryotes utilisent la sexualité comme mode de reproduction...

## **A) La reproduction sexuée est coûteuse**

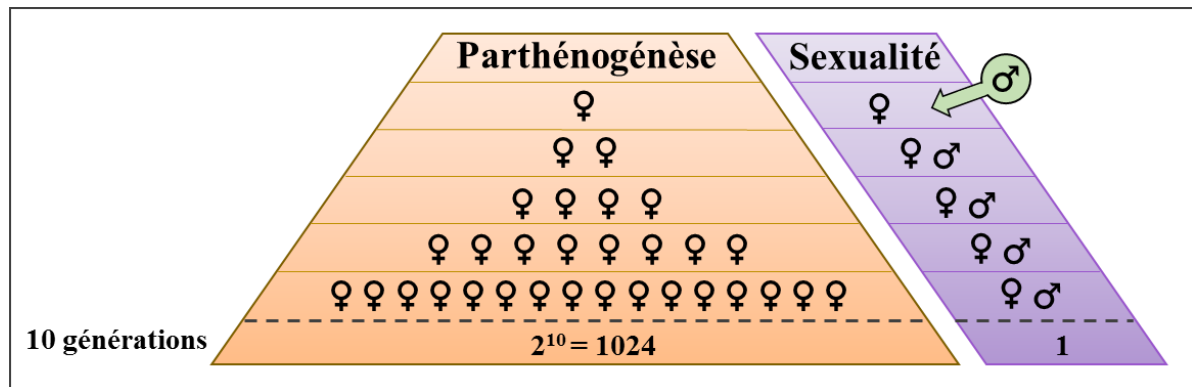
L'utilisation de la reproduction sexuée est associée à trois coûts évolutifs. Il est fréquent d'étudier ces coûts en comparant la valeur sélective (pouvant être assimilée en première approximation à la capacité de reproduction) de deux espèces hypothétiques : l'une utilisant la reproduction sexuée et l'autre la parthénogénèse, mode de reproduction qui aboutit à la formation d'individus clonaux.

### **1) Le coût du mâle ou le facteur 2**

Le premier et le plus important des coûts associés à la reproduction sexuée est appelé le « coût du mâle » ou encore le « facteur 2 ». Prenons deux espèces proches pour lesquelles une femelle produit systématiquement deux individus à chaque génération. Dans le cas de la parthénogénèse, la femelle donnera naissance à deux nouvelles femelles identiques. Dans le cas de la reproduction sexuée, la femelle donnera naissance à un mâle et à une femelle après fécondation par un mâle. Ainsi, la première femelle parthénogénétique aura quatre femelles identiques pour petits-enfants tandis que la première femelle sexuée ne trouvera qu'une femelle parmi ses petits-enfants. Cela étant vrai à chaque génération, la parthénogénèse présente donc un potentiel reproducteur deux fois plus élevé, aboutissant après dix générations à 1024 individus clonaux contre seulement une femelle dans le cas de la reproduction sexuée (Figure 1). Des modélisations informatiques confirment la supériorité de la parthénogénèse sur la reproduction sexuée. En effet, elles indiquent qu'une population sexuée d'un million d'individus deviendrait entièrement clonale, 50 générations après l'apparition d'une femelle réalisant la parthénogénèse. La reproduction asexuée, parce qu'elle ne produit pas de mâles, surpasse dans ce modèle la reproduction sexuée par son efficacité démographique (Otto et Lenormand, 2002; Stearns, 2013).

Cependant, ces modélisations sont à nuancer car elles prennent uniquement en compte les populations de femelles. En effet, la population sexuée produit à chaque génération un

mâle qui peut à son tour féconder des femelles et engendrer une descendance, non représentées sur la figure 1, augmentant ainsi la puissance démographique de cette population.



**Figure 1 : Illustration du coût du mâle**

Chaque femelle parthénogénétique (orange) donne naissance à deux femelles alors que chaque femelle sexuée (violet) donne naissance à un mâle et à une femelle. Une population parthénogénétique possède ainsi un potentiel reproducteur deux fois plus élevé qu'une population sexuée : après dix générations, la population parthénogénétique compte 1024 femelles alors que la population sexuée n'en compte qu'une seule.

Ce coût peut également être interprété d'un point de vue génétique comme le « coût de la méiose » : un gène présent chez une femelle sexuée a seulement une chance sur deux d'être transmis à sa descendance alors que cette probabilité est de 100% pour la femelle parthénogénétique. A cela s'ajoute également la coûteuse mise en place de structures anatomiques spécialisées dans la production des gamètes ainsi que les mécanismes de régulation de la méiose.

## 2) Le double coût du sexe : le soin aux jeunes

Chez les Mammifères, c'est le plus souvent seule que la femelle s'occupe des jeunes, les éduque et les nourrit pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. Durant cette période, elle utilise une grande partie de son temps et de ses ressources métaboliques à nourrir une descendance qui ne comprend que la moitié de son génome. Cet aspect s'avère être pénalisant d'un point de vue évolutif dans l'optique de transmettre le maximum de ses propres gènes à sa descendance. En parallèle, le mâle utilisera ces mêmes ressources pour sa croissance et sa survie, se soustrayant le plus souvent du soin aux jeunes (Smith, 1971, 1978). Il semble alors aberrant pour la femelle d'évacuer la moitié de son matériel génétique dans un globule polaire pour former un ovocyte haploïde, ultérieurement fécondé par un spermatozoïde au génome différent, pour ensuite s'occuper seule de cette descendance chimère : il s'agit du double coût du sexe. La seule contribution du mâle serait alors d'installer rapidement et efficacement la

moitié de ses gènes dans la cellule reproductrice femelle. Il s'agit là d'un véritable cas de parasitisme, comme le soulignait Cyril Darlington : « il n'y a pas loin de l'hérédité à l'infection ».

Cette notion doit être cependant modérée car pour une grande partie des espèces monogames (56% des Mammifères), les mâles sont investis dans la construction d'un abri (investissement pré-zygotique) ou dans l'alimentation de la progéniture (investissement post-zygotique). Cela conduit inévitablement à une augmentation de la valeur sélective de la progéniture et compenserait, au moins partiellement, le double coût du sexe (Lodé, 2011).

### **3) La triple peine**

Le dernier obstacle évolutif pouvant limiter la reproduction sexuée est une véritable lapalissade : il faut être deux pour s'accoupler. Il existe un paradoxe de taille car s'accoupler et donner une descendance suppose de trouver un partenaire différent, du sexe opposé mais suffisamment identique pour qu'il appartienne à la même espèce. Cette restriction est à l'origine d'un grand nombre d'adaptations morphologiques que l'on peut regrouper sous le terme d'hypertélie. Ce développement excessif d'organes outrepassant leur fonction initiale est très coûteux en terme développemental et semble s'opposer au principe de sélection naturelle : la queue démesurée et colorée du paon n'est pas un atout dans la lutte pour la survie. A cela s'ajoutent de nombreuses extravagances comportementales comme les parades amoureuses, par essence peu discrètes puisqu'elles permettent de signaler sa présence à de potentiels partenaires. Ces parades sont souvent précédées d'explorations territoriales qui augmentent l'exposition aux prédateurs et aux pathogènes, entraînant une diminution de la valeur évolutive de l'individu.

Mais le plus dur est encore à venir, il ne suffit pas de rencontrer un partenaire sexuellement mature et réceptif pour s'assurer d'une descendance, il faut également écarter les mâles compétiteurs et conserver l'accès aux femelles par le biais de combats souvent violents. Cette territorialité exacerbée aboutit le plus souvent à des joutes sanglantes : quel coût en énergie, en temps et en ressources ; quels risques démesurés pour ne transmettre que la moitié de son génome.



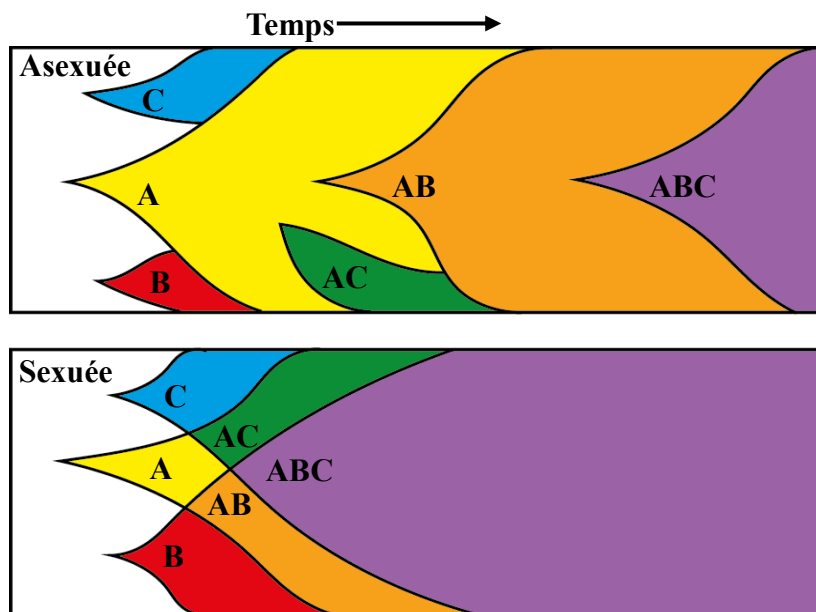
## **B) Comment expliquer le maintien de la reproduction sexuée ?**

Malgré les coûts très élevés associés à la reproduction sexuée, 95% des Eucaryotes pratiquent la sexualité. L'explication évolutive justifiant un tel mode de reproduction fait encore débat dans la communauté scientifique mais son avantage évolutif est reconnu de tous. En effet, il est inenvisageable que ce mode de reproduction, autant plébiscité dans le monde vivant, ne présente pas des avantages évolutifs extrêmement importants, comme l'écrivait déjà Erasmus Darwin, le grand-père de son célèbre petit-fils : «The larger and more perfect animals are now propagated by sexual reproduction only, which seems to have been the chef d'œuvre or capital work of nature » (Darwin, 1803). L'une des hypothèses les plus satisfaisantes pour expliquer le succès de la reproduction sexuée réside dans la création de diversité génétique par opposition à la multiplication clonale qui ne fait que reproduire à l'identique, aux mutations près.

De fait, la reproduction sexuée est caractérisée par trois phénomènes biologiques fondamentaux : la ségrégation et la recombinaison des allèles lors de la méiose puis leur réassociation lors de la fécondation. Ainsi, non seulement les descendants d'un couple se distinguent de leurs parents mais ils se différencient aussi les uns par rapport aux autres. Cette idée a été longuement développée par Augustes Weismann dans sa théorie de la diversité des pairs. Mais alors pourquoi une descendance génétiquement hétérogène présenterait une meilleure valeur sélective que des clones ? Quel pari risqué de casser les combinaisons alléliques de parents ayant réussi à survivre jusqu'à l'âge de leur maturité sexuelle. Aucun consensus n'est actuellement établi tant chaque hypothèse, intellectuellement satisfaisante, se heurte à la réalité des modélisations qui attestent souvent d'une supériorité de la reproduction asexuée. Cependant, les théories suivantes ne sont pas exclusives et la réalité semble être une combinaison conjointe de ces mécanismes évolutifs.

### 1) Combiner des mutations favorables et défavorables

Une première hypothèse formulée par Muller (Muller, 1932) met l'accent sur la puissance du brassage génétique pour disperser rapidement des mutations bénéfiques dans des populations sexuées, augmentant ainsi leur valeur adaptative. Pour illustrer ce modèle, Muller propose de comparer le temps nécessaire à l'apparition d'un génotype favorable ABC dans des populations clonales ou dans des populations sexuées. Ce temps est bien plus long pour les populations asexuées. En effet, elles doivent attendre l'apparition de trois mutations successives dans la même lignée contrairement aux populations sexuées qui effectuent un brassage génétique qui permet de recombinaison rapidement les trois mutations apparues dans des lignées indépendantes. De plus, dans ce modèle, l'apparition des mutations est un phénomène aléatoire indépendant du temps. Ainsi, l'apparition de 3 mutations successives dans une même lignée peut potentiellement prendre un temps infini et ne jamais se produire (Figure 2).

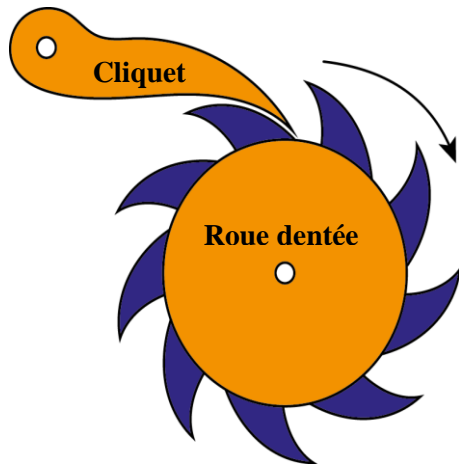


**Figure 2 : Temps nécessaire pour obtenir un génotype avantageux ABC dans des populations sexuées et asexuées, adapté de Muller (1932)**

*Dans une population asexuée (haut), trois mutations favorables apparaissent indépendamment et engendrent 3 lignées porteuses de ces mutations : les lignées A (jaune), B (rouge) et C (bleu). Au sein de la population A, une mutation B apparaît et donne une lignée AB (orange). L'obtention du génotype favorable ABC ne se fera que lorsqu'une ultime mutation C apparaîtra dans la lignée (violette). Ainsi, il faut attendre que trois mutations successives (A, B puis C) touchent une même population pour obtenir le génotype ABC.*

*Dans une population sexuée (bas), trois mutations favorables apparaissent indépendamment et engendrent 3 lignées porteuses de ces mutations : les lignées A (jaune), B (rouge) et C (bleu). La recombinaison génétique de ces lignées permet l'apparition rapide de populations porteuses conjointement des mutations AC (vert) et AB (orange). Ces deux nouvelles populations se recombinent à nouveau pour obtenir rapidement une population porteuse du génotype avantageux ABC (violette).*

Cependant, ce modèle est incomplet car les mutations qui apparaissent dans une population ne sont pas toujours bénéfiques, bien au contraire. Cette précision sera émise quelques décennies plus tard par Muller lui-même, en utilisant la métaphore de la roue crantée à cliquet (Muller, 1964). Ce principe énonce qu'une population clonale accumule de façon irréversible des mutations défavorables sans jamais pouvoir s'en débarrasser. Les crans de la roue représentent des mutations délétères si bien qu'à chaque passage du cliquet, la roue continue de tourner dans le même sens, sans jamais pouvoir revenir en arrière (Figure 3).



**Figure 3 : Principe de fonctionnement du cliquet de Muller**

*Le cliquet est un mécanisme qui empêche le retour en arrière de la roue dentée. D'après ce principe, une population clonale accumule de façon irréversible des mutations défavorables, représentées par les crans de la roue, sans pouvoir s'en débarrasser.*

Alexis Kondrashov et Harris Bernstein développeront cette idée dans les années 1980 en émettant la théorie de la « réparation – complémentation ». La reproduction sexuée serait alors un outil permettant de contrer l'accumulation de ces mutations délétères dans la population. Ainsi, partant de deux lignées possédant des mutations délétères, on peut obtenir en les recombinant une lignée sans mutation (Peters et Otto, 2003). Cette réparation possède effectivement un coût, celui d'engendrer des descendants défavorisés sur le plan évolutif car porteurs de toutes les mutations délétères. Néanmoins, la combinaison de ces théories ne permet pas de contrebalancer le coût évolutif du facteur 2 décrit précédemment (Ridley, 2000). Une autre hypothèse expliquant le maintien de la reproduction sexuée pourrait alors résider dans la résistance accrue aux pathogènes.

## **2) Alice de l'autre côté du miroir ou la résistance aux pathogènes**

Les pathogènes représentent l'une des causes principales de diminution de la valeur adaptative d'une population. Même s'ils ne tuent pas toujours leurs hôtes, l'infection diminue les capacités de reproduction de l'individu en détournant les ressources énergétiques dévolues aux parades nuptiales et au soin des jeunes. La reproduction sexuée permettrait d'augmenter la résistance aux pathogènes d'une population. Ainsi, la descendance génétiquement

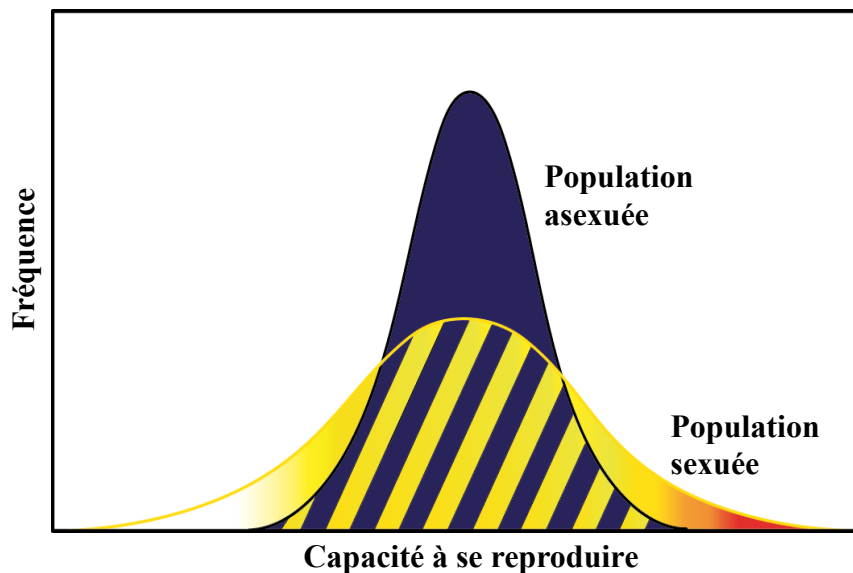
différente des parents serait une cible plus difficile pour des pathogènes adaptés au génotype majoritaire des parents. Il s'agit là d'une véritable « course aux armements » entre les adaptations défensives visant à endiguer les infections pathogènes et les adaptations offensives visant à augmenter la propagation et la virulence des pathogènes.

Cet aspect de co-évolution est au cœur de la théorie de la Reine rouge proposée par Leigh Van Valen en 1973 puis reprise quinze ans plus tard par Donald Hamilton et Marlene Zuk sous le nom d'« hypothèse de résistance » (Hamilton et al. 1990). Cette théorie, aujourd'hui largement acceptée de la communauté scientifique, fut refusée de tous les journaux scientifiques de l'époque. Le chercheur trouva alors une solution inédite pour contourner la fameuse barrière éditoriale en publiant son article dans un journal qu'il créa spécialement (Van Valen, 1973). Il fut le premier à utiliser l'image de la Reine rouge en référence à un épisode des aventures d'Alice dans « De l'autre côté du miroir » de Lewis Carroll. Dans une scène du livre, Alice se lance dans une course effrénée avec un personnage de jeu d'échec, la Reine rouge, qui explique alors : « ici, vois-tu, on est obligé de courir tant qu'on peut pour rester au même endroit. Si on veut aller ailleurs, il faut courir au moins deux fois plus vite ». En termes biologiques, l'analogie est frappante : même si l'environnement physique est en apparence constant, les espèces évoluent dans un environnement biotique en constante évolution. Dans cette course aux armements, le sexe apparaît comme une stratégie assurant une réponse rapide aux fluctuations et à la dynamique des populations de pathogènes. Bien que cette hypothèse soit vérifiée dans de très nombreux cas de terrain, il subsiste quelques ombres au tableau. Certains considèrent notamment que la majorité des infections pathogènes n'altère que trop peu la survie ou la fécondité des individus pour contrebalancer l'effet du facteur 2 (Gouyon, 2009).

### **3) Gagner à la loterie pour rejoindre sa « rive luxuriante »**

La dernière série d'hypothèses évolutives tentant d'expliquer le maintien du sexe invoque une fois de plus les avantages d'une descendance hétérogène mais cette fois-ci dans un environnement aux propriétés abiotiques changeantes. Michael Ghislin propose en 1974 l'hypothèse de la loterie selon laquelle chaque individu peut être tiré au sort pour devenir le nouveau génotype optimal dans un nouvel environnement. Il apparaît alors avantageux de produire une descendance variée sachant que quelques-uns seront parfaitement adaptés à un potentiel nouvel environnement. Une façon d'illustrer ce principe consiste à comparer la capacité à se reproduire d'une population sexuée et d'une population asexuée dans un environnement donné. Comme abordé précédemment, les individus de la population asexuée

sont génétiquement très semblables et présentent donc la même forte capacité à se reproduire par clonage. Au contraire, la diversité des individus de la population sexuée aboutit à la répartition suivante : la majorité des individus possède une capacité de reproduction moyenne alors que deux minorités apparaissent. Une première minorité d'individus aux capacités très faibles et une deuxième minorité d'individus aux excellentes capacités de reproduction. Admettons que la pression de sélection s'accroisse soudainement à cause d'une perturbation importante du milieu de telle sorte que seuls les individus au potentiel reproducteur excellent puissent se reproduire, on assistera alors à la persistance de la population sexuée et à l'extinction de la population asexuée dans ce nouvel environnement, incapable de se reproduire (Figure 4).



**Figure 4 : Illustration de l'hypothèse de la loterie, adapté de Williams, (1975)**

*Distribution d'une population sexuée (bleu) et asexuée (jaune) selon leur capacité à se reproduire. Les individus de la population sexuée présentent tous une bonne capacité de reproduction (bleu). L'hétérogénéité des individus de la population sexuée aboutit à des capacités mauvaises (blanc), bonnes (jaune) ou excellentes (rouge) de reproduction. Lors d'une perturbation importante du milieu, seuls les individus présentant une excellente capacité de reproduction donneront une descendance alors qu'aucun individu n'en sera capable dans la population asexuée.*

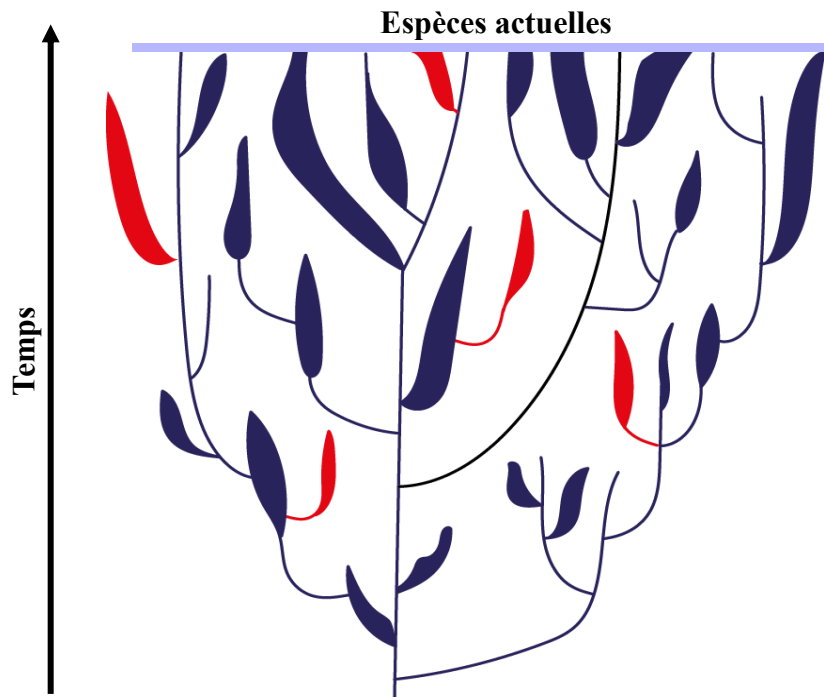
Dans la continuité de cette théorie est apparu le concept de la rive luxuriante (Burt, 2000). D'après ce concept, chaque individu posséderait une niche écologique idéale convenant parfaitement à son équipement génétique (encore faut-il trouver sa rive luxuriante par l'intermédiaire d'une perturbation du milieu ou par une migration). Un autre argument en faveur de ces théories est apporté par l'étude des compétitions interindividuelles : les individus d'une population hétérogène ne prélèveront pas les mêmes ressources dans le milieu alors que des individus asexués seront en compétition pour les mêmes besoins écologiques.

Des modélisations confirment effectivement une supériorité du sexe dans des milieux perturbés mais uniquement pour des habitats remaniés très fréquemment. Or de telles conditions, rarement retrouvées dans la nature, ne représentent qu'une part négligeable des biotopes colonisés par les espèces qui présentent une reproduction sexuée. Par ailleurs, on observe une prédominance des espèces asexuées dans des milieux très perturbés : près des pôles et aux hautes altitudes, leur aptitude de pionnier l'emportant face aux espèces sexuées (Burt, 2000). Enfin, des modélisations affirment que la supériorité de la forme sexuée dans le modèle de la loterie est assurée à condition que chaque femelle produise un nombre minimal de  $10^8$  descendants par génération. Ce dernier aspect est largement incompatible avec la reproduction de presque tous les organismes pluricellulaires sexués (Mallet, 2010).

Ainsi, Il s'avère délicat d'élaborer des modèles explicatifs suffisamment robustes pour expliquer le maintien de la reproduction sexuée à l'aide de considérations évolutives uniquement restreintes à quelques générations.

#### **4) Un crédit avantageux à long terme pour l'évolution des espèces**

Replacer la reproduction sexuée dans un cadre temporel plus large permet de mettre en lumière d'autres avantages inhérents à ce mode reproduction. En effet, il est nécessaire de considérer l'évolution des espèces et non pas uniquement celle de populations, et ce sur un temps suffisamment long afin de prendre en compte les phénomènes de spéciation et d'extinction. L'étude de la biodiversité actuelle et passée révèle que la reproduction asexuée a presque toujours existé mais qu'elle ne s'est jamais imposée comme mode de reproduction principal des différentes espèces. L'hypothèse développée par Gouyon en 1999 est la suivante : toute espèce peut devenir clonale lorsque des mutants parthénogénétiques apparaissent par mutation. Ces nouvelles espèces asexuées envahissent alors très rapidement les niches écologiques grâce à leurs fortes capacités démographiques, comme explicité précédemment. Néanmoins, elles s'avèrent être incapables de résister à long terme aux changements biotiques et abiotiques ce qui conduit à une extinction de l'espèce à brève ou moyenne échéance contrairement aux espèces sexuées (Figure 5). Cela est confirmé par les études de phylogénie qui attestent que les espèces asexuées actuelles sont apparues bien plus récemment que les espèces sexuées (Gouyon et Giraud, 2009a, 2009b). Il est tout de même à noter que la reproduction sexuée ne protège pas entièrement les espèces des extinctions lorsque les contraintes biotiques et abiotiques sont trop importantes.



**Figure 5 : Comparaison de la phylogénie d'espèces sexuées et asexuées**

*Les espèces asexuées (rouge) apparaissent par mutation au sein d'espèces sexuées (bleues) mais leur incapacité à s'adapter à un environnement changeant induit leur extinction à court ou moyen terme. Cela est confirmé par le jeune âge des espèces asexuées actuelles. Bien que certaines espèces sexuées s'éteignent, elles restent majoritaires grâce à leur capacité d'adaptation et de radiation évolutive.*

Ainsi, le maintien de la reproduction sexuée est permis par nombreux avantages qui contrebalancent les coûts importants qu'elle engendre. La rencontre de deux patrimoines génétiques lors de la fécondation est associée à de nombreux mécanismes sur lesquels s'exerce une forte pression de sélection ce qui explique qu'ils soient très conservés au sein d'une espèce considérée. Chez les Mammifères, cette rencontre est associée au développement de comportements et d'adaptations morphologiques dimorphiques qui participent à la réalisation de l'accouplement.

## **II. Sélection sexuelle et comportements associés**

Chez les Mammifères, le principe de la reproduction sexuée repose sur la rencontre et la fusion des gamètes mâles et femelles. Cette étape primordiale va conditionner une multitude de comportements et d'adaptations spécifiques à chaque espèce qui ont été soumis à la sélection sexuelle.

### **A) Il aura quand même fallu douze ans à Charles Darwin**

La sélection sexuelle est un processus de lutte entre individus de la même espèce pour un accès à la reproduction. Cette idée, apparue très tôt dans l'esprit de Charles Darwin, a pris une place croissante au sein de sa théorie de l'évolution. En effet, la sélection sexuelle n'occupe que quelques pages de la première version de *l'Origine des espèces* de 1858, qui est presque exclusivement consacrée à la sélection naturelle, alors que douze ans plus tard, 575 pages traitent de la sélection sexuelle dans un ouvrage intitulé *La filiation de l'Homme et la sélection liée au sexe*. Il distingue deux composantes majeures qui interviennent dans le processus de sélection sexuelle : l'affrontement entre mâles et l'attraction des femelles. Ces deux modalités s'effectuent grâce à des attributs comportementaux et morphologiques spécialisés, souvent très conservés au sein des espèces. Cela s'explique par le fait que les filles hériteront des critères de préférence de la mère tandis que les fils hériteront des attributs du père qui ont permis la fécondation de la mère. Encore un nouveau paradoxe : la reproduction sexuée crée de la diversité par recombinaison mais tend à uniformiser les comportements et les attributs par sélection sexuelle.

En considérant cette nouvelle force évolutive, les individus ne sont plus sélectionnés uniquement sur leur capacité de survie. Le fameux concept de « struggle for life », où ne survivent que les individus les plus forts et les plus rusés, n'est plus l'unique moyen de sélection : rien ne sert de courir, il faut se reproduire.

Quel intérêt évolutif à vivre vieux et heureux d'avoir déjoué tous les pièges de la nature si aucune descendance ne profite de ce bagage génétique performant? Il apparaît alors que l'évolution ne requiert finalement aucun mort mais simplement des amours plus ou moins contrariées qui donneront une descendance ultérieurement soumise à la sélection sexuelle. La fameuse formule de Lucien Cuénot « l'évolution c'est le hasard trié par la mort » pourrait alors être adaptée en « l'évolution c'est le hasard trié par l'amour ».



## **B) Dimorphisme et régime d'appariement**

Une des étymologies proposées pour le mot sexe, viendrait du latin « *secarer* » qui signifie « couper, diviser », en ce sens que l'acte de reproduction sexuée implique deux partenaires de genre différent. Effectivement, l'expression du comportement sexuel se base sur l'existence de différences phénotypiques entre un genre mâle et un genre femelle. Par convention, le mâle sera l'individu qui produit de petits gamètes mobiles en grand nombre, contrairement à la femelle qui produit peu de gamètes de taille importante et emplies de réserves. Cette propriété, appelée anisogamie est un des piliers de la séparation des sexes qui est au cœur des processus comportementaux permettant la sélection sexuelle. Ce dimorphisme sexuel est le plus souvent proportionnel à l'intensité de la compétition sexuelle au sein de l'espèce. C'est pourquoi les hypertélies les plus développées sont retrouvées chez les espèces polygynes (plusieurs femelles sont fécondées par un unique mâle) où la compétition est maximale. Cela est notamment le cas du Cerf élaphe, *Cervus elaphus*, qui présente comme hypertélie dimorphique, des bois très développés. Ce mode d'appariement est souvent associé à des luttes entre mâles permettant d'accéder seul aux faveurs d'un groupe de femelles.

Chez la souris commune, *Mus musculus*, comme chez la plupart des Rongeurs, le dimorphisme morphologique se résume quasiment aux seules différences génitales. Cette similarité morphologique entre mâles et femelles s'explique par le mode de reproduction polygynandre : ce régime de promiscuité copulatoire est caractérisé par une absence presque totale de règles de reproduction car chaque mâle féconde plusieurs femelles et chaque femelle est fécondée par plusieurs mâles.

L'impossibilité pour le mâle de monopoliser l'accès aux femelles favorise néanmoins le maintien d'adaptations, plus discrètes que celles du cerf élaphe, permettant d'accroître les chances de paternité. Cela est notamment le cas du bouchon vaginal formé par l'éjaculat durci du mâle dans le vagin de la femelle. Ce dispositif limite la compétition spermatique avec d'autres mâles en empêchant toute nouvelle copulation pendant une quinzaine d'heures ce qui correspond à la fenêtre temporelle de fertilité de la femelle. A cela s'ajoute la libération progressive et continue des spermatozoïdes à partir du bouchon vaginal ce qui permet d'augmenter la probabilité de gestation après un accouplement (Dean et al. 2011).

D'autres adaptations permettant d'accroître les chances de paternité sont dépendantes de l'olfaction, modalité sensorielle permettant de décrypter l'identité et le statut reproducteur des individus. On peut notamment citer l'effet Vandenberg (Vandenberg, 1969) : des femelles exposées à un mâle sexuellement mature présentent une avancée de leur premier

œstrus. Cet effet est reproduit par une simple exposition à la litière du mâle mature. De façon similaire, l'effet Whitten correspond à l'induction de l'ovulation par la seule signature olfactive d'un mâle sexuellement mature (Whitten et al. 1968). Certaines adaptations permettent quant à elles de diminuer le succès reproducteur des autres mâles notamment par l'effet Bruce (Bruce, 1959) selon lequel l'échec gestationnel est beaucoup plus élevé lorsque la femelle gestante est en présence d'un mâle étranger ou de son odeur. Ainsi, ces adaptations assurent au mâle ayant réussi à s'accoupler, une maximisation des chances de paternité dans un régime de promiscuité sexuel polygynandre.

### **C) Etudier le comportement sexuel à la lumière de Tinbergen**

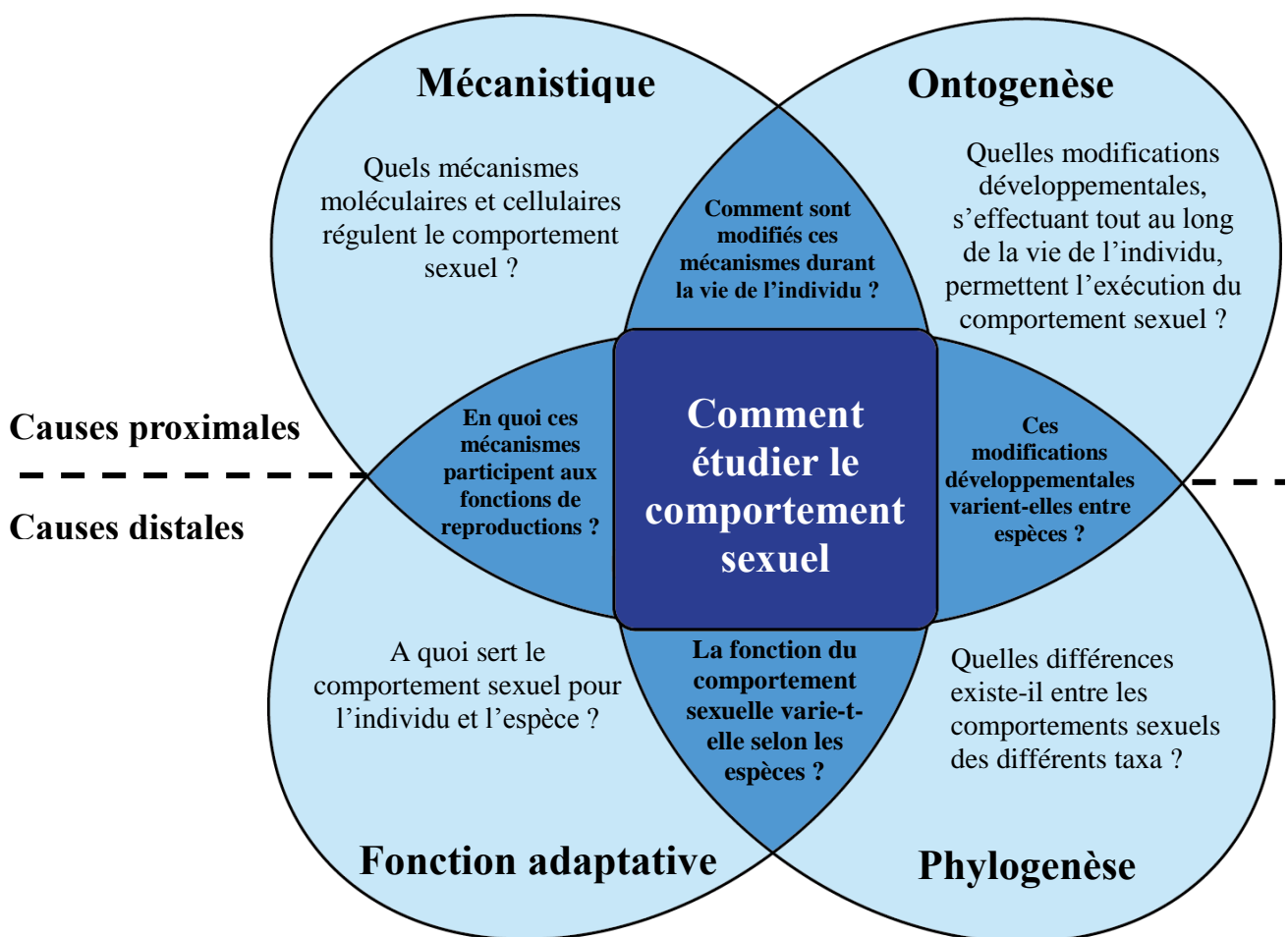
Le mode de reproduction polygynandre des souris implique une forte compétition entre mâles pour l'accès à la reproduction. Quelques mâles dominants jouissent d'un accès illimité à un groupe de femelles qui constitue une unité de reproduction consanguine appelée « dème ». Ce dème est en moyenne composé de trois mâles pour sept femelles. Certains mâles sont des célibataires itinérants jusqu'à ce qu'ils s'accouplent de manière fortuite avec des femelles de passage pour fonder un nouveau dème (Panthier, 2003).

Une fois l'accès aux femelles établi, le comportement sexuel entre mâle et femelle peut être initié. Du point de vue de l'expérimentateur, l'étude complète de ce comportement peut être appréhendée en répondant aux quatre questions définies par le fondateur de l'éthologie moderne Nikolaas Tinbergen (Tinbergen, 1963). Cette étude peut être divisée en deux séries d'interrogations. La première série concerne les causes proximales du comportement, c'est-à-dire « comment ça marche » grâce des approches moléculaires et développementales. La deuxième série d'interrogations concerne les causes distales du comportement, c'est-à-dire « pourquoi ce comportement existe et à quoi sert-il » à l'aide de réflexions sur l'origine phylogénétique du comportement et sur son implication dans les capacités adaptatives de l'individu et de l'espèce (Figure 6).

Dans les parties suivantes, l'accent sera essentiellement mis sur l'étude des causes proximales du comportement sexuel par une approche mécanistique. Ce travail de thèse s'intéresse aux modifications de ces mécanismes par l'expérience sexuelle et se situe donc à l'intersection de la mécanistique et de l'ontogenèse en répondant à la question : comment les mécanismes moléculaires et cellulaires de régulation du comportement sexuel sont modifiés durant la vie de l'individu ?

Les éléments uniquement liés à l'ontogenèse (comme l'expression dimorphique de certaines molécules) seront abordés dans l'introduction du premier article pour leur potentielle implication dans les mécanismes de plasticité induits par l'expérience sexuelle.

La fonction adaptative du comportement sexuel ne sera pas développée car sa fonction chez les Rongeurs est presque exclusivement restreinte au support de la reproduction sexuée. De façon similaire, les approches phylogéniques ne seront que brièvement abordées dans la discussion générale afin d'appuyer certains résultats obtenus dans le premier article.



**Figure 6 : Diagramme de Venn illustrant les quatre questions de Tinbergen adaptées à l'étude du comportement sexuel**

*L'étude des causes proximales (haut) par une analyse mécanistique et de l'ontogenèse, permet de répondre à la question « comment ça marche » alors que l'étude des causes distales (bas) par analyse de la phylogénèse et de la fonction adaptative permet de répondre à la question « à quoi sert ce comportement ». Il découle de l'étude de ces quatre domaines (bleu clair) de nouvelles interrogations positionnées à leur intersection (bleu foncé).*



# **Revue bibliographique**



# Chapitre 1

## Le comportement sexuel de la souris mâle

Les points développés dans les parties suivantes se réfèrent de façon majoritaire au comportement sexuel mâle. Néanmoins, le comportement sexuel de la femelle est tout aussi important dans la réussite de l'accouplement. En effet, la femelle accepte généralement de s'accoupler lors de sa période de fécondité qui coïncide avec l'ovulation. Le refus de s'accoupler pendant les autres moments du cycle ovarien est caractérisé par une fuite et un rejet du mâle qui s'accompagne de vocalisations et d'événements de « boxing ». L'ensemble de ces événements aboutissent alors à l'abandon de la copulation par le mâle (Johansen et al. 2008).

### I. Une séquence comportementale stéréotypée

Les différentes étapes qui composent le comportement sexuel de la souris mâle suivent un ordre précis et séquentiel qui aboutit *in fine* à l'émission des gamètes mâles dans le tractus génital femelle. Chez la souris, le comportement sexuel du mâle s'exprime sans restriction de saisonnalité ou de cyclicité. Il présente un comportement sexuel à chaque fois qu'il est en présence d'une femelle réceptive, sous réserve de ne pas être en période de désintérêt post-éjaculatoire.

#### A) Les étapes du comportement sexuel mâle

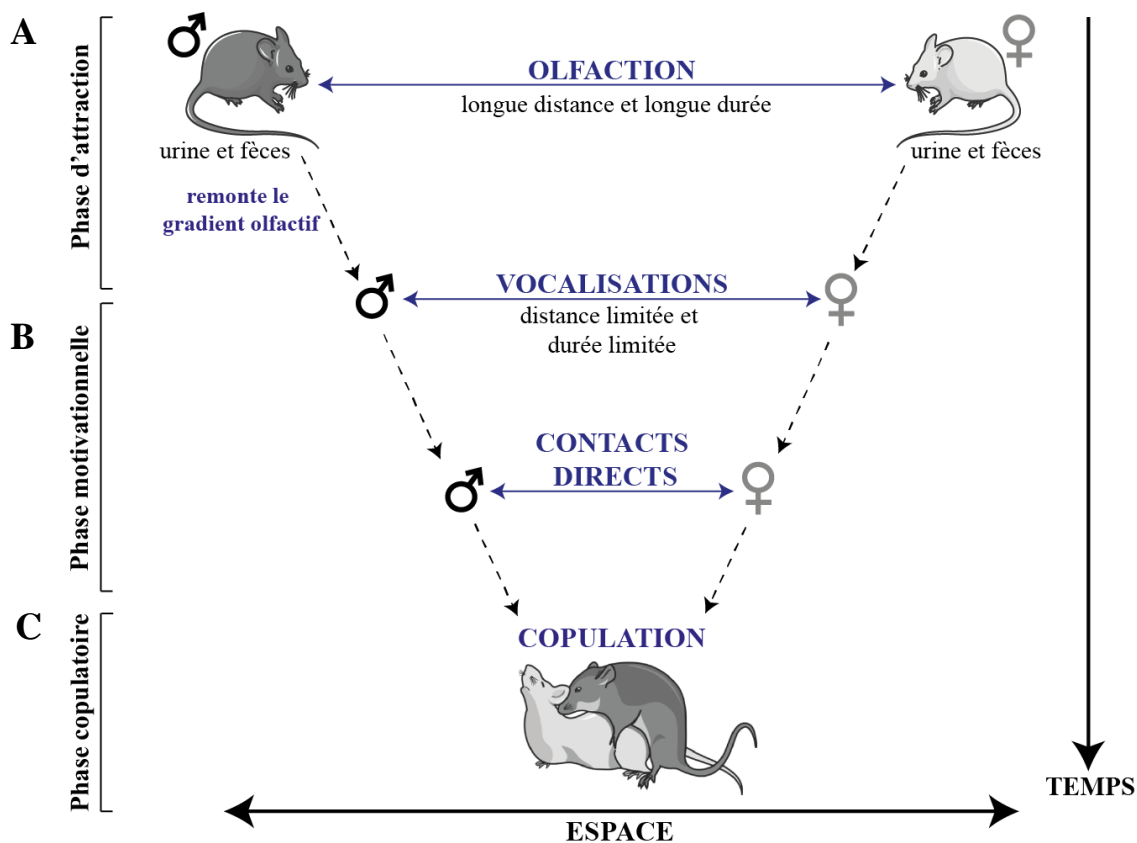
Le comportement sexuel est souvent divisé en trois phases par les éthologues : la première phase d'attraction des partenaires est suivie par la phase motivationnelle puis par la phase copulatoire qui correspond à l'accouplement lui-même (Thibault et Levasseur, 2001).

##### 1) La phase d'attraction

La phase d'attraction repose sur l'émission passive et active de signaux qui permet aux deux partenaires de se trouver simultanément au même endroit. Cette phase d'attraction fait généralement suite à une exploration du territoire souvent effectuée lors des périodes d'activité nocturne des Rongeurs. Chez la souris, cette phase repose presque exclusivement sur l'olfaction qui permet de détecter des marquages urinaires et des fèces riches en phéromones. Ces marquages donnent un renseignement spatial de très bonne résolution (un individu du sexe opposé est passé exactement à cet endroit) mais un renseignement temporel de faible précision (quand est-il passé ?). En effet, les signaux olfactifs s'estompent avec le

temps et se retrouvent disposés selon un gradient de concentration depuis la source d'émission. L'ensemble de ces molécules permettent de renseigner sur l'identité, le statut reproducteur et l'éloignement génétique des individus. Ainsi, lors de la phase d'attraction, le mâle présentera une investigation accrue pour un marquage olfactif appartenant à une femelle sans parasite, pubère (Ferrero et al. 2013), au statut hormonal proche de l'ovulation et éloignée génétiquement (Asaba et al. 2014; Pfaff et Joels, 2016).

Durant cette phase, le mâle va également émettre quelques vocalisations ultrasonores comprises entre 30 et 110 kHz. Ces vocalisations, déclenchées au contact de l'urine de femelle, permettent au mâle de signaler sa présence et possèdent un rôle attracteur vis-à-vis des femelles. Cette phase d'attraction aboutit donc à la présence simultanée du mâle avec une ou plusieurs femelles dans une zone restreinte, ce qui déclenche alors la deuxième phase du comportement sexuel : la phase motivationnelle (Figure 7A).



**Figure 7 : Succession des 3 phases du comportement sexuel de la souris mâle, adapté de Pfaff et al. (2008)**

(A) Lors de la phase d'attraction, la détection des molécules olfactives présentes dans l'urine et les fèces permet d'identifier la présence d'un individu du sexe opposé avec une résolution spatiale excellente mais avec une faible résolution temporelle. Le mâle remonte alors le gradient olfactif et émet quelques vocalisations ultrasonores qui permettent de signaler sa présence et d'attirer les femelles.

(B) Lors de la phase motivationnelle (pré-copulatoire), le mâle et la femelle sont à proximité et effectuent des investigations ano-génitales associées à des vocalisations ultrasonores.

(C) Lors de la phase copulatoire, le mâle effectue plusieurs montées comprenant des poussées pelviennes extra ou intra vaginales jusqu'à l'éjaculation.



## **2) La phase motivationnelle**

La phase motivationnelle, également appelée phase pré-copulatoire ou encore phase appétitive, représente l'étape durant laquelle s'exprime la motivation sexuelle. Cette phase regroupe l'ensemble des interactions entre le mâle et la femelle qui permettent l'initiation de la copulation à proprement parler. Durant cette phase, le mâle présente une augmentation importante de son activité locomotrice et entreprend des contacts directs avec l'ensemble des femelles à proximité. Il s'en suit alors une série d'investigations ano-génitales et faciales réciproques associés à des marquages urinaires. Le mâle va ensuite réaliser seul les flairages et les léchages allant souvent jusqu'à soulever le flanc de la femelle avec son museau lors d'épisodes de « rooting ». De nouvelles vocalisations ultrasonores sont émises avec des variations de fréquence et d'amplitude différentes de celles de la phase d'attraction. Leur signification n'est pas encore élucidée bien que leur rôle dans la facilitation du déclenchement du comportement sexuel soit établi (Asaba et al. 2014; Holy et Guo, 2005) (Figure 7B).

## **3) La phase copulatoire**

La phase copulatoire, également appelée phase consommatoire, commence avec la première montée du mâle sur la femelle réceptive. Le mâle maintient fermement la femelle par ses flancs et réalise plusieurs poussées pelviennes. La réussite de l'accouplement repose sur la réceptivité de la femelle qui s'illustre par la posture de lordose adoptée suite à la stimulation des flancs et du périnée lors des montées du mâle. La femelle s'immobilise, étend ses pattes arrière, soulève sa queue et adopte une cambrure du dos qui facilite les poussées pelviennes. Ces poussées pelviennes sont rapides (20Hz) lorsqu'elles sont extra-vaginales ou lentes (2Hz) et de grande amplitude lorsqu'elles sont associées à l'intromission du pénis dans le vagin. La montée s'achève après quelques dizaines de secondes et laisse place à des toilettages génitaux, reflets de l'intensité de l'érection (Collins et al. 2009). De nouvelles montées avec ou sans intromission se succèdent durant environ 30 minutes jusqu'à la dernière montée où s'effectue l'éjaculation, caractérisée par des poussées pelviennes de très faible amplitude et de haute fréquence (20Hz) suivies par une torpeur d'environ 20 secondes. Le mâle effectue alors de nouveaux toilettages et présente un désintérêt pour la femelle (Figure 7C).

#### **4) Le comportement post-éjaculatoire**

L'éjaculation provoque chez la souris un état de quiescence sexuelle. Cet état est bien documenté chez de nombreux Rongeurs comme le rat, *Rattus rattus*. Ainsi, on définit classiquement le temps entre une première éjaculation et une nouvelle montée comme l'intervalle post-éjaculatoire. Durant la première partie de cet intervalle, le mâle ne répond à aucun stimulus et présente un désintérêt total pour la femelle réceptive : il s'agit de la période réfractaire absolue. La deuxième partie de cet intervalle est appelée période réfractaire relative car sa durée peut être réduite par des stimulations électriques sous-cutanées (Barfield et Sachs, 1968) ou par l'introduction d'une nouvelle femelle réceptive (Zucker et Wade, 1968). Lorsque des rats s'accouplent sans restriction, ils atteignent généralement une dizaine d'éjaculations, séparées par des intervalles post-éjaculatoires de quelques minutes. Le rat rentre ensuite dans une période de satiété sexuelle totale qui dure plusieurs jours.

Ces paramètres sont difficilement applicables à la souris qui présente un comportement sexuel différent : contrairement au rat, il est rare d'observer plusieurs éjaculations lors d'un même comportement sexuel pour la plupart des souches de laboratoire. En effet, l'intervalle qui sépare deux éjaculations est en moyenne de 2 jours pour les souches DBA/2J et B6D2F (McGill et Tucker, 1964).

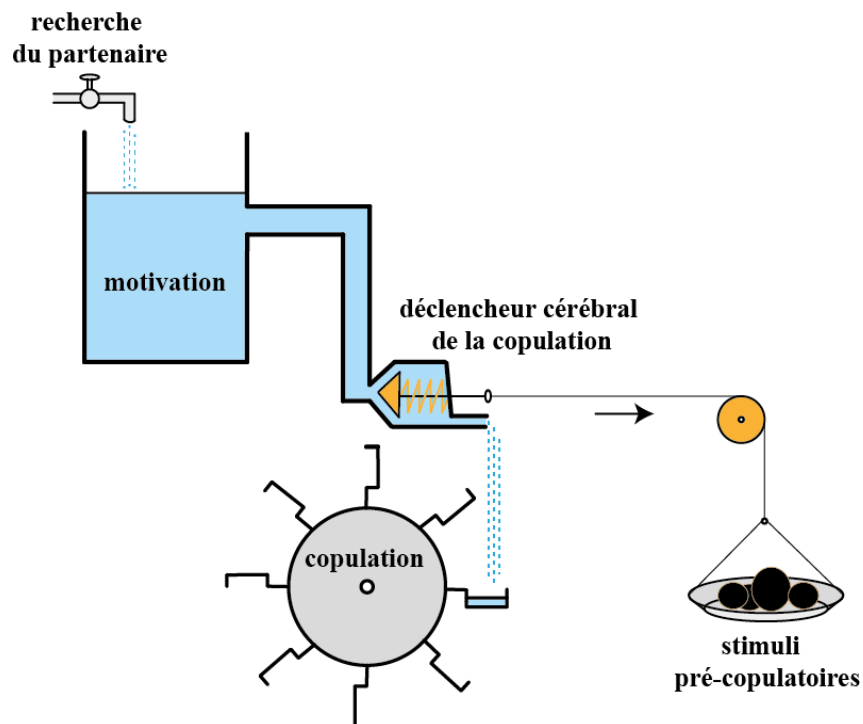
Il est cependant possible d'observer un deuxième accouplement quelques minutes après une éjaculation pour certaines souches comme les AKR/J ou les C3H/HeJ qui mettent respectivement 25 minutes et 45 minutes après une première éjaculation pour entreprendre une nouvelle copulation avec une nouvelle femelle (Mosig et Dewsbury, 1976). L'ensemble de ces observations indique qu'il existe au sein de la même espèce *Mus musculus* une certaine diversité de comportement de copulation associée à une variabilité inter-individuelle, comme cela sera développé partie II-B.

Pour la souche C57Bl/6J utilisée pour cette thèse, l'intervalle qui sépare deux éjaculations est en moyenne de 2 jours mais il peut s'étendre de 1 à 38 jours selon les individus (Mosig et Dewsbury, 1976). Cette caractéristique rend l'étude du comportement post-éjaculatoire difficile à caractériser tant la durée de l'intervalle post-éjaculatoire se confond avec la satiété sexuelle.

## **B) De la phase motivationnelle à la phase copulatoire**

Bien que les phases motivationnelles et copulatoires comprennent des actes moteurs bien différenciés qui se succèdent dans un ordre défini, les mécanismes permettant le passage d'une phase à l'autre sont encore débattus. Plusieurs modèles ont été proposés au cours des dernières décennies (Ball et Balthazart, 2008) dont notamment le modèle psycho-hydraulique de Konrad Lorenz (Lorenz, 1950).

D'après ce modèle, le passage de la phase motivationnelle à la phase copulatoire est irréversible. Le mâle suit la piste olfactive et auditive de la femelle lors de la phase d'attraction. Cette investigation augmente au fur et à mesure la motivation du mâle à s'accoupler, représentée par l'énergie potentielle de l'eau qui s'accumule dans un réservoir. Lors de la phase motivationnelle, les investigations ano-génitales et faciales très rapprochées se succèdent et finissent par déclencher un système cérébral de copulation qui ouvre le système hydraulique. Dès lors, à condition que la motivation ait atteint un seuil nécessaire, l'eau peut s'écouler et entraîner le mouvement d'une roue à aubes représentant la copulation dont les étapes séquentielles se succèdent sans retour en arrière possible (Figure 8).



**Figure 8 : Modèle psycho-hydraulique de Lorenz illustrant la transition entre phase motivationnelle et phase copulatoire, adapté de Lorenz (1950)**

*Le mâle suit la piste olfactive et auditive de la femelle lors de la phase d'attraction. Cette recherche du partenaire augmente sa motivation à s'accoupler, représentée par l'accumulation de l'eau dans le réservoir. Lors de la phase motivationnelle, les stimuli pré-copulatoires issus des investigations ano-génitale et faciales très rapprochées (poids déposés dans le plateau) se succèdent et finissent par activer le déclencheur cérébral de copulation. Cette activation ouvre alors le système hydraulique qui laisse l'eau s'écouler. Dès lors, l'eau peut entraîner le mouvement d'une roue à aubes représentant la copulation dont les étapes séquentielles se succèdent sans retour en arrière possible.*

D'autres modèles sont en désaccord avec cette vision comme notamment le modèle de Pfaus proposé en 1996 (Pfaus, 1996). D'après ce dernier modèle, la frontière entre phase motivationnelle et copulatoire n'est pas aussi nette : le mâle effectue des allers-retours entre ces deux composantes. Cela est notamment le cas lors des périodes qui entrecoupent les montées. Durant ces périodes, le mâle effectue des toilettages génitaux et des investigations olfactives qui assurent son maintien dans un état d'excitation permettant d'entreprendre de nouvelles montées. La perturbation du mâle durant ces périodes empêche la poursuite de la copulation. Cela indique que les étapes séquentielles de la phase copulatoire ne se succèdent pas toujours de façon irréversible comme les pales de la roue à aube du modèle de Lorenz.

Ainsi, bien que la réalité de la distinction entre la phase motivationnelle et la phase copulatoire ne soit pas encore tranchée, elle se révèle utile pour caractériser de façon reproductible le comportement sexuel et pour identifier les mécanismes neuroendocrines (potentiellement différents) qui régulent ces deux phases.

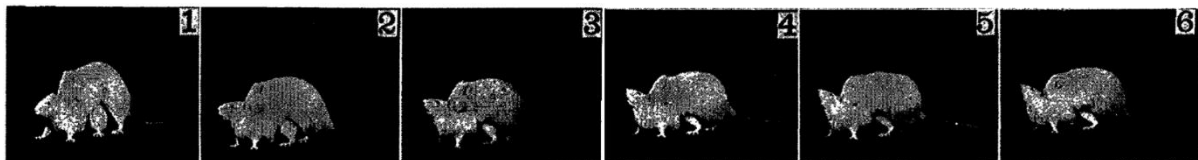
## II. Etude expérimentale du comportement sexuel

Un certain nombre d'outils, de méthodes et de conventions ont été développés afin de caractériser le comportement sexuel de différents modèles animaux utilisés en laboratoire.

### A) Approche historique de l'étude de la phase copulatoire

Les premières analyses de la phase copulatoire étaient obtenues suite à des observations réalisées en direct. Ce genre de méthode limitait le nombre d'animaux analysés et les résultats obtenus se révélaient être très dépendants de l'expérimentateur. De plus, il n'était pas possible d'analyser de façon précise les événements moteurs rapides comme le nombre de poussées pelviennes. La quantification relativement précise de ces mouvements rapides a été permise par le développement de la « cinématographie à haute vitesse ». Dès 1940, Stone et Ferguson (1940) ont filmé des rats en accouplement grâce à des caméras capables d'enregistrer 64 images par secondes. Le film obtenu était ensuite projeté à 16 images par secondes ce qui permettait de visionner le film au ralenti. Ce dispositif a notamment permis pour la première fois de définir la suite des événements moteurs qui se succèdent lors d'une montée avec intromission avec une précision de l'ordre de la dizaine de millisecondes.

Cette étude a également permis d'affiner les causes des intromissions ratées qui ont alors été imputés soit à un refus de la femelle soit à un raté dans le mouvement de poussée pelvienne du mâle (Figure 9).

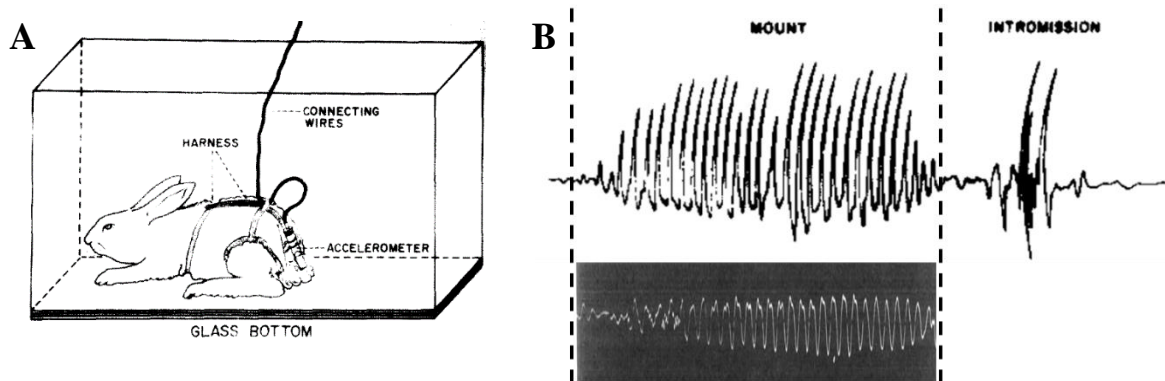


**Figure 9 : Premières analyses vidéo du comportement sexuel de rat réalisée avec une caméra haute vitesse (Stone et Ferguson, 1940)**

*Les rats sont filmés en accouplement avec une fréquence d'enregistrement de 64 images par seconde. Le film est ensuite projeté au ralenti à 16 images par seconde et permet d'étudier précisément et de façon individuelle les poussées pelviennes.*

Bien que l'utilisation de cette technologie ait été très novatrice pour l'époque, le nom de cinématographie haute vitesse ainsi que la qualité des images peut prêter à sourire tant les caméras grand public d'aujourd'hui permettent d'acquérir plus de 1000 images par seconde alors que les dispositifs de recherche fondamentale les plus perfectionnés acquièrent plusieurs milliards d'images par seconde (Nakagawa et al. 2014).

Comme cette technique d'enregistrement ne donnait pas suffisamment d'informations quantitatives sur certains aspects dynamiques du mouvement copulatoire comme par exemple la rythmicité ou la vitesse du mouvement, une méthode d'enregistrement par accéléromètre a été développée à la fin des années 70. Cette technique a été utilisée pour la première fois chez le lapin blanc néo-zélandais, *Oryctolagus cuniculus*, par Contreras et Beyer, (1979) : un harnais comportant un accéléromètre est placé sur le dos d'un lapin pendant l'accouplement. Les rapides changements d'accélération qui ont lieu lors des va-et-vient pelviens sont convertis par l'accéléromètre en un courant électrique analysé grâce à un oscilloscope ou un polygraphe. Cette technique présente l'avantage de déterminer de façon précise la durée, la fréquence et l'accélération des poussées pelviennes, même celles les plus brèves qui ne durent que quelques millisecondes. Il est également aisé de distinguer les différents types de montées avec ou sans intromission qui présentent des caractéristiques différentes (Figure 10).



**Figure 10 : Première étude du comportement sexuel du lapin réalisée en utilisant un accéléromètre (Contreras et Beyer, 1979)**

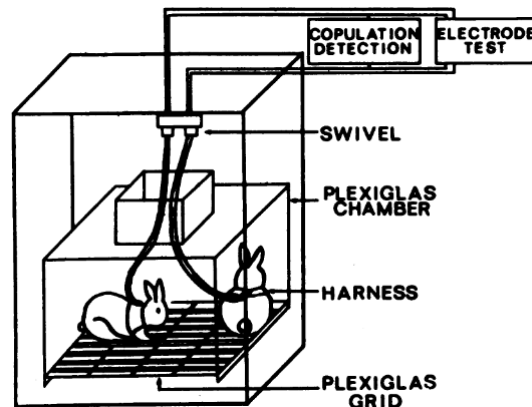
(A) Un harnais comportant un accéléromètre est disposé sur le lapin mâle puis relié à un oscilloscope ou un polygraphe.

(B) L'enregistrement obtenu par un polygraphe sur 4 secondes (haut) ou obtenu par oscilloscope (bas) permet de déterminer précisément la fréquence, l'accélération et la durée des poussées pelviennes dont les caractéristiques varient lorsque le mâle réalise une montée sans intromission (MOUNT) ou avec intromission (INTROMISSION).

Cette technique a été ultérieurement appliquée à l'étude du comportement sexuel du rat (Beyer et al. 1981), du Hamster doré, *Mesocricetus auratus*, (Arteaga et Morali, 1997) et de la souris (Moralí et al. 2003) ce qui a permis de révéler des différences importantes dans les séquences motrices de ces différentes espèces, jusqu'alors difficilement quantifiables par la seule analyse vidéo.

Une autre approche permettant l'étude complète de la copulation a été permise par la détermination de la durée exacte du contact entre le pénis et le vagin lors d'une intromission. Les pionniers du domaine, Peirce et Nuttall (1961), se sont intéressés à la durée du contact

génital lors de l'éjaculation chez le rat. Cette question a été ensuite étendue à l'étude de toutes les autres intromissions de l'accouplement chez le rat (Carlsson et Larsson, 1962) et chez le lapin (Rubin et Azrin, 1967). Cette technique d'enregistrement repose sur l'implantation d'électrodes sous-cutanées disposées sur le flanc de la femelle et du mâle. Le dispositif est ensuite relié par un harnais à un circuit électrique et à un oscilloscope qui est activé lorsque s'effectue un contact entre les parties génitales des deux partenaires. (Figure 11).



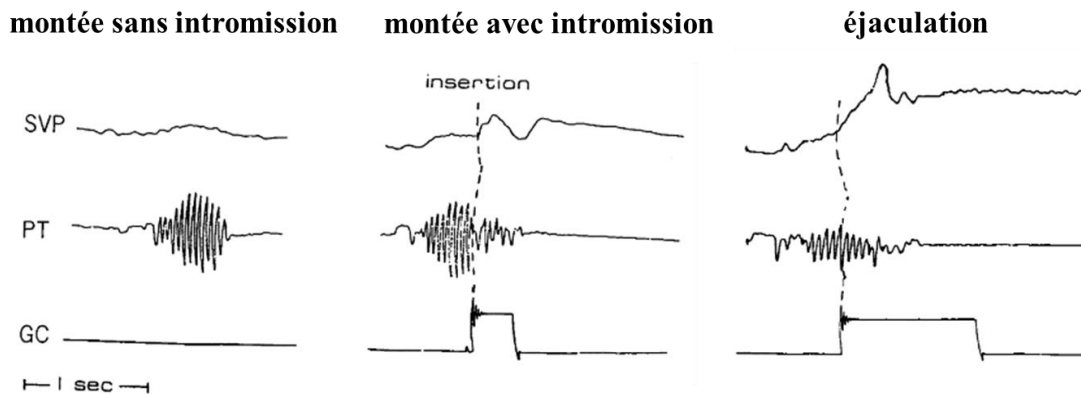
**Figure 11 : Détermination du temps de contact génital lors de l'accouplement de lapins grâce à l'implantation d'électrodes sous-cutanées (Rubin et Azrin, 1967)**

*Le mâle et la femelle sont placés dans une enceinte d'accouplement munis d'implants sous-cutanés reliés à un circuit électrique. Lors du contact pénis-vagin, le circuit électrique se ferme et permet le passage d'un courant imperceptible de faible intensité qui est ensuite enregistré au niveau d'un oscilloscope.*

Le passage du courant, provoqué par la fermeture du circuit électrique, est suffisamment faible pour ne pas être perceptible par les animaux. Une limitation de cette technique réside dans l'activation du circuit électrique par des contacts différents des parties génitales. En effet, l'enregistrement se déclenche aussi lors de contacts buccaux et lors de montées sans intromission ce qui explique que cette technique ait le plus souvent été utilisée en association à des enregistrements vidéos.

Alors que le développement de ces techniques a permis de caractériser les patterns copulatoires de façon précise, très peu d'informations étaient disponibles sur le fonctionnement des organes génitaux interne lors de l'accouplement. C'est pourquoi Beyer et al. (1982) ont développé l'enregistrement de la pression interne de la vésicule séminale afin de caractériser sa contraction lors des différentes phases de l'accouplement comme notamment lors de l'émission du liquide séminal. Ces mesures ont été réalisées *in vivo* suite à l'implantation d'un cathéter dans l'une des vésicules séminales d'un rat préalablement déplacée dans le dos afin de ne pas gêner la réalisation du comportement sexuel. Néanmoins, l'interprétation des résultats obtenus s'est révélée délicate à cause des augmentations de pression ayant lieu à de nombreux moments de la copulation et pas uniquement lors de l'émission du liquide séminal. En effet, les variations de cette pression interne se sont avérées

être régulées par des arcs réflexes complexes et indépendants les uns des autres, modulés par le système nerveux autonome. Ces difficultés d'interprétation ont conduit à l'utilisation d'enregistrements multiples qui ont nécessité de nombreuses mises au point et des appareillages parfois invasifs pour les animaux (Figure 12). Actuellement ce genre d'études est réalisée de façon plus précise et moins invasive par l'implantation de cathéters reliés directement à des dispositifs télémétriques sous-cutanés (Sung et al. 2015).



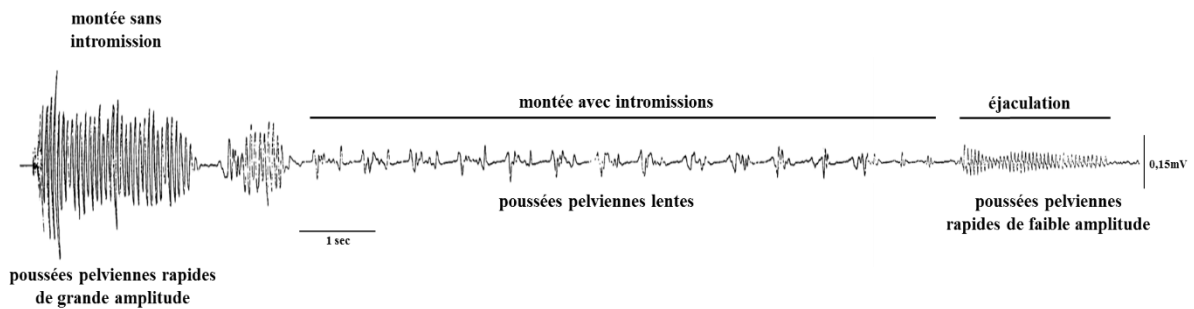
**Figure 12 : Etude de la copulation d'un rat par l'utilisation simultanée de trois techniques différentes, adapté de Beyer et al. (1982)**

La pression interne de la vésicule séminale (SVP), le pattern copulatoire obtenu par accéléromètre (PT) ainsi que la durée du contact génital (GC) sont enregistrés lors d'une montée sans intromission (gauche), lors d'une montée avec intromission (milieu) et lors d'une éjaculation (droite). La pression interne de la vésicule séminale augmente au moment de l'éjaculation mais également lors de l'intromission. Le tracé enregistré par l'accéléromètre est caractéristique de la copulation du rat : des mouvements rapides sont enregistrés lors des montées sans intromission alors que ces mouvements sont plus lents lors de l'intromission et de l'éjaculation. Les électrodes sous-cutanées indiquent quant à elles que le contact génital ne s'effectue que lors de la montée avec intromission et de façon prolongée lors de l'éjaculation.

Ce genre d'études multiples ont par la suite été appliquées au hamster, au Cochon d'Inde, *Cavia porcellus*, au rat (Moralí et al. 2003) mais n'a jamais été mis en place chez la souris à cause de sa taille ne permettant pas d'appareiller tous les instruments de mesure simultanément.

Seuls des enregistrements établis par accéléromètre ont été effectués sur un nombre très limité de souris dont la souche n'est pas connue (Wang et al. 1989) : lors des montées sans intromission, la fréquence des poussées pelviennes extra-vaginales est rapide (22-25 Hz) et l'amplitude du mouvement est élevée (0,6mV). Lors des montées avec intromissions, la fréquence des poussées pelviennes intra-vaginales ralentit à une fréquence de 2Hz avec une faible amplitude de 0,1mV. Cette phase de montée avec intromissions dure plusieurs dizaines de secondes et est suivie par l'éjaculation qui est associée à de nouvelles poussées pelviennes intra-vaginales rapides (22-25 Hz) et de faible amplitude (0,05mV) difficilement observables à l'œil nu (Figure 13).





**Figure 13 : Pattern copulatoire de la souris mâle obtenu par accéléromètre, adapté de Moralí et al. (2003)**

*La souris effectue des poussées pelviennes très rapides (22-25 Hz) lors de la montée sans intromission. Elles sont suivies par des poussées pelviennes rythmiques plus lentes (2 Hz) lors de la montée avec intromissions qui dure plusieurs dizaines de secondes. L'éjaculation est caractérisée par de nouvelles poussées pelviennes intravaginales rapides (22-25 Hz) mais de faible amplitude.*

Toutes ces études ont apporté de nombreuses informations utiles à la caractérisation précise des séquences copulatoires. Néanmoins, elles ont été progressivement remplacées par l'utilisation presque exclusive d'enregistrements vidéo permettant aussi la caractérisation des poussées pelviennes sans nécessiter la délicate mise en place d'un accéléromètre sur la souris.

Ainsi, les études actuelles se focalisent essentiellement sur l'analyse vidéo des paramètres associés aux phases motivationnelles et copulatoires. La première de ces phases est souvent caractérisée par l'étude du temps passé à renifler la femelle ainsi que par le temps nécessaire à initier la première montée sans intromission ou la première montée avec intromissions. Ces paramètres sont classiquement interprétés comme des reflets de la motivation sexuelle (Fiorino et Phillips, 1999). La phase copulatoire est souvent analysée en termes de performance. Cette performance est estimée par un ensemble de paramètres comme le nombre de montées avec ou sans intromissions, le nombre de poussées pelviennes ou encore la durée nécessaire pour éjaculer.

## **B) Différences de comportement sexuel entre la souris et le rat**

Le rat et la souris sont les deux animaux modèles les plus utilisés pour les études du comportement sexuel en laboratoire. Il arrive parfois que le comportement sexuel des Rongeurs soit décrit de façon unique comme une succession de montées et d'intromissions aboutissant à l'éjaculation. Cependant, les comportements sexuels mâles de ces deux Rongeurs présentent des différences importantes. Alors que la phase motivationnelle est globalement similaire avec la réalisation de marquages urinaires, d'investigations anogénitales et de vocalisations ultrasonores, le déroulé de la phase copulatoire présente des

distinctions majeures. En effet, lors d'une montée avec intromission, le rat s'immobilise pendant environ 300 ms et ne réalise aucune poussée pelvienne intra-vaginale. Cela diffère du comportement de la souris qui réalise des dizaines de poussées pelviennes intra-vaginales. C'est pour cette raison qu'on applique le terme de « montées avec intromission » pour le rat (au singulier) et de « montée avec intromissions » pour la souris (au pluriel).

Une autre différence importante est retrouvée dans le comportement vis-à-vis de l'éjaculation, comme cela a déjà été abordé précédemment (chapitre 1, partie I-A-4). Après une dizaine de montées avec intromission, le rat réalise une montée avec intromission qui aboutit à une éjaculation. Cette éjaculation déclenche un intervalle post-éjaculatoire de toilettes et de désintérêt pour la femelle qui dure environ 5 à 10 minutes. Le mâle recommence ensuite la même séquence comportementale (succession de montées avec intromission) jusqu'à atteindre une nouvelle éjaculation. Après une dizaine d'éjaculations, le mâle entre dans une phase de satiété sexuelle qui dure plusieurs jours. Cela diffère du comportement de la souris qui ne réalise (la plupart du temps) qu'une seule éjaculation avant d'entrer dans la phase de satiété sexuelle (Beyer et al. 1982; Hull et Dominguez, 2007).

### **C) Différences de comportement sexuel entre les lignées de souris**

Bien que le comportement sexuel des souris mâles présente une succession d'étapes largement conservées au sein de l'espèce, de nombreuses différences existent entre les souches de souris couramment utilisées en laboratoire comme présenté dans le Tableau 1. De façon générale, les souris mettent quelques minutes pour initier la première montée sans intromission et la première montée avec intromissions (de 0,7 à 10,2 minutes). Il s'en suit une dizaine de montées avec intromissions (de 5 à 142) séparées par des intervalles inter-intromission de quelques dizaines de secondes (0,46 à 2,28 minutes). L'éjaculation, caractérisée par une torpeur d'environ 15 secondes (13 à 25,8 secondes), est déclenchée après plusieurs dizaines de minutes (18,2 à 116 minutes) durant lesquelles sont effectuées plusieurs centaines de poussées pelviennes (11 à 1435). Bien que ces lignées appartiennent à la même espèce, il existe parfois des différences très importantes pour un paramètre selon la lignée considérée. Cela est notamment le cas du nombre de poussées pelviennes réalisées durant l'accouplement (NbPP) allant de 11 pour la souche AKR/J x DBA/J à plus de 1400 pour la souche C3H/HeJ.

Une autre difficulté réside dans l'existence de grandes différences, variant souvent du simple au double, pour la même lignée selon l'étude considérée. Ainsi, un mâle de la lignée AKR/J, nécessite plus de 600 poussées pelviennes réparties sur une heure pour atteindre l'éjaculation d'après Mosig et Dewsbury (1976), contre seulement 376 poussées pelviennes réparties sur 36 minutes d'après McGill et Ransom (1968). Ces différences peuvent s'expliquer par des approches expérimentales légèrement différentes mais également par l'expression des résultats sous forme de médiane, qui dépend fortement du nombre d'animaux utilisés.

Souche	LM	LI	NM	NMI	III	PP/I	NbPP	DA	DE	Références
Souris sauvage	10,2	10,6	x	x	2,25	22	190	14,7	25,8	Estep et al., 1975
C57BL/6J	0,7	1,7	18	17	0,46	16	400	20,9	23	] McGill and Blight, 1963
DBA/2J	1,4	3	16	5	2,28	20	129	23	17	
C57BL/6J x DBA/2J	0,7	1,6	7	18	0,7	19	546	18,2	19	] McGill., 1962
BALB/c	1	1,9	18	36	0,93	14	621	60	13	
C3H/HeJ	4,6	6,3	12	142	0,7	12	1435	116	14	] Mosig and Dewsbury, 1976
AKR/J	1,87	2,3	8	47	0,9	12	623	59	14	
AKR/J	1,22	3,2	55	32	0,6	10	376	36	13	] McGill and Ransom, 1968
AKR/J x DBA/J	1,25	2,2	20	39	0,5	22	11	28,3	14	

**Tableau 1 : Comparaison des paramètres du comportement sexuel mâle de différentes souches de souris, adapté de Burns-Cusato et al. (2004); Estep et al. (1975); McGill (1962); McGill et Blight (1963); McGill et Ransom (1968); Mosig et Dewsbury (1976)**

Les valeurs affichées correspondent aux médianes exprimées en minutes excepté pour la DE qui est exprimée en secondes.

LM = latence de première montée : temps nécessaire au mâle à partir de l'introduction de la femelle pour réaliser la première montée sans intromission.

LI = latence de première montée avec intromissions : temps nécessaire au mâle à partir de l'introduction de la femelle pour réaliser la première montée avec intromissions

NM = nombre de montées sans intromission

NMI = nombre de montées avec intromissions

III = Intervalles inter-intromission : temps séparant deux montées avec intromissions

PP/I = poussées pelviennes par intromission : nombre de poussées pelviennes réalisé lors d'une montée avec intromissions

NbPP = nombre total de poussées pelviennes réalisé au cours de l'accouplement complet

DA = Durée d'accouplement : temps séparant la première montée avec intromissions de l'éjaculation

DE = Durée d'éjaculation : temps de torpeur post-éjaculatoire

Malgré ces imprécisions, il apparaît consensuel que la souche C57Bl/6J, modèle animal utilisé pour cette thèse, est caractérisée par une initiation et une réalisation rapide du comportement sexuel ainsi que par des intervalles inter-intromission courts. Cette lignée présente également une durée d'éjaculation relativement longue, permettant la détection de l'éjaculation sans ambiguïté.

Ainsi, le comportement sexuel de la souris est composé d'une phase d'attraction, d'une phase motivationnelle et d'une phase copulatoire. L'éjaculation unique aboutit à une phase de satiété sexuelle caractérisée par un désintérêt pour la femelle. Cette séquence comportementale, qui varie selon le modèle animal et la souche étudiée, est déclenchée et modulée par des stimuli sensoriels.

Le contrôle de ce comportement complexe est assuré par des régulations nerveuses et endocrines. Ces régulations mettent en jeu des structures cérébrales spécialisées et des tissus périphériques impliqués dans les fonctions de reproduction.

## Chapitre 2

# Régulations nerveuses et endocrines du comportement sexuel mâle

La réalisation du comportement sexuel met en jeu de nombreuses structures cérébrales, spinales et périphériques qui assurent l'intégration des différentes modalités sensorielles ainsi que la réalisation précise et séquentielle de la séquence comportementale. La participation de ces différents acteurs est finement régulée par des structures nerveuses et endocrines spécialisées.

### I. Circuits cérébraux impliqués dans le contrôle du comportement sexuel mâle

Plusieurs techniques ont permis d'identifier les participations relatives des différentes aires cérébrales impliquées dans le contrôle du comportement sexuel. Il s'agit notamment d'études de cartographie établies suite à la détection de gènes d'activation précoce et d'études de micro-lésion et de micro-stimulation pharmacologique ou électrique.

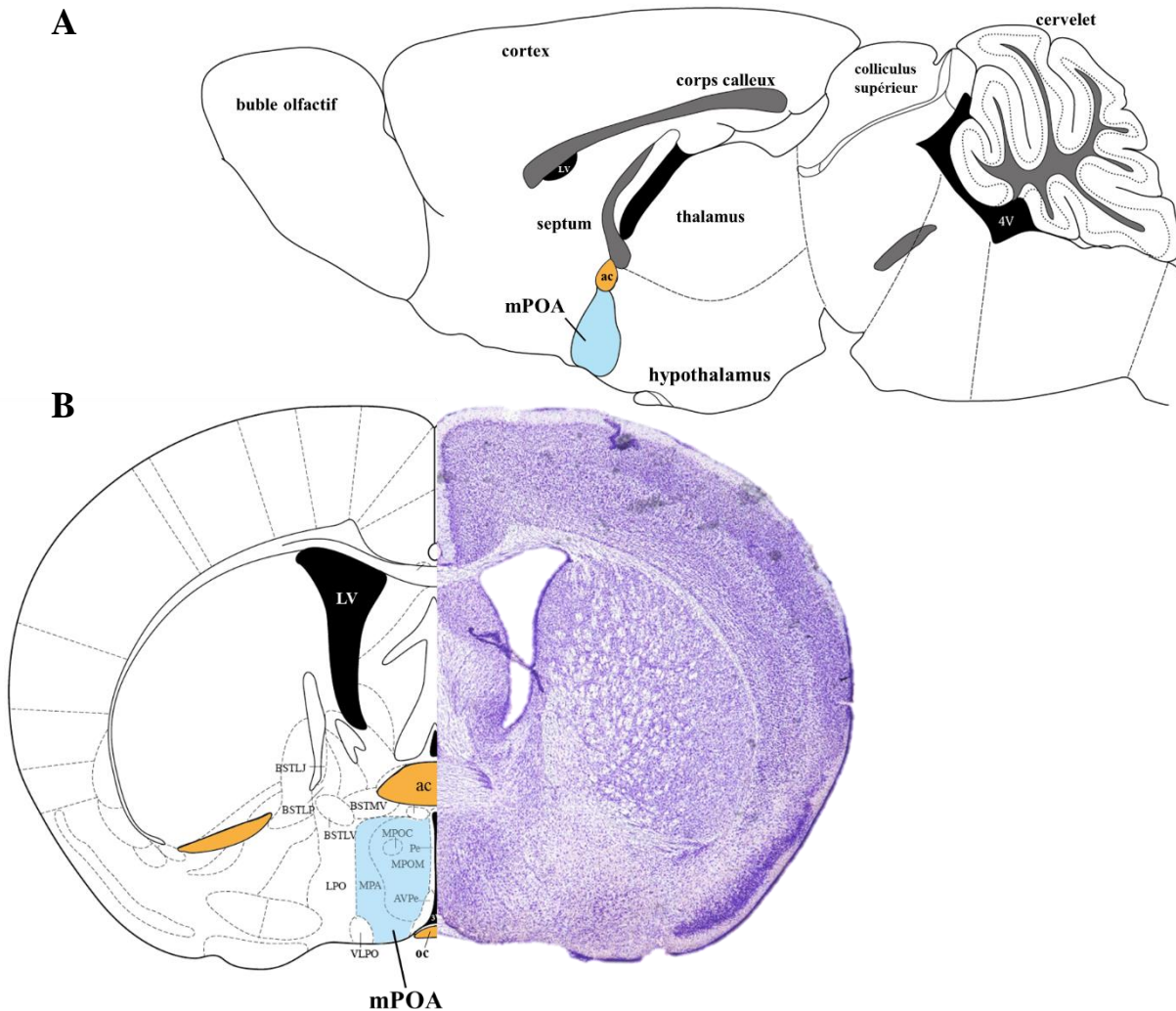
#### **A) L'aire pré-optique médiane (mPOA) : centre intégrateur**

L'aire pré-optique médiane (mPOA) est la principale région cérébrale impliquée dans le contrôle du comportement sexuel mâle. Son implication a été démontrée chez la totalité des espèces de vertébrés étudiées (Pfaff et Joels, 2016).

##### **1) Localisation de la mPOA**

Cette aire se situe dans l'hypothalamus antérieur entre la commissure antérieure et le chiasma optique, de part et d'autre du troisième ventricule. Néanmoins, sa localisation exacte chez la souris s'avère délicate à cause de l'absence de marqueur moléculaire spécifique à cette région. De plus, la coloration de Nissl ne permet pas d'identifier clairement les sous-noyaux de cette aire, comme le SDN (sexually dimorphic nucleus) facilement identifiable chez le rat.

Cela explique en partie le fait que les atlas stéréotaxiques et les études de la littérature n'utilisent pas la même dénomination des sous-régions de l'aire pré-optique. La référence prise pour cette thèse est basée sur la seconde édition de l'atlas de Paxinos et Franklin, (2004) comme illustré Figure 14.



**Figure 14 : Localisation de l'aire pré-optique médiane (mPOA) chez la souris, adapté de Paxinos et Franklin (2004) et de Allen Mouse Brain Atlas**

(A) Localisation de la mPOA (bleu) sur une coupe sagittale de cerveau de souris. La mPOA se situe entre l'hypothalamus antérieur, ventralement positionnée par rapport à la commissure antérieure (ac).

(B) Localisation de la mPOA (bleu) sur une coupe coronale de cerveau de souris. La mPOA se situe dans entre la commissure antérieure (ac) et le chiasma optique (oc) de part et d'autre du troisième ventricule. La mPOA est constituée de plusieurs sous-régions comme notamment la MPOC (medial preoptic nucleus central part), la MPOM (medial preoptic nucleus medial part) ou encore la MPA (medial preoptic area, lato sensu).

## 2) Expériences de lésions de la mPOA

La lésion électrolytique de la mPOA abolit tout comportement sexuel chez le rat (Ågmo et al. 1977). Des lésions restreintes aux différentes sous-régions aboutissent à des altérations des différentes phases du comportement sexuel qui varient selon le modèle animal (Hull et al. 2002). Cette variété de réponse explique l'absence de consensus actuel quant au rôle précis des différentes sous-régions de la mPOA dans le contrôle du comportement sexuel (Balthazart et Ball, 2007; Paredes, 2003). Un modèle élaboré chez la caille propose une distinction fonctionnelle entre les parties antérieures et postérieures de la mPOA. La phase motivationnelle serait majoritairement régulée par la partie rostrale alors que la phase

copulatoire serait majoritairement régulée par la partie caudale de la mPOA (Balthazart et Ball, 2007). Cependant, les données des littératures obtenues chez les Rongeurs ne confirment pas toujours ce modèle (Paredes, 2003).

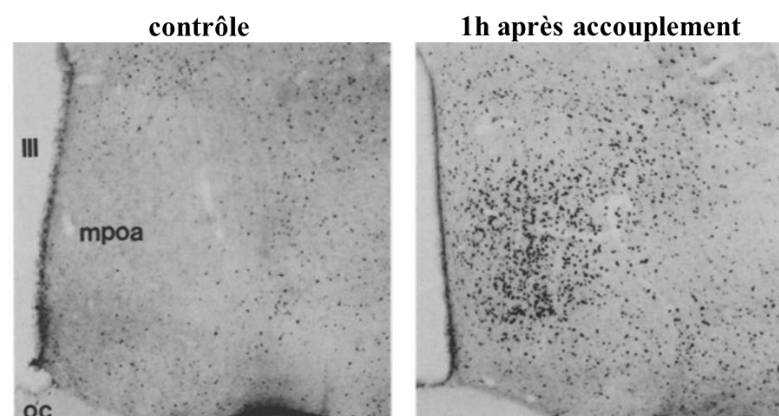
De façon intéressante, aucune récupération fonctionnelle n'a été observée suite à des lésions de la mPOA, en ce sens qu'aucune autre aire cérébrale n'est capable de compenser le rôle joué par la mPOA dans le contrôle du comportement sexuel que ce soit après plusieurs mois de récupération ou suite à des protocoles de stimulation électrique ou pharmacologique.

### **3) Stimulations de la mPOA**

De façon opposée aux protocoles de lésion, la stimulation électrique de la mPOA facilite l'exécution du comportement sexuel chez la plupart des Rongeurs testés (Malsbury, 1971; Merari et Ginton, 1975; Rodríguez-Manzo et al. 2000) et stimule l'érection chez le rat (Giuliano et al. 1996). De nombreuses études se sont intéressées aux effets de stimulations pharmacologiques de la mPOA et à leurs effets sur le comportement sexuel. Les résultats de ces travaux seront détaillés dans la partie II de ce chapitre.

### **4) Enregistrement de l'activité de la mPOA**

Afin de déterminer l'implication d'une zone cérébrale dans un comportement donné, il est possible d'estimer son activité en détectant le produit des gènes d'activation précoce suite à la réalisation de ce comportement. c-Fos est un de ces marqueurs connu pour voir son expression augmentée 60 à 90 minutes après l'activation de la zone cérébrale d'intérêt (Watts et al. 2006). Au niveau de la mPOA, l'accouplement induit une importante augmentation des niveaux de c-Fos chez le rat (Baum et Everitt, 1992) (figure 15).

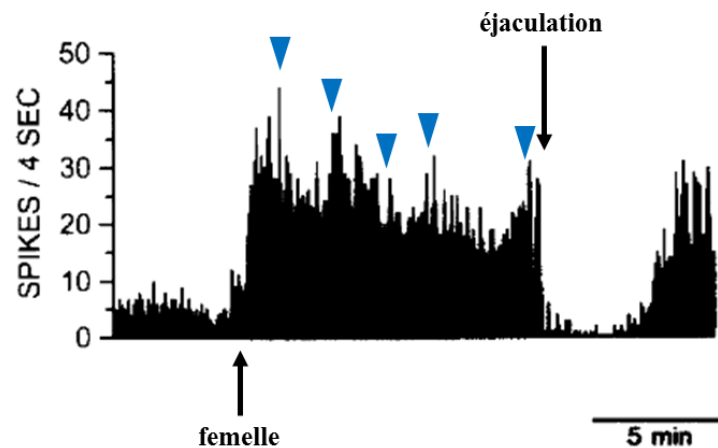


**Figure 15 : Activation de la mPOA estimée par détection de c-Fos dans la mPOA de rat, adapté de Baum et Everitt (1992)**

*IHC détectant c-Fos dans la mPOA de rat sacrifié sans contact avec une femelle (contrôle) ou une heure après éjaculation (1h après accouplement). L'accouplement induit une activation de la mPOA observable par l'augmentation du nombre de cellules c-Fos immuno-réactives.*

Cette activation de la mPOA, estimée par c-Fos, est retrouvée dès que le mâle est placé en présence d'une femelle réceptive mais elle est maximale lorsque l'accouplement aboutit à l'éjaculation.

Une autre technique permettant d'estimer l'activation de la mPOA consiste à réaliser des enregistrements électro-physiologiques de l'activité électrique de groupes de cellules de lors de la copulation (Horio et al. 1986; Shimura et al. 1994). Il apparaît que la mPOA est globalement activée lors des différentes composantes comportementales de la copulation. Cependant, les différents groupes de cellules enregistrés sont activés préférentiellement pour un type de comportement donné. Ainsi, certains groupes de cellules sont activés lors d'épisodes de poursuite, de montée, d'intromission ou d'éjaculation. L'activité électrique globale est ensuite fortement diminuée après l'éjaculation (Figure 16).



**Figure 16 : Activité électrique de la mPOA de rat enregistrée durant un accouplement, adapté de Shimura et al. (1994)**

*Enregistrement extracellulaire d'un groupe de cellules (MUA : multi unit activity) de la mPOA lors de la copulation d'un rat. Ce groupe de cellules présente une augmentation importante de son activité électrique de l'introduction de la femelle jusqu'à l'éjaculation. Les niveaux maximum d'activité sont associés aux montées avec intromission (triangle bleu).*

La mPOA joue donc un rôle très important dans la régulation cérébrale de la phase motivationnelle et copulatoire du comportement sexuel. Cette implication s'explique notamment par sa position centrale dans le circuit neuronal contrôlant ce comportement.



## **B) Les afférences projetant sur la mPOA**

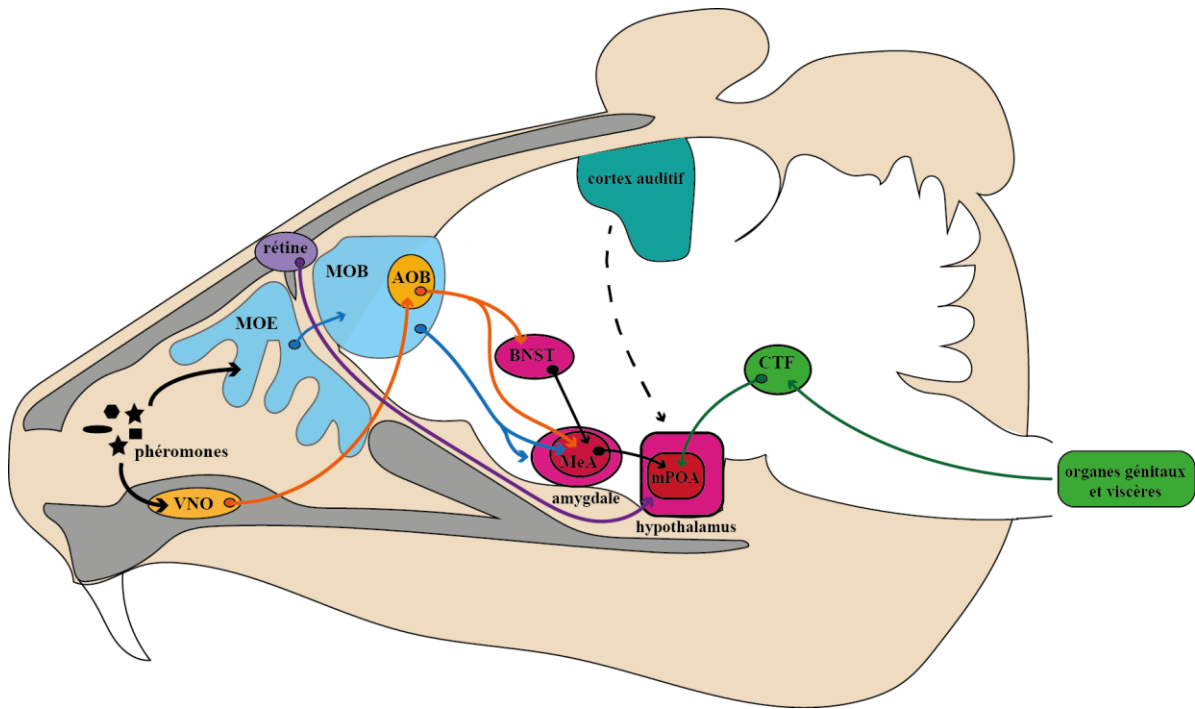
La majorité des afférences reçues par la mPOA proviennent de systèmes sensoriels. L'identification des différentes afférences a été obtenue suite à des études de traçage histologique, de micro-lésion et de détection de gènes d'activation précoce.

### **1) Le système olfactif**

L'olfaction est la modalité sensorielle la plus développée chez les Rongeurs. Cela s'explique notamment par le mode de vie essentiellement nocturne de la plupart des espèces. Ce système repose sur la détection de molécules odorantes classiquement distinguées en molécules volatiles et non-volatiles. On trouve parmi ces très nombreuses molécules une famille regroupée sous le nom de phéromone. Le terme phéromone a été défini par Karlson et Luscher (1959) comme une substance sécrétée provoquant le déclenchement ou la modulation d'une réponse comportementale ou développementale d'un autre individu de la même espèce. Retrouvées dans la majorité des sécrétions corporelles (salive, larme, urine, fèces), les phéromones permettent de renseigner sur le genre, l'âge, le statut hormonal et physiologique de l'individu. Cela explique le rôle central joué par la détection de ces molécules dans le déclenchement et la modulation du comportement sexuel mâle (Tirindelli et al. 2009).

Les phéromones sexuelles sont détectées au niveau de deux groupes de neurones chimio-sensoriels localisés dans deux régions anatomiques distinctes : l'organe voméronasal (VNO) et l'épithélium olfactif principale (MOE). Les neurones de l'organe voméronasal projettent vers le bulbe olfactif accessoire (AOB) qui innerve l'amygdale médiane (MeA) directement ou après un relais au niveau du noyau du lit de la strie terminale (BNST). Les neurones de l'épithélium olfactif principal projettent quant à eux vers le bulbe olfactif principal (MOB) qui innerve à son tour l'amygdale médiane. Les neurones de l'amygdale médiane projettent ensuite vers l'hypothalamus notamment vers la mPOA (Figure 17).

Il est généralement admis que l'épithélium olfactif principal détecte les molécules volatiles par opposition à l'organe voméronasal qui détecte les molécules non volatiles. Néanmoins, plusieurs études ont montré que l'organe voméronasal était également sensible aux odeurs volatiles (Moncho-Bogani et al. 2005) et que les neurones de l'épithélium olfactif principal pouvaient aussi être activés par des odeurs non volatiles (Restrepo et al. 2004; Spehr et al. 2006).



**Figure 17 : Afférences sensorielles projetant sur la mPOA, adapté d'Asaba et al. (2014)**

Les phéromones sont détectées au niveau de deux systèmes distincts représentés en bleu et en orange. Des phéromones (surtout les composés non-volatiles) peuvent être détectées au niveau de l'organe voméronasal (VNO) dont les neurones projettent vers le bulbe olfactif accessoire (AOB). Cette structure projette ensuite vers l'amygdale médiane (MeA) directement ou indirectement via le noyau du lit de la strie terminale (BNST). Des phéromones (surtout les composés volatiles) peuvent aussi être détectées au niveau de l'épithélium olfactif principal (MOE) dont les neurones projettent vers le bulbe olfactif principal (MOB) qui projette à son tour vers l'amygdale médiane (MeA). L'ensemble des signaux olfactifs en provenance des deux systèmes atteignent ensuite l'aire pré-optique médiane (mPOA) dans l'hypothalamus.

La mPOA reçoit également des projections du tegmentum central (CTF) qui relaye des informations somatosensorielles en provenance de la périphérie, notamment celles associées aux organes génitaux (vert).

Les informations visuelles peuvent également atteindre la mPOA grâce à des projections directes depuis la rétine (violet).

La participation de ces deux systèmes au contrôle du comportement sexuel n'est pas totalement claire. En effet, une étude réalisée par Pankevich et al. (2004) indique que l'ablation de l'organe voméronasal n'a aucun effet sur la composante copulatoire du comportement sexuel mais diminue la préférence olfactive pour l'urine de femelle réceptive. Une étude réalisée par Stowers et al. (2002) confirme ces résultats par une délétion génétique d'un canal ionique spécifiquement exprimé dans l'organe voméronasal (TRP2). Cette délétion a pour effet une diminution de la capacité à discriminer les mâles des femelles sans altérer le comportement sexuel. Néanmoins, d'autres études plus anciennes indiquent que l'ablation de l'organe voméronasal affecte fortement la phase copulatoire du comportement sexuel (Clancy et al. 1984; Wysocki et Lepri, 1991).

En ce qui concerne l'épithélium olfactif principal, sa lésion chimique ou l'ablation génétique de canaux ioniques spécifiques abolit tout comportement sexuel (Mandiyan et al.

2005; Yoon et al. 2005). De façon contradictoire, une étude plus ancienne indique que la lésion chimique de l'épithélium olfactif principal au sulfate de zinc n'a aucun effet sur le comportement sexuel (Edwards et al. 1972).

En résumé, bien que les études apparaissent parfois contradictoires, le consensus actuel semble établir une participation majoritaire de l'organe voméronasal dans les processus de discrimination olfactive alors que l'épithélium olfactif principal semble majoritairement impliqué dans la régulation plus générale du déroulement de la phase copulatoire. Cependant, les modalités de l'interaction entre ces deux systèmes et leur complémentarité fonctionnelle dans le contrôle du comportement sexuel ne sont pas encore totalement établis (Asaba et al. 2014; Keller et al. 2006).

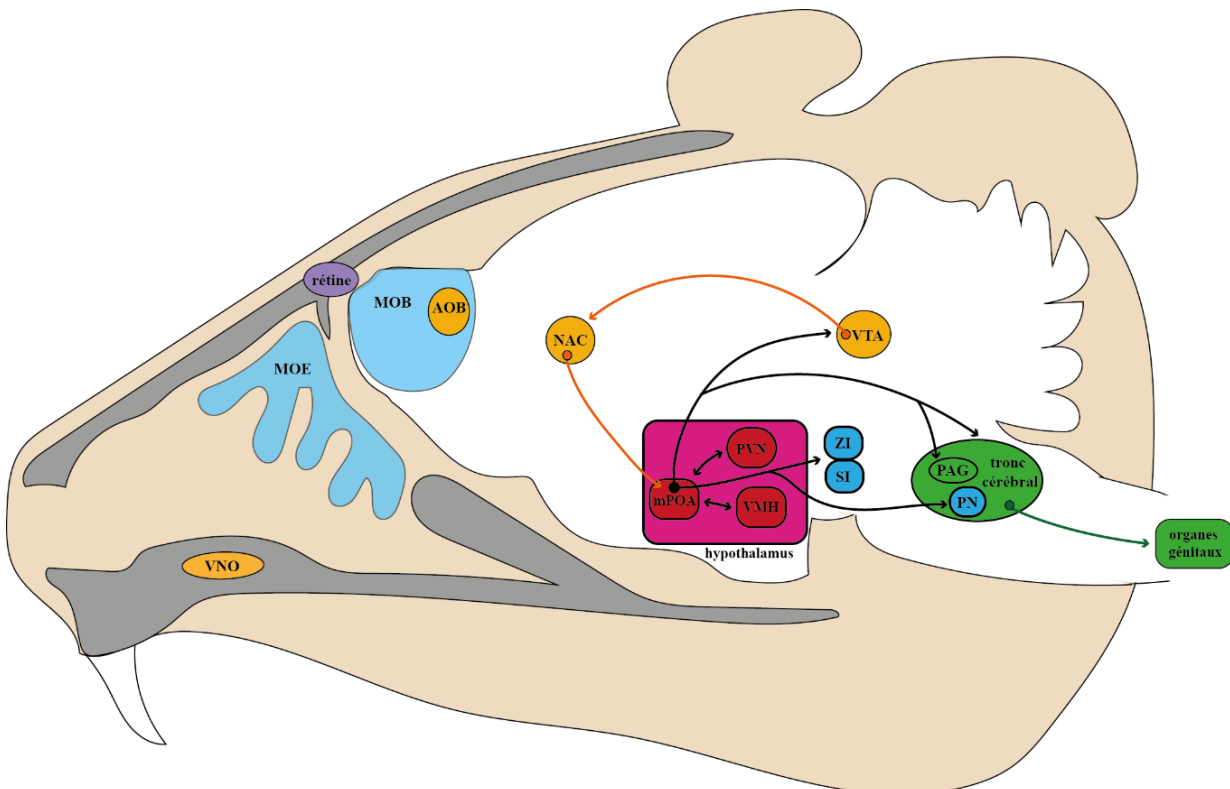
## 2) **Les autres afférences**

Bien que l'olfaction représente la modalité sensorielle principale impliquée dans le contrôle du comportement sexuel, d'autres projections périphériques issues de la moelle épinière atteignent également la mPOA. Il s'agit notamment des informations somatosensorielles provenant des organes génitaux qui effectuent un relai au niveau du tegmentum central (CTF) avant de rejoindre la mPOA. Il a également été démontré que les informations visuelles peuvent directement projeter depuis la rétine jusqu'à la mPOA (Morin et Studholme, 2014) (Figure 16).

A cela s'ajoutent d'autres aires cérébrales projetant directement ou indirectement sur la mPOA comme notamment les régions corticales impliquées dans le traitement des informations auditives, les régions du tronc cérébral notamment celles du raphé ou encore certaines régions du circuit de la récompense comme le noyau accumbens. Enfin des régions localisées à proximité de l'hypothalamus comme la *zona incerta* (ZI) ou des noyaux hypothalamiques postérieures comme le noyau paraventriculaire (PVN) ou le noyau hypothalamique ventro-médian (VMH) sont également connues pour projeter dans la mPOA (Simerly et Swanson, 1986).

### C) Les efférences de la mPOA

La mPOA projette directement vers un grand nombre de régions cérébrales. Cette multitude de cibles s'explique par l'implication de la mPAO dans différentes fonctions physiologiques comme la thermogénèse (Boulant, 2000), le sommeil (Szymusiak et al. 2001), le soin parental (Champagne et al. 2003) ou le comportement sexuel. Les efférences présentées ci-dessous, sont liées à la régulation du comportement sexuel et ont été mises en évidence par des expériences de traçage histologiques ainsi que par des expériences de micro-stimulations et de micro-lésions (Figure 18).



#### **Figure 18 : Efférences en provenance de la mPOA**

*L'aire pré-optique médiane (mPOA) projette des efférences au niveau du tronc cérébral et plus particulièrement au niveau de la substance grise périaqueducule (PAG). Le tronc cérébral module par la suite les systèmes nerveux autonomes impliqués dans le contrôle de l'érection et de l'éjaculation et projette également vers des régions spinales impliquées dans des régulations motrices (vert).*

*La mPOA projette aussi de nombreuses efférences vers le circuit de la récompense (orange) au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA). Le circuit de la récompense, en étroite interaction avec la mPOA, peut moduler son activité via des projections issues du noyau accumbens (NAC).*

*La mPOA envoie également des efférences vers des régions cérébrales impliquées dans le déclenchement et la régulation du mouvement (bleu) comme la zone incerta (ZI), la substantia innominata (SI) et le noyau pédonculéopontin (PN) qui module l'activité de la voie nigrostriée et du cortex moteur.*

*Enfin, la mPOA projette vers des régions hypothalamiques comme le noyau para-ventriculaire (PVN) et le noyau ventro-médian (VMH) qui projettent eux aussi vers le circuit de la récompense et vers les régions du tronc cérébral régulant les systèmes nerveux autonomes.*

Suite à l'intégration des signaux sensoriels, la mPOA projette vers le tronc cérébral, majoritairement au niveau de la substance grise périaqueducale (PAG). Les différentes structures activées dans le tronc cérébral modulent les systèmes nerveux autonomes impliqués dans le contrôle de l'érection et de l'éjaculation et projettent vers des régions spinales impliquées dans la coordination du mouvement (Rizvi et al. 1996). Le déclenchement et la modulation plus fine des actes moteurs sont également permis par des projections issues de la mPOA vers la *substentia innominata*, la *zona incerta* ou le noyau pédonculépointin, connu pour ses relations avec le cortex moteur et la voie nigro-striée (Simerly et Swanson, 1988).

La mPOA possède aussi la capacité d'activer le circuit de la récompense grâce à des efférences qui atteignent l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Tobiansky et al. 2016). Il est d'ailleurs de plus en plus clair que le circuit de la récompense entretient un lien étroit avec la mPOA notamment en ce qui concerne la régulation des renforcements comportementaux associés aux récompenses naturelles (Pitchers et al. 2010b; Tobiansky et al. 2013). Cela s'explique notamment par les projections issues du noyau accumbens (NAC) qui atteignent la mPOA, comme mentionné précédemment (Mogenson et al. 1983).

En plus de ces régions extra-hypothalamiques, des efférences issues de la mPOA atteignent des régions hypothalamiques comme le noyau paraventriculaire (PVN) ou le noyau hypothalamique ventro-médian (VMH). Ces deux noyaux projettent également en retour des efférences vers la mPOA (Canteras et al. 1994; Geerling et al. 2010) ce qui constitue un réseau complexe fortement impliqué dans la régulation du comportement sexuel. En effet, le PVN émet, comme la mPOA, des projections vers le circuit de la récompense au niveau de l'aire tegmentale ventrale, vers le tronc cérébral et vers certains centres spinaux (Argiolas et Melis, 2004; Geerling et al. 2010). Le VMH, dont le rôle est majoritairement étudié dans le contrôle de la lordose chez la femelle, participe également à la régulation du comportement sexuel chez le mâle. Il émet, comme la mPOA, des projections vers les régions du tronc cérébral au niveau de la PAG (Flanagan-Cato, 2011).

Ainsi, la mPOA intègre une grande variété de signaux somatosensoriels et projette vers les centres de régulations des systèmes nerveux autonomes mais également vers le circuit de récompense et les circuits contrôlant la motricité.

La grande diversité des circuits neuronaux projetant vers la mPOA explique la grande diversité de neuromédiateurs retrouvés dans cette région de l'hypothalamus. La partie suivante s'intéresse à la participation de certains de ces neuromédiateurs au contrôle du comportement sexuel et à leur action plus spécifique au sein de la mPOA.

## II. Neuromédiateurs impliqués dans le contrôle du comportement sexuel mâle

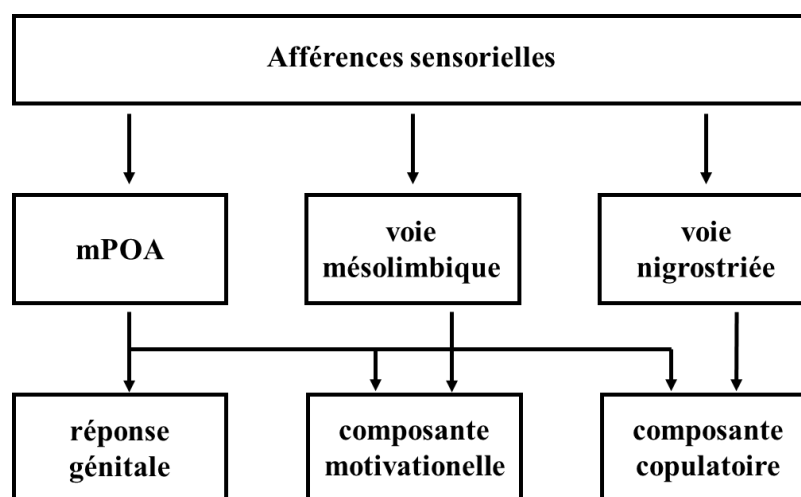
Cette partie détaille de façon non exhaustive les principaux neuromédiateurs impliqués dans la régulation du comportement sexuel mâle. Les neuromédiateurs abordés ci-dessous sont ceux pour lesquels des données sont disponibles pour la mPOA.

### A) La dopamine

La dopamine est une catécholamine qui possède un effet globalement facilitateur sur le comportement sexuel. Dès les années 70, des observations cliniques ont attesté de cet effet. Le traitement de patients parkinsoniens par le précurseur de la dopamine, la L-DOPA, aboutissait à une augmentation de la *libido* et provoquait des comportements d'hypersexualité (Bowers et al. 1971; Politis et al. 2013; Vogel et Schiffter, 1983). Néanmoins, les mécanismes précis d'action de ce neurotransmetteur sont complexes du fait de son implication dans des systèmes cérébraux distincts.

#### 1) Les 3 voies dopaminergiques impliquées dans la régulation du comportement sexuel

La dopamine est libérée par 3 voies cérébrales qui sont toutes impliquées dans la régulation du comportement sexuel (Hull et al. 1999) (Figure 19).



**Figure 19 : Participation de trois voies dopaminergiques à la régulation du comportement sexuel mâle, adapté de Hull et al. (1999)**

*Les stimuli sensoriels issus de la femelle aboutissent à la libération de dopamine dans trois systèmes distincts : la mPOA, la voie mésolimbique et la voie nigrostriée. La dopamine de la mPOA active les réponses génitales ainsi que les composantes motivationnelle et copulatoire du comportement sexuel. La libération de dopamine de la voie mésolimbique et de la voie nigrostriée aboutit respectivement à une activation de la composante appétitive et de la composante copulatoire.*

La voie nigrostriée est composée de neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire qui projettent majoritairement dans la partie dorsale du striatum, au niveau du noyau caudé et du putamen. Ce réseau constitue un système modulateur des aires corticales motrices. La libération de dopamine dans le striatum dorsal régule la partie consommatoire de la copulation en favorisant l'initiation et la réalisation du pattern copulatoire des montées (Damsma et al. 1992).

La voie mésolimbique est composée de neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale qui projettent vers le noyau accumbens et l'amygdale. Ce système, essentiellement associé aux aspects de récompense et de renforcement, régule la phase motivationnelle du comportement sexuel (Hull et al. 1997).

La dopamine est également sécrétée dans l'hypothalamus au niveau de la mPOA par quelques cellules de la région péri-ventriculaire mais surtout par des fibres en provenance de la *zona incerta* (Simerly et al. 1986). Cette troisième voie hypothalamique joue un rôle fondamental dans le contrôle des systèmes nerveux autonomes ainsi que dans la régulation des composantes motivationnelles et copulatoires du comportement sexuel.

Il est à noter que la dichotomie entre ces 3 circuits ne reflète pas la réalité des interactions nombreuses entre ces systèmes. En effet, il existe de nombreuses projections bidirectionnelles entre la mPOA et différentes structures de la voie mésolimbique et nigrostriée, comme abordée partie I-C. De plus, l'implication de la voie nigrostriée dans le contrôle de la phase copulatoire est davantage interprétée comme un contrôle général de la motricité de l'animal.

## **2) Injections systémiques d'agents pharmacologiques et comportement sexuel**

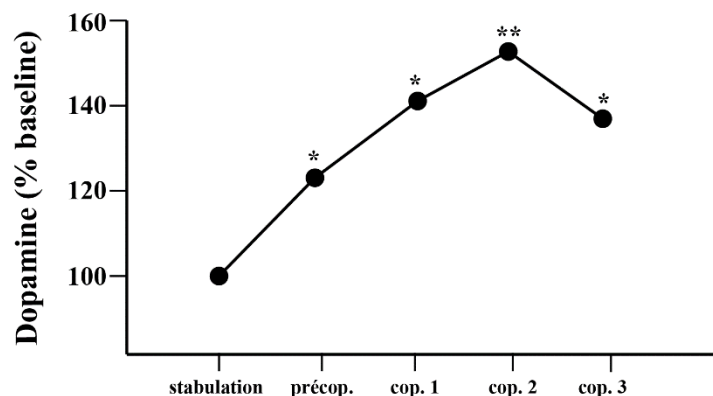
L'injection systémique d'agonistes de la dopamine possède un effet facilitateur sur le comportement sexuel qui se manifeste par une diminution des latences de première montée, une diminution des intervalles post-éjaculatoires et une restauration partielle de la copulation chez des mâles castrés (Giuliano et Allard, 2001; Hull et Dominguez, 2006; Melis et Argiolas, 1995; Scaletta et Hull, 1990). De façon opposée, l'administration systémique d'antagonistes des récepteurs de la dopamine inhibe le comportement sexuel en allongeant la durée de la phase motivationnelle et en allongeant la durée les intervalles post-éjaculatoires. L'administration de ces antagonistes est également capable d'abolir tout comportement sexuel selon la dose et la spécificité de la molécule utilisée (Ahlenius et Larsson, 1990; Melis et Argiolas, 1995; Pfaus et Phillips, 1989).



La dopamine possède également un effet activateur sur l'érection d'une part *via* une action cérébrale sur les circuits de contrôle de l'érection (Succu et al. 2007) et d'autre part *via* des mécanismes périphériques au niveau du corps caverneux. En effet, l'injection d'apomorphine (agoniste des récepteurs dopaminergiques) dans le corps caverneux, associée à une stimulation électrique du nerf caverneux, facilite l'érection alors que l'injection de SCH23390 (antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1) diminue cette réponse (El-Din et al. 2007).

### 3) La dopamine dans la mPOA

Des expériences de micro-dialyse réalisées dans mPOA de rat ont permis de mettre en évidence l'augmentation de la concentration en dopamine lors des différentes phases du comportement sexuel (Hull et al. 1995). Ainsi, la dopamine est libérée dans la mPOA lorsque le mâle est en présence d'une femelle réceptive inaccessible placée derrière une grille mais également lors de la copulation (Figure 20). Cette libération de dopamine est spécifique du comportement sexuel puisque ni le contact avec un mâle (interaction sociale non sexuelle) ni l'activité locomotrice volontaire dans une roue ne provoque cette libération de dopamine.

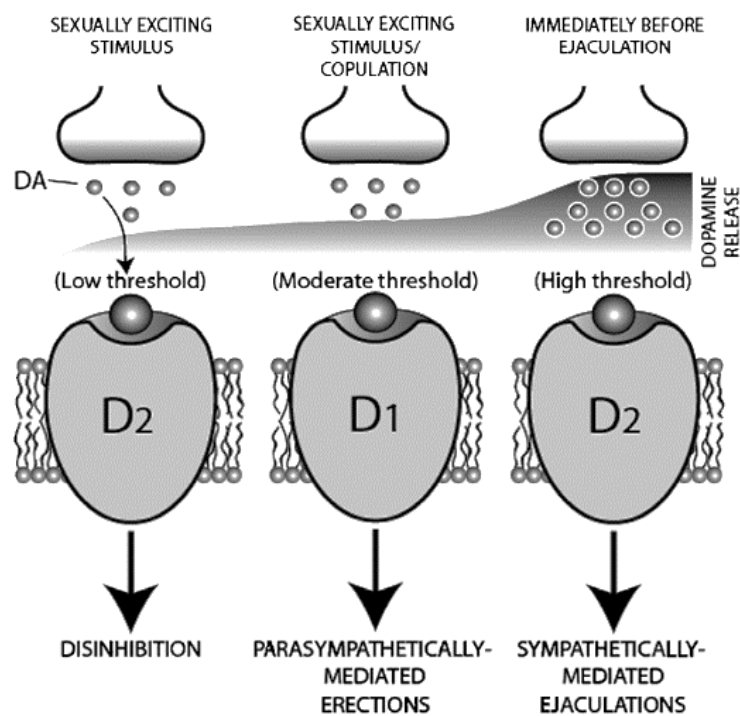


**Figure 20 : Evolution de la concentration en dopamine dans la mPOA de rat au cours du comportement sexuel mâle, adapté de Hull et al. (1995)**

*La concentration extracellulaire en dopamine est mesurée par micro-dialyse dans la mPOA de rats restant dans leur cage de stabulation (stabulation), au contact d'une femelle réceptive inaccessible placée derrière une grille (précop.), et lors de la copulation permise pendant 36 minutes (3 échantillons prélevés : cop.1, cop.2 et cop.3).*

La micro-injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dans la mPOA provoque la mort cellulaire spécifique des neurones dopaminergiques. Celle-ci aboutit à une perturbation importante du comportement sexuel qui affecte la phase motivationnelle et la phase copulatoire. En effet, les rats injectés présentent une augmentation des latences d'intromission ainsi qu'un allongement des intervalles post-éjaculatoires et de la latence d'éjaculation (Bazzett et al. 1992).

Les cibles cellulaires activées par cette libération de dopamine ne sont pas connues. Néanmoins, l'implication respective des différents types de récepteurs de la dopamine dans le contrôle du comportement sexuel a été étudiée par des micro-injections d'agents pharmacologiques dans la mPOA. Les récepteurs de la dopamine sont regroupés en 2 grandes catégories, les récepteurs D1-like (récepteurs D1 et D5) et les récepteurs D2-like (D2, D3 et D4). Les premiers sont activateurs de l'adénylate cyclase tandis que les seconds sont inhibiteurs de cette enzyme. Les études pharmacologiques fournissent de nombreux résultats difficiles à interpréter à cause des effets tantôt activateurs, tantôt inhibiteurs d'un même agoniste selon la dose utilisée. Cela s'explique notamment par la spécificité des agents pharmacologiques qui ne se limite pas toujours à un seul sous-type de récepteur. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à caractériser l'implication des récepteurs D1-like et D2-like de la mPOA dans le contrôle de l'érection et de l'éjaculation. L'ensemble des résultats traitant des réponses génitales est résumé dans un modèle synthétique élaboré chez le rat par Dominguez et Hull en 2005 (Figure 21).



**Figure 21 : Implication des différents récepteurs de la dopamine de la mPOA dans la régulation des réponses génitales durant l'accouplement du rat (Dominguez et Hull, 2005)**

La dopamine est libérée dans la mPOA suite à l'intégration des stimuli sensoriels en provenance d'une femelle réceptive. Cette dopamine libérée dans un premier temps à faible dose, active les récepteurs D2-like qui exercent une action désinhibitrice sur les réflexes génitaux. La dopamine est ensuite libérée dans la mPOA de façon plus importante ce qui stimule des récepteurs D1-like. Cette stimulation active le système parasympathique à l'origine du déclenchement et du maintien de l'érection. Suite à une stimulation prolongée de la mPOA due aux afférences olfactives et somatosensorielles associées aux intromissions, la dopamine atteint une concentration maximale dans la mPOA. Cela a pour effet d'activer à nouveau les récepteurs D2-like ce qui aboutit à la stimulation du système sympathique qui déclenche l'éjaculation et inhibe l'érection.

D'après ce modèle, la concentration extracellulaire de dopamine augmente progressivement dans la mPOA depuis la rencontre avec une femelle réceptive jusqu'à l'éjaculation. Les faibles concentrations en dopamine vont dans un premier temps activer uniquement certains récepteurs D2-like qui désinhibent (inhiber l'inhibition GABAergique) les circuits contrôlant l'activation génitale. Dans un second temps, l'augmentation de la concentration extracellulaire en dopamine active des récepteurs D1-like qui possèdent un effet activateur sur le système parasympathique ce qui aboutit au déclenchement et au maintien de l'érection. Enfin, lorsque la concentration de dopamine atteint un niveau suffisant dans la mPOA, d'autres récepteurs D2-like sont activés ce qui aboutit à la stimulation du système sympathique qui déclenche l'éjaculation et inhibe l'érection.

L'implication des récepteurs D1-like et D2-like de la mPOA dans les processus de motivation sexuelle ont été essentiellement étudiés chez les oiseaux. Les récepteurs D1-like semblent exercer un rôle activateur et les récepteurs D2-like un rôle inhibiteur sur la motivation sexuelle. En effet, chez l'étourneau sansonnet, *Sturnus vulgaris*, la micro-injection d'un agoniste des récepteurs D1-like dans la mPOA augmente la motivation sexuelle et le nombre de chants effectués au contact d'une femelle alors que la micro-injection d'un antagoniste possède des effets opposés (Riters et al. 2014). Bien que les réponses observées suivent une relation dose-réponse non linéaire, l'expression de récepteurs D2-like dans la mPOA s'avère être anti-corrélée à l'expression des récepteurs D1-like et aux scores obtenus lors de tests de motivation sexuelle (DeVries et al. 2015).

Ainsi, la dopamine possède un rôle central dans le contrôle du comportement sexuel. Cependant, l'implication de trois systèmes cérébraux rend les études utilisant des injections pharmacologiques systémiques difficiles à interpréter. Bien que la dopamine soit libérée lors de la phase motivationnelle et copulatoire du comportement sexuel, les cibles cellulaires activées dans la mPOA ne sont pas encore connues mais semblent impliquer l'action conjointe des récepteurs D1-like et D2-like.

## **B) Le glutamate**

Le glutamate, neurotransmetteur excitateur majoritaire du système nerveux central, possède un effet globalement activateur du comportement sexuel.

### **1) Injections systémiques d'agents pharmacologiques et comportement sexuel**

Les premières études ont été réalisées, par des injections systémiques de différents agonistes et antagonistes des récepteurs du glutamate chez le rat. Des injections intra-péritonéales de faibles doses (1 et 2,5 mg/kg) d'acide kaïnique ont un effet stimulant sur le comportement sexuel qui aboutit à la diminution des latences de première montée et à l'augmentation de la fréquence de montées avec intromission. Néanmoins, une forte dose (5mg/kg) de ce même agoniste possède un effet inhibiteur sur le comportement sexuel qui aboutit à l'augmentation des latences de première montée et à l'allongement de la durée d'accouplement (Drago et Busă, 1997).

L'injection systémique de MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA, inhibe le comportement sexuel en augmentant les latences de montée avec intromission et la fréquence d'éjaculation (Powell et al. 2003).

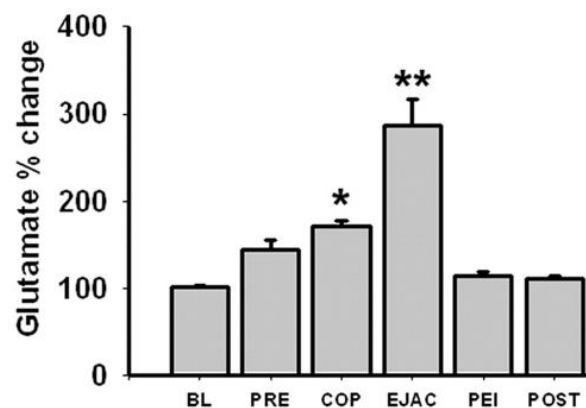
Des études se sont également intéressées à la participation des récepteurs métabotropiques mGluRs. L'injection intra-péritonéal de LY379268 (1 et 3 mg/kg), agoniste des récepteurs mGluR2/3, n'a aucun effet sur le comportement sexuel alors que l'injection de MPEP (20 mg/kg), antagoniste du récepteur mGluR5, ou de AMN082 (10 et 20 mg/kg), antagoniste du récepteur mGluR7, altèrent le comportement sexuel de façon dose dépendant, en augmentant les durées d'accouplement et la fréquence des montées avec intromission (Li et al. 2013). Ainsi, les injections systémiques d'agents pharmacologiques renseignent sur le rôle activateur de la neurotransmission glutamatergique sur le comportement sexuel avec la participation de récepteurs ionotropiques et métabotropiques.

### **2) Le glutamate dans la mPOA**

Des études plus précises de micro-injection d'agents pharmacologiques et de micro-dialyse ont permis de préciser le rôle du glutamate de la mPOA. Ainsi, la micro-injection d'un mélange d'inhibiteur de recapture du glutamate dans la mPOA diminue la durée d'accouplement et augmente la fréquence d'éjaculation (Dominguez et al. 2006). La participation des récepteurs NMDA a été étudiée suite à la micro-injection de MK-801 qui aboutit à la diminution du nombre de vocalisations ultrasonores émises par le mâle en présence d'une femelle réceptive (Brudzynski et Pniak, 2002). Cette micro-injection perturbe

également la phase copulatoire en augmentant les latences et en diminuant les fréquences de montée avec intromission et d'éjaculation (Vigdorichik et al. 2012). Ces résultats indiquent que le glutamate de la mPOA, en partie via les récepteurs NMDA, participe à la régulation de la phase motivationnelle et copulatoire du comportement sexuel.

Des expériences de micro-dialyse de la mPOA ont permis de suivre l'évolution de la concentration extracellulaire en glutamate au cours des différentes phases du comportement sexuel chez le rat. La concentration de glutamate augmente légèrement dès la mise en contact du mâle avec la femelle. Cette augmentation devient significative lors de la copulation. La concentration extracellulaire de glutamate est maximale au moment de l'éjaculation puis elle retourne à son niveau de base lors des intervalles post-éjaculatoires et lors de la période de satiété (Dominguez et al. 2006) (Figure 22).



**Figure 22 : Evolution de la concentration en glutamate dans la mPOA de rat au cours du comportement sexuel mâle (Dominguez et al. 2006)**

*La concentration de glutamate dans la mPOA est estimée par micro-dialyse et normalisée par rapport à la concentration obtenue chez un mâle restant dans sa cage (BL : base line). La concentration de glutamate augmente légèrement lors du contact avec la femelle (PRE : phase pré copulatoire) et augmente significativement lors de la copulation (COP : copulation). La concentration extracellulaire de glutamate est maximale lors de l'éjaculation (EJAC : éjaculation) puis retourne à son niveau de base lors des intervalles post éjaculatoires (PEI) et los de la période de satiété sans femelle (POST).*

La provenance du glutamate libéré dans la mPOA a été déterminée par l'utilisation d'aspartate tritiée. Les projections glutamatergiques qui atteignent la mPOA sont originaire du septum latéral, du noyau du lit de la strie terminale, de l'amygdale médiane, du noyau paraventriculaire ou encore du noyau arqué (Kocsis et al. 2003). Les aires appartenant au circuit contrôlant le comportement sexuel sont les sources majoritaires de ce glutamate libéré durant l'accouplement. En effet, une étude réalisée chez la Gerbille de Mongolie, *Meriones unguiculatus*, indique que la totalité des cellules glutamatergiques de l'amygdale médiane, qui expriment c-Fos suite à un accouplement, projette vers la mPOA (Simmons et Yahr, 2003).

En conclusion, le glutamate libéré durant la copulation dans la mPOA possède un effet activateur sur le comportement sexuel grâce à son action *via* des récepteurs ionotropiques (AMPA-kaïnate et NMDA) et métabotropiques (mGluR5 et mGluR7).

### **C) Le monoxyde d'azote (NO)**

Le monoxyde d'azote (NO) est une petite molécule gazeuse qui a historiquement été décrite comme la molécule responsable de la vasodilatation des artérioles dans les tissus périphériques. Reconnue molécule de l'année en 1992 après la parution de l'article fondateur intitulé « NO news is good news » (Culotta et Koshland, 1992), les détails des mécanismes de sa synthèse et de son action vasculaire ont valu le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1998 à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad.

Cette molécule gazeuse est synthétisée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui catalyse l'oxydation de l'arginine en L-citrulline et NO. Cette enzyme est exprimée sous 3 isoformes : l'isoforme inductible (iNOS) exprimée dans les cellules gliales et parfois neuronales, l'isoforme endothéliale (eNOS) exprimée dans les cellules endothéliales constitutives des vaisseaux sanguins et l'isoforme neuronale (nNOS). Bien que la nNOS s'exprime dans de nombreux neurones du cerveau et de la moelle épinière, elle est également exprimée dans les ganglions sympathiques, dans les cellules musculaires striées ainsi qu'au niveau de terminaisons nerveuses nitrergiques impliquées dans la régulation du tonus vasculaire (Förstermann et Sessa, 2012).

Au niveau cellulaire, l'activité enzymatique de la nNOS est activée par la calmoduline suite à une élévation de la concentration intracellulaire en calcium. La nNOS possède un domaine PDZ ce qui lui permet une interaction directe avec certaines protéines de l'échafaudage post-synaptique comme la PSD-95 (Post-Synaptic Density 95) ce qui assure sa localisation au niveau de la membrane post-synaptique à proximité des récepteurs NMDA et des influx de calcium.

Le NO agit dans le système nerveux central comme neuromodulateur notamment grâce à l'activation de la guanylate cyclase responsable de la synthèse de GMPc qui active de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Le NO est également responsable de modifications post-traductionnelles comme la S-nitrosylation (ajout du groupement NO sur un groupement thiol SH d'une cystéine) qui participe à la régulation de l'activité biologique des protéines cibles (Zhou et Zhu, 2009).

Ainsi, la sensibilité au calcium, la localisation synaptique de la nNOS et les propriétés de diffusion du NO expliquent sa participation importante à la régulation des mécanismes de plasticité synaptique (Bon et Garthwaite, 2003; Guix et al. 2005). Cela est confirmé par les déficits mnésiques importants retrouvés chez les souris invalidées pour le gène *nNOS* (Kirchner et al. 2004).

Le rôle de la nNOS dans la régulation du comportement sexuel a d'abord été caractérisé pour son implication dans le contrôle de l'érection. En effet, certaines terminaisons nitrergiques du système parasympathique proviennent du plexus pelvien et innervent le corps caverneux. La libération de NO à leur extrémité provoque la relaxation des muscles lisses des artérioles ce qui déclenche et maintient l'érection. L'étude de ce mécanisme est notamment à l'origine de la mise sur le marché d'inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 (PDE5) comme le viagra® ou le levitra®. Cette enzyme dégrade le GMPc produit après action du NO. Ainsi en diminuant la dégradation de GMPc, l'érection est maintenue en dépit d'afférences excitatrices. C'est pourquoi les injections systémiques d'inhibiteur de NOS provoquent une diminution du nombre d'érections et altèrent l'ensemble de la copulation chez le rat (Hull et al. 1994).

Au niveau cérébral, la micro-injection dans la mPOA d'arginine, substrat des NOS, augmente la fréquence de montées alors que la micro-injection d'un inhibiteur de NOS, le L-nitro-arginine méthyl ester (L-NAME) diminue la fréquence et le nombre de montées et allonge la durée de l'accouplement (Lagoda et al. 2004; Sato et al. 1998). Ces résultats indiquent que le NO libéré au niveau de la mPOA possède un effet facilitateur du comportement sexuel.

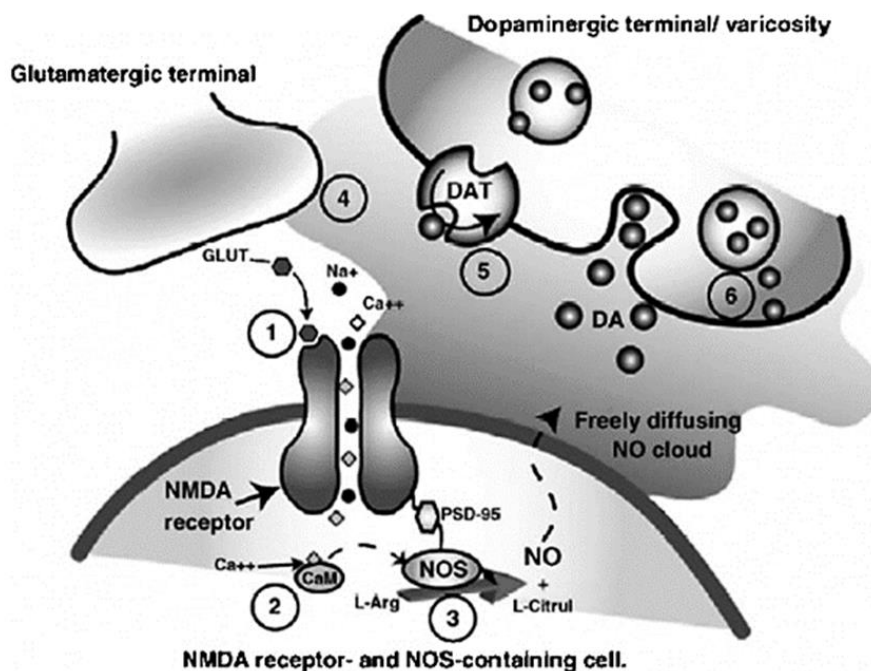
#### **D) Interactions dans la mPOA entre la dopamine, le glutamate et le NO**

Comme présenté dans les parties précédentes, la dopamine et le glutamate sont connus pour être libérés dans la mPOA au moment de la copulation. Ils possèdent, comme le NO, une action facilitatrice sur le comportement sexuel. Plusieurs études se sont intéressées aux interactions entre ces 3 neuromédiateurs au niveau de la mPOA en lien avec l'accouplement. Il a tout d'abord été montré par micro-dialyse de la mPOA que l'augmentation de la concentration en dopamine induite par l'accouplement était dépendante du NO. En effet, cette augmentation est totalement abolie par la micro-injection de L-NAME (Lorrain et al. 1996). Une autre étude a permis de démontrer l'implication du glutamate dans ce mécanisme. La micro-injection de glutamate dans la mPOA provoque une augmentation de la concentration

en dopamine. Cette augmentation est également abolie par la micro-injection de L-NAME (Dominguez et al. 2004). Finalement, il a été démontré que l'augmentation de la concentration en dopamine pouvait être provoquée par la micro-injection de nitroprussiate de sodium, un donneur de NO.

L'action activatrice du NO sur la libération de dopamine serait dépendante de l'activation de la guanylate cyclase et de la synthèse de GMPc puisque cette augmentation est inhibée par l'injection d'un inhibiteur de la guanylate cyclase ou par l'injection d'un analogue inactif du GMPc (Sato et Hull, 2006).

Prenant en compte l'ensemble de ces résultats, un modèle résumant les interactions entre ces 3 neuromédiateurs a été proposé par Hull et Dominguez (2006) (Figure 23).



**Figure 23 : Modèle de Hull présentant les interactions moléculaires entre le glutamate, le monoxyde d'azote (NO) et la dopamine dans la mPOA de rat au cours du comportement sexuel mâle (Hull et Dominguez, 2006)**

*Lors de l'accouplement, les afférences glutamatergiques libèrent du glutamate ce qui active les récepteurs NMDA (1), provoquant l'entrée de calcium dans les neurones cibles. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium activerait ensuite la calmoduline (2) qui activerait à son tour la nNOS (oxyde nitrique synthase neuronale), localisée à proximité des synapses glutamatergiques grâce à son interaction directe avec PSD-95 (3). Suite à l'activation de la nNOS, le NO serait produit en quantité et diffuserait librement jusqu'aux terminaisons dopaminergiques (4). Le NO stimulerait ensuite la guanylate cyclase qui produirait du GMPc, capable d'inhiber indirectement le fonctionnement du transporteur de la dopamine (DAT) (5) et d'activer la libération vésiculaire de la dopamine (6). Cela aurait donc pour effet une augmentation de la concentration en dopamine extracellulaire dans la mPOA et une activation du comportement sexuel.*



D'après ce modèle, la libération du glutamate observée dans la mPOA lors de l'accouplement active des récepteurs NMDA provoquant l'entrée de calcium dans les neurones cibles. Cette augmentation de la concentration intracellulaire en calcium active la calmoduline qui active à son tour la nNOS, localisée à proximité des synapses glutamatergiques grâce à son interaction directe avec PSD-95. Suite à l'activation de la nNOS, le NO est produit en quantité et diffuse librement jusqu'aux terminaisons dopaminergiques. Le NO active dans ces terminaisons la guanylate cyclase qui produit du GMPc, capable d'inhiber indirectement le fonctionnement du transporteur de la dopamine (DAT) et de stimuler la libération des vésicules synaptiques chargées en dopamine. Cela a donc pour effet une augmentation de la concentration en dopamine extracellulaire dans la mPOA et une activation du comportement sexuel.

Cependant, certains éléments de ce modèle sont encore soumis à débat. Il s'agit notamment de la façon dont le NO aboutit à une augmentation de la concentration extracellulaire en dopamine. En effet, certaines études contradictoires indiquent un effet tantôt activateur, tantôt inhibiteur sur la recapture et sur la libération de la dopamine selon la zone cérébrale considérée (Sato et Hull, 2006). Il est également possible que le NO exerce une action sur d'autres systèmes de neurotransmission présents dans la mPOA et impliqués dans le contrôle du comportement sexuel. Il a notamment été montré que le NO pouvait stimuler la libération de glutamate (Sequeira et al. 1997), de GABA, de sérotonine et d'acétylcholine (Guevara-Guzman et al. 1994). De plus, l'identité exacte des cellules exprimant les différents acteurs du modèle et leur localisation précise au niveau de la mPOA n'est toujours pas connue. Enfin, la place qu'occupent les hormones stéroïdes sexuelles et leurs récepteurs dans ce modèle fait toujours l'objet d'investigations.

En résumé, l'augmentation de la concentration en dopamine dans la mPOA semble être l'événement responsable du déclenchement et du maintien du comportement sexuel. Cette augmentation est sous la dépendance d'afférences glutamatergiques qui mettent en jeu la participation du NO mais l'identité biochimique des cellules sensibles à cette dopamine, leurs cibles et leur participation relative au contrôle des différentes composantes du comportement sexuel sont totalement inconnus.

## **E) La sérotonine**

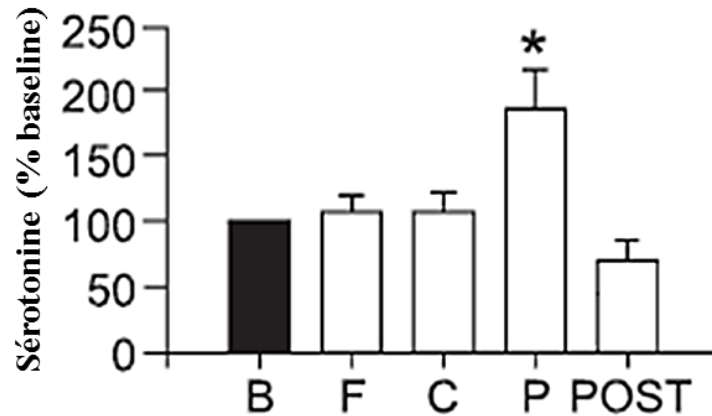
La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), est une monoamine synthétisée au niveau cérébral par les noyaux du raphé. Les projections sérotoninergiques atteignent la moelle épinière et de nombreuses structures du système limbique, dont l'hypothalamus. De façon générale, la sérotonine possède un effet inhibiteur sur le comportement sexuel. Cela est notamment retrouvé lors de l'utilisation d'inhibiteurs de recapture de la sérotonine, utilisés comme antidépresseurs. Ces molécules, qui augmentent la concentration extracellulaire de sérotonine, retardent l'éjaculation et perturbent l'érection chez le rat (Mos et al. 1999) et chez l'homme (de Jong et al. 2006). Cependant, il apparaît délicat de différencier les effets dus à des régulations cérébrales des effets spinaux tant les projections de la moelle épinière qui régulent l'éjaculation sont riches en fibres sérotoninergiques (de Jong et al. 2006).

Au niveau cérébral, des lésions du raphé dorsal aboutissent à une diminution des latences d'éjaculation et à une réduction des intervalles post-éjaculatoires (McIntosh et Barfield, 1984a). De façon plus précise, la sérotonine exerce son action inhibitrice sur le comportement sexuel en agissant notamment au niveau de la mPOA. En effet, la micro-injection de sérotonine dans la mPOA augmente le nombre de montées ainsi que les latences de première montée et d'éjaculation. Cet effet inhibiteur s'explique notamment par l'abolition de la libération de glutamate normalement observée lors de la copulation (Dominguez et Hull, 2010).

Des études se sont intéressées à la participation relative des différents récepteurs de la sérotonine. Ces récepteurs, répartis en 7 groupes de 5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>, peuvent être ionotropiques (5-HT<sub>3</sub>) ou métabotropiques. La micro-injection d'un antagoniste des récepteurs 5HT<sub>2</sub> dans la mPOA possède un effet activateur sur le comportement sexuel en diminuant la latence d'éjaculation (Verma et al. 1989). En outre, la micro-injection d'agoniste des récepteurs 5HT<sub>1B/C</sub> inhibe le comportement sexuel en augmentant la latence d'éjaculation, confirmant le rôle globalement inhibiteur de la sérotonine. Néanmoins, de façon contradictoire, la micro-injection d'agonistes des récepteurs 5HT-<sub>1A</sub> possède un effet facilitateur du comportement sexuel en diminuant la latence d'éjaculation (Fernández-Guasti et al. 1992). Ainsi, bien que l'action de la sérotonine dans la mPOA retarde l'éjaculation, la participation relative des différents sous-types de récepteurs, pouvant notamment être des autorécepteurs inhibiteurs, n'est pas encore totalement établie.

Des expériences de micro-dialyse de la mPOA ont permis d'estimer la concentration extracellulaire de sérotonine durant l'accouplement du rat. De façon surprenante, aucune

modification de la concentration n'a été détectée dans la mPOA contrairement à la forte augmentation détectée dans l'aire hypothalamique latérale suite à l'éjaculation (Lorrain et al. 1997) (Figure 24).



**Figure 24 : Evolution de la concentration en sérotonine dans l'aire hypothalamique latérale de rat durant le comportement sexuel mâle (Hull et al. 2004)**

*La concentration en sérotonine dans l'aire hypothalamique latérale a été estimée par micro-dialyse et normalisée par rapport à la concentration obtenue chez un mâle restant dans sa cage (B). La concentration en sérotonine n'augmente pas lors du contact avec la femelle réceptive inaccessible derrière une grille (F) ou lors de la copulation (C) mais elle augmente significativement lors des intervalles post-éjaculatoires (P) pour revenir à une concentration basale lorsque la femelle est retirée (POST).*

Cette augmentation de sérotonine dans l'aire hypothalamique latérale n'est observée que lors des intervalles post-éjaculatoires. Son rôle serait associé à l'inhibition de la libération de dopamine dans le système mésolimbique, notamment dans le noyau accumbens, ce qui participerait à l'arrêt du comportement sexuel suite à l'éjaculation et l'entrée en phase de satiété (Hull et al. 2004).

En conclusion, la sérotonine possède un effet globalement inhibiteur sur le fonctionnement des réflexes génitaux et sur le comportement sexuel. Sa libération massive dans l'hypothalamus latéral au moment de l'éjaculation serait associée à l'arrêt du comportement sexuel et au déclenchement des périodes de satiété.

## **F) Le GABA**

Le GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique, est le neurotransmetteur inhibiteur majoritaire du système nerveux central. L'injection systémique d'agonistes GABAergiques ou d'inhibiteurs de synthèse aboutissent à l'inhibition du comportement sexuel. Cette action inhibitrice est notamment à l'œuvre lors des premiers instants qui succèdent à l'éjaculation. En effet, la concentration en GABA dans le liquide cébrospinal augmente d'environ 200 % suite à l'éjaculation chez le rat (Qureshi et Södersten, 1986).

Au niveau cérébral, la micro-injection dans la mPOA de bicuculline (antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) diminue les latences d'éjaculation et la durée des intervalles post-éjaculatoires (Fernandez-Guasti et al. 1986). Cependant, une micro-injection équivalente n'a aucun effet sur la période de satiété, indiquant que les mécanismes qui régulent les intervalles post-éjaculatoires et la satiété ne sont pas strictement identiques (Rodríguez-Manzo et al. 2000). De façon opposée, la micro-injection de muscimol, substance psychoactive retrouvée dans les champignons du groupe des Amanites (agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) ou la micro-injection d'inhibiteurs de la dégradation du GABA (Ethanolamine-O-sulfate) aboutissent à une diminution du nombre d'animaux qui s'accouplent et à un allongement des intervalles post-éjaculatoires (Fernández-Guasti et al. 1986), confirmant le rôle inhibiteur joué par le GABA dans la mPOA sur le comportement sexuel.

### **G) La noradrénaline**

La noradrénaline est une catécholamine qui possède un effet ambivalent sur le comportement sexuel. En effet, l'injection d'agonistes ou d'antagonistes des différents récepteurs de la noradrénaline provoque des effets tantôt activateurs ou tantôt inhibiteurs sur comportement sexuel (Pfaff et Joels, 2016). Cela s'explique en partie par la grande variété de fonctions physiologiques régulées par la noradrénaline. En effet, elle représente le neurotransmetteur principal du système nerveux autonome sympathique qui régule entre autre la pression artérielle, le rythme cardiaque, la digestion ou encore l'érection et l'éjaculation.

Au niveau cérébral, l'ablation des cellules noradrénergiques du *locus coeruleus*, principale source de noradrénaline, aboutit à une diminution de la motivation sexuelle et à une augmentation importante des intervalles post-éjaculatoires (McIntosh et Barfield, 1984b).

Dans la mPOA, la noradrénaline possède un effet facilitateur du comportement sexuel. En effet, la micro-injection de noradrénaline augmente les paramètres associés à la motivation sexuelle et à la copulation. De façon opposée, la micro-injection d'antagonistes des récepteurs alpha ou béta adrénergiques altère le comportement sexuel de façon dose-dépendant chez le rat (Mallick et al. 1996).

## **H) L'ocytocine**

L'ocytocine est un nonapeptide exprimé par des neurones hypothalamiques du noyau paraventriculaire (PVN) et du noyau supra optique. L'ocytocine, libérée au niveau de la neurohypophyse par les neurones magnocellulaires, participe en tant que neurohormone au contrôle de la parturition et à l'éjection du lait. Chez le mâle, sa libération dans la circulation sanguine au moment de l'éjaculation est bien caractérisée chez l'homme et jouerait un rôle dans la satiété sexuelle (Thackare et al. 2006).

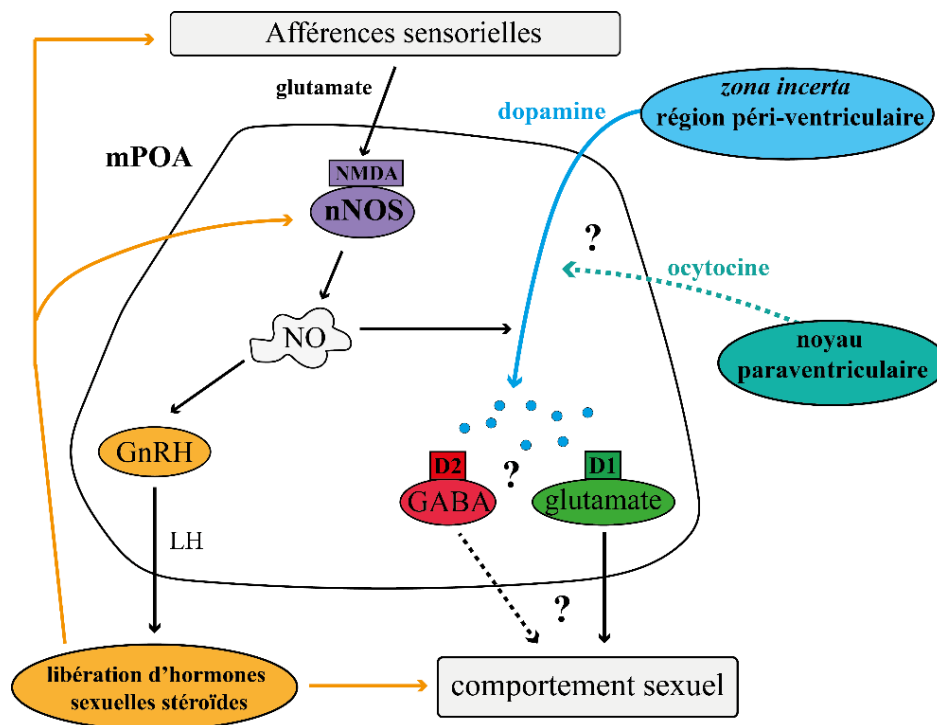
Ce neuropeptide est également sécrété par les neurones parvocellulaires du PVN en tant que neurotransmetteur dans le système de récompense, le système limbique, le bulbe olfactif ou encore dans des régions spinales impliquées dans le contrôle de l'érection. Les neurones ocytocinergiques du PVN sont activés lors de la copulation dès les premières intromissions, comme indiqué par les niveaux d'expression de c-Fos chez le rat (Witt et Insel, 1994). L'effet facilitateur de ce peptide sur le comportement sexuel a été démontré par l'administration systémique ou intra-cérébro-ventriculaire d'ocytocine qui provoque une diminution des latences de montées et d'éjaculation et favorise le déclenchement de l'érection. De façon opposée, l'injection intra-cérébro-ventriculaire d'antagonistes du récepteur de l'ocytocine provoque une altération du comportement sexuel et inhibe le déclenchement d'érections provoqué par la mise en contact avec une femelle réceptive (Argiolas et Melis, 2004).

Au niveau du PVN, les neurones parvocellulaires ocytocinergiques peuvent être activés par différents neurotransmetteurs comme la dopamine, le glutamate ou même l'ocytocine elle-même. Les interactions entre ces neurotransmetteurs et leurs rôles respectifs dans la libération d'ocytocine dans les autres zones cérébrales ne sont pas encore totalement élucidées.

Certains neurones ocytocinergiques du PVN qui projettent vers la mPOA semblent être impliqués dans la régulation de la phase motivationnelle et copulatoire du comportement sexuel. En effet, la micro-injection d'ocytocine dans la mPOA augmente le nombre de montées avec intromissions alors que la micro-injection d'un antagoniste des récepteurs augmente les latences de première montée (Gil et al. 2011). Cet effet facilitateur du comportement sexuel serait dû à une augmentation de la libération de dopamine dans la mPOA induite par l'ocytocine. En effet, un tel mécanisme a été identifié dans d'autres aires cérébrales comme l'aire tegmentale ventrale dans laquelle l'injection d'ocytocine provoque une libération de dopamine (Melis et al. 2007).

Ainsi, l'ocytocine possède un rôle activateur des réflexes génitaux grâce à des projections directes du PVN vers des structures spinales et génitales. L'ocytocine possède également un rôle activateur du comportement sexuel dont le mécanisme d'action, non encore élucidé, pourrait être associé à une augmentation de la libération de dopamine dans la mPOA.

Quelques unes des interactions entre les systèmes de neurotransmission présentés ci-dessus sont résumées dans la figure 25.



**Figure 25 : Différents systèmes de neurotransmission de la mPOA de rat impliqués dans la régulation du comportement sexuel mâle, adapté de Hull et al. (2004)**

Les afférences sensorielles libèrent du glutamate dans la mPOA. Ce glutamate se fixe sur des récepteurs NMDA et active la production de NO (oxyde nitrique) par les nNOS (oxyde nitrique synthase neuronale). Le NO et l'ocytocine, issue de projections du noyau paraventriculaire, provoquent la libération de dopamine à partir de fibres qui proviennent de la zona incerta et de la région péri-ventriculaire. La dopamine libérée se fixe sur des récepteurs D1 et D2 qui, respectivement activent des neurones glutamatergiques et inhibent des neurones GABAergiques, ce qui aboutit à l'activation du comportement sexuel. Le NO libérée dans la mPOA stimule également la libération de GnRH dans l'hypophyse ce qui provoque la libération d'hormones sexuelles qui modulent les niveaux d'expression de nNOS, régulent la sensibilité des afférences sensorielles et stimule le comportement sexuel.

Lors du contact avec une femelle réceptive, les afférences sensorielles stimulent la libération de glutamate dans la mPOA à partir de fibres issues du noyau du lit de la strie terminale, de l'amygdale ou du cortex. Le glutamate se fixe sur des récepteurs NMDA ce qui provoque l'activation de nNOS par des mécanismes calcium-dépendants. Ces enzymes activées, synthétisent du NO qui diffuse vers des terminaisons dopaminergiques issues de la zona incerta et de la région péri-ventriculaire ce qui provoque la libération de dopamine dans la mPOA. Cette libération est également stimulée par de l'ocytocine issue de neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire, selon des mécanismes encore inconnus.

Cette dopamine libérée dans la mPOA active des récepteurs D1 (activateurs) localisés sur des neurones glutamatergiques et active des récepteurs D2 (inhibiteurs) localisés sur des neurones GABAergiques, ce qui stimule les réponses génitales et motrices nécessaires à la réalisation du comportement sexuel. Néanmoins, les cibles de ces cellules et les mécanismes exacts ne sont pas connus. Enfin, le NO de la mPOA stimule également la libération de GnRH (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires) dans l'hypophyse ce qui provoque la libération d'hormones stéroïdes sexuelles dans la circulation sanguine. Ces hormones stéroïdes vont ensuite moduler les niveaux d'expression de nNOS dans la mPOA, réguler la sensibilité des afférences sensorielles et stimuler le comportement sexuel, selon des modalités qui seront détaillées dans le chapitre 2, partie III.

En conclusion, de nombreux neuromédiateurs interviennent dans le contrôle du comportement sexuel. Ils sont impliqués dans la modulation de la réponse des organes génitaux ainsi que dans la régulation des aspects motivationnels et copulatoires. Bien que ces systèmes soient répartis dans de nombreuses aires cérébrales différentes, ils convergent tous dans la mPOA où ils y modulent, au moins en partie, l'expression du comportement sexuel. D'après le modèle de Hull, l'augmentation de la concentration en dopamine dans la mPOA semble être l'événement responsable du déclenchement et du maintien du comportement sexuel, bien que ses cibles moléculaires et cellulaires ne soient pas connues.

Le comportement sexuel est un comportement intégré qui, d'après les questions de Tinbergen (Figure 6), est associé aux fonctions de reproduction chez les Rongeurs. Ce rôle évolutif implique l'existence de systèmes de communication entre les organes périphériques impliqués dans la maturation et l'expulsion des gamètes et le système nerveux impliqué dans le contrôle du comportement sexuel. Cette communication est assurée par différentes hormones dont les rôles sont exposés dans la partie suivante.

### **III. Contrôle endocrine du comportement sexuel mâle**

La fonction de reproduction met en jeu la participation des organes sexuels impliqués dans la production et la maturation des gamètes. Leur fonctionnement est finement régulé par les hormones stéroïdes sexuelles qui possèdent également la capacité de moduler l'expression du comportement sexuel par leur action au niveau cérébral. Lors des périodes périnatales et pubertaires, les hormones sexuelles participent à la maturation des organes sexuels, au développement des caractères sexuels secondaires et à la maturation du système nerveux. Ces effets organisationnels, qui permettent l'expression des comportements de reproduction à l'âge adulte, sont à distinguer des effets activationnels (Phoenix et al. 1959). Seuls les effets activationnels, qui comprennent l'ensemble des régulations exercées par les hormones sexuelles sur le fonctionnement du cerveau adulte, mature et sensible, seront détaillés dans cette partie.

#### **A) Testostérone et fonctions de reproduction chez le mâle**

La testostérone est considérée comme l'hormone majoritairement impliquée dans le contrôle du comportement sexuel mâle depuis plusieurs siècles et notamment depuis les premières expériences historiques de castration réalisées chez le coq, *Gallus gallus domesticus*, par Bethold en 1849 (Quiring, 1944). Bien que l'influence de la castration sur le comportement sexuel de l'homme ait été reporté depuis plus de 3000 ans dans la majorité des civilisations d'Asie et de Mésopotamie (Aucoin et Wassersug, 2006), les expériences réalisées par Bethold ont été les premières à mettre en évidence le lien vasculaire entre gonades, développement des caractères sexuels secondaires et comportement sexuel. Ce facteur testiculaire sera isolé, cristallisé et nommé testostérone en 1935 par David K.G. (Leray, 2012; Nieschlag and Nieschlag, 2014).

Chez le mâle, la testostérone est majoritairement produite au niveau testiculaire par les cellules de Leydig (95%). Une faible partie de la testostérone circulante (5%) est également synthétisée au niveau des glandes surrénales. La synthèse de cette hormone est sous contrôle de l'hormone lutéinisante (LH). Cette gonadotropine est sécrétée par l'adénohypophyse dans la circulation générale après stimulation par l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) produite par l'hypothalamus.

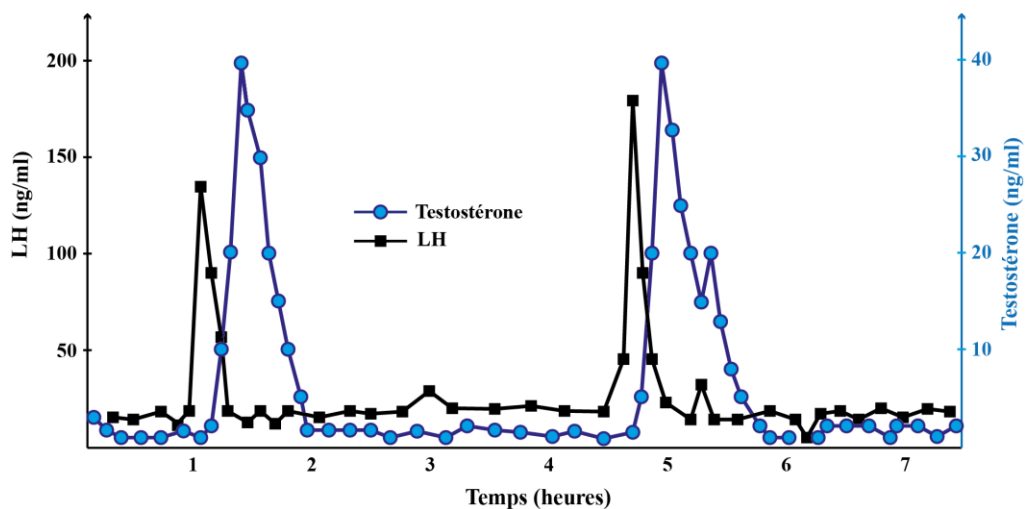
La nature hydrophobe de la testostérone empêche son stockage dans les compartiments intracellulaires et ne permet pas de contrôler précisément le moment de sa libération. Ainsi, l'augmentation du taux circulant de testostérone provoquée par la LH



s'explique par l'activation rapide de voies de signalisation AMPc dépendantes qui régulent directement la transcription et l'activité des enzymes impliquée dans la biosynthèse de la testostérone. Cette régulation rapide de l'ordre de la seconde permet une réponse réactive de ce système endocrine en réponse à des stimuli sexuels (Dong et Hardy, 2004).

### 1) Sécrétion pulsatile

Chez la souris, les taux circulant de testostérone varient au cours de la journée avec une pulsativité de 3 à 4 heures. Cette pulsativité, dont la régularité continue durant la phase de sommeil, est due à l'augmentation transitoire de la sécrétion de LH, elle-même corrélée à la sécrétion de GnRH (Nyby, 2008) (Figure 26).



**Figure 26 : Sécrétion pulsatile de LH et de testostérone chez la souris mâle (Nyby, 2008)**

*La testostérone est sécrétée au niveau des testicules de façon pulsatile en réponse à la LH sécrétée dans l'adénohypophyse. Les pics de testostérone apparaissent régulièrement toutes les 3-4 heures, atteignant une concentration plasmatique 50 fois plus importante que la concentration basale d'environ 1 ng/ml.*

Cette périodicité de sécrétion est à l'origine d'un certain nombre de biais dans les études de dosages. En effet, selon la phase dans laquelle se trouve l'individu au moment du prélèvement, les valeurs peuvent varier d'un facteur 40. Cela est à l'origine d'une grande variabilité entre les individus d'un même groupe expérimental ce qui aboutit parfois à des résultats contradictoires.

Bien que la concentration plasmatique en testostérone soit pulsatile et rythmée au cours de la journée, elle est sous l'influence de facteurs externes qui peuvent moduler sa sécrétion. Cela est notamment le cas de plusieurs stimuli sensoriels associés à l'accouplement.

## **2) Sécrétion de testostérone et stimuli associés à l'accouplement**

Chez la souris, l'exposition d'un mâle à une femelle réceptive inaccessible positionnée derrière une grille provoque une augmentation de la testostérone plasmatique. Cependant, une première étude indique que cette augmentation est uniquement observée pour les souches C57Bl/6 (passage de 1 à 3 ng/ml) et DBA2J (passage de 3 à 14 ng/ml) mais pas pour les souches BALB/c, BDF1 et CBA/H (Batty, 1978). De façon contradictoire, une deuxième étude indique que cette augmentation est retrouvée uniquement chez les souches CBA/H (passage de 1,5 à 4 ng/ml) et BALB/c (passage de 0,8 à 4 ng/ml) mais pas chez les souches C57Bl/6 et DBA2J (Amstislavskaya et Khrapova, 2002).

L'augmentation de testostérone peut aussi être provoquée par une exposition à de l'urine de femelle réceptive (Maruniak et Bronson, 1976), aux phéromones qui la composent (Singer et al. 1988; Wysocki et al. 1983) ou par l'exposition à des vocalisations ultrasonores issues d'une femelle réceptive (Nyby, 2008).

Des dosages plasmatiques réalisés à différents moments de l'accouplement ne révèlent aucune différence significative entre la première montée, la seconde montée, l'éjaculation ou la période post-éjaculatoire avec des concentrations comprises entre 1 et 5 ng/ml pour la souche C57Bl/6 (Amstislavskaya et Popova, 2004; Batty, 1978).

Malgré la difficulté d'interprétation de ces résultats, Coquelin et Bronson (1980) ont proposé un modèle dans les années 80 dans lequel le comportement sexuel de la souris mâle est associé à deux pics de testostérone. Le premier pic apparaît lors des premiers instants de la phase motivationnelle alors que le deuxième pic est associé à l'éjaculation. Néanmoins, les nombreuses études parues depuis sur le sujet n'ont jamais totalement confirmé ce modèle en ce qui concerne les cinétiques, les amplitudes et le nombre de pics observés.

Chez le rat, de façon similaire à la souris, il est possible d'induire une augmentation de la testostérone plasmatique par une exposition à de l'urine de femelle réceptive (Purvis et Haynes, 1978). De plus, la concentration plasmatique en testostérone est augmentée lors de la copulation et immédiatement après la première éjaculation uniquement chez des mâles sexuellement expérimentés (Bonilla-Jaime et al. 2006). Cela est confirmée par des dosages réalisés lors du premier intervalle post-éjaculatoire qui indiquent une augmentation de la concentration en testostérone uniquement chez des mâles fréquemment accouplés (Kamel et al. 1975).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Shulman et Spritzer (2014). Dans cette étude, la testostérone plasmatique est augmentée uniquement lors du premier accouplement d'un rat alors qu'aucune différence n'est observable lors des 7 accouplements

suivants. De façon opposée à tous ces résultats, Balin et Schwartz (1976) n'ont observé aucune différence dans les concentrations plasmatiques de LH et de testostérone lors de toutes les phases du comportement sexuel par rapport à un rat conservé dans sa cage de stabulation.

Ainsi, les données de la littérature sur l'évolution de la concentration en testostérone selon les différentes phases de l'accouplement sont contradictoires. Les valeurs obtenues correspondent rarement au facteur 40 observé lors des variations circadiennes. En effet, elles se répartissent plutôt entre 1 et 10 ng/ml. Néanmoins, il apparaît admis que la concentration plasmatique de testostérone est augmentée par des stimuli sexuels associés à la phase motivationnelle (urine, phéromones, vocalisations) mais son évolution pendant la copulation et au moment de l'éjaculation - ou des éjaculations chez le rat - est loin de faire consensus.

Cependant, l'augmentation de la concentration plasmatique en testostérone par des stimuli associés à l'accouplement semble être largement conservée au sein des Mammifères comme cela a été montré chez le lapin, le taureau, *Bos taurus*, le hamster, le bélier, *Ovis aries* ou encore l'homme (Gombe et al. 1973; Nyby, 2008; Perkins et Roselli, 2007; Younglai et al. 1976). Chez l'homme, il a notamment été montré que la concentration salivaire ou plasmatique de testostérone augmentait suite à des stimuli sexuels variés comme l'entrée dans un club de strip-tease (Escasa et al. 2011), le visionnage de films érotiques (Cook et Crewther, 2012), l'exposition olfactive à des sécrétions génitales de femmes proches de l'ovulation (Cerdeña-Molina et al. 2013), l'anticipation d'un rapport sexuel (Anon, 1970) ou une relation sexuelle (Dabbs Jr. et Mohammed, 1992).

### **3) Glutamate et sécrétion de testostérone**

Des expériences de micro-injection de glutamate (2 $\mu$ M) dans le troisième ventricule cérébral ont permis de mettre en évidence que ce neurotransmetteur modulait positivement la libération de LH et donc la synthèse de testostérone chez le rat (Ondo et al. 1976). Cette libération de LH n'est pas retrouvée lors d'une injection de glutamate dans l'hypophyse antérieure, indiquant la participation d'une régulation hypothalamique faisant intervenir l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH). En effet, la libération de LH induite par le glutamate est abolie par l'administration d'un antagoniste GnRH (Strobl et al. 1993) alors que l'administration systémique de NMDA augmente la synthèse d'ARNm du GnRH au niveau de la mPOA (Petersen et al. 1991). Bien que l'activation de la libération du GnRH par le glutamate soit bien établie, la participation éventuelle des neurones à kiss-peptine n'est pas encore avérée car l'injection de NMDA dans le troisième ventricule de souris kiss-peptine KO provoque toujours une augmentation de la sécrétion de LH

(d'Anglemont de Tassigny et al. 2010). Dans l'état actuel des connaissances, différentes populations de neurones GnRH possèderaient une sensibilité au glutamate dépendant de leur localisation dans l'hypothalamus. Ainsi, les neurones à GnRH de la mPOA seraient activés par un mécanisme NMDA dépendant alors que les neurones à GnRH du noyau arqué seraient activés par des mécanismes AMPA dépendant (Brann et Mahesh, 1994).

#### **4) Castration, supplémentation et comportement sexuel**

Une première approche permettant d'identifier le rôle de la testostérone dans le contrôle du comportement sexuel consiste à castrer puis à supplémenter les individus mâles à l'âge adulte. La castration provoque une altération du comportement sexuel qui n'est pas immédiate et met plusieurs semaines à impacter l'ensemble des phases du comportement sexuel selon une séquence bien définie et conservée parmi les espèces de Rongeurs. Les altérations concernent tout d'abord l'éjaculation, puis les montées avec intromission et enfin l'ensemble des comportements de la phase motivationnelle : *in fine*, la castration induit une abolition presque totale de tout comportement sexuel et une altération des reflexes érectiles chez la plupart des animaux (Clemens et al. 1988; Hull et al. 2002). De façon intéressante, la complémentation en testostérone restaure l'ensemble de ces comportements dans l'ordre inverse de leur disparition : les premiers comportements restaurés sont ceux de la phase motivationnelle, puis les montées avec intromission et enfin le pourcentage d'animaux atteignant l'éjaculation (Hull et al. 2002). Cette restauration du comportement sexuel, partielle ou totale selon la souche considérée (Clemens et al. 1988), nécessite une période d'imprégnation d'environ 10 jours (McGinnis et Dreifuss, 1989; Putnam et al. 2001) et la néo-synthèse de protéines (McGinnis et Kahn, 1997).

La castration n'altère pas le comportement sexuel de la même façon selon la souche de souris considérée (Clemens et al. 1988). L'exemple le plus remarquable concerne la souche B6D2F1, dont 30 % des individus continuent à s'accoupler jusqu'à l'éjaculation 25 semaines après la castration alors que ce pourcentage est de 0 % pour la souche C57Bl6 et de 10 % pour la souche DBA2J. Le pourcentage d'animaux présentant des montées est également plus important chez la souche B6D2F1 (75 %) contre seulement 30 % chez les deux autres souches, 25 semaines après la castration. Ainsi, la castration est souvent présentée comme une abolition absolue du comportement sexuel mais dans le détail, une proportion non négligeable d'individus présente une rétention, au moins partielle, des capacités copulatoires.

Cette observation, rarement énoncée dans la littérature scientifique, a été relatée il y a plusieurs millénaires pour les castrations concernant les hommes. La grande majorité des

civilisations antiques et médiévales pratiquaient couramment des castrations dans le but d'obtenir des eunuques dont les qualités intellectuelles et relationnelles étaient très prisées. Universellement décrit comme loyal, intelligent, organisé et peu enclin aux emportements virils, l'eunuque occupait des postes à haute responsabilité (diplomate, haut conseiller, général) nécessitant un bon jugement et un sens développé de la parcimonie. Dans l'imaginaire collectif, ce rôle est souvent occulté au profit de celui de gardien de harem. Cette réalité, relatée dans les textes de la culture romaine, byzantine ou encore chinoise, a permis l'étude de la sexualité des eunuques. De façon surprenante, seule une minorité des eunuques présentait une absence totale de comportement sexuel alors que la grande majorité présentait une sexualité homosexuelle et hétérosexuelle active. Ainsi, la fonction de garde de harem permettait à l'eunuque d'entretenir de nombreuses relations sexuelles avec les femmes gardées. La castration servait donc uniquement à éviter tout enfantement et tout trouble dans la lignée royale. C'est pour cela que certains sultans ottomans, davantage regardant sur les mœurs de leur harem, procédaient à l'ablation du pénis de façon concomitante à la castration.

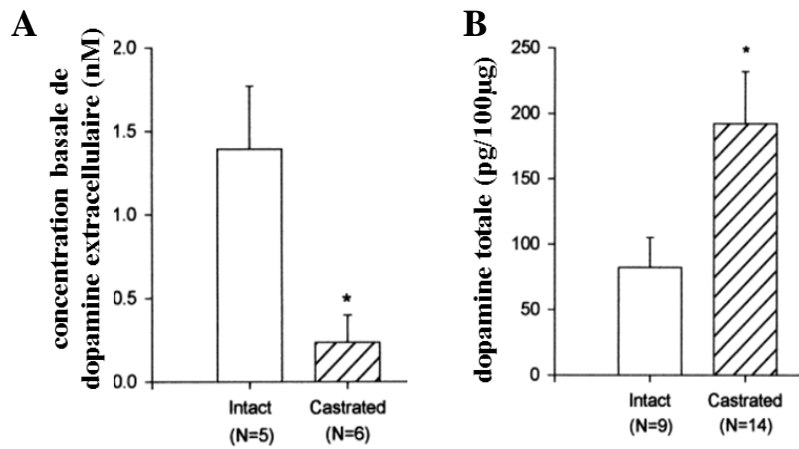
La sexualité active des eunuques explique en partie leur implication importante dans l'éducation sexuelle des jeunes souverains et leur statut particulier dans la société, qualifié par certains auteurs d' « objet de désir le plus recherché de tous » comme le cite Ayalon (1999) : « a man would love a eunuch because he resembled in some ways a woman; and a woman because he resembled in some ways a man ».

De façon intéressante, la rétention du comportement sexuel après castration chez les eunuques a historiquement été mise en lien avec l'âge de la castration. En effet, plus la castration était réalisée tard après la puberté (comme souvent le cas dans la Rome antique), plus l'eunuque présentait un comportement sexuel proche de celui observé avant la castration. A cela s'ajoutait une certaine variabilité interindividuelle qui entraînait, dans les mêmes conditions de castration, des eunuques totalement asexués ou très actifs sexuellement comme cela est observé chez la souris (Aucoin et Wassersug, 2006). Ainsi, bien que la castration altère le comportement sexuel, elle n'est pas synonyme d'abolition de la copulation.

##### **5) Effet de la castration sur la libération de dopamine dans la mPOA**

Les rats castrés présentent dans la mPOA un taux basal de dopamine extracellulaire plus faible que les rats intacts. En revanche, des traitements avec des amphétamines et des dosages de la dopamine totale indiquent que les rats castrés possèdent globalement plus de dopamine totale que les rats intacts. Ainsi, la castration aboutit à un défaut de libération de la

dopamine dans la mPOA, ce qui peut expliquer l'altération du comportement sexuel chez les animaux castrés (Du et al. 1998; Hull et al. 1997) (Figure 27).

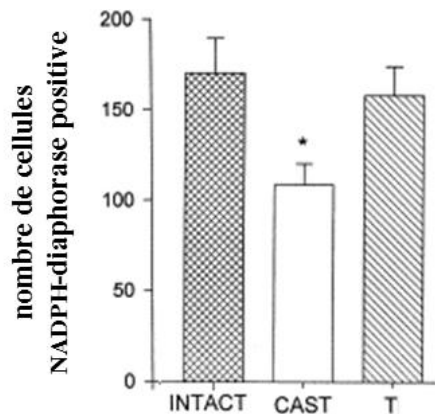


**Figure 27 : La castration altère la libération de la dopamine dans la mPOA de rat (Du et al. 1998; Hull et al. 1997)**

(A) Les mâles castrés présentent une concentration basale de dopamine extracellulaire dans la mPOA plus faible que les animaux intacts.

(B) Le dosage de la dopamine totale contenue dans la mPOA indique que les animaux castrés possèdent davantage de dopamine que les animaux intacts, indiquant un déficit de libération de dopamine induit par la castration.

Cette altération du système dopaminergique observée chez les rats castrés est due à des déficits de synthèse de NO, neuromédiateur facilitateur de la libération de dopamine. En effet, l'expression de la nNOS est positivement régulée par la testostérone dans la mPOA : la castration diminue le nombre de cellules possédant une activité enzymatique nNOS dans la mPOA alors que ce déficit est aboli par la supplémentation en testostérone (Du et Hull, 1999; Sato et al. 2005) (Figure 28).



**Figure 28 : La testostérone régule positivement l'activité de la nNOS dans la mPOA de rat (Du et Hull, 1999)**

La castration (CAST) diminue le nombre de cellules présentant une activité enzymatique nNOS (marquage NADPH-diaphorase) alors que la supplémentation en testostérone (T) restaure ce déficit.

Cette modification de l'activité enzymatique est interprétée comme une régulation du niveau basal de la nNOS, connu pour être positivement régulé par les stéroïdes sexuels (Panzica et al. 2006).

Ainsi, l'altération du comportement sexuel des mâles castrés serait due, au moins en partie, à un déficit de la libération de dopamine au niveau de la mPOA, *via* un mécanisme NO dépendant.

#### **6) Injection ponctuelle de testostérone et comportement sexuel mâle**

Le rôle physiologique de l'augmentation de la testostérone plasmatique associée à l'accouplement est assez peu documenté dans la littérature. La majorité des études se sont intéressées aux mécanismes associés à deux cas cliniques humains : l'hypogonadisme et l'abus de stéroïdes anabolisants. Pour cela, les études utilisent des traitements chroniques dans lesquels la testostérone est délivrée à de fortes doses non physiologiques pour mimer l'abus d'anabolisant ou des modèles de castration permettant de mimer les cas d'hypogonadisme. Peu d'études ont donc été effectuées avec des doses physiologiques et des traitements ponctuels de testostérone.

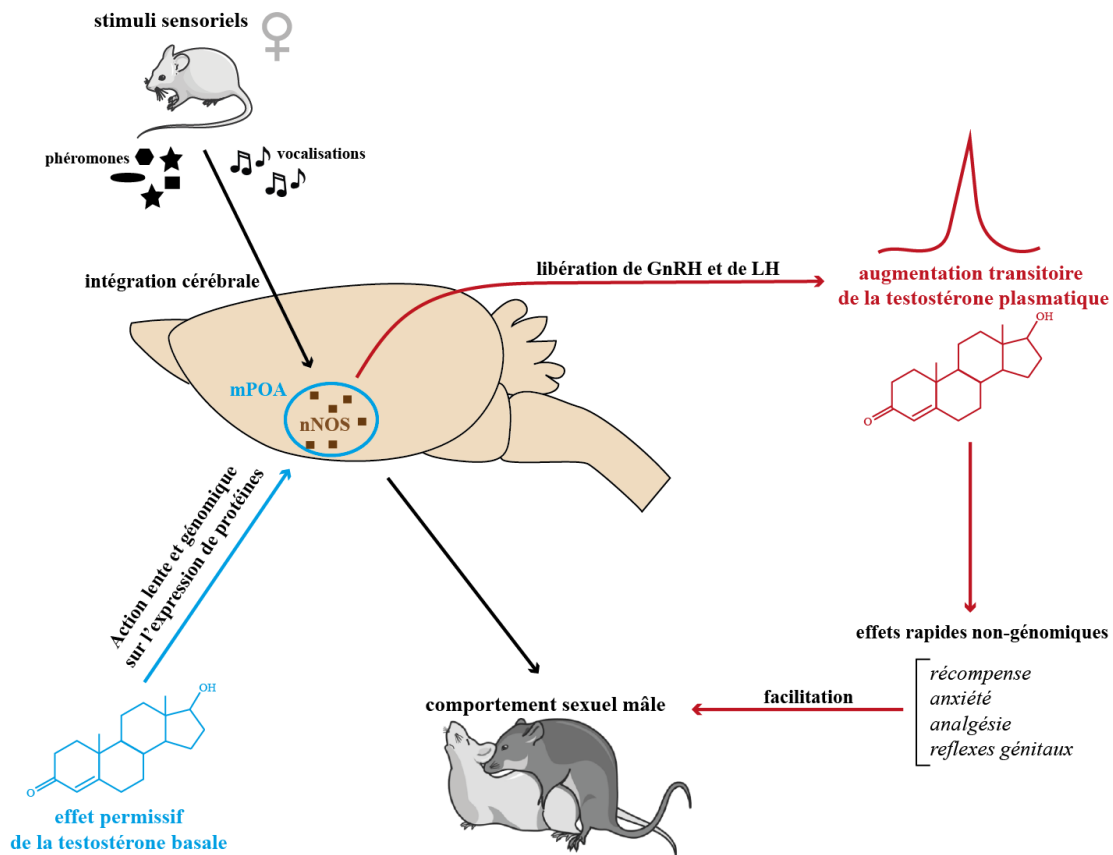
Chez la souris, l'injection d'une dose de testostérone correspondant au pic observé lors de la mise en présence avec une femelle, diminue les latences de première montée observées une heure après l'injection (James et Nyby, 2002).

Chez le rat, l'expérience similaire a permis de montrer que l'injection de testostérone diminue, comme chez la souris les latences de première montée mais également la latence d'éjaculation ainsi que la durée des intervalles post-éjaculatoires (Malmnäs, 1977).

Un certain nombre d'études ont utilisé des modèles de souris castrées et supplémentées en testostérone. En absence de toute pulsativité, leur comportement sexuel ne présente pas de différences majeures avec des animaux intacts (Raskin et al. 2009). Ainsi, le pic de testostérone semble posséder un effet facilitateur sur le comportement sexuel bien que son absence ne semble pas altérer la copulation.

Nyby (2008) propose un modèle selon lequel le rôle physiologique de ce pic de testostérone est associé à la régulation de comportements non-copulatoires influençant indirectement l'efficacité générale de la copulation. En effet, la testostérone est connue pour exercer des effets anxiolytiques (Aikey et al. 2002) et analgésiques (Edinger et Frye, 2004; Pednekar et Mulgaonker, 1995). Elle permet également de réguler positivement les aspects de récompense (Arnedo et al. 2002, 2000; Wood, 2002; Wood et al. 2004) et d'apprentissage (Edinger et al. 2004).

Ainsi le modèle proposé par Nyby (2008) présenté figure 29, insiste sur le double rôle joué par la testostérone dans le contrôle du comportement sexuel.



**Figure 29 : Modèle explicatif du double rôle de la testostérone dans le contrôle du comportement sexuel mâle, adapté de Nyby (2008)**

La testostérone sécrétée de façon basale assure le maintien du cerveau dans un état capable d'activer le comportement sexuel, notamment par le maintien de l'expression de la forme neuronale de l'oxyde nitrique synthase (nNOS) dans l'aire pré-optique médiane (mPOA). Cette régulation par la testostérone met en jeu des régulations lentes génomiques (bleu). Les stimuli sensoriels en provenance de la femelle réceptive (phéromones et vocalisations) sont intégrés au niveau cérébral et aboutissent au déclenchement du comportement sexuel mais aussi à la libération de GnRH et de LH à l'origine d'une augmentation transitoire de la testostérone plasmatique. Cette augmentation exerce des rapides effets non génomiques (rouge) sur le système de la récompense et module positivement l'anxiété, l'analgésie et ainsi que les réflexes génitaux. L'ensemble de ces régulations facilite la réalisation du comportement sexuel.

Premièrement, la testostérone sécrétée de façon basale par le testicule permet de maintenir le cerveau, notamment la mPOA, dans un état sensible aux stimuli sensoriels modulateurs du comportement sexuel. Cela est notamment le cas *via* le maintien de l'expression de la nNOS, impliquée dans la libération de dopamine activatrice du comportement sexuel. Cette régulation s'effectuant sur des temps longs, souvent supérieurs à plusieurs semaines, est vraisemblablement associée à des régulations génomiques de la testostérone, comme cela sera développé dans la partie suivante.



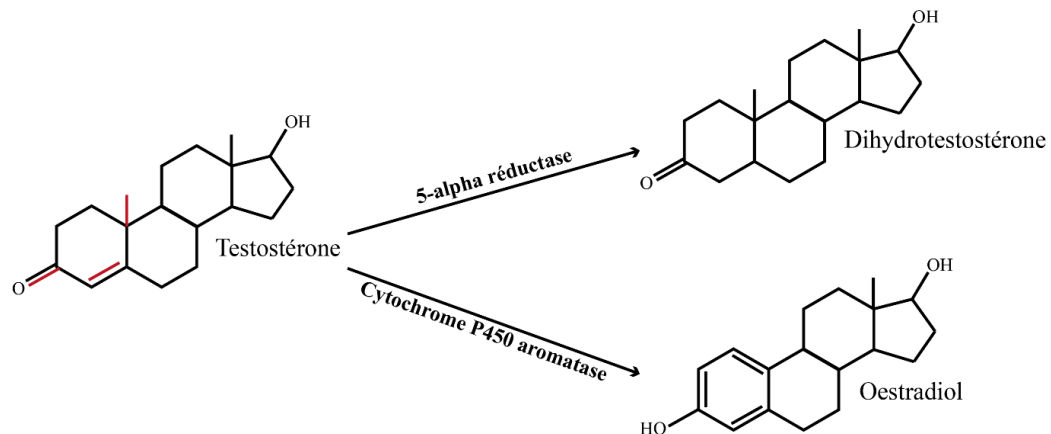
Deuxièmement, l'intégration cérébrale des stimuli sensoriels en provenance d'une femelle réceptive provoque une libération de GnRH dans l'hypophyse antérieure qui induit la libération de LH dans la circulation sanguine. Cela a pour effet d'induire une augmentation transitoire de la testostérone circulante qui active un ensemble de composantes comportementales (régulation du système de récompense, de l'anxiété, de l'analgésie, et des réflexes génitaux) qui facilitent la copulation. Cet effet rapide et transitoire serait vraisemblablement dû à des régulations non génomiques de la testostérone.

## **B) Mécanismes moléculaires d'action de la testostérone**

Une partie des effets décrits précédemment ne sont pas directement dus à l'action de la testostérone mais à l'action de deux de ses principaux métabolites actifs que sont l'œstradiol et la dihydrotestostérone, également appelée androstanolone.

### **1) Les métabolites de la testostérone**

L'œstradiol est obtenu suite à l'aromatation de la testostérone par le cytochrome P450 aromatasase. Cette enzyme catalyse l'oxydation du cycle porteur de la fonction cétone en cycle aromatique, de façon concomitante à l'élimination d'un groupement méthyl. La dihydrotestostérone est obtenue suite à la réduction la testostérone (élimination du doublet non liant du cycle porteur de la fonction cétone) par la 5 $\alpha$ -réductase (Figure 30).



**Figure 30 : La testostérone est convertie dans les tissus cibles en deux métabolites actifs : l'œstradiol et la dihydrotestostérone**

*Les liaisons représentées en rouge sont celles qui diffèrent entre la testostérone et ses métabolites actifs. L'oxydation de la testostérone par le cytochrome P450 aboutit à l'œstradiol alors que la réduction de la testostérone par la 5 $\alpha$ -réductase aboutit à la dihydrotestostérone.*

La conversion de la testostérone en œstradiol et en dihydrotestostérone a lieu dans les tissus pourvus en équipement enzymatique adéquat comme cela est le cas du testicule, des glandes surrénales, du foie, de la peau ou encore de certaines régions cérébrales.

Chez le mâle, ces métabolites sont également sécrétés dans la circulation sanguine au niveau des testicules et des glandes surrénales qui libèrent ces métabolites avec la même pulsativité que la testostérone (Winters et Troen, 1986). L'œstradiol et la dihydrotestostérone sont néanmoins présents dans le plasma à de plus faibles concentrations, environ 50 fois inférieures aux concentrations de testostérone (Gupta et al. 1975). Bien que l'évolution des concentrations plasmatiques de ces métabolites n'ait jamais été établie au cours du comportement sexuel, leur implication dans la régulation des fonctions de reproduction est bien établie.

Au niveau périphérique, l'œstradiol est connu pour son effet inhibiteur de l'érection. Cette action serait due à une inhibition de la sécrétion de GnRH concomitante à une inhibition de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig ce qui limiterait la synthèse de testostérone (Srilatha et Adaikan, 2004). Certains cas de priapisme ont ainsi été traités par l'injection de faibles doses d'œstradiol (Shamloul et el Nashaar, 2005). Bien que le mécanisme exact par lequel la testostérone régule positivement l'érection soit encore sujet à débat (régulation périphérique ou centrale) (Rajfer, 2000), la dihydrotestostérone semble être le métabolite actif responsable de cet effet car la supplémentation en dihydrotestostérone d'un mâle castré permet de rétablir l'érection de façon comparable à des animaux uniquement supplémentés en testostérone (Lugg et al. 1995). L'œstradiol est également impliquée dans la régulation de la perméabilité des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli (MacCalman et al. 1997) et stimule, tout comme la dihydrotestostérone (Ahmad et al. 1975; Harris et al. 1977; Meachem et al. 2007), la spermatogénèse (Carreau et Hess, 2010; O'Donnell et al. 2001; Schulster et al. 2016).

La restauration de la copulation par la testostérone après castration est en partie due à l'action de ses métabolites. En effet, la supplémentation en testostérone associée à un inhibiteur de l'aromatase P450 inhibe fortement la restauration du comportement sexuel alors que cette inhibition est reversée par l'ajout d'œstradiol (Roselli et al. 2003). De plus, la supplémentation d'un mâle castré avec de la dihydrotestostérone ou de l'œstradiol seul ne restaure que partiellement tous les comportements associés à l'accouplement. En revanche, la supplémentation effectuée avec les deux métabolites restaure les paramètres du comportement sexuel à un niveau comparable à la supplémentation effectuée avec la testostérone seule (Attila et al. 2010; Cooke et al. 2003).

## 2) Les récepteurs de la testostérone et de ses métabolites

Au niveau cérébral, la testostérone et la dihydrotestostérone se lient aux récepteurs des androgènes (AR) alors que l'œstradiol se lie aux récepteurs des œstrogènes (ER). Ces récepteurs ont été initialement décrits comme exerçant un unique rôle de facteur de transcription. Cependant, il est aujourd'hui clair que ces récepteurs exercent des actions cellulaires rapides et modulent des voies de signalisation sans translocation dans le noyau. Certains auteurs utilisent la distinction génomique/non-génomique pour caractériser ces deux modalités d'action. Les termes « voie classique » et voie « non-classique » seront préférés dans cette partie. En effet, l'activation des voies de signalisations cytosoliques peut *in fine* aboutir à la modulation de la transcription de gènes cibles, rendant le qualificatif « non-génomique » inexact.

### - Les récepteurs AR

La première modalité d'action de l'AR passe par la voie classique. En absence d'hormone, les récepteurs AR sont engagés dans un complexe multi-protéique cytosolique qui maintient les récepteurs dans un état inactif grâce à des protéines chaperons : HSP90, HSP70 et HSP40. La fixation de la testostérone ou de la dihydrotestostérone (qui possède une affinité 3 fois supérieure pour les AR) induit la déstabilisation du complexe et provoque la dimérisation des récepteurs qui sont transloqués dans le noyau (Azad et al. 2015). Le dimère actif se lie sur des séquences spécifiques de l'ADN au niveau des éléments de réponse aux hormones (ARE : androgen responsive elements) grâce à des domaines en doigt de zinc et recrute des coactivateurs transcriptionnels ainsi que la machinerie de transcription. Le pic de transcription est le plus souvent observé quelques heures après la stimulation par les androgènes. Cette voie classique est facilement identifiable par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction qui abolissent les effets cellulaires observés (Foradori et al. 2008).

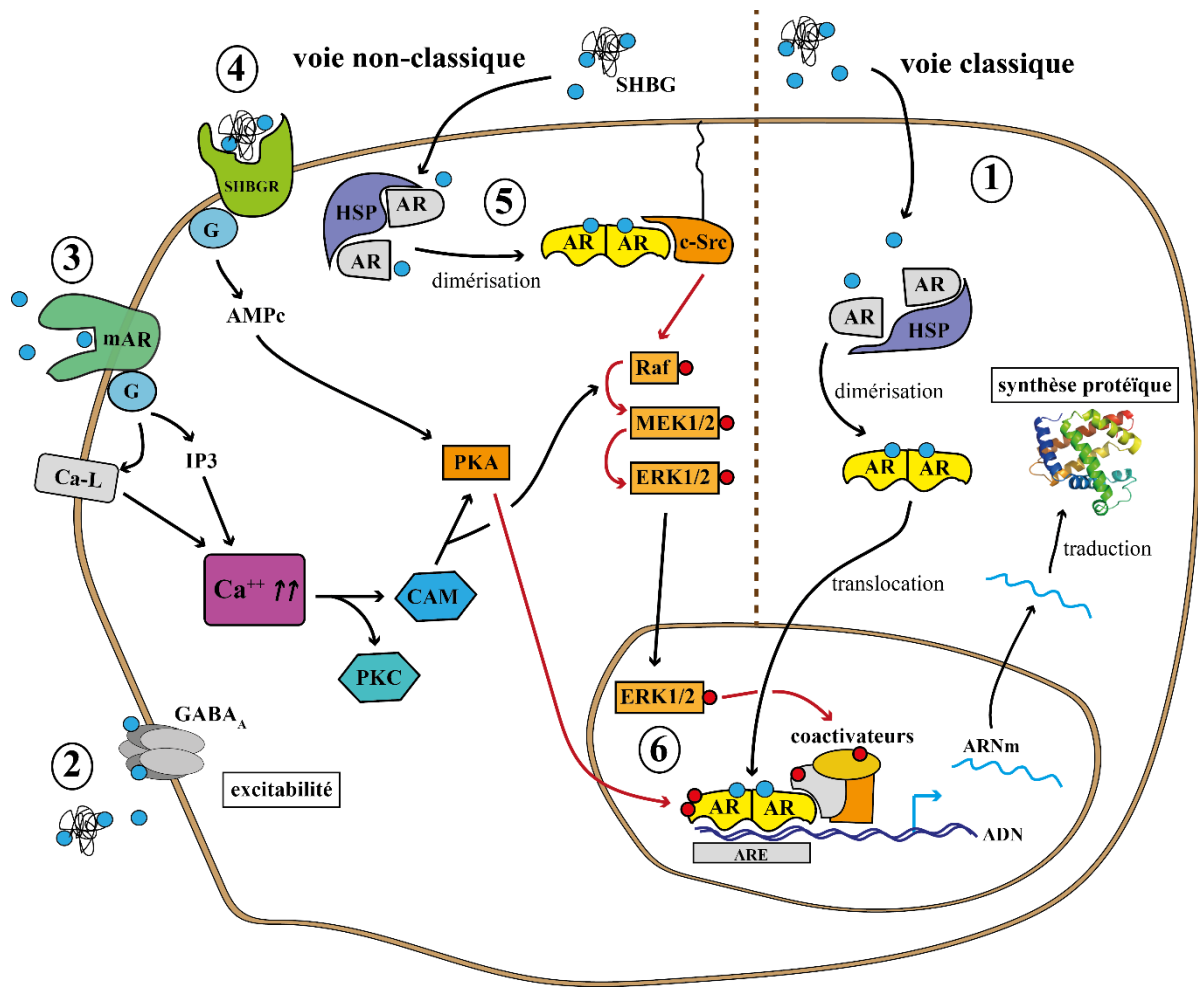
Les autres modalités d'action de l'AR font intervenir des mécanismes plus rapides qui ne nécessitent pas la translocation nucléaire du récepteur. Tout d'abord, les androgènes possèdent la capacité d'interagir directement comme modulateur allostérique de certains récepteurs comme les récepteurs GABA<sub>A</sub>, modulant ainsi les propriétés de perméabilité membranaire et d'excitabilité des cellules (Rahman et Christian, 2007; Rahman et al. 2006). Les androgènes peuvent également se fixer au niveau de récepteurs membranaires couplés à des protéines G, appelés mAR (membrane associated androgen receptor). Certains de ces récepteurs identifiés sont codés par des gènes différents de celui de l'AR, comme ZIP9 et

GPRC6A mais des recherches sont toujours en cours afin de cloner et de purifier les autres récepteurs qui sont exprimés de façon spécifique selon le type cellulaire étudié. Certains de ces mAR sont des isoformes tronquées du récepteur AR de la voie classique, comme notamment AR9 et AR45 (Foradori et al. 2008; Yang et al. 2011). Le point commun de ces récepteurs membranaires réside dans leur capacité à activer des protéines G, ce qui aboutit à une augmentation rapide et transitoire de la concentration intracellulaire en calcium. Cette augmentation est permise par l'activation de canaux calcium voltage-dépendant de type L (origine extracellulaire) ou par l'activation de la voie de signalisation IP3-DAG qui déclenche la libération de calcium depuis le réticulum endoplasmique (origine intracellulaire).

L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium aboutit à l'activation de plusieurs voies de signalisation par l'intermédiaire de la protéine kinase C (PKC) ou de la calmoduline (CAM) qui active notamment la protéine kinase A (PKA) ou les voies Mitogen-activated protein kinases (MAPK).

Les androgènes peuvent également stimuler l'activité de la PKA par un mécanisme rapide qui implique la sex hormone binding globulin (SHBG). Cette glycoprotéine, qui assure le transport sanguin des stéroïdes hydrophobes, est reconnue au niveau d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires, le « sex hormone binding globuline receptor » (SHBGR). Ce récepteur, couplé à une protéine G active l'adénylate cyclase qui synthétise de l'AMPc ce qui aboutit à l'activation de la PKA (Nakhla et al. 1999).

Enfin, les androgènes peuvent exercer une action rapide en se fixant à des récepteurs AR intracellulaires, similaires à ceux de la voie classique, qui se dimérisent et recrutent directement des kinases de la famille des c-Src qui activent les voies MAPK, dont notamment la voie ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase). Cette activation aboutit à la phosphorylation de ERK1/2 qui transloque dans le noyau et module la transcription de gènes *via* la phosphorylation de coactivateurs transcriptionnels. Néanmoins, la distinction fonctionnelle entre la voie classique et la voie non classique peut s'avérer délicate car l'activation des voies de signalisation de la voie non-classique module l'efficacité de l'action transcriptionnelle de l'AR de la voie classique. En effet, l'activation de la PKA aboutit à la phosphorylation indirecte de l'AR (ce qui module son activité de régulateur de transcription). De plus, la translocation nucléaire de pERK1/2 dans le noyau aboutit à la phosphorylation de coactivateurs qui interagissent avec l'AR mais également de coactivateurs qui régulent la transcription de l'AR lui-même. L'ensemble des mécanismes de la voie classique et non classique sont résumés dans la Figure 31.



**Figure 31 : Voies classique et non-classique de l'action cellulaire des récepteurs des androgènes (AR)**

Les androgènes, testostérone et dihydrotestostérone (ronds bleus) sont liés à la SHBG (sex hormone binding globulin) dans la circulation sanguine. Une fraction libre est libérée à proximité des cellules cibles. Les flèches rouges représentent des activations induites par des phosphorylations. Les ronds rouges représentent l'ajout d'un groupement phosphate.

(1) La voie classique consiste en une action transcriptionnelle de l'AR qui nécessite plusieurs heures avant d'aboutir à des effets cellulaires visibles. L'AR est dans un état inactivé lié à des protéines chaperons (HSP : heat shock proteins) dans le cytosol. La fixation des androgènes provoque la libération de l'AR qui s'homodimérise et transloque dans le noyau. Le dimère actif se fixe sur des séquences spécifiques (ARE : androgen response elements) et recrute des coactivateurs transcriptionnels ainsi que la machinerie de transcription. Les ARNm transcrits sont ensuite traduits dans le cytosol ce qui aboutit à la synthèse de nouvelles protéines.

La voie non-classique est caractérisée par des cinétiques beaucoup plus courtes et par l'absence de translocation des AR dans le noyau.

(2) Les androgènes peuvent agir comme modulateurs allostériques de certains récepteurs comme les récepteurs GABA<sub>A</sub> ce qui module les propriétés de perméabilité membranaire et d'excitabilité des cellules.

(3) Les androgènes peuvent se fixer au niveau de récepteurs membranaires mAR couplés à des protéines G (membrane associated androgen receptor). Cette fixation aboutit à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire en activant des canaux calciques de type L (Ca-L) ou en stimulant la libération de calcium depuis le réticulum via l'activation de la voie inositol triphosphate (IP3). Cette augmentation active des voies de signalisation via la protéine kinase C (PKC) et la calmoduline (CAM).

(4) Les androgènes liés à la SHBG peuvent se fixer à un récepteur à 7 domaines transmembranaires, le sex hormone binding globuline receptor (SHBGR). Cette fixation aboutit à l'activation d'une protéine G qui active l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc ce qui active la protéine kinase A (PKA).

(5) Enfin les androgènes peuvent se fixer sur l'AR intracellulaire qui recrute des kinases de la famille des c-Src ce qui active les voies Mitogen-activated protein kinases (MAPK).

(6) Les voies classiques et non-classiques sont interconnectées : l'activation de la PKA aboutit à la phosphorylation indirecte de l'AR ce qui module son activité de régulateur de transcription ; l'activation des voies MAPK aboutit à la translocation de la pERK1/2 dans le noyau qui va phosphoryler des coactivateurs qui interagissent avec l'AR de la voie classique ainsi que des coactivateurs qui régulent la transcription de l'AR lui-même.

La plupart des études permettant d'identifier les différents types de récepteurs et les voies de signalisation activées par les androgènes ont été menées *in vitro* sur des cellules de Sertoli, Leydig ou encore des cultures primaires de neurones. Il est donc probable que les modalités d'action des androgènes présentées figure 31 ne soient pas toutes présentes dans un même neurone et puissent différer selon le type cellulaire considéré.

#### - Les récepteurs ER

Les ER peuvent exercer leurs effets par une voie classique et par une voie non-classique. Dans la voie classique, les deux isoformes ER $\alpha$  et ER $\beta$  (respectivement codés par les gènes *ESR1* et *ESR2*) sont engagés dans un complexe multi-protéique cytosolique qui maintient les récepteurs dans un état inactif grâce à des protéines chaperons de la famille des HSP. La fixation des œstrogènes, majoritairement l'œstradiol, induit la déstabilisation du complexe et provoque la formations d'homodimères (ER $\alpha$ -ER $\alpha$  ou ER $\beta$ -ER $\beta$ ) ou d'hétérodimères (ER $\alpha$ -ER $\beta$ ) qui sont transloqués dans le noyau (Micevych et Kelly, 2012). Le dimère actif se lie sur des séquences spécifiques de l'ADN au niveau des éléments de réponse aux hormones (ERE : estrogen responsive elements) grâce à des domaines en doigt de zinc et recrute des coactivateurs transcriptionnels ainsi que la machinerie de transcription.

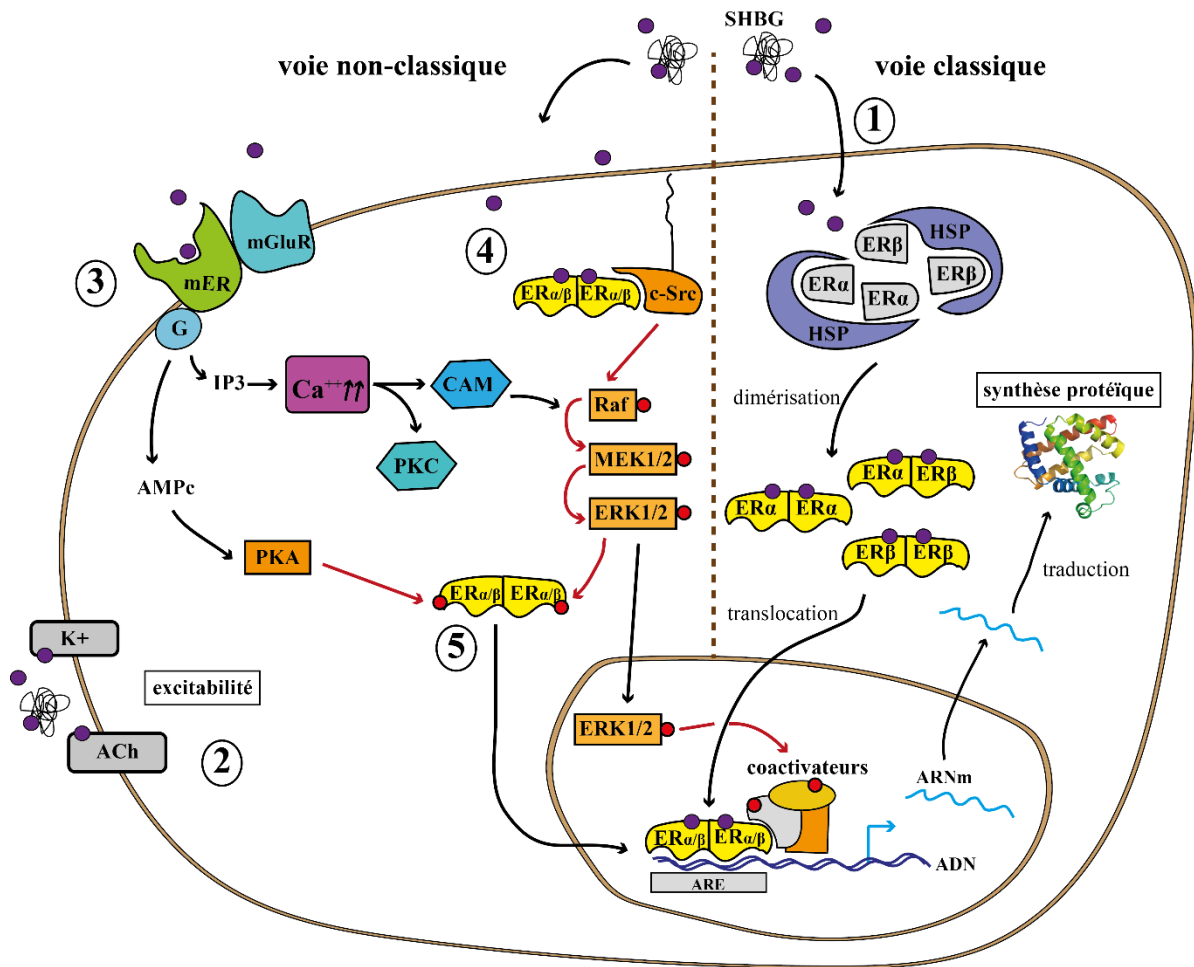
La voie non classique d'action des ER fait intervenir des mécanismes plus rapides qui ne nécessitent pas la translocation nucléaire du récepteur. De façon assez similaire aux androgènes, l'œstradiol peut se fixer directement au niveau de canaux ioniques et de récepteurs canaux comme certains canaux perméables au K<sup>+</sup> (Valverde et al. 1999) et certains récepteurs nicotiniques (Paradiso et al. 2001) modulant ainsi les propriétés de perméabilité membranaire et d'excitabilité des cellules.

L'œstradiol possède également la capacité de se fixer à des récepteurs membranaires que l'on regroupe sous le nom de mER (membrane associated estrogen receptor). Ces récepteurs peuvent être des isoformes tronquées des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  de la voie classique (comme R-X et GqmER) ou des récepteurs codés par gènes différents de *ESR1* et *ESR2* (comme GPR30) (Heldring et al. 2007). Le point commun de ces récepteurs membranaires réside dans leur capacité à activer des protéines G. Selon la protéine G impliquée, l'activation des mER aboutit à une augmentation rapide et transitoire de la concentration intracellulaire en calcium par l'activation de la voie de signalisation IP3-DAG ou à l'activation de voies de signalisations liées à la PKC, à la PKA et à la calmoduline (Arevalo et al. 2015). Certains mER ont également la capacité d'interagir directement avec des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) ce qui potentialise leur réponse et

augmente la phosphorylation du facteur de transcription CREB (c-AMP Response Element-binding protein) (Micevych et Dominguez, 2009).

Enfin, certaines formes non tronquées des ER, similaires à ceux de la voie classique, peuvent interagir avec les kinases de la famille des c-Src qui activent les voies MAPK (Varricchio et al. 2007). De façon intéressante, les ER possèdent des acides-aminés directement phosphorylables par pERK1/2 (Driggers et Segars, 2002) et par la PKA (Lannigan, 2003). Cette phosphorylation effectuée dans le cytosol permet d'activer les récepteurs ER qui sont transloqués dans le noyau et jouent leur rôle d'activateur de la transcription sans même avoir fixé d'œstradiol (Heldring et al. 2007). Ces éléments renforcent l'idée que la distinction voie génomique et voie non-génomique n'est pas la plus pertinente. L'ensemble des mécanismes de la voie classique et non classique des ER sont résumés dans la Figure 32.

Ainsi, il apparaît que les récepteurs AR et ER partagent de nombreuses voies de signalisations intracellulaires communes. Certaines études indiquent même une interaction possible entre ces deux récepteurs au niveau des kinases de la famille c-Src (Migliaccio et al. 2000). Grâce à leur capacité d'action sur des cinétiques longues (voie classique) et rapides (voie non-classique) et leur implication dans l'activation de voies de signalisation et de propriétés membranaires des cellules excitables, les récepteurs des stéroïdes jouent un rôle majeur dans la régulation du comportement sexuel.



**Figure 32 : Voies classique et non-classique de l'action cellulaire des récepteurs des œstrogènes (ER)**

L'œstradiol (ronds violets), œstrogène majoritaire, est lié à la SHBG (sex hormone binding globulin) dans la circulation sanguine. Une fraction libre est libérée à proximité des cellules cibles. Les flèches rouges représentent des activations induites par des phosphorylations. Les ronds rouges représentent l'ajout d'un groupement phosphate.

(1) La voie classique consiste en une action transcriptionnelle des ER, trouvés sous deux formes majoritaires ERα et ERβ. Cette action nécessite plusieurs heures avant d'aboutir à des effets cellulaires visibles. Les ER se trouvent dans un état inactif lié à des protéines chaperons de la famille des HSP (heat shock porteins) dans le cytosol. La fixation de l'œstradiol provoque la libération des ER qui se dimérisent en homodimères (ERα-ERα ou ERβ-ERβ) ou hétérodimère (ERα-ERβ) puis transloque dans le noyau. Les dimères actifs se fixent sur des séquences spécifiques (ERE : estrogen response elements) et recrutent des coactivateurs transcriptionnels ainsi que la machinerie de transcription. Les ARNm transcrits sont ensuite traduits dans le cytosol ce qui aboutit à la synthèse de nouvelles protéines.

(2) L'œstradiol peut également agir comme modulateur allostérique de certains récepteurs K<sup>+</sup> et de certains récepteurs nicotiniques (ACh) ce qui module les propriétés de perméabilité membranaire et d'excitabilité des cellules.

(3) L'œstradiol possède la capacité de se fixer au niveau de récepteurs membranaires regroupés sous le nom de mER couplés à des protéines G (membrane associated estrogen receptor). L'activation des mER aboutit à une augmentation rapide et transitoire de la concentration intracellulaire en calcium par l'activation de la voie de signalisation IP3-DAG ou à l'activation de voies de signalisations liées à la PKC, à la PKA et à la calmoduline (CAM). Certains mER ont également la capacité d'interagir directement avec des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) ce qui potentialise leur réponse.

(4) Enfin l'œstradiol peut se fixer sur les ER intracellulaires qui recrutent des kinases de la famille des c-Src ce qui active les voies Mitogen-activated protein kinases (MAPK).

(5) Les voies classiques et non-classiques sont interconnectées. L'activation de la PKA et de ERK1/2 peuvent aboutir à la phosphorylation des ER ce qui induit leur translocation dans le noyau sans même avoir fixé d'œstradiol. De plus, la forme activée de ERK1/2 (pERK1/2) peut transloquer dans le noyau et phosphoryler des coactivateurs qui interagissent avec les ER.



### **3) Récepteurs des stéroïdes AR et ER et régulation du comportement sexuel**

L'implication des récepteurs des androgènes et des œstrogènes dans la régulation du comportement sexuel a d'abord été évaluée dans des modèles de castration et de supplémentation en testostérone. La restauration du comportement sexuel par la testostérone après castration est fortement perturbée chez le rat par l'injection quotidienne d'antagonistes des AR (hydroxyflutamide) et des ER (RU 58668) (Gladue et Clemens, 1980; Vagell et McGinnis, 1998). En effet, l'inhibition des récepteurs des androgènes diminue fortement l'ensemble des paramètres comportementaux testés (nombre de rats atteignant l'éjaculation, efficacité copulatoire, préférence pour une femelle réceptive, nombre de marquages urinaires ou encore le nombre de vocalisations ultrasonores) alors que l'inhibition des récepteurs des œstrogènes n'altère que certains comportements effectués durant la phase motivationnelle (vocalisations ultrasonores et marquage urinaires).

Au niveau cérébral, l'ensemble des zones impliquées dans la régulation du comportement sexuel expriment les récepteurs des œstrogènes et des androgènes (Cunningham et al. 2012). La participation de ces récepteurs à la restauration du comportement sexuel après castration a été étudiée grâce à la mise en place d'implants intracérébraux délivrant différentes substances pharmacologiques dans la mPOA. Ainsi, l'implantation d'hydroxyflutamide (antagoniste AR) dans la mPOA diminue fortement le nombre de rats réalisant des montées (25%) et des éjaculations (20%) malgré la supplémentation systémique en testostérone qui rétablit les montées (100%) et les éjaculations (75%) de la quasi-totalité des animaux (McGinnis et al. 1996). De façon similaire, des rats castrés reçoivent un implant délivrant dans la mPOA de l'œstradiol, du PPT (propyl pyrazole triol, agoniste des ER $\alpha$ ) ou du DPN (diarylpropionitrile, agoniste des ER $\beta$ ) en complément d'injections sous-cutanée de dihydrotestostérone (Russell et al. 2012). L'analyse de leur comportement sexuel confirme que la supplémentation en dihydrotestostérone ne rétablit que partiellement les composantes de la copulation (comme précédemment développé, partie III-B-1). La délivrance d'œstradiol dans la mPOA améliore grandement la restauration de la copulation (fréquence de montée et d'éjaculation) à des niveaux presque comparables à ceux d'animaux intacts. Des résultats similaires sont obtenus avec le PPT mais pas avec le DPN, ce qui indique que l'action de l'œstradiol passe essentiellement par les récepteurs ER $\alpha$  et non pas par les récepteurs ER $\beta$ . Ces résultats sont confirmés par la suppression de l'expression de l'ER $\alpha$  par l'injection de constructions virales délivrant des ARN interférents dans la mPOA. Cette suppression, effectuée à l'âge adulte, aboutit à une diminution du nombre de montées et du nombre de montées avec intromissions chez la souris (Sano et al. 2013).

Ainsi les androgènes et les œstrogènes régulent le comportement sexuel en partie par une action cérébrale au niveau de la mPOA *via* les récepteurs AR et ER $\alpha$ . Les études présentées jusqu'ici mettent en jeu des régulations longues qui durent plusieurs jours voire plusieurs semaines impliquant vraisemblablement la voie classique décrite précédemment.

#### **4) Action rapide des stéroïdes sur le comportement sexuel**

Les stéroïdes possèdent également la capacité de moduler le comportement sexuel avec des cinétiques courtes de l'ordre de la dizaine de minutes. Cela est notamment le cas de l'œstradiol dont l'injection sous-cutanée augmente en moins de 30 minutes les investigations olfactives et diminue les latences de première montée de façon dose-dépendante chez des rats castrés (Cross et Roselli, 1999). De plus, l'injection sous-cutanée de fadrozole (inhibiteur de l'aromatase) diminue la motivation sexuelle d'un rat castré et supplémenté en testostérone alors que cette diminution est abolie par l'injection sous cutanée d'œstradiol (Roselli et al. 2003).

Au niveau cérébral, et plus particulièrement dans la mPOA, le fonctionnement de l'aromatase possède un rôle important dans la régulation du comportement sexuel. En effet, l'injection quotidienne de fadrozole diminue les fréquences de montées et d'éjaculation de rats intacts (Clancy et al. 1995). Contrairement aux effets lents impliquant la translocation nucléaire des récepteurs, la stimulation rapide du comportement sexuel par l'œstradiol met en jeu une voie dépendante des récepteurs membranaires mER. En effet, la mise en place dans la mPOA de rats castrés et supplémentés en dihydrotestostérone, d'un implant d'œstradiol couplé à de la BSA, provoque le même effet stimulateur sur le comportement sexuel (augmentation des fréquences d'intromission et d'éjaculation) que le même implant rempli d'œstradiol (Huddleston et al. 2007)

Des éléments intéressants ont été obtenus chez la Caille du japon, *Coturnix japonica*. Dans ce modèle, la mise en présence avec une femelle serait associée à une augmentation rapide (en quelques minutes) de l'activité enzymatique de l'aromatase par des phosphorylations calcium-dépendantes. Cette augmentation d'activité aboutit à l'augmentation de la synthèse locale d'œstradiol dans la mPOA ce qui régule positivement la phase motivationnelle par des mécanismes membranaires (Balthazart et al. 2004; Laredo et al. 2014; Serebinski et al. 2013). L'action rapide de l'œstradiol sur la motivation sexuelle est en partie dépendante de l'activation de récepteurs mGLuR1a, activés à la suite de la stimulation de récepteurs membranaires de l'œstradiol (Serebinski et al. 2015).

Ainsi, les androgènes et les œstrogènes exercent des actions lentes et rapides qui participent à la régulation du comportement sexuel. Agissant sur des cibles périphériques et cérébrales, leur action est dépendante de l'expression de différents récepteurs membranaires et intracellulaires. La testostérone, considérée comme l'hormone majoritaire de contrôle du comportement sexuel exerce la plupart de ses actions après sa conversion locale en métabolites actifs. D'après des études essentiellement réalisées chez la Caille japonaise, l'aromatase joue un rôle important dans la stimulation de la phase motivationnelle grâce à son action de conversion de la testostérone en œstradiol, notamment au niveau de la mPOA.

Le modèle de Nyby présenté figure 28 n'intègre pas ces quelques précisions. D'une part la testostérone exerce son effet essentiellement par ses métabolites actifs et d'autre part, la concentration locale en stéroïdes peut être augmentée par une stimulation de l'activité de l'aromatase, de façon indépendante du pic de testostérone plasmatique. De plus, l'action rapide des stéroïdes ne semble pas se limiter à une modulation de l'anxiété ou de la récompense mais stimule directement le comportement sexuel, en partie par une action dans la mPOA.

De nombreuses études ont caractérisé la participation des œstrogènes et des androgènes à la régulation du comportement sexuel. Une autre hormone stéroïde rarement citée, la progestérone, semble jouer un rôle tout aussi important dans la régulation des fonctions de reproduction du mâle, bien que les modalités exactes de ses actions ne soient pas encore totalement comprises.

### **C) Progestérone et fonctions de reproduction chez le mâle**

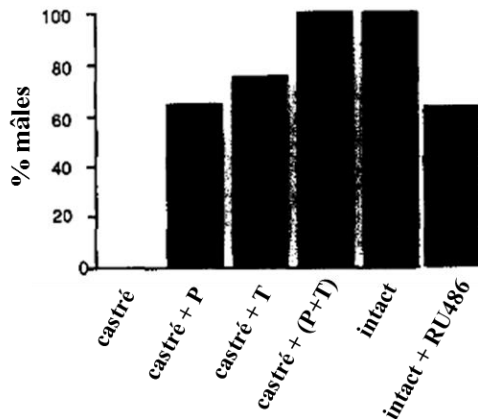
La progestérone est une hormone stéroïde sexuelle essentiellement étudiée pour son rôle dans la régulation de la fertilité et du comportement sexuel femelle. Libérée en quantité importante par l'ovaire lors de la phase lutéale, elle participe entre autre à l'induction du comportement de lordose et au développement de la muqueuse utérine. Néanmoins, cette hormone est aussi synthétisée de façon importante chez le mâle au niveau des cellules de Leydig et des glandes surrénales, puisque les taux plasmatiques de progestérone sont identiques entre les hommes et les femmes en phase folliculaire (Oettel et Mukhopadhyay, 2004). Bien que peu de données soient disponibles sur les rôles physiologiques joués par la progestérone chez le mâle, elle semble impliquée dans la régulation du sommeil, de la respiration, de l'activité du système immunitaire, de l'absorption rénale et des paramètres

cardiovasculaires associés à la régulation de la pression artérielle (Oettel et Mukhopadhyay, 2004).

L'implication de la progestérone dans la régulation des fonctions de reproduction du mâle est loin d'être établie de façon consensuelle. Historiquement, la progestérone a été associée à la régulation du comportement sexuel de la femme et donc opposée à la stimulation du comportement sexuel de l'homme. Une étude réalisée en 1958 (Heller et al. 1958) a relaté la diminution de la *libido* de quatre hommes qui avaient reçu une injection intramusculaire de progestérone. De cela a découlé des traitements destinés aux patients présentant des comportements sexuels paraphiles grâce à deux substances majoritairement utilisées en Amérique du Nord, l'acétate de medroxyprogestérone et l'acétate de cyproterone. Ces deux molécules, mimant les effets de la progestérone, diminuent les concentrations plasmatiques de testostérone et bloquent l'action des androgènes dans les tissus cibles selon des modalités encore débattues (augmentation de la dégradation hépatique de la testostérone, inhibition de sa réduction en dihydrotestostérone ou encore compétition au niveau du récepteur des androgènes). Cependant, le mécanisme d'action précis de ces substances progestatives est loin d'être compris tant le rôle de la testostérone dans le comportement sexuel a été surestimé alors même que la corrélation entre testostérone plasmatique et comportement sexuel excessif n'a jamais été vérifiée. Néanmoins, le domaine d'étude s'intéressant au rôle de la progestérone dans le contrôle des fonctions de reproduction de l'homme est en plein essor, ayant notamment pour optique la mise au point de contraceptifs masculins (Mathew et Bantwal, 2012; Wang et Swerdloff, 2010).

De façon assez paradoxale, il semble convenu que la progestérone stimule la maturation et la capacitation des spermatozoïdes chez l'homme (Foresta et al. 1992) et possède un effet pro-érectile dans un modèle particulier de privation de sommeil chez le rat (Andersen et al. 2007, 2004). Des expériences réalisées sur des cultures de cellules de Leydig indiquent que les molécules progestatives possèdent des effets opposés sur la synthèse de testostérone selon la dose et la molécule étudiée. Ainsi, les relations dose-réponse présentent des allures en U non-linéaires et rendent les résultats difficiles à interpréter (Oettel et Mukhopadhyay, 2004).

Chez le rat, la progestérone semble associée à un effet activateur du comportement sexuel. La restauration de la copulation suite à la castration par la testostérone est améliorée par une supplémentation en progestérone alors que l'injection systémique quotidienne de RU486, antagoniste des récepteurs de la progestérone, diminue le pourcentage d'animaux intacts qui réalisent des montées lors de test d'accouplement (Witt et al. 1995) (Figure 33).

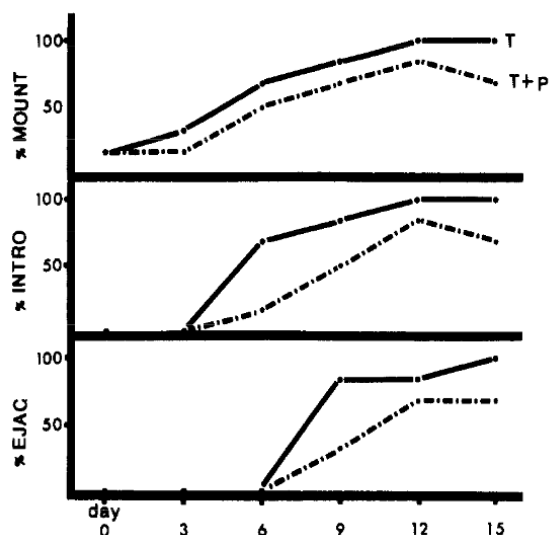


**Figure 33 : Effet de la progestérone sur la restauration de la copulation après castration chez le rat, adapté de Witt et al. (1995)**

Pourcentage de mâles présentant des montées lors d'un test d'accouplement effectué deux semaines après castration (castré), castration et supplémentation en progestérone (castré + P), castration et supplémentation en testostérone (castré + T), castration et supplémentation en testostérone et progestérone (castré + (P+T) ou chez des mâles intacts ou injectés quotidiennement avec du RU486, un antagoniste des récepteurs de la progestérone (intact + RU486).

Cet effet activateur de la progestérone semble confirmé par la corrélation observée entre la progestérone plasmatique et l'efficacité de l'accouplement déterminée par la fréquence d'éjaculation chez le rat (Alvarenga et al. 2010).

De façon opposée, la progestérone a un effet inhibiteur sur la restauration du comportement sexuel après castration chez le hamster. Le pourcentage d'animaux effectuant montées, montées avec intromissions et éjaculations est plus faible lorsque la supplémentation en testostérone et accompagnée de progestérone (DeBold et al. 1978; Witt et al. 1995) (Figure 34). De façon intéressante, la restauration de la copulation suit l'ordre observé chez le rat avec un retour des montées puis des intromissions et enfin des éjaculations.



**Figure 34 : Effet de la progestérone sur la restauration de la copulation après castration chez le hamster, adapté de DeBold et al. (1978) et Witt et al. (1995)**

Pourcentage de mâles présentant des montées sans intromissions (% mount), des montées avec intromission (%intro) et au moins une éjaculation (% ejac) lors de tests d'accouplement effectués tous les 3 jours, 8 semaines après castration. Les animaux sont injectés quotidiennement avec une solution de testostérone (T 150µg ; trait plein) ou une solution de testostérone + progestérone (T 150µg + P 2,5mg ; trait pointillé).

Chez la souris, l'injection quotidienne de progestérone possède un effet globalement inhibiteur sur le comportement sexuel. Alors que les faibles doses (0,25mg par jours) n'ont aucun effet, les doses les plus élevées aboutissent à une augmentation de la durée des investigations ano-génitales et à une diminution du nombre de montées avec intromissions (Erpino, 1973). De façon concordante avec ces résultats, les mâles KO pour le récepteur de la progestérone ne présentent pas de problème de fertilité (Couse et Korach, 1998) mais présentent une altération du comportement sexuel avec notamment une diminution de la fréquence de montée (Phelps et al. 1998). De plus, la copulation des mâles KO est davantage impactée par la castration et la restauration par la supplémentation en testostérone est moins efficace que pour des mâles sauvages. Ces résultats indiquent que des synergies et des interactions semblent exister entre les voies de signalisation des différents stéroïdes. Ces synergies pourraient être le résultat d'interactions directes entre les différents récepteurs des stéroïdes comme cela a déjà été montré entre les récepteurs de l'œstradiol et de la progestérone (Ballaré et al. 2003).

Une partie des effets de la progestérone sur le comportement sexuel s'effectue par une action au niveau cérébral notamment au niveau de la mPOA. En effet, cette région est riche en récepteurs de la progestérone (Lauber et al. 1991) et la micro-injection de progestérone améliore les paramètres du comportement sexuel alors que la micro-injection d'antagonistes des récepteurs inhibent ces mêmes paramètres chez la souris et le rat (Andersen et Tufik, 2006).

Ainsi, malgré certaines contradictions, la progestérone semble avoir un rôle plutôt activateur du comportement sexuel mâle *via* une action, au moins partielle, au niveau de la mPOA. Cet effet est vraisemblablement modulé par d'importantes interactions avec les voies de signalisation des autres stéroïdes sexuels.

En conclusion, bien que l'implication des stéroïdes sexuels dans la régulation des comportements de reproduction soit totalement admise, les mécanismes moléculaires ainsi que les cinétiques d'action exacts sont loin d'être établis, comme en témoignent les nombreuses études souvent contradictoires. Cette difficulté provient entre autre des différents modèles utilisés, tantôt castrés, supplémentés grâce à des implants, injectés ou encore intacts et étudiés en conditions physiologiques. Ces hormones modulent quelque uns des nombreux systèmes de neurotransmission présents dans la mPOA qui exercent une action inhibitrice ou activatrice sur les différentes composantes du comportement sexuel.

Le comportement des Rongeurs est réalisé selon une suite ordonnée et séquentielle d'actes moteurs. Néanmoins, ce comportement est sujet à une amélioration de ses paramètres motivationnels et copulatoires. Ce phénomène porte le nom d'expérience sexuelle. Cette amélioration est associée à des modifications cérébrales et endocrines des différents systèmes, précédemment décrits comme impliqués dans le contrôle de l'exécution du comportement sexuel.





## **Chapitre 3**

# **Améliorations comportementales et modifications cérébrales et endocrines induites par l'expérience sexuelle**

Le comportement sexuel des souris est inné : déterminé dès la formation de la cellule œuf, il s'exprime après la puberté en présence des stimuli sexuels adéquats. Néanmoins, les paramètres de ce comportement peuvent être améliorés et peuvent gagner en efficacité au cours de la vie de l'individu. Cela s'observe notamment suite au premier accouplement : il s'agit de l'expérience sexuelle. La partie suivante détaille les modifications comportementales, cérébrales et endocrines associées à l'expérience sexuelle chez le mâle. Des processus similaires ont lieu chez la femelle mais ne seront pas développés. En effet, des femelles sexuellement expérimentées présentent notamment une augmentation du taux de lordose (Carroom et Bronson, 1971) ainsi qu'une augmentation du nombre de vocalisations associées à l'accouplement (Shepard et Liu, 2011).

### **I. Les améliorations comportementales associées à l'expérience sexuelle**

Une des difficultés associée à l'étude de l'expérience sexuelle réside dans la diversité des protocoles et des modèles animaux utilisés qui peuvent parfois présenter un comportement sexuel différent. Dans les parties suivantes, les animaux n'ayant jamais été en contact avec une femelle réceptive après leur sevrage seront qualifiés de naïfs.

#### **A) Chez la souris**

Comme développé précédemment, le comportement sexuel de la souris peut varier légèrement selon la souche étudiée (chapitre 1, partie II-C). La majorité des études traitant de l'expérience sexuelle chez la souris a été réalisée sur la souche C57Bl/6. De façon générale, l'expérience sexuelle se traduit par une augmentation de l'efficacité de la phase motivationnelle caractérisée par une réduction des latences de première montée et de première montée avec intromissions mais également par une augmentation de l'efficacité de la phase copulatoire caractérisée par une réduction de la durée d'accouplement. Cependant, les protocoles expérimentaux utilisés pour induire l'expérience sexuelle peuvent différer selon les études notamment en ce qui concerne la durée et le nombre d'expositions aux femelles réceptives. Les résultats et les protocoles de quelques études sont présentés dans le Tableau 2.

Souche	Protocole expérimental	Comportements testés	Améliorations comportementales	Références bibliographiques
C57Bl/6J	- mâle stabulé avec 4 femelles jusqu'à ce qu'une femelle soit gestante - enregistrement de l'accouplement test pendant 1h	Latence de première montée sans intromission	-	Swaney et al., 2007
		Fréquence de montée sans intromission	+	
		Fréquence de montée avec intromissions	+	
C57Bl/6J	- mâle mis en présence d'une femelle réceptive trois fois pendant 2h - habituation de 15 minutes puis enregistrement de l'accouplement test pendant 30 minutes (arrêt à l'éjaculation)	Latence de première montée sans intromission	Tendance -	Keller et al., 2006
		Latence de première montée avec intromissions	Tendance -	
		Latence d'éjaculation	Tendance -	
C57Bl/6J	- mâle stabulé 3 semaines consécutives avec deux femelles réceptives puis 1 semaine avec deux femelles non réceptives - enregistrement de l'accouplement test pendant 1h	Latence de première montée sans intromission	-	Swaney et al., 2012
		Latence de première montée avec intromissions	-	
		Latence d'éjaculation	Tendance -	
		Fréquence de montée sans intromission	Tendance +	
		Fréquence de montée avec intromissions	+	
		Durée d'olfaction avant la première montée	-	
		Durée des montées sans intromission	=	
C57Bl/6J	- isolement du mâle 3 jours avant le test puis réalisation de deux accouplements séparés par deux semaines. - habituation de 4 heures puis enregistrement de l'accouplement test pendant 10h	Latence de première montée sans intromission	-	Picot et al., 2014
		Latence de première montée avec intromissions	-	
		Latence d'éjaculation	-	
		Nombre de montées sans intromission	=	
		Nombre de montées avec intromissions	-	
		Nombre de poussées pelviennes	-	
C57Bl/6J ERβ <sup>fl/fl</sup>	- isolement du mâle 3 jours avant le test puis réalisation de deux accouplements séparés par deux semaines. - habituation de 4 heures puis enregistrement de l'accouplement test pendant 10h	Latence de montée sans intromission	-	Naulé et al., 2016
		Latence de montée avec intromissions	-	
		Latence d'éjaculation	-	
		Nombre de montées sans intromission	=	
		Nombre montées avec intromissions	=	
		Nombre de poussées pelviennes	+	
		Durée d'accouplement	-	

**Tableau 2 : Améliorations du comportement sexuel associées à l'expérience sexuelle chez la souris mâle (Keller et al. 2006; Naulé et al. 2016; Picot et al. 2014; Swaney et al. 2012)**

*Ce tableau présente pour différentes études, le protocole expérimental utilisé pour induire l'expérience sexuelle. Il présente également les paramètres comportementaux étudiés et leur éventuelle amélioration associée à l'expérience sexuelle. La latence de première montée correspond au temps écoulé entre la mise en présence de la femelle réceptive et la première montée effectuée par le mâle. La latence d'éjaculation correspond au temps écoulé entre la mise en présence de la femelle réceptive et l'éjaculation. La fréquence de montée correspond au nombre total de montées effectuées durant la totalité de l'accouplement. La durée d'accouplement correspond au temps séparant la première montée avec intromissions de l'éjaculation.*

Bien que les résultats de ces études ne soient pas tous identiques, il se dégage quelques tendances générales. Alors que le nombre et la durée des poussées pelviennes et des montées avec intromissions semblent constants, la durée d'accouplement est toujours diminuée.

Cela indique que le pattern copulatoire global n'est pas impacté par l'expérience sexuelle. La copulation est effectuée plus rapidement, notamment grâce à une diminution des intervalles de temps qui séparent les montées avec intromissions. De plus, les latences de première montée et la durée des investigations olfactives sont réduites ce qui indique un raccourcissement de la phase pré-copulatoire. Enfin, le nombre et la durée des vocalisations ultrasonores réalisées durant la phase motivationnelle sont augmentés chez un mâle sexuellement expérimenté (Arriaga et al. 2012; Ferhat et al. 2016). L'ensemble de ces éléments aboutit globalement à une diminution du temps nécessaire à la réalisation totale du comportement sexuel, de l'introduction de la femelle réceptive à l'éjaculation.

L'expérience sexuelle facilite également d'autres comportements indirectement associés à l'accouplement. Ainsi un mâle sexuellement expérimenté présente une plus grande préférence olfactive pour une femelle réceptive (Hayashi et Kimura, 1974) et répond à une plus grande variété de stimuli olfactifs en provenance de la femelle (Sipos et al. 1992).

Des études plus nombreuses ont été réalisées chez le rat mais les paramètres comportementaux améliorés par l'expérience sexuelle diffèrent légèrement de ceux de la souris, notamment à cause des différences entre les comportements sexuels de ces deux rongeurs (éjaculations multiples et absence de poussées pelviennes intra-vaginales lors des montées avec intromission chez le rat).

## **B) Chez le rat**

Chez le rat, l'expérience sexuelle est à l'origine d'améliorations des paramètres du comportement sexuel, comme chez la souris. Des études supplémentaires, non réalisées chez la souris, ont permis de mettre en évidence l'existence de processus associatifs qui aboutissent à des réponses conditionnées grâce au fort pouvoir hédonique du comportement sexuel.

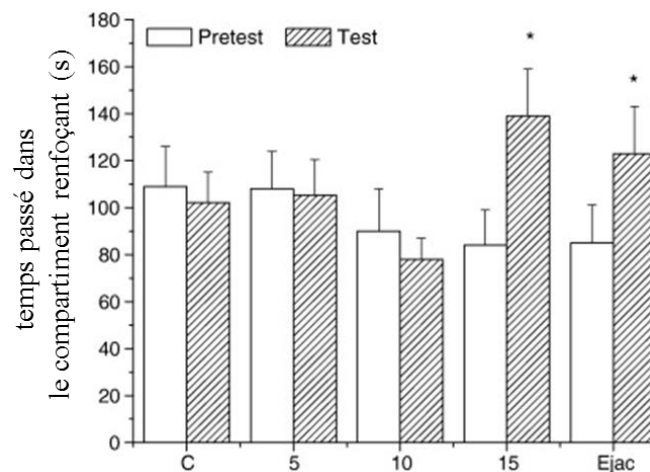
### **1) Amélioration du comportement sexuel**

L'expérience sexuelle chez le rat est globalement caractérisée par une augmentation de l'efficacité copulatoire qui se traduit aussi par une diminution de la durée des phases motivationnelles et copulatoires. Cela est associé à une diminution des latences de première montée sans intromission et avec intromission ainsi qu'à une diminution des durées

d'accouplement. Ce raccourcissement de la durée de copulation est dû à une augmentation des fréquences de montée avec intromission et à une réduction des intervalles séparant les montées. On observe également une augmentation du nombre et de la durée des vocalisations ultrasonores chez un mâle sexuellement expérimenté (Bialy et al. 2000). De plus, le nombre d'éjaculations réalisées durant l'accouplement est très souvent augmenté avec en parallèle une diminution des intervalles post-éjaculatoires. Ainsi, de façon similaire à la souris, le pattern copulatoire du rat n'est pas modifié par l'expérience sexuelle mais la durée globale du comportement est réduite (Bialy et al. 2010; Dewsbury, 1969; Glasper et Gould, 2013; Pitchers et al. 2012).

## 2) Conditionnement et expérience sexuelle

Le comportement sexuel est un comportement aux propriétés hédoniques qui peut être associé à des renforcements comportementaux variés. Cela est notamment mis en évidence par des expériences de conditionnement de place. Ainsi, des rats qui ont réalisé certaines parties du comportement sexuel présentent une préférence de place pour le lieu du test contrairement à des rats naïfs n'ayant jamais rencontré de femelle. Le comportement sexuel induit une préférence de place lorsque le rat réalise au moins 15 intromissions ou atteint l'éjaculation (Camacho et al. 2004) (Figure 35).



**Figure 35 : Propriétés hédoniques du comportement sexuel estimées par un protocole de conditionnement de place (Camacho et al. 2004)**

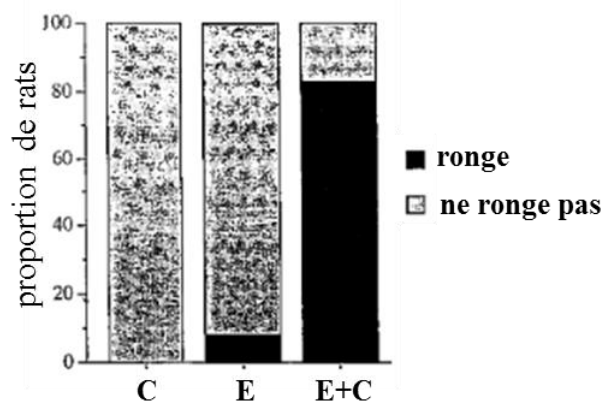
*Des mâles réalisent différentes parties du comportement sexuel (C : pas de femelle, 5 : 5 intromissions, 10 : 10 intromissions, 15 : 15 intromission,; Ejac : une éjaculation) dans un des compartiments d'une chambre à deux compartiments. Le temps passé dans le compartiment où a été réalisé le comportement sexuel est comparé entre le pré-test (animaux naïfs placé dans la chambre sans femelle) et lors du test (après la réalisation du comportement). Il apparait que le comportement sexuel induit une préférence de place lorsque le rat réalise au moins 15 intromissions ou atteint l'éjaculation.*

Cet aspect de récompense associée au comportement sexuel évolue avec l'expérience sexuelle. En effet, un rat ayant réalisé 6 accouplements répartis sur 6 jours consécutifs

présente un conditionnement de place uniquement pour l'éjaculation et non plus pour les intromissions. Cela indique que le même stimulus renforçant provoque un effet hédonique moindre chez un rat sexuellement expérimenté (Tenk et al. 2009).

La réalisation d'un premier comportement sexuel est également à l'origine d'une augmentation de la motivation à s'accoupler. Cela est observable lors de la réalisation de tâches aversives que les rats effectuent en vue d'un accouplement, comme par exemple le passage à travers des grilles électrisées ou le passage dans des labyrinthe aquatiques (Pfaus et al. 2001).

De plus, certains stimuli aversifs peuvent devenir attractifs s'ils sont associés à l'accouplement. Cela est notamment démontré par l'utilisation de cadavérine, une polyamine répulsive sécrétée par les tissus en décomposition. Ainsi, des rats qui se sont accouplés 9 fois avec une femelle réceptive enduite de cadavérine, présentent une forte attraction pour un morceau de bois recouvert de cette substance normalement répulsive (Pfaus et al. 2001) (Figure 36).



**Figure 36 : Conversion d'un stimulus aversif en stimulus attractif suite à l'induction de l'expérience sexuelle, adapté de Pfaus et al. (2001)**

*Des rats naïfs (control : C) ou mis en accouplement 9 fois avec une femelle réceptive (expérience sexuelle : E) ou une femelle réceptive enduite de cadavérine (expérience sexuelle + cadavérine : E+C) sont placés en présence d'un morceau de bois enduit de cadavérine. La proportion de rats rongant le morceau de bois enduit est ensuite mesurée.*

Enfin, de nombreux conditionnements opérants ont été associés à la réalisation du comportement sexuel. Cela est notamment le cas d'expériences dans lesquelles des rats ont réalisé des apprentissages motivés comme appuyer plusieurs centaines de fois sur un levier, tourner dans une roue ou encore creuser dans le sable pour avoir accès à une femelle réceptive (Pfaus et al. 2001).

Ainsi, le comportement sexuel, notamment les intromissions et l'éjaculation, s'avère être un puissant stimulus hédonique qui permet à des rats sexuellement expérimentés d'outrepasser des obstacles pour s'accoupler, de potentialiser des apprentissages motivés et convertir des stimuli aversifs en stimuli attractifs.

### C) Dans les autres modèles animaux

L'expérience sexuelle a été étudiée dans d'autres modèles animaux afin de caractériser l'implication de cette amélioration du comportement sexuel dans les mécanismes de rétention de la copulation après castration. Ainsi, l'expérience sexuelle permet dans une certaine mesure de retarder l'abolition de la copulation après la castration chez le chat, *Felis silvestris catus* (Rosenblatt et Aronson, 1958), le bélier (Borg et al. 1992), le hamster (Bunnell et Kimmel, 1965), le lapin (Ågmo, 1976) ou encore le chien, *Canis lupus familiaris* (Hart, 1968).

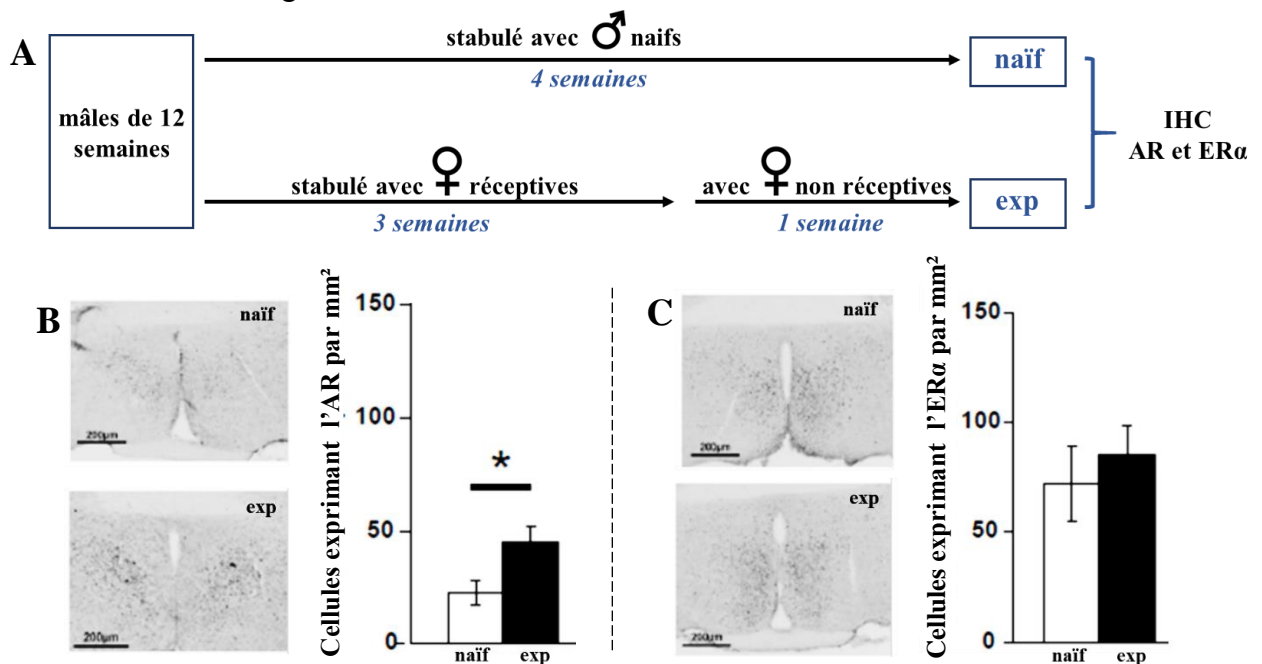
Ainsi, l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle est retrouvée dans la plupart des modèles animaux étudiés et impacte la phase motivationnelle, la phase copulatoire et la rétention du comportement suite à la castration. Cela indique que des modifications cérébrales et endocrines sont mises en jeu, vraisemblablement au niveau de la mPOA, centre intégrateur des différents signaux impliqués dans la régulation du comportement sexuel.

## II. Modifications cérébrales induites par l'expérience sexuelle

Comme développé dans les parties précédentes, de nombreuses aires cérébrales et plusieurs systèmes de neurotransmission sont impliqués dans le contrôle du comportement sexuel. Cette partie s'intéresse aux modifications cérébrales induites par l'expérience sexuelle.

### A) Chez la souris

Seules deux études se sont intéressées à caractériser les modifications cérébrales du circuit de régulation du comportement sexuel après induction de l'expérience sexuelle chez la souris. La première étude a été réalisée par Swaney et al. (2012). Un mâle sexuellement expérimenté (stablé deux semaines consécutives avec des femelles réceptives) présente une augmentation du nombre de cellules exprimant l'AR dans la mPOA. Cette augmentation n'est pas détectée dans d'autres zones cérébrales (noyau du lit de la strie terminale, amygdale médiane) impliquées dans la régulation du comportement sexuel (Figure 37). Par ailleurs, aucune différence n'est observée pour le nombre de cellules exprimant l'ER $\alpha$  dans l'ensemble de ces régions.



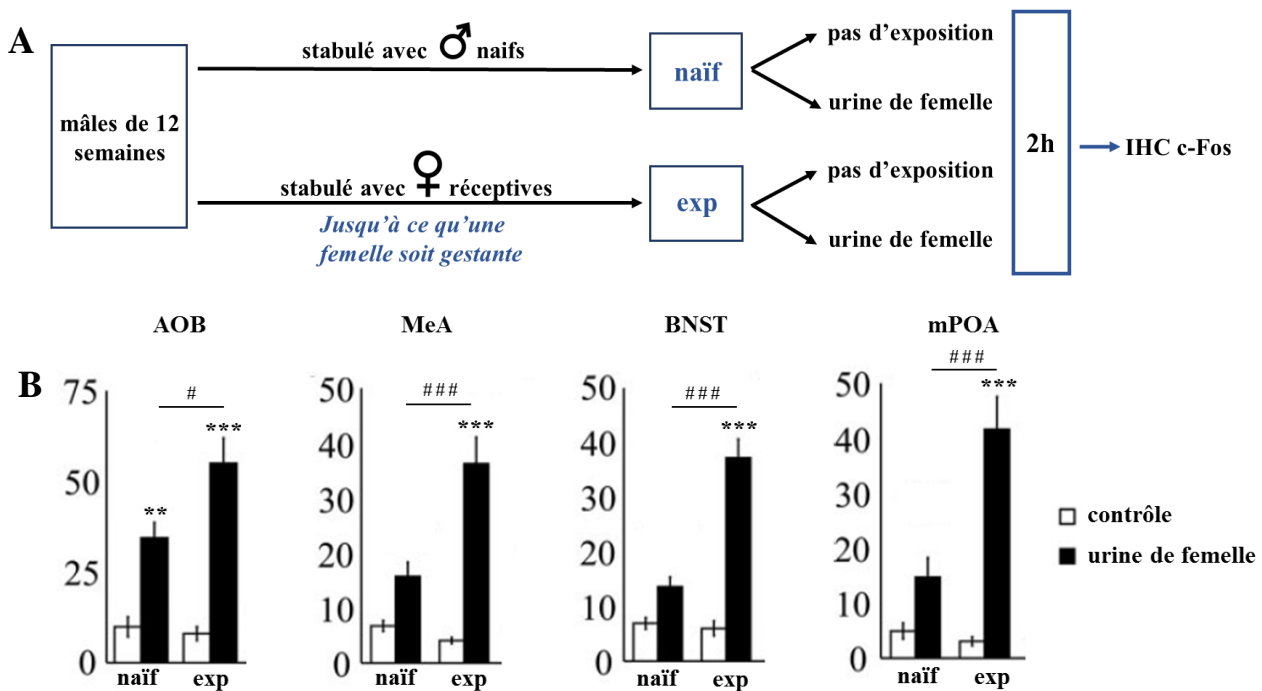
**Figure 37 : Les souris mâles sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules exprimant l'AR dans la mPOA, adapté de Swaney et al. (2012)**

(A) Protocole d'expérience sexuelle : des mâles sont stablés soit avec des mâles naïfs sans être en contact avec des femelles pendant quatre semaines (naïf) soit avec deux femelles réceptives pendant 3 semaines puis avec 2 femelles non réceptives pendant 1 semaine (exp).

(B) Micrographie représentative de l'IHC AR dans la mPOA et quantification associée. Les mâles sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules exprimant l'AR dans la mPOA que les mâles naïfs.

(C) Micrographie représentative de l'IHC ER $\alpha$  dans la mPOA et quantification associée. Les mâles sexuellement expérimentés possèdent autant de cellules exprimant l'ER $\alpha$  dans la mPOA que les mâles naïfs.

Cette étude indique qu'une exposition prolongée de plusieurs semaines à des femelles réceptives augmente l'expression de récepteurs AR dans la mPOA. La stabulation effectuée pendant une semaine avec des femelles non réceptives permet d'écartier la participation de modifications cérébrales plus rapides potentiellement induites par un accouplement. L'implication de l'expérience sexuelle dans l'induction de tels effets rapides a été analysée dans une seconde étude. L'expression cérébrale de c-Fos, induite par une exposition à de l'urine de femelle réceptive, a été comparée entre des mâles naïfs et sexuellement expérimentés (Swaney et al. 2007) (Figure 38).



**Figure 38 : Les souris mâles sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules c-Fos dans le circuit de contrôle du comportement sexuel, adapté de Swaney et al. (2007)**

(A) Protocole d'expérience sexuelle et d'exposition à l'urine de femelle : des mâles sont stabulés - soit avec des mâles naïfs sans être en contact avec des femelles (naïf) soit avec quatre femelles réceptives jusqu'à ce qu'une femelle soit gestante (exp). Les mâles sont ensuite exposés deux minutes à de l'urine de femelle réceptive puis sacrifiés 2 heures plus tard.

(B) Quantification par IHC du nombre de cellules c-Fos immuno-réactives après stimulation olfactive. Chez les mâles naïfs, la stimulation olfactive induit une augmentation du nombre de cellules c-Fos uniquement dans le bulbe olfactif accessoire (AOB) (\* $p < 0.05$  comparé à la condition contrôle). Chez les mâles sexuellement expérimentés, la stimulation olfactive induit une augmentation du nombre de cellules c-Fos dans l'AOB, dans l'amygdale médiane (MeA), dans le noyau du lit de la strie terminale (BNST) et dans l'aire pré-optique médiane (mPOA) (\* $p < 0.05$  comparé à la condition contrôle). Cette augmentation est plus importante que pour des animaux naïfs (# $p < 0.05$ ).

Les animaux sexuellement expérimentés, sacrifiés 2 heures après l'exposition à de l'urine de femelle réceptive, présentent une augmentation de l'expression de c-Fos plus importante que des animaux naïfs. Cette augmentation est observée dans les zones cérébrales impliquées dans le contrôle du comportement sexuel comme notamment le bulbe olfactif



accessoire, l'amygdale médiane, le noyau du lit de la strie terminale et la mPOA. Ces résultats indiquent que le circuit cérébral du contrôle du comportement sexuel est potentialisé par l'expérience sexuelle.

Ainsi, ces deux études réalisées chez la souris mettent en évidence que l'exposition à des femelles réceptives augmente l'expression protéique de l'AR uniquement dans la mPOA et augmente l'expression de c-Fos suite à une stimulation olfactive dans l'ensemble du circuit cérébral contrôlant le comportement sexuel.

## **B) Chez le rat**

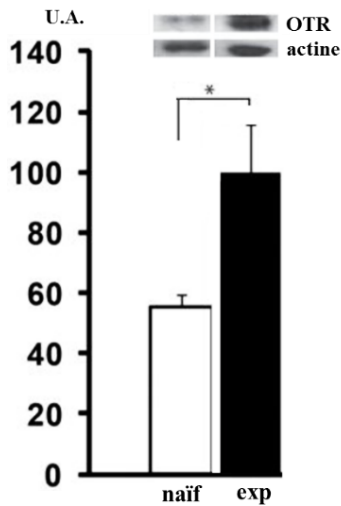
La bibliographie traitant des modifications cérébrales induites par l'expérience sexuelle chez le rat est bien plus fournie que celle de la souris, notamment grâce aux contributions d'Elaine Hull et de Juan Dominguez, auteurs de la majorité des études présentées ci-dessous.

### **1) Modifications de la mPOA induites par l'expérience sexuelle**

Plusieurs études ont décrit des modifications moléculaires induites par l'expérience sexuelle dans la mPOA de rat. Dans les six études présentées ci-dessous, l'expérience sexuelle est induite par des expositions multiples pendant plusieurs semaines à une femelle réceptive. Le premier paragraphe de cette partie traite des différences d'expression protéique détectées en condition basale entre des mâles naïfs ou sexuellement expérimentés. Le deuxième paragraphe s'intéresse aux différences qui existent entre des mâles naïfs et sexuellement expérimentés en ce qui concerne les modifications transitoires induites par l'accouplement.

#### **- Modifications à long terme de la mPOA**

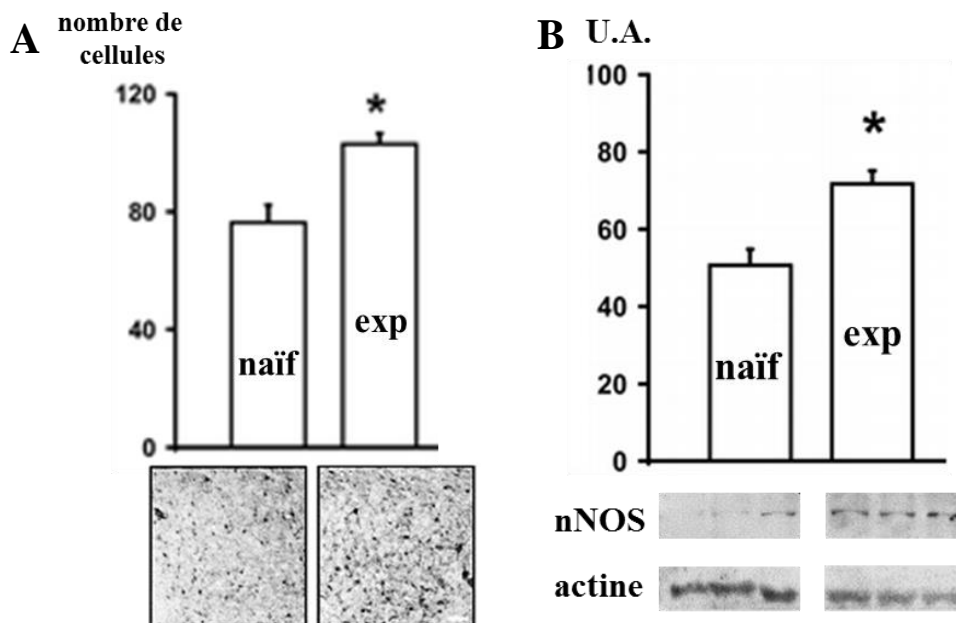
Dans une première étude, les niveaux d'expression des récepteurs de l'ocytocine, neuropeptide connu pour son action facilitatrice sur le comportement sexuel (Gil et al. 2011) (chapitre 2, partie II-H) ont été détectés par RT-qPCR et par Western blot réalisés à partir de mPAO de rats naïfs et sexuellement expérimentés (Gil et al. 2013). Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs de l'ocytocine et de leurs ARNm dans la mPOA (Figure 39).



**Figure 39 : Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs de l'ocytocine dans la mPOA (Gil et al. 2013)**

*Les niveaux d'expression des récepteurs de l'ocytocine (OTR), estimés par Western blot, sont augmentés dans la mPOA de rats sexuellement expérimentés.*

Une autre étude réalisée par Dominguez et al. (2006a) a caractérisé les niveaux d'expression de nNOS. Cette enzyme est responsable de la synthèse de NO, un neuromédiateur gazeux connu pour son action activatrice de la libération de dopamine dans la mPOA et son action facilitatrice du comportement sexuel (chapitre 2, partie II-H). Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation du nombre de cellules nNOS-immuno-réactives ainsi qu'une augmentation du niveau global d'expression de nNOS détectée par Western blot (Dominguez et al. 2006a) (Figure 40).

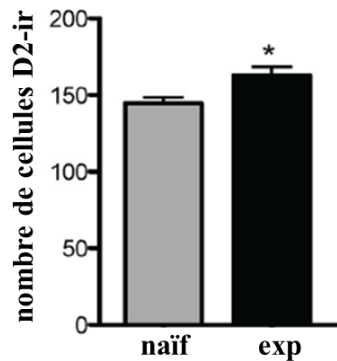


**Figure 40 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules nNOS ainsi que des niveaux d'expression plus élevés de nNOS dans la mPOA (Dominguez et al. 2006a)**

*(A) Nombre de cellules nNOS détectées dans la mPOA par IHC et micrographie représentative de l'IHC.*

*(B) Estimation du niveau total d'expression de la nNOS par Western blot.*

Enfin, une étude réalisée par Nutsch et al. (2016) s'est intéressée à l'influence de l'expérience sexuelle sur l'expression des récepteurs D2. Ces récepteurs localisés dans la mPOA régulent positivement le comportement sexuel et les réflexes génitaux puisque l'injection systémique d'un antagoniste retarde la première montée et diminue le nombre de montées et d'éjaculations chez le rat (Pfaus et Phillips, 1989) (chapitre 2, partie II-A). Cette étude indique qu'un rat sexuellement expérimenté possède davantage de cellules D2 immuno-réactives dans la mPOA qu'un rat naïf (Figure 41).



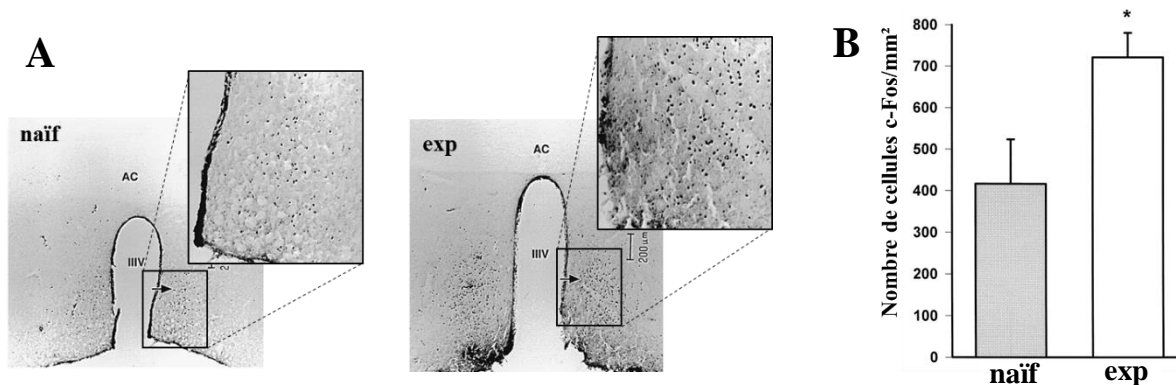
**Figure 41 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules D2 immuno-réactives dans la mPOA (Nutsch et al. 2016)**

*La quantification du nombre de cellules D2 immuno-réactives indique que les mâles sexuellement expérimentés présentent davantage de cellules D2 immuno-réactives que des mâles naïfs.*

Ainsi, il apparaît que la mPOA est le siège de modifications protéiques qui ne semblent pas être restreintes à un seul système de neurotransmission comme le montre l'augmentation des niveaux de protéines associées aux systèmes ocytocinergiques, nitroergiques et dopaminergiques.

- Modifications transitoires de la mPOA induites par l'accouplement et potentialisées par l'expérience sexuelle

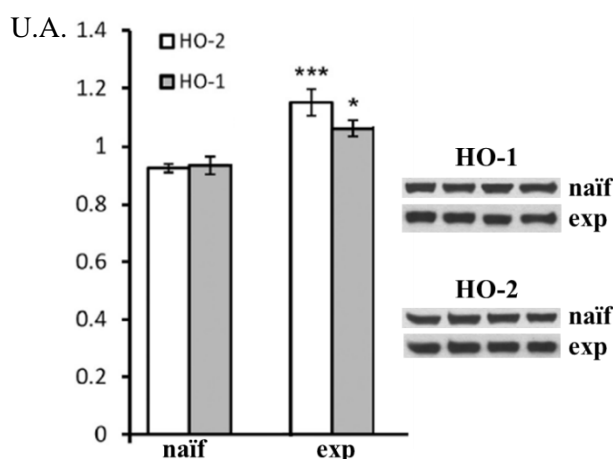
Un certain nombre de modifications moléculaires sont observables uniquement durant un court intervalle de temps après un accouplement. Cela est notamment le cas de phosphorylations de protéines ou encore d'expression de gènes d'activation précoce. Les rats sexuellement expérimentés sacrifiés 80 minutes après l'éjaculation possèdent davantage de cellules c-Fos immuno-réactives que des rats naïfs sacrifiés dans les mêmes conditions après leur première éjaculation (Lumley et Hull, 1999) (Figure 42). Ainsi, de façon similaire à la souris, l'expérience sexuelle augmente l'immuno-réactivité c-Fos, interprétée comme un index de l'activation de la mPOA. Cela est confirmé par des études s'intéressant à l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, enzyme limitante du métabolisme oxydatif qui indiquent que les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation de l'activité métabolique basale de la mPOA (Sakata et al. 2002).



**Figure 42 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellule c-Fos immuno-réactives dans la mPOA (Lumley et Hull, 1999)**

(A) Micrographie représentative et (B) quantification de l'IHC détectant c-Fos dans la mPOA d'animaux naïfs et sexuellement expérimentés sacrifiés 80 minutes après l'éjaculation. Les rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules c-Fos, interprété comme un index de l'activation de la mPOA.

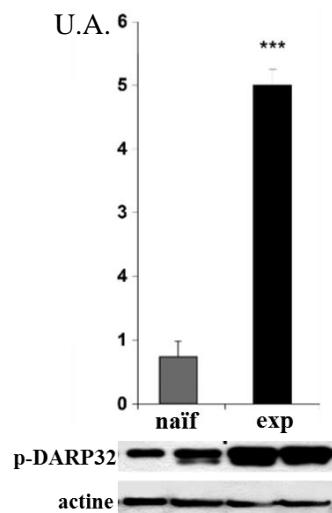
Une autre étude a comparé la mPOA de rats naïfs et de rats sexuellement expérimentés, sacrifiés 2h après l'éjaculation (Robison et al. 2017). Les niveaux d'expression de deux enzymes, les hème-oxygénase 1 et 2 (HO-1 et HO-2), ont été estimés par Western blot (Figure 43). Ces enzymes sont capables de synthétiser du monoxyde de carbone (CO) dont le rôle dans la régulation des fonctions hypothalamiques est encore loin d'être élucidé (Mancuso et al. 2010). Cependant, la participation du CO au contrôle des fonctions de reproduction est soutenue par sa capacité à stimuler la libération de GnRH *in vitro* (Errico et al. 2010). Il apparaît ainsi que les mâles sexuellement expérimentés possèdent des niveaux de HO-1 et HO-2 plus élevés dans la mPOA que des mâles naïfs.



**Figure 43 : Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression de HO-1 et HO-2 dans la mPOA (Lumley et Hull 1999)**

Estimation par Western blot du niveau d'expression des enzymes HO-1 et HO-2 (hème-oxygénase 1 et 2), catalysant la formation de monoxyde de carbone (CO). Les mâles sexuellement expérimentés, sacrifiés 2h après l'éjaculation, présentent des niveaux d'expression supérieurs aux mâles naïfs.

Enfin, dans une étude réalisée par McHenry et al. (2012a), des rats naïfs et sexuellement expérimentés sont sacrifiés 2 heures après éjaculation et les niveaux de la forme phosphorylée de DARP32 (p-DARP32) sont estimés par Western blot dans la mPOA (Figure 44). Cette protéine est connue pour être activée suite à la stimulation de récepteurs dopaminergiques de type D1, la plupart du temps via des mécanismes PKA-dépendants. Les mâles sexuellement expérimentés présentent une augmentation de la forme phosphorylée de DARP32.



**Figure 44 : Les rats sexuellement expérimentés possèdent des niveaux plus importants de p-DARP32 dans la mPOA (McHenry et al. 2012)**

*Les mâles sexuellement expérimentés possèdent des niveaux plus importants de forme phosphorylée p-DARP32 (protéine intracellulaire phosphorylée suite à l'activation des récepteurs dopaminergiques D1) estimés par Western blot 2 heures après l'éjaculation.*

Ainsi, la mPOA, connue pour être activée lors de l'accouplement, apparaît potentialisée par l'expérience sexuelle comme l'indique l'augmentation des niveaux de c-Fos, d'enzymes HO et des voies de signalisation en aval des récepteurs dopaminergiques D1. De plus, l'expérience sexuelle induit une augmentation des niveaux d'expressions des récepteurs AR chez la souris et des récepteurs de l'ocytocine, de la nNOS et des récepteurs D2 chez le rat. Ces différentes molécules, appartenant à des systèmes de neurotransmission différents, ont pour point commun de faciliter l'expression du comportement sexuel.

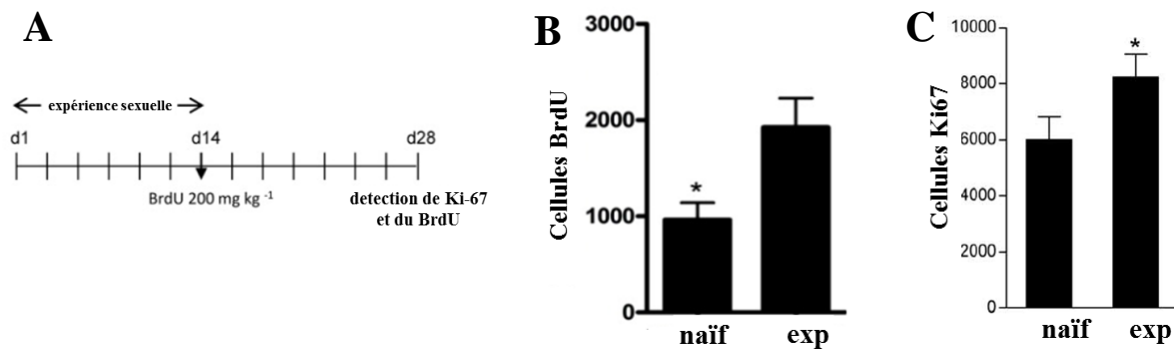
D'autres modifications cérébrales localisées dans des régions différentes de la mPOA ont également été reportées comme étant associées à l'expérience sexuelle.

## 2) Autres modifications cérébrales induites par l'expérience sexuelle

Les autres modifications cérébrales touchent des régions diverses qui ont pour point commun d'exprimer des récepteurs des hormones stéroïdes comme l'hippocampe, le cortex préfrontal ou encore le noyau accumbens.

### - Stimulation de la neurogenèse hippocampique par l'expérience sexuelle

L'effet de l'expérience sexuelle sur la neurogenèse hippocampique a été étudié en détectant Ki-67, un marqueur de prolifération cellulaire ainsi que la bromodésoxyuridine (BrdU), un analogue structural de la thymidine capable de s'intégrer dans l'ADN lors des phases de réplication. La détection de ces molécules a été effectuée après induction de l'expérience sexuelle par une exposition quotidienne de quelques heures à une femelle réceptive pendant de 14 jours (Glasper et Gould, 2013; Leuner et al. 2010) (Figure 45).



**Figure 45 : L'expérience sexuelle stimule la neurogenèse hippocampique chez le rat (Glasper et Gould, 2013 ; Leuner et al. 2010)**

(A) L'expérience sexuelle est induite par une exposition quotidienne de 14 jours à une femelle réceptive. Le nombre de cellules Ki-67 et BrdU immuno-réactives est détecté 14 jours plus tard par IHC.

(B) Quantification du nombre de cellules BrdU positives détectées dans le gyrus denté de l'hippocampe.

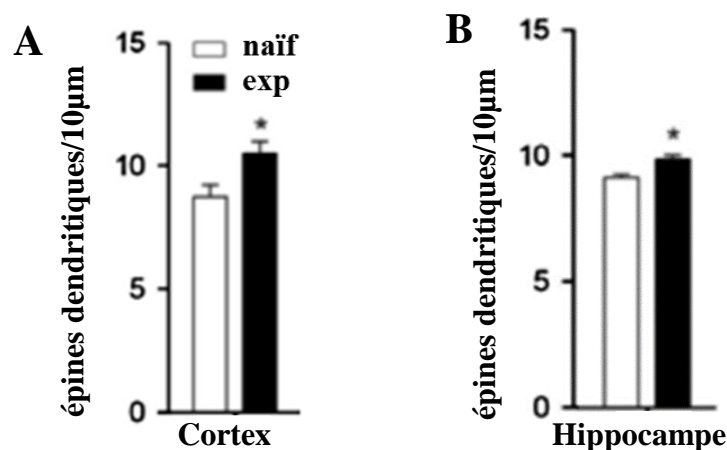
(C) Quantification du nombre de cellules Ki-67 immuno-réactives détectées dans le gyrus denté de l'hippocampe.

Ces deux études indiquent que chez les mâles sexuellement expérimentés, la prolifération cellulaire est plus importante au niveau du gyrus denté. D'après les auteurs, cette augmentation de la prolifération serait régulée par la testostérone et par des neuropeptides libérés durant l'accouplement dans l'hippocampe, comme l'ocytocine. Compte tenu du rôle joué par l'hippocampe dans les processus d'apprentissage (Deng et al. 2010), il est envisageable que cette augmentation de la neurogenèse participe, au moins en partie, à l'amélioration des paramètres comportementaux associées à l'expérience sexuelle.

### - Arborisation dendritique et expérience sexuelle

Les épines dendritiques sont des protrusions post-synaptiques qui permettent d'intégrer des signaux excitateurs (Hering et Sheng, 2001). La modification de leur taille ou de leur densité est souvent associée à des mécanismes de plasticité synaptique et d'apprentissage (Nimchinsky et al. 2002; Sala et Segal, 2014).

Les modifications de l'arborisation dendritique ont été observées par coloration de Golgi-Cox suite à l'induction de l'expérience sexuelle par une exposition prolongée de 7 jours à une femelle réceptive (Glasper et al. 2015). Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation de la densité d'épines dendritiques des cellules granulaires du gyrus denté et des cellules pyramidales du cortex préfrontal (Figure 46).



**Figure 46 : L'expérience sexuelle augmente la densité d'épines dendritiques des neurones du gyrus denté et des neurones pyramidaux de cortex préfrontal chez le rat (Glasper et al. 2015)**

(A) Micrographie représentative et quantification de la densité en épines dendritiques des neurones pyramidaux du cortex préfrontal après coloration de Golgi-Cox.

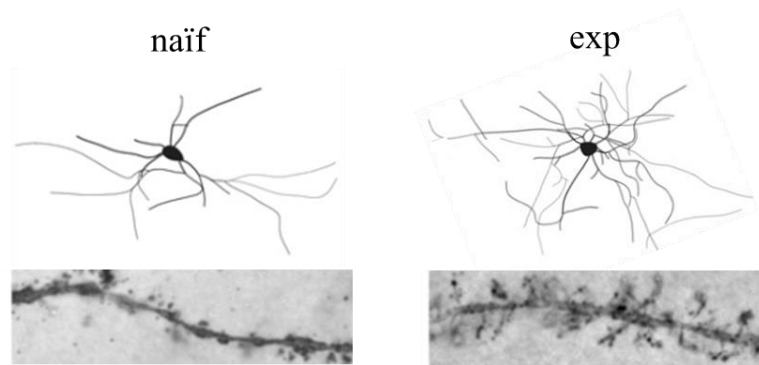
(B) Micrographie représentative et quantification de la densité en épines dendritiques des neurones du gyrus denté après coloration de Golgi-Cox.

Ces études suggèrent que l'expérience sexuelle induit une modification des réseaux hippocampiques et corticaux conduisant à une augmentation de leur réactivité. Cependant, une limite sur la pertinence de ces études réside dans le fait que les modifications observées ne sont peut-être pas spécifiques à l'expérience sexuelle. En effet, ces régions ne font pas directement partie du circuit cérébral contrôlant le comportement sexuel et sont connues pour être activées lors de protocoles d'interaction sociale.

### - Modifications du circuit de la récompense par l'expérience sexuelle

Le comportement sexuel est une récompense naturelle qui active le circuit de la récompense en provoquant la libération de dopamine dans le système mésolimbique (Balfour et al. 2004; Fiorino et al. 1997; Fiorino et Phillips, 1999; Pfaus et al. 1990). Plusieurs modifications sont induites par l'expérience sexuelle dans ce circuit notamment au niveau du noyau accumbens. Dans les études suivantes, l'expérience sexuelle a été induite par 5 accouplements réalisés sur 5 jours consécutifs.

Les modifications de l'arborisation dendritique ont été observées par coloration de Golgi-Cox dans le noyau accumbens (Pitchers et al. 2010a). Les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation du nombre de dendrites et une augmentation de la densité d'épines dendritiques dans ce noyau cérébral (Figure 47). La différence observée entre rats naïfs et sexuellement expérimentés est observable uniquement après un délai de 7 jours à partir de la fin du protocole d'expérience sexuelle. Cela indique que ces modifications structurales nécessitent un certain temps avant d'être induites et/ou stabilisées.



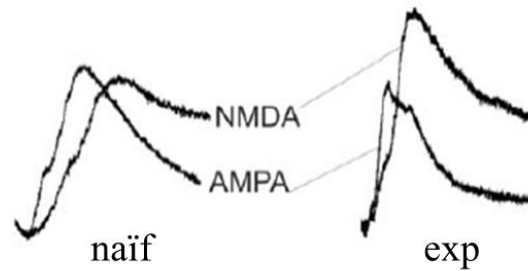
**Figure 47 : L'expérience sexuelle augmente le nombre de dendrites et la densité d'épines dendritiques des neurones du noyau accumbens chez le rat (Pitchers et al. 2010a)**

*Les neurones du noyau accumbens de rats sexuellement expérimentés possèdent davantage de dendrites et une densité plus importante d'épines dendritiques que des rats naïfs.*

Ces modifications de la microstructure du noyau accumbens sont accompagnées d'une modification des niveaux d'expression des récepteurs du glutamate. En effet, des rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux de NMDA NR1 le jour suivant le protocole d'expérience ainsi qu'une augmentation des niveaux de AMPA GLUR2 une semaine après la fin du protocole d'expérience sexuelle. Ces analyses ont été combinées à des analyses de la localisation membranaire et intracellulaire des sous unités des récepteurs. Bien que les résultats soient délicats à interpréter, ils indiquent que l'expérience sexuelle s'accompagne de processus dynamiques de recyclage et de relocalisation des différentes sous-unités des récepteurs du glutamate dans le noyau accumbens.



Contrairement aux différences d'expression des sous-unités qui évoluent sur plusieurs semaines après l'arrêt du protocole d'expérience sexuelle, les modifications des propriétés électrophysiologiques des neurones épineux du noyau accumbens sont visible un jour après l'induction de l'expérience sexuelle et se maintiennent plusieurs mois (Pitchers et al. 2012) (Figure 48).



**Figure 48 : L'expérience sexuelle augmente la réponse NMDA des neurones épineux du noyau accumbens chez le rat (Pitchers et al. 2010a)**

*L'enregistrement des courants AMPA et NMDA enregistrés après stimulations du cortex préfrontal indiquent que l'expérience sexuelle induit une augmentation des courants NMDA dans les neurones épineux du noyau accumbens. Cette augmentation est observée durant plusieurs semaines qui suivent la fin de l'expérience sexuelle.*

Les enregistrements des réponses des neurones épineux ont été réalisés suite à des stimulations du cortex préfrontal. Les courants dépendants des récepteurs AMPA ne sont pas modifiés par l'expérience sexuelle contrairement aux courants NMDA qui sont augmentés dans les neurones des rats sexuellement expérimentés. Cette augmentation des courants NMDA est observée dès le lendemain du protocole d'induction de l'expérience sexuelle et se maintient pendant plusieurs semaines. Bien que ces résultats indiquent une potentialisation de la réponse du noyau accumbens par l'expérience sexuelle, ils n'ont été obtenus qu'après stimulation du cortex préfrontal, qui d'après les auteurs, ne représente pas l'afférence majoritaire qui régule l'activité de ces neurones, surtout lors de la réalisation du comportement sexuel.

Cette augmentation de la réponse du circuit de la récompense est confirmée par l'augmentation du nombre de cellules  $\Delta$ c-Fos immuno-réactives. En effet, cette forme tronquée et très sable de c-Fos, dont la participation aux processus de renforcement comportementaux n'est pas encore élucidée, est davantage exprimée dans le noyau accumbens de rats sexuellement expérimentés (Pitchers et al. 2010b).

Ainsi, l'expérience sexuelle induit des modifications de l'arborisation dendritique, des niveaux d'expression de sous-unités des récepteurs du glutamate et augmente les propriétés électriques des neurones du circuit de la récompense. La potentialisation de ce circuit peut

expliquer, au moins en partie, l'augmentation de la motivation sexuelle et l'augmentation de l'efficacité comportementale induite par l'expérience sexuelle.

Jusqu'à présent, les études présentées dans cette partie se sont intéressées aux modifications cérébrales induites par l'expérience sexuelle. Afin de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués, l'approche inverse est également possible. Les études suivantes ont perturbé spécifiquement certains systèmes cérébraux par des administrations pharmacologiques dans le but d'observer de potentiels déficits dans la mise en place de l'expérience sexuelle.

### **3) Perturbation de l'expérience sexuelle par inhibition pharmacologique**

Les études perturbant l'expérience sexuelle par le biais d'inhibitions pharmacologiques ont ciblé des récepteurs ou des enzymes connus pour faciliter le comportement sexuel. Les injections systémiques ou intracérébrales dans la mPOA sont réalisées avant un ou plusieurs accouplements puis les effets sont observés lors d'un accouplement test réalisé sans injection.

#### **- Implication des récepteurs NMDA**

Trois études réalisées chez le rat par Bialy et al. (2000), Fleming et Kucera, (1991) et Powell et al. (2003) sont arrivées à la même conclusion. L'injection systémique de MK-801, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, 15 minutes avant chaque accouplement diminue de façon réversible l'amélioration comportementale (nombre de vocalisations ultrasonores, fréquence de montées avec intromissions et fréquence d'éjaculation) observée lors de l'accouplement test. De façon intéressante, l'injection d'un inhibiteur de la traduction (cycloheximide) 10 minutes avant chaque accouplement aboutit aux mêmes effets (Fleming et Kucera, 1991).

Lorsque qu'un rat naïf est exposé de façon répétée à une femelle réceptive inaccessible placée derrière une grille, ses paramètres sexuels sont améliorés le jour où la copulation est autorisée. Bien que ce protocole ne corresponde pas exactement à la définition de l'expérience sexuelle, il permet de tester facilement l'implication de molécules dans des améliorations comportementale associées à l'exposition à des femelles réceptives. Ainsi, il a été montré que cette sensibilisation aux femelles est dépendante des récepteurs NMDA puisque l'injection systémique de MK-801, 15 minutes avant chaque exposition quotidienne, abolit toute amélioration comportementale observée le jour de la copulation test (Vigdorchik et al. 2012).

Les récepteurs NMDA ainsi que des synthèses protéiques sont donc nécessaires à l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle. Cependant, les protocoles

d'injection systémique utilisés sont trop imprécis pour établir des conclusions quant aux aires cérébrales impliquées.

- Implication des récepteurs D1

Dans la même idée, l'implication des récepteurs D1 dans l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle a été testée grâce à l'injection sous-cutanée d'un antagoniste des récepteurs D1 (SCH-23390) 30 minutes avant chacun des 5 accouplements espacés de 7 jours. Ce traitement aboutit à une augmentation des latences de première montée et d'éjaculation lors de ces 5 accouplements. De façon intéressante, le comportement sexuel s'améliore lors de 4 nouveaux accouplements réalisés sans injection. Cependant, la même expérience réalisée avec un agoniste des récepteurs D1, le SKF-38393, n'a que peu d'effet sur les paramètres du comportement sexuel (Bialy et al. 2010).

L'implication des récepteurs D1 dans le processus de sensibilisation a été testée de façon similaire à l'étude de Vigdorichik et al. (2012) mais en injectant directement dans la mPOA, un antagoniste des récepteurs D1 (SCH-23390) 15 minutes avant chaque exposition. Cette injection abolit toute amélioration comportementale observée le jour de la copulation sans injection indiquant l'implication majoritaire des récepteurs D1 localisés dans la mPOA sur les améliorations comportementales observées (McHenry et al. 2012b).

- Implication de la nNOS

De façon similaire à l'étude réalisée par McHenry et al. (2012b), il a été montré que la sensibilisation à une femelle réceptive était également dépendante du NO. En effet, l'injection dans la mPOA de L-nitro-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la nNOS, 15 minutes avant chaque exposition abolit également toute amélioration comportementale observée le jour de la copulation sans injection (Lagoda et al. 2004).

En conclusion, les récepteurs du glutamate NMDA, les récepteurs de la dopamine D1 et la nNOS jouent un rôle dans les mécanismes d'induction de l'expérience sexuelle. De plus, une précision peut être apportée quant à la participation, au moins partielle, des récepteurs D1 et de la nNOS par une action au niveau de la mPOA. Cependant, la plupart des études pharmacologiques qui se sont intéressées à l'expérience sexuelle sont difficiles à interpréter du fait de l'injection systémique et de potentiels effets non spécifiques. Par exemple, l'antagoniste des récepteurs NMDA, le MK-801, diminue l'amplitude de la libération de GnRH et interagit donc avec le statut hormonal des animaux traités (Ping et al. 1995). De plus, les traitements pharmacologiques réalisés lors des premiers accouplements aboutissent

à une altération de certains paramètres du comportement sexuel. Ces altérations pourraient expliquer le déficit d'expérience sexuelle sans que la molécule injectée ne possède réellement d'effet inhibiteur sur les mécanismes moléculaires à l'origine de l'induction de l'expérience sexuelle.

L'expérience sexuelle est donc associée à des modifications cérébrales associées à différents systèmes de neurotransmission. Etant donné le rôle central que jouent les hormones sexuelles dans le contrôle du comportement sexuel (chapitre 2, partie III), d'autres études se sont intéressées à caractériser les modifications endocrines induites par l'expérience sexuelle.

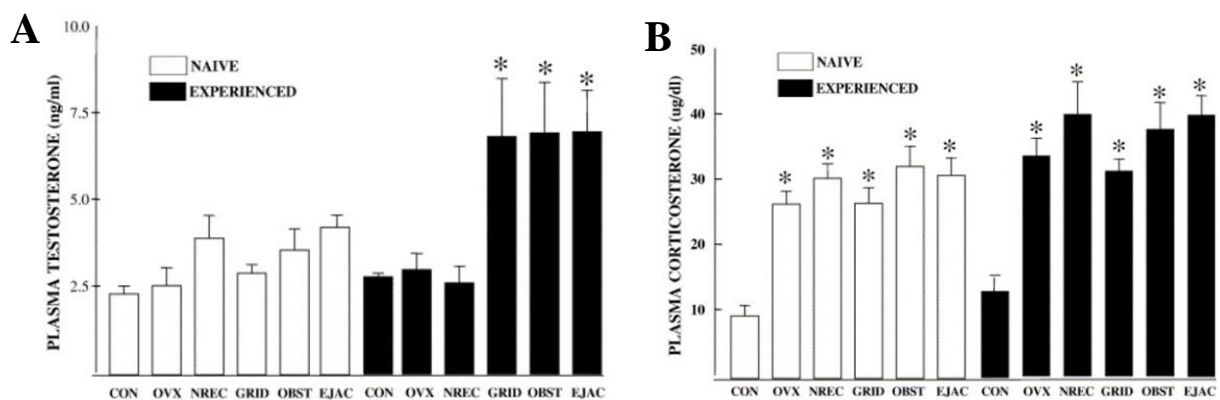
### III. Modifications endocrines induites par l'expérience sexuelle

L'ensemble des études présentées dans cette partie a été réalisé chez le rat. En effet, aucune donnée de la littérature ne décrit d'éventuelles modifications hormonales en lien avec l'expérience sexuelle chez la souris.

Ainsi, une étude réalisée par Bonilla-Jaime et al. (2006), a caractérisé les taux plasmatiques de testostérone et de corticostérone lors des différentes phases de l'accouplement chez des rats naïfs et sexuellement expérimentés ayant déjà réalisé 3 accouplements (Figure 49). La corticostérone, hormone stéroïde sécrétée par les glandes surrénales, est souvent associée au stress mais elle est également connue pour être sécrétée lors de phase d'activité motrice ou lors du contact avec un partenaire (Leuner et al. 2010).

Les taux plasmatiques de testostérone restent identiques lors de toutes les phases de l'accouplement chez les mâles naïfs alors qu'ils sont augmentés chez les mâles sexuellement expérimentés dans trois conditions : lors de la mise en présence avec une femelle réceptive derrière une grille (GRID), lors du contact avec une femelle réceptive possédant un bouchon vaginal (OBST) ou immédiatement après l'éjaculation (EJAC).

Par opposition aux taux de testostérone, les taux plasmatiques de corticostérone sont augmentés dans toutes les conditions mettant en jeu une femelle, chez les mâles naïfs ou sexuellement expérimentés.



**Figure 49 : Effet de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques de testostérone et de corticostérone lors de différentes phases du comportement sexuel mâle chez le rat (Bonilla-Jaime et al. 2006)**

Les taux plasmatiques de testostérone (A) et de corticostérone (B) ont été mesurés chez des mâles naïfs (NAIVE) ou sexuellement expérimentés qui ont déjà réalisé 3 accouplements (EXPERIENCED) dans différentes conditions. CON : contrôle, sans contact avec une femelle. OVX : 20 minutes de contact avec une femelle ovariectomisée. NREC : au contact d'une femelle non réceptive pendant 20 minutes. GRID : en présence d'une femelle réceptive placée derrière un grillage pendant 20 minutes. OBST : en présence d'une femelle réceptive avec un bouchon vaginal EJAC : après éjaculation.

Le fait que des rats sexuellement expérimentés présentent, lors de l'accouplement, des taux plasmatiques de testostérone plus élevés que des rats naïfs a également été observé par Kamel et al. (1975) (Tableau 3). Dans cette étude, l'expérience sexuelle a été induite par 6 accouplements puis les taux plasmatiques de testostérone ont été mesurés dans la cage de stabulation ou après un accouplement. Les mâles sexuellement expérimentés possèdent après accouplement, un taux de testostérone plus élevé que les mâles naïfs alors que les taux en condition basale sont identiques pour les 2 groupes.

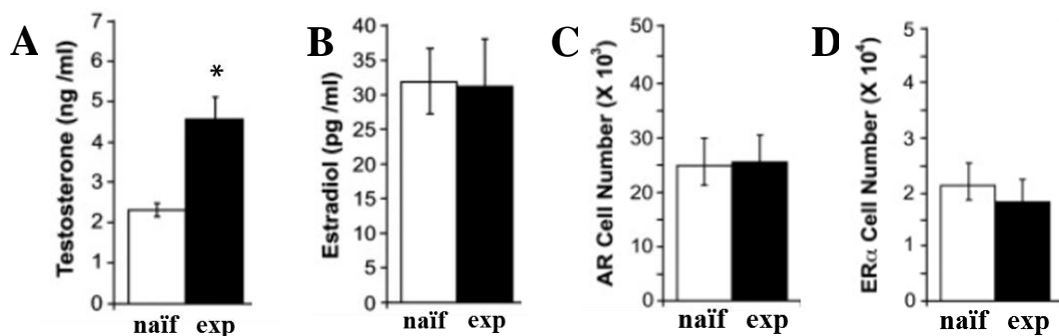
Hormone	Group	Concentration (ng/ml)		% Increase
		Resting level	After mating	
Testosterone	Naive(5)	1.17 ± 0.19	1.64 ± 0.38	40.2 ns
	Experienced(12)	1.29 ± 0.21	2.46 ± 0.36	90.7*

**Tableau 3 : Effet de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques de testostérone en condition basale et après accouplement chez le rat (Kamel et al. 1975)**

*Les taux plasmatiques de testostérone ont été mesurés chez des mâles naïfs (Naives) ou sexuellement expérimentés ayant réalisé 6 accouplements (experienced) dans leur cage de stabulation (Resting level) ou après un accouplement (After mating).*

Ces deux études montrent qu'il n'existe aucune différence de taux plasmatique de testostérone entre des mâles naïfs et sexuellement expérimentés en condition basale. En revanche, les mâles sexuellement expérimentés présentent une augmentation significative du taux plasmatique de testostérone lors d'événements associés à la copulation.

De façon contradictoire à ces résultats, plusieurs études ont observé des modifications des taux plasmatiques de testostérone en condition basale après induction d'expérience sexuelle. Cela est notamment le cas d'une étude réalisée par Wu et Gore (2009) dans laquelle l'expérience sexuelle a été induite par 30 jours d'accès quotidien à une femelle réceptive. Les taux circulant de testostérone et d'œstradiol ont été mesurés et mis en relation avec le nombre de cellules exprimant l'AR ou l'ER $\alpha$  dans la mPOA détectée par IHC (Figure 50). Il apparaît que les rats sexuellement expérimentés présentent une augmentation du taux plasmatique de testostérone mais pas d'œstradiol en condition basale. De plus, contrairement à ce qui a été montré chez la souris par Swaney et al. (2012), l'expérience sexuelle ne modifie pas les niveaux d'expression de l'AR et de l'ER $\alpha$  dans la mPOA.



**Figure 50 : Effet de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques basales de testostérone et d'œstradiol et sur l'expression des récepteurs AR et ER $\alpha$  dans la mPOA de rat (Wu et Gore, 2009)**

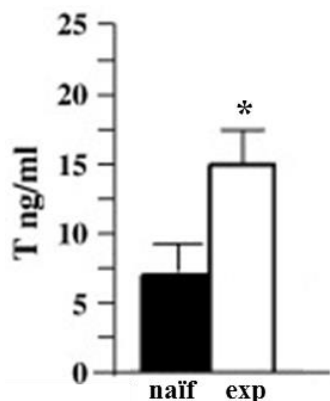
(A) Taux plasmatique basal de testostérone mesuré chez des mâles naïfs ou sexuellement expérimentés (30 jours d'accouplement quotidien).

(B) Taux plasmatique basal d'œstradiol mesuré chez des mâles naïfs ou sexuellement expérimentés (30 jours d'accouplement quotidien).

(C) Quantification du nombre de cellules exprimant l'AR dans la mPOA détectée par IHC.

(D) Quantification du nombre de cellules exprimant l'ER $\alpha$  dans la mPOA détectée par IHC.

Une dernière étude réalisée par Edinger et Frye, (2007) est en accord avec ces derniers résultats. Les mâles sexuellement expérimentés de cette étude ont passé une année en tant que mâles reproducteurs d'une colonie. Ces derniers présentent un taux basal plasmatique de testostérone plus élevé que des mâles naïfs (Figure 51).



**Figure 51 : Effet de l'expérience sexuelle sur la concentration plasmatique basale de testostérone chez le rat (Edinger et Frye, 2007)**

Les mâles sexuellement expérimentés (mâle reproducteur de colonie pendant 1 an) possèdent un niveau basal de testostérone plasmatique plus élevé que les mâles naïfs.

En résumé, les études caractérisant l'influence de l'expérience sexuelle sur le statut hormonal des mâles sont contradictoires. Alors que certaines indiquent une augmentation des taux de testostérone uniquement lors de stimulations associées à la copulation (Bonilla-Jaime et al. 2006; Kamel et al. 1975), d'autres indiquent une augmentation basale de ce taux chez les animaux sexuellement expérimentés (Edinger et Frye, 2007; Wu et Gore, 2009). Une partie de ces différences peut s'expliquer d'une part à cause des différents protocoles utilisés pour induire l'expérience sexuelle et d'autre part à cause de la pulsativité de la sécrétion de testostérone qui peut être à l'origine d'une forte variabilité.

De plus, il apparaît que les valeurs de concentration plasmatique de testostérone basales ou associées à la copulation sont variables, passant de 2 à 7,5 ng/ml (Bonilla-Jaime et al. 2006), de 1,29 à 2,46 ng/ml (Kamel et al. 1975), de 2 à 4,5 ng/ml (Wu et Gore, 2009) ou encore de 6 à 15 ng/ml (Edinger et Frye, 2007) selon l'étude considérée.

En somme, malgré l'absence de consensus et l'absence de données chez la souris, il semble que l'expérience sexuelle puisse induire des modifications hormonales basales et aussi réguler des mécanismes endocrines rapides qui sont mis en œuvre lors de la copulation.

En conclusion, l'expérience sexuelle représente l'amélioration du comportement sexuel suite à la rencontre préalable avec une femelle réceptive. Cette amélioration comportementale concerne aussi bien la phase motivationnelle que la phase copulatoire et aboutit à une réduction du temps nécessaire à la réalisation complète du comportement sexuel.

Des études réalisées chez le rat ont permis de mettre en évidence la participation de multiples acteurs moléculaires associés aux systèmes glutamatergiques, dopaminergiques, nitrergiques. La plupart de ces molécules, exerçant leur action facilitatrice sur le comportement sexuel au niveau de la mPOA, interagissent selon des modalités décrites par le modèle de Hull présenté figure 23. Néanmoins, ce modèle ne prend pas en compte la potentielle influence des stéroïdes sexuels sur la modulation de ces différents systèmes de neurotransmission. En effet, des études contradictoires indiquent que l'expérience sexuelle est capable de modifier les taux circulants de testostérone ainsi que les niveaux d'expression de ses récepteurs au niveau de la mPOA.

Le nombre d'études réalisées chez la souris est relativement faible et indique seulement que l'expérience sexuelle induit une augmentation de l'activité globale de la mPOA estimée par des marquages c-Fos ainsi qu'une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs AR dans cette même aire. Néanmoins, ces éléments ne suffisent pas à totalement expliquer l'amélioration comportementale induite par l'expérience sexuelle.



# Objectifs de thèse

À la lumière de ces éléments de bibliographie, mon projet de thèse a eu pour but de caractériser les phénomènes de plasticité qui se déroulent dans l'aire pré-optique médiane (mPOA) de l'hypothalamus à la suite de l'induction de l'expérience sexuelle chez la souris mâle.

Mon projet s'est tout d'abord focalisé sur la mise en place d'un paradigme expérimental permettant de caractériser de façon reproductible l'expérience sexuelle. Cette amélioration comportementale a été induite par un unique accouplement contrairement aux expositions multiples ou prolongées à des femelles réceptives, souvent retrouvées dans la littérature.

Dans un premier temps, mon étude s'est concentrée sur l'identification et la caractérisation de modifications structurales et moléculaires de la mPOA induites par ce premier accouplement. Cette caractérisation a été effectuée par des expériences d'IHC et de Western blots détectant des protéines participant au contrôle du comportement sexuel. Ces études ont été accompagnées de colorations de Golgi-Cox permettant de caractériser les modifications de la connectivité de la mPOA. De façon concomitante à ces études histologiques et moléculaires, des dosages sanguins et hypothalamiques d'hormones stéroïdes ont été réalisés sur des animaux naïfs et sexuellement expérimentés, afin de caractériser les modifications endocrines qui pourraient sous-tendre l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle. Ces résultats sont présentés dans le premier article.

Dans un second temps, mon projet s'est focalisé sur des événements cérébraux rapides induits par l'accouplement et leur relation avec l'expérience sexuelle. Pour cela, l'implication de la voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) dans la mise en place de l'expérience sexuelle a été étudiée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le SL-327. Les mécanismes moléculaires permettant d'activer cette voie ont ensuite été caractérisés par des analyses *ex vivo* réalisées sur tranches d'hypothalamus incubées avec des hormones stéroïdes. Enfin, l'activation de cette voie de signalisation lors de l'accouplement a été comparée entre des animaux naïfs et sexuellement expérimentés. Ces résultats sont présentés dans le second article.



# Résultats



# Premier article

**Revisiting sexual experience in male mouse: induction of dendritic spine maturation and glutamate network sensitivity independently of the nitreergic pathway and sex steroids within the mPOA**

**Arnaud JEAN**, Pauline Bonnet, Philippe Lière, Caroline Parmentier, Sakina Mhaouty-Kodja and Hélène Hardin-Pouzet

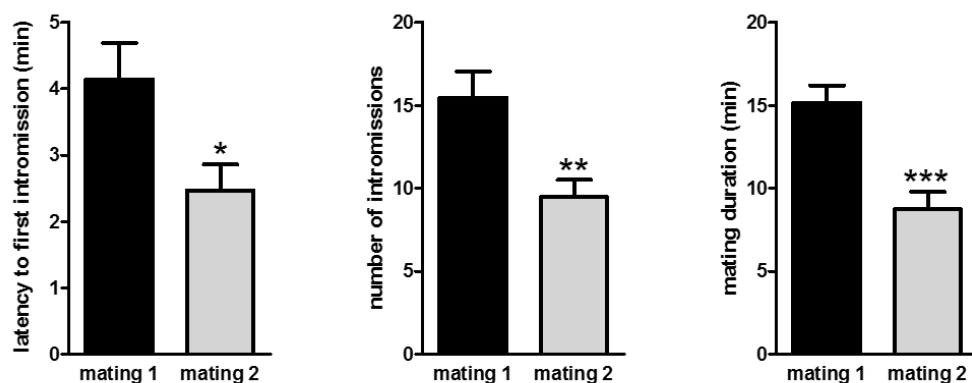
*En préparation*



La présentation de cet article est composée d'une première partie exposant la méthodologie employée et les résultats obtenus. Elle est suivie d'une deuxième partie visant à discuter les résultats et permettant détailler les perspectives qui en découlent. Les figures présentant des résultats originaux qui ne sont pas issus de la littérature possèdent une légende de couleur bleue.

## Méthodologies et résultats

Dans le premier article de cette thèse, des modifications à long terme de la mPOA ont été caractérisées suite à l'induction de l'expérience sexuelle. Pour cela, des mâles naïfs ont réalisé deux accouplements espacés de 14 jours puis les paramètres comportementaux de ces deux accouplements ont été comparés (Figure 52).



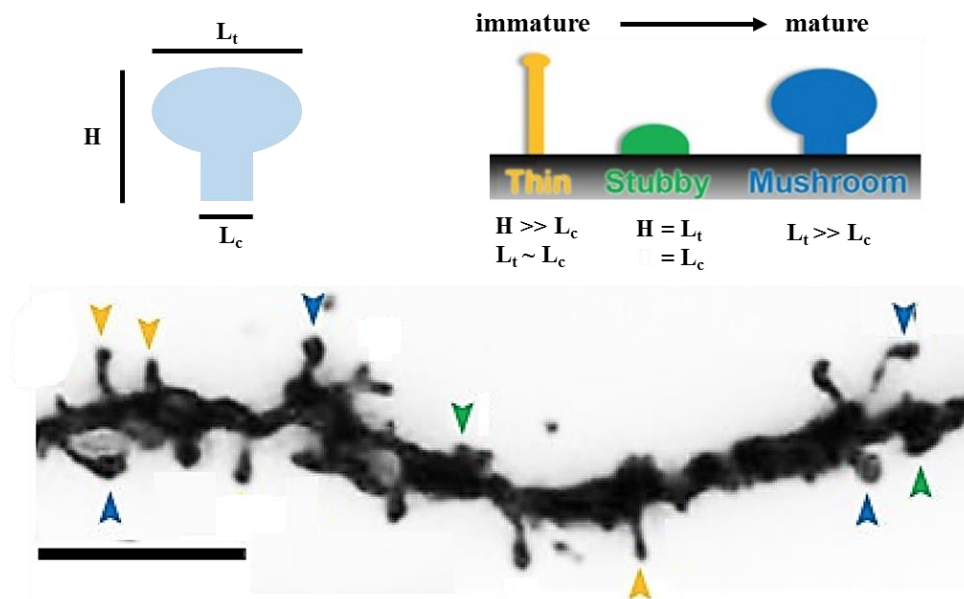
### Figure 52 : Amélioration du comportement sexuel lors du deuxième accouplement

Lors du deuxième accouplement, les mâles présentent une diminution de la latence de première montée (A) ainsi qu'une diminution du nombre de montées avec intromissions, nécessaires pour atteindre l'éjaculation (B). La durée de l'accouplement (durée séparant la première montée avec intromission de l'éjaculation) est également réduite lors du deuxième accouplement.

Lors du deuxième accouplement, les mâles présentent une diminution de la latence de première intromission ce qui indique une réduction de la durée de la phase motivationnelle. Les paramètres de la phase copulatoire sont également améliorés : les mâles effectuent moins de montées avec intromission et atteignent l'éjaculation plus rapidement. Ainsi, un unique accouplement est à l'origine d'une amélioration du comportement sexuel observé 14 jours plus tard. Ce paradigme expérimental permet donc d'étudier les modifications moléculaires de la mPOA, induites par le premier accouplement.

Dans un premier temps, l'arborisation dendritique de la mPOA a été étudiée chez des animaux naïfs et sexuellement expérimentés. Le choix d'étudier ces protrusions post-synaptiques intégrant des signaux excitateurs, réside dans leur propriété à refléter la force d'un circuit neuronal (Hering et Sheng, 2001). En effet, la densité d'épines dendritiques augmente dans certaines régions hippocampiques et corticales à la suite d'apprentissages (Leuner et Shors, 2004) alors que l'ablation des nouvelles épines formées perturbe fortement l'amélioration comportementale observée dans plusieurs paradigmes, comme la piscine de Morris (Bonhoeffer, 2016).

Outre l'augmentation de la densité totale d'épines dendritiques, la forme qu'elles adoptent est elle-même associée à la capacité de neurotransmission de la synapse. Selon la classification proposée par Harris et al. (1992), les épines dendritiques peuvent adopter des formes allant du type « thin » immature au type « mushroom » mature (Figure 53). Cette dernière forme est induite par la réalisation de protocoles de potentialisation à long terme (Maiti et al. 2015) et retrouvée de façon majoritaire suite à des paradigmes d'apprentissages (Mahmmoud et al. 2015).

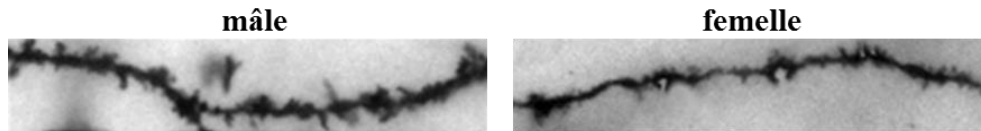


**Figure 53 : Classification des épines dendritiques selon leur morphologie, adapté de Risher et al. (2014)**

*La morphologie des épines dendritiques peut être caractérisée grâce aux valeurs de la hauteur (H), de largeur de la tête (Lt) et de la largeur du cou (Lc). Ainsi, les épines dendritiques immatures sont de type « thin » (jaune), la hauteur est plus grande que la largeur de la tête et du coup. Les épines intermédiaires de type « stubby » (vert) présentent une hauteur égale à leur largeur alors que les épines dendritiques matures de type « mushroom » (bleu) possèdent une largeur de tête plus importante que la largeur du cou (barre d'échelle 5µm).*

La densité d'épines dendritiques de la mPOA est dimorphique : les mâles possèdent une densité d'épines plus importante que les femelles (Larriva-Sahd, 1991) (Figure 54).





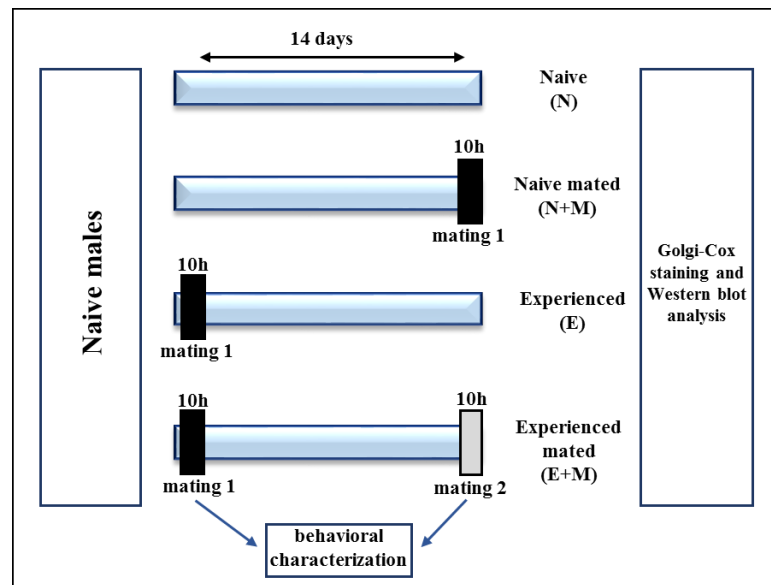
**Figure 54 : Dimorphisme de la densité d'épines dendritiques observé dans la mPOA de rat (Amateau et McCarthy, 2004)**

*L'arborisation dendritique, révélée par coloration de Golgi-Cox, est d'une densité supérieure dans la mPOA des mâles comparée à la mPOA de femelles sacrifiées à PN25.*

Ces structures jouent un rôle important dans la régulation du comportement sexuel mâle puisque l'abolition périnatale de ce dimorphisme aboutit à une diminution de l'efficacité copulatoire chez le mâle adulte (Amateau et McCarthy, 2004).

A l'âge adulte, la densité d'épines dendritiques de la mPOA est sous le contrôle de la testostérone comme cela a été montré chez le hamster. En effet, la castration diminue la densité d'épines alors que la supplémentation en testostérone rétablit le phénotype initial (Garelick et Swann, 2014).

Ainsi, l'implication des épines dendritiques dans les processus d'apprentissage, leur caractère dimorphique et leur sensibilité à la testostérone en font des supports structuraux potentiellement impliqués dans l'amélioration comportementale induite par l'expérience sexuelle. C'est pour cela qu'une coloration de Golgi-Cox a été réalisée afin de comparer l'arborisation dendritique de la mPOA de mâles naïfs et sexuellement expérimentés, sacrifiés dans leur cage ou ayant passé 10h en présence d'une femelle réceptive (Figure 55).

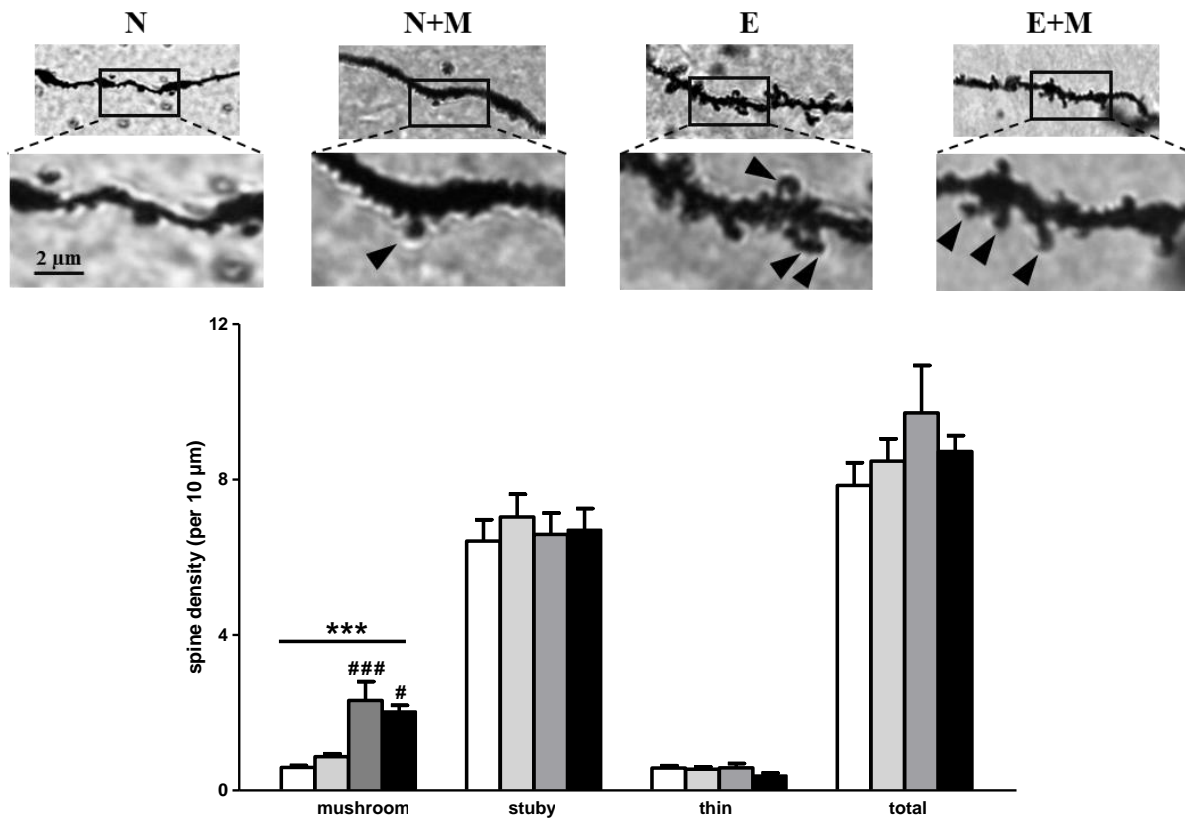


**Figure 55 : Protocole expérimental utilisé pour analyser l'effet de l'accouplement et de l'expérience sexuelle sur l'arborisation dendritique de la mPOA de souris**

*Une coloration de Golgi-Cox est réalisée sur la mPOA de mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation (N), sacrifiés après 10h passées avec une femelle réceptive (N+M), sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive (E) ou sacrifiés après 10h passées avec une femelle réceptive, 14 jours après un premier accouplement (E+M).*

Les mâles sexuellement expérimentés (E et E+M) présentent une augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom » sans variation de la densité totale en épines (Figure 56). Ces résultats indiquent qu'un premier accouplement induit une maturation de l'arborisation dendritique de la mPOA, nécessitant plusieurs jours avant d'être observable.

Partant de ce constat, les niveaux d'expressions de protéines pré-synaptiques (synaptotagmine) et post-synaptiques (PSD-95 et spinophiline) ont été estimés par Western blot entre des animaux naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E).



**Figure 56 : L'expérience sexuelle induit une augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom » dans la mPOA de souris**

Micrographies représentatives et quantification de la densité d'épines dendritiques selon leur morphologie. L'analyse de l'arborisation dendritique a été réalisée après coloration de Golgi-Cox dans la mPOA de mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation (N), sacrifiés après 10h passées avec une femelle réceptive (N+M), sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive (E) ou sacrifiés après 10h passées avec une femelle réceptive, 14 jours après un premier accouplement (E+M). Les flèches noires indiquent les épines de type « mushroom ».

La synaptotagmine est une protéine appartenant à la famille des SNARE, (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) dont les membres sont impliqués dans la régulation des mécanismes de fusion membranaire associés à l'exocytose des neurotransmetteurs. La synaptotagmine, possède un rôle de senseur de calcium et permet d'initier la formation du complexe de fusion membranaire. Cette protéine est associée à la régulation de mécanismes de plasticité synaptique. En effet, son expression est augmentée par

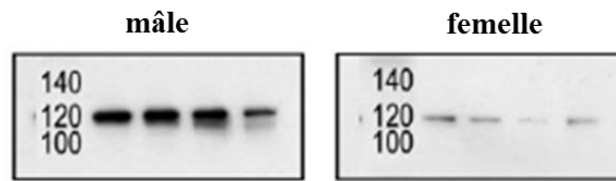
la réalisation de tâches comportementales (Liu et al. 2008) alors que son absence chez des souris transgéniques altère leur capacité d'apprentissage dans des protocoles de conditionnement par la peur (Ferguson et al. 2000). Sa détection permet de mettre en évidence l'existence de mécanismes de plasticité mettant en jeu le compartiment pré-synaptique.

Au niveau post synaptique, la PSD-95 (post-synaptic density protein 95) est une protéine d'échafaudage retrouvée de façon très abondante au niveau des synapses glutamatergiques (Keith et El-Husseini, 2008). Elle peut interagir au niveau de la membrane post-synaptique avec des molécules d'adhérence, des récepteurs NMDA via les sous-unités GluN2B et GluN2A (Mellone et al. 2015) ainsi qu'avec des canaux perméables au potassium (Sheng et Sala, 2001). La PSD-95 interagit également de façon indirecte avec d'autres récepteurs, comme les récepteurs AMPA, grâce à des interactions avec d'autres protéines d'échafaudage. Enfin, la PSD-95 interagit directement avec des enzymes cytosoliques comme la nNOS mais aussi indirectement avec des éléments du cytosquelette (Christopherson et al. 1999).

Ces nombreuses interactions expliquent le rôle majeur que joue la PSD-95 dans la régulation de l'adhérence transynaptique et dans la spinogénèse (Sala et Segal, 2014). En effet, la surexpression de cette protéine dans des cultures cellulaires d'hippocampe provoque une augmentation de la densité et de la taille des épines dendritiques (El-Husseini et al. 2000) alors que sa délétion provoque des dérégulations des processus de LTP et de LTD (Carlisle et al. 2008) et abolit la stabilisation des synapses (Ehrlich et al. 2007). L'implication de la PSD-95 dans ces processus de plasticité synaptique s'explique par sa participation à la régulation de la localisation membranaire des récepteurs NMDA et AMPA (Kim et al. 2007). De plus, l'expression de la PSD-95 est connue pour être sensible aux taux de testostérone (Li et al. 2012) et d'œstradiol (Li et al. 2004) dans l'hippocampe.

Enfin, la dernière protéine synaptique étudiée dans cet article est la spinophiline. Localisée au niveau des épines dendritiques, elle interagit directement avec l'actine et indirectement avec les récepteurs glutamatergiques, notamment via PP-1 (Wu et al. 2008). Elle joue un rôle important dans la régulation de la morphogénèse des épines dendritiques ainsi que dans les mécanismes de plasticité synaptique qui sont altérés chez les souris KO (Feng et al. 2000). Cette protéine est utilisée par de nombreux auteurs comme un indicateur de la densité d'épines dendritiques (Amateau et McCarthy, 2002; Fester et al. 2009). La spinophiline est exprimée de façon dimorphique au niveau de la mPOA chez le rat, ce qui est

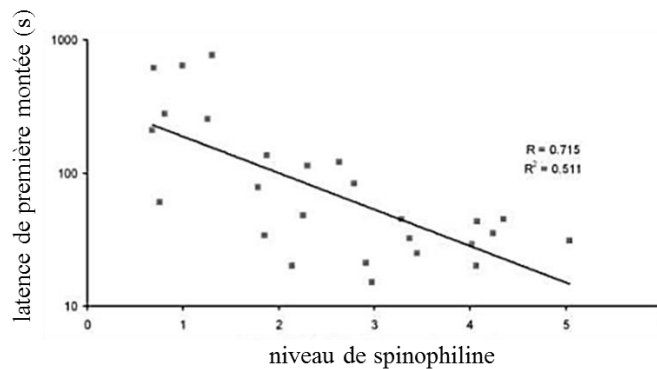
cohérent avec le dimorphisme de l'arborisation dendritique illustré figure 54 (Amateau et McCarthy, 2004) (Figure 57).



**Figure 57 : Expression dimorphique de la spinophiline dans la mPOA de rat (Amateau et McCarthy, 2004)**

*Les niveaux de spinophiline, estimés par Western blot chez le rat adulte, sont plus élevés dans la mPOA des mâles que des femelles.*

L'expression de la spinophiline est influencée à l'âge adulte par les taux d'hormones stéroïdes notamment par l'œstradiol (Lee et al. 2004; Li et al. 2004). De plus, son niveau d'expression dans la mPOA est négativement corrélé à certains paramètres du comportement sexuel comme la latence de première montée chez le rat (Wright et al. 2008) (Figure 58).



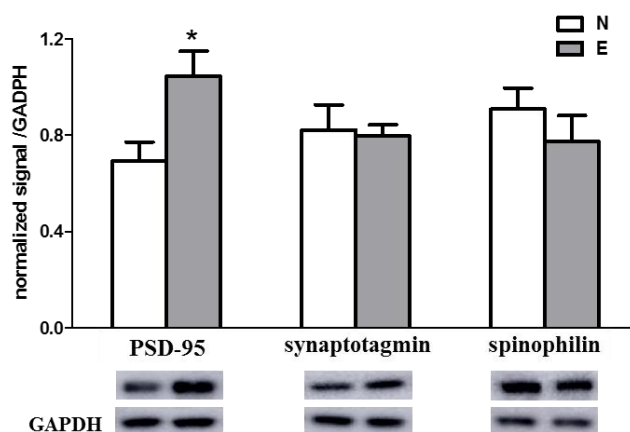
**Figure 58 : Corrélation entre la latence de première montée et le niveau d'expression de la spinophiline dans la mPOA de rat (Wright et al. 2008)**

*Les niveaux de spinophiline, estimés par Western blot dans la mPOA, sont plus élevés chez les animaux présentant les latences de première montée les plus courtes.*

Ainsi, les propriétés de ces trois protéines, fortement impliquées dans les mécanismes de plasticité synaptique, de spinogénèse et dont les expressions sont modulées par les hormones stéroïdes, en font de potentiels supports moléculaires de l'expérience sexuelle.

L'analyse des Western blots indique que les niveaux d'expression de PSD-95 sont augmentés chez les mâles sexuellement expérimentés (E) contrairement aux niveaux de spinophiline et de synaptotagmine (Figure 59). Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom » (Figure 56) connues pour être enrichies en PSD-95 (Bourne et Harris, 2008; Pak et al. 2001).

Un unique accouplement provoque donc la maturation de l'arborisation dendritique et une augmentation des niveaux d'expression de PSD-95. Ces résultats indiquent que les modifications structurales de la mPOA, induites par l'expérience sexuelle, concernent préférentiellement le compartiment post-synaptique.



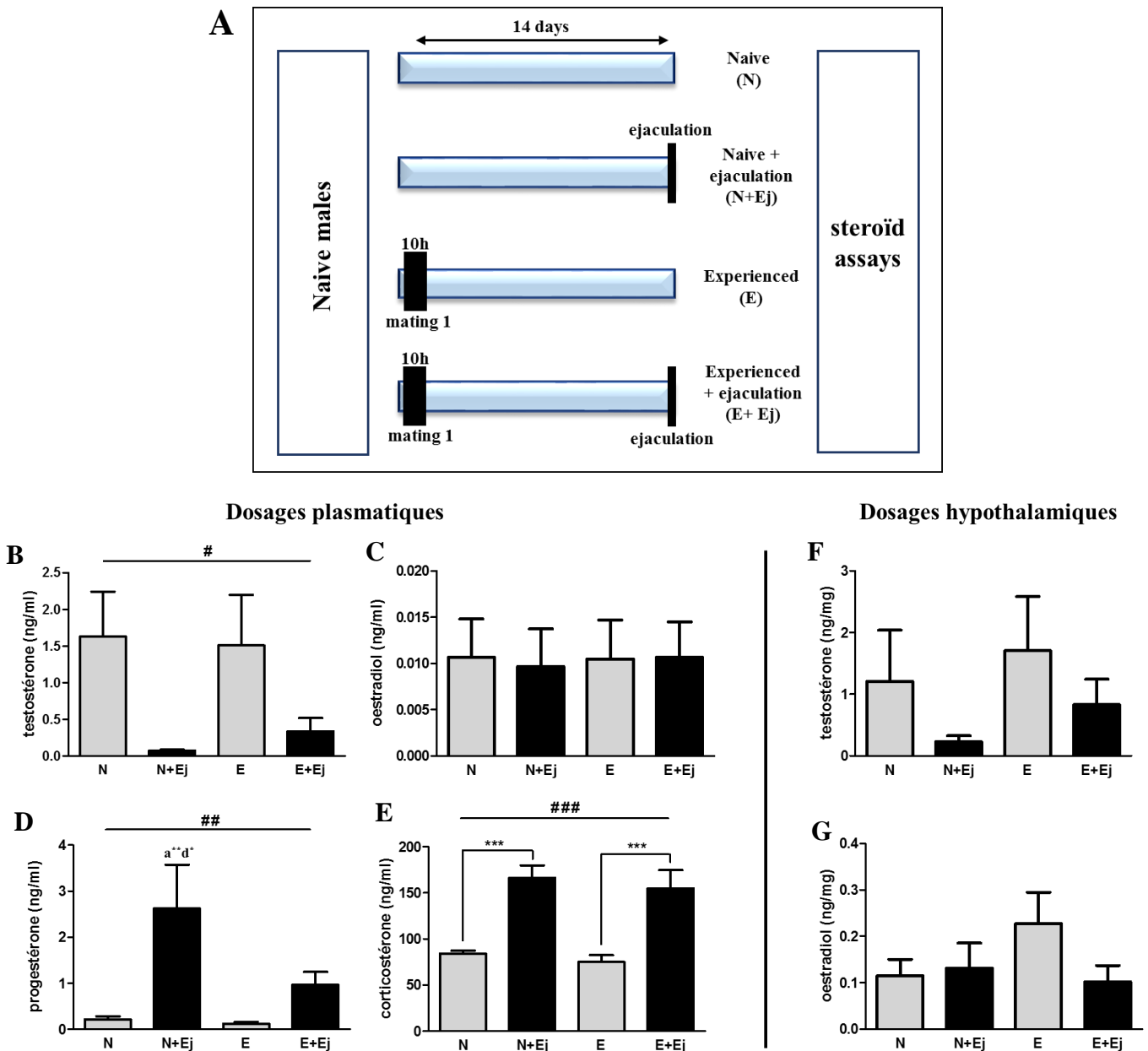
### Figure 59 : L'expérience sexuelle induit une augmentation des niveaux de PSD-95 dans la mPOA de souris

Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression de PSD-95, synaptotagmine et spinophiline détectés dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

Comme abordé précédemment, les hormones stéroïdes sexuelles régulent en partie les mécanismes de plasticité dendritique et l'expression de la PSD-95. De plus, elles jouent un rôle fondamental dans le contrôle cérébral du comportement sexuel comme cela a été développé chapitre 2, partie III.

Ainsi, nous avons dans un second temps caractérisé l'effet de l'expérience sexuelle sur la sécrétion des hormones stéroïdes et sur l'expression de leurs récepteurs dans la mPOA. En effet, aucun consensus n'est établi quant à l'effet de l'expérience sexuelle sur les taux d'hormones circulant chez le rat (chapitre 3, partie II). De plus, aucune étude n'a jamais caractérisé les potentielles différences hormonales entre des mâles naïfs et sexuellement expérimentés chez la souris.

Pour cela, les taux plasmatiques de testostérone, d'œstradiol, de progestérone et de corticostérone ont été dosés dans le plasma d'animaux naïfs ou sexuellement expérimentés, restant dans leur cage de stabulation ou sacrifiés au moment de l'éjaculation (Figure 60). Le sacrifice au moment de l'éjaculation a été choisi car la sécrétion de testostérone est maximale à ce moment chez le rat (Bonilla-Jaime et al. 2006; Kamel et al. 1975). Des dosages hypothalamiques de testostérone et d'œstradiol ont également été réalisés sur les mêmes animaux afin de mettre en évidence une potentielle synthèse locale de stéroïdes. Les différentes conditions de sacrifice permettent donc d'identifier de potentielles différences dans les taux d'hormones stéroïdes en état basal (sacrifié dans la cage de stabulation) ou lors d'une sécrétion maximale (éjaculation).



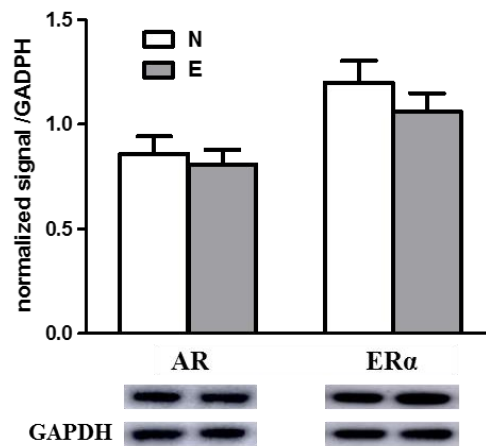
**Figure 60 : Effets de l'éjaculation et de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques et hypothalamiques de stéroïdes chez la souris**

Protocole expérimental (A) utilisé pour déterminer l'effet de l'éjaculation et de l'expérience sexuelle sur les concentrations plasmatiques en testostérone (B), œstradiol (C), progestérone (D), et corticostérone (E) ainsi que les concentrations hypothalamiques de testostérone (F) et d'œstradiol (G). Les différents stéroïdes sont dosés chez des mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation (N), sacrifiés après éjaculation lors d'un premier accouplement (N+Ej), sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive (E) ou sacrifié après éjaculation, 14 jours après un premier accouplement (E+Ej). Les # indiquent un effet significatif de l'éjaculation, (a) indique un effet significatif comparé au groupe N, (d) indique un effet significatif comparé au groupe E+Ej.

Les dosages plasmatiques indiquent que l'éjaculation provoque une diminution importante des taux de testostérone et une augmentation des taux de corticostérone et de progestérone. Une tendance similaire est observée pour les taux hypothalamiques de

testostérone. En revanche, l'expérience sexuelle ne provoque aucune variation des taux plasmatiques et hypothalamiques des différents stéroïdes dosés.

Ces dosages ont été associés à la détection des récepteurs AR et ER $\alpha$  par Western blot dans la mPOA d'animaux naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E) restant dans leur cage (Figure 61).



**Figure 61 : L'expérience sexuelle ne modifie ni les niveaux de récepteurs des androgènes (AR) ni les niveaux de récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ ) dans la mPOA de souris**

*Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression de l'AR et de l'ER $\alpha$  détectés dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.*

L'analyse des Western blots indique que les niveaux d'expression des récepteurs AR et ER $\alpha$  sont similaires entre les mâles naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E). Ainsi, l'expérience sexuelle ne modifie ni la sécrétion ni les niveaux d'expression des récepteurs des hormones sexuelles stéroïdes.

Ces éléments mettent en évidence que les modifications moléculaires induites par l'expérience sexuelle chez la souris sont différentes de celles observées chez le rat. En effet, plusieurs études indiquent que l'expérience sexuelle modifie les concentrations plasmatiques de testostérone au repos et/ou au moment de l'éjaculation chez le rat (Chapitre 3, Partie III).

Ainsi, bien que la testostérone joue un rôle majeur dans la régulation du comportement sexuel mâle (chapitre 2, partie III), elle n'est pas le support de l'expérience sexuelle chez la souris. Elle semble davantage posséder un rôle permissif comme cela est suggéré par des expériences de castration et de supplémentation en testostérone. En effet, les souris mâles présentent toujours une amélioration de leur comportement sexuel en dépit de tout changement possible de la sécrétion de testostérone (Raskin et al. 2009).

L'expérience sexuelle chez la souris n'augmente ni les niveaux de spinophiline ni les concentrations de testostérone. Or ces éléments sont davantage présents chez le mâle que chez la femelle et sont connus pour corrélés avec les paramètres du comportement sexuel mâle

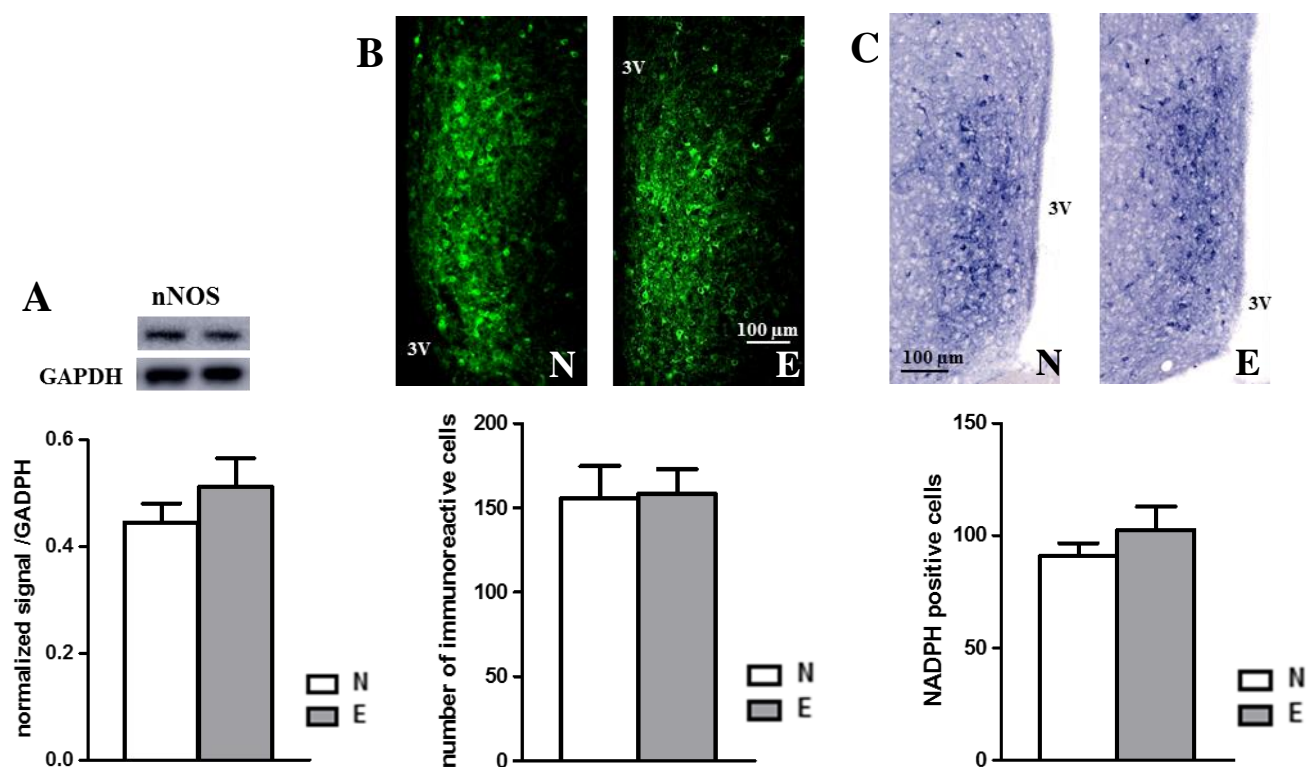
chez le rat. En effet, les niveaux d'expression de la spinophiline corrèlent avec les latences de première montée (Wright et al. 2008) et les concentrations plasmatiques de testostérone corrèlent avec le nombre d'éjaculations chez le rat (Rowland et Houtsmuller (1998). Cela indique donc que l'amélioration du comportement sexuel chez la souris n'est pas associée à une masculinisation du phénotype moléculaire de la mPOA. En revanche, elle est vraisemblablement associée à une augmentation de la sensibilité et/ou de la réactivité de la cette aire.

Nous nous sommes donc ensuite intéressés à caractériser les modifications de certains acteurs particulièrement impliqués dans la mise en place de l'expérience sexuelle chez le rat et potentiellement impliqués dans l'augmentation de la réactivité de la mPOA. Cela est notamment le cas du NO. Cette molécule gazeuse, synthétisée par les enzymes NOS est un neuromodulateur du système nerveux qui participe à la régulation des processus de plasticité synaptique (Hardingham et al. 2013) et d'apprentissage (Kirchner et al. 2004; Weitzdoerfer et al. 2004). Il est également un acteur majeur du contrôle central du comportement sexuel mâle d'après le modèle proposé par Hull et illustré figure 23 (chapitre 2, Partie II-B et II-C) (Hull et Dominguez, 2006). En effet, la micro-injection dans la mPOA d'arginine, substrat des NOS, augmente la fréquence de montées alors que la micro-injection d'un inhibiteur de NOS, le L-nitro-arginine méthyl ester (L-NAME) diminue la fréquence et le nombre de montées et allonge la durée de l'accouplement (Lagoda et al. 2004; Sato et al. 1998).

La potentialisation du système nitroergique est une des hypothèses avancées chez le rat permettant d'expliquer l'amélioration comportementale induite par l'expérience sexuelle. Ce modèle s'appuie notamment sur le fait que les mâles sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules nNOS ainsi que des niveaux d'expression estimés par Western blot plus élevés dans la mPOA (Dominguez et al. 2006a). De plus, la micro-injection dans la mPOA de L-nitro-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la nNOS abolit l'amélioration comportementale normalement induite par l'exposition à des femelles inaccessibles (Lagoda et al. 2004).

Ainsi, les caractéristiques de la neurotransmission nitroergique ont été analysées dans la mPOA de mâles naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E). Pour cela, les niveaux de nNOS ont été estimés par Western blot et le nombre de cellules nNOS immuno-réactives a été déterminé par IHC. De plus, le nombre de cellules présentant une activité enzymatique nNOS a été déterminé par un marquage histo-enzymologique à la NADPH-diaphorase (Figure 62).





**Figure 62 : L'expérience sexuelle ne modifie pas le nombre de cellules, les niveaux d'expression et l'activité enzymatique de la nNOS dans la mPOA de souris**

(A) Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression de la nNOS détectée dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

(B) IHC représentative et quantification du nombre de cellules nNOS détectées dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

(C) Histoenzymologie NADPH-diaphorase représentative et quantification du nombre de cellules présentant une activité enzymatique NOS détectées dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

Les mâles sexuellement expérimentés (E) possèdent autant de cellules nNOS immuno-réactives et autant de cellules NADPH-diaphorase positives que les mâles naïfs (N). De plus, l'analyse du Western blot confirme que les niveaux d'expression de la nNOS sont identiques entre les deux groupes d'animaux.

Ces résultats contrastent fortement avec ceux obtenus chez le rat. En effet, l'expérience sexuelle est associée chez le rat à une augmentation du nombre de cellules nNOS immuno-réactives ainsi qu'à une augmentation des niveaux d'expression de la nNOS détectée par Western blot (Dominguez et al. 2006a) (Figure 40).

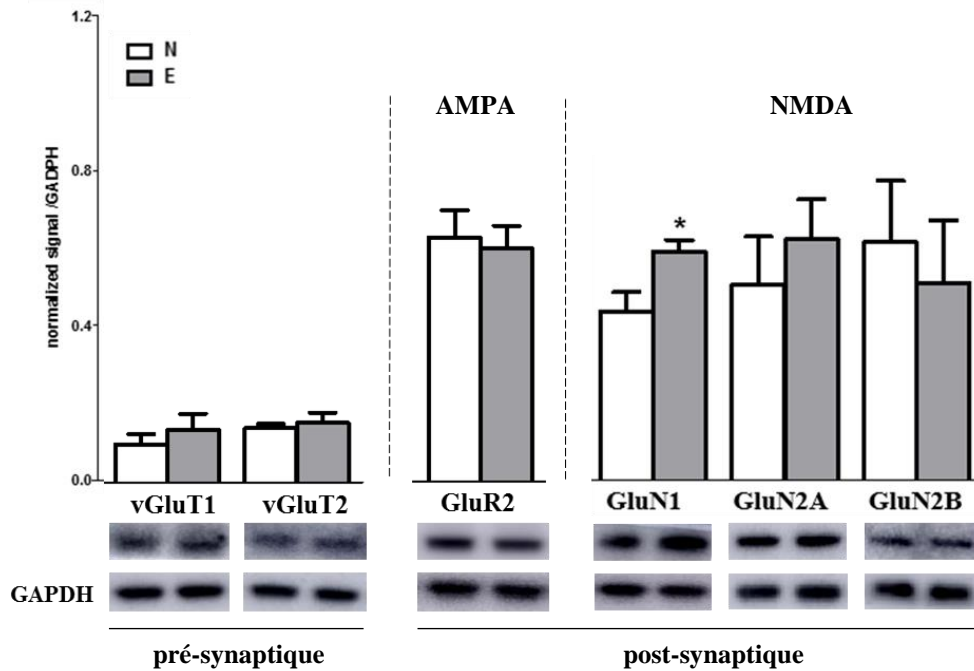
L'absence de modification du système nitreurgique indique la nécessité d'élaborer un nouveau modèle propre à la souris permettant d'explicitier les mécanismes moléculaires associés à l'expérience sexuelle.

Afin d'identifier des modifications biochimiques permettant d'expliquer l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle, nous nous sommes alors intéressés à caractériser l'expression de certaines protéines associées à la neurotransmission glutamatergique. En effet, les résultats précédents indiquent que l'expérience sexuelle entraîne une modification de l'arborisation dendritique et une augmentation des niveaux de PSD-95, protéine associée aux synapses excitatrices. De plus, le glutamate libéré dans la mPOA durant l'accouplement (Dominguez, 2006) possède un effet facilitateur sur le comportement sexuel chez le rat (Will et al. 2014) (chapitre 3, Partie II). Il est alors envisageable que l'efficacité de la neurotransmission glutamatergique soit augmentée dans la mPOA des souris mâles sexuellement expérimentées.

L'augmentation de la transmission glutamatergique peut être due à une augmentation de la libération de glutamate, notamment par une augmentation des niveaux des transporteurs vésiculaires de glutamate (vGluT1 et vGluT2), dont l'expression conditionne la probabilité de libération des vésicules synaptiques (Herman et al. 2014) ainsi que la quantité de glutamate libérée (Wojcik et al. 2004). De plus, selon Tordera et al. (2005), les niveaux d'expression des vGluts représentent un indicateur du nombre de boutons synaptiques glutamatergiques.

L'augmentation de l'efficacité de la transmission glutamatergique pourrait également être due à une modulation des réponses post-synaptiques *via* les récepteurs du glutamate, notamment les récepteurs AMPA et NMDA, fortement impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique (Chater et Goda, 2014; Lau et Zukin, 2007; Lüscher et Malenka, 2012) et connus pour participer à la régulation centrale du comportement sexuel (chapitre 2, Partie II-B).

Les récepteurs NMDA se trouvent sous forme di-hétéromériques (2 sous-unités GluN1 associées à deux sous-unités GluN2 du même type) ou sous forme tri-hétéromériques (2 sous-unités GluN1 associées à deux sous-unités GluN2 de type différent). La composition en sous-unités du récepteur NMDA influence les propriétés de perméabilité, de sensibilité aux agonistes, de probabilité d'ouverture ou encore de désensibilisation des récepteurs (Paoletti et al. 2013). Les récepteurs AMPA sont quant à eux composés de 4 sous unités (GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4) assemblés en tétramères. La plupart des récepteurs AMPA sont di-hétéromériques composés d'un dimère obligatoire GluR2 associé à un dimère GluR1, GluR3 ou GluR4 (Mayer, 2005). Ainsi, les niveaux d'expression de vGluT1, vGluT2, de la sous-unité obligatoire des récepteurs AMPA GluR2 ainsi que les niveaux d'expression des sous-unités des récepteurs NMDA GluN1, GluN2A et GluN2B ont été estimés par Western blot dans la mPOA d'animaux naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E) (Figure 63).



**Figure 63 : Effet de l'expérience sexuelle sur la neurotransmission glutamatergique dans la mPOA de souris**

Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression des transporteurs vésiculaires de glutamate vGluT1 et vGluT2, de la sous-unité obligatoire des récepteurs AMPA GluR2 et des sous-unités des récepteurs NMDA GluN1, GluN2A et GluN2B détectés dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

Les niveaux d'expression de vGluT1 et de vGluT2 sont similaires entre les deux groupes d'animaux. Ce résultat, cohérent avec l'absence de modification des niveaux de synaptotagmine (Figure 59), indique que le compartiment pré-synaptique ne semble pas être modifié par l'expérience sexuelle.

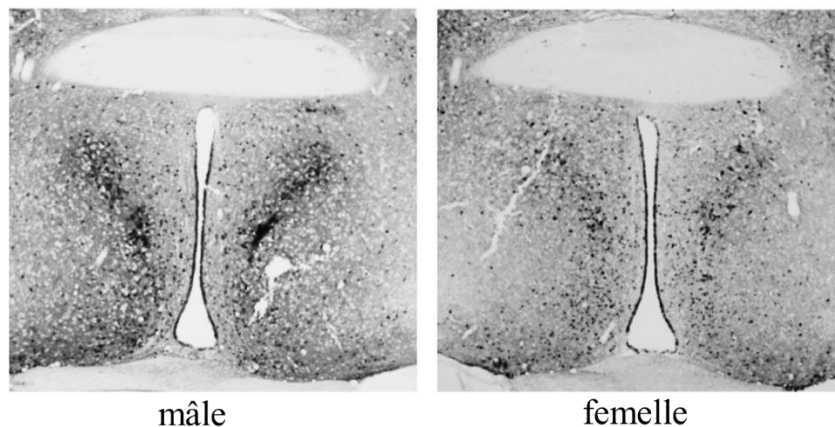
Au niveau post-synaptique, les mâles sexuellement expérimentés (E) présentent des niveaux de GluR2 identiques mais des niveaux de GluN1 plus élevés que les mâles naïfs (N). L'expérience sexuelle induit donc des modifications d'expression des sous-unités des récepteurs NMDA alors que l'expression de la sous-unité obligatoire des récepteurs AMPA reste constante. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation des courants NMDA (mais pas des courants AMPA) observée dans le noyau accumbens de rats sexuellement expérimentés (Figure 48) (Pitchers et al. 2010a).

Ainsi, alors que la quantité de glutamate libérée dans la mPOA n'est pas modifiée par l'expérience sexuelle (estimée par les niveaux de vGluts), les niveaux d'expression des récepteurs NMDA sont augmentés chez les mâles sexuellement expérimentés. Cela indique que l'expérience sexuelle induit vraisemblablement une augmentation de la sensibilité de la mPOA au glutamate en potentialisant la réponse post-synaptique *via* des mécanismes NMDA dépendants.

Partant du constat que les récepteurs NMDA sont perméables au calcium, nous nous sommes intéressés à l'expression d'une protéine intracellulaire sensible au calcium, la calbindine.

Cette protéine intracellulaire de 28 kDa est capable de fixer 4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec une forte affinité et participe aux mécanismes intracellulaires de régulation de l'homéostasie calcique. Cette protéine neuronale, exprimée dans la plupart des régions cérébrales (Baimbridge et al. 1982), possède un rôle de senseur, de tampon intracellulaire du calcium (Schwaller, 2010) et est fortement impliquée dans les mécanismes d'apprentissage. En effet, les souris déficientes pour le gène de la calbindine présentent des déficits de mémoire et d'interactions sociales (Harris et al. 2016). Cependant, le rôle précis de la calbindine dépend fortement du type de neurone et de la région cérébrale considérée. Ainsi l'absence d'expression dans les cellules de Purkinje du cervelet altère la coordination motrice alors que cette absence dans le gyrus denté altère la mémoire spatiale.

Une propriété intéressante de ce marqueur neuronal réside dans son expression dimorphique dans le cortex préfrontal et dans le cervelet (femelle > mâle) mais également au niveau de l'hypothalamus dans la mPOA (mâle > femelle) (Orikasa et Sakuma, 2010) (Figure 64).

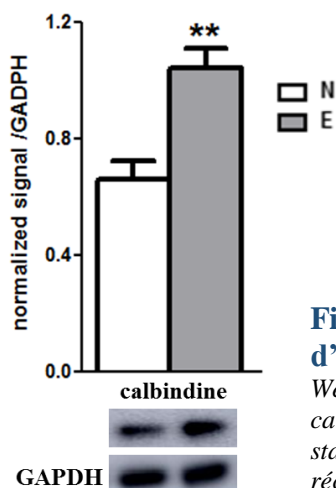


**Figure 64 : Expression dimorphique de la calbindine dans la mPOA de souris (Orikasa et Sakuma, 2010)**

*Le nombre de cellules immuno-réactives pour la calbindine est plus important chez les mâles que les femelles.*

De plus, ce dimorphisme, régulé en période périnatale par la testostérone et l'œstradiol (Sickel et McCarthy, 2000) est également retrouvé chez le rat et permet de délimiter le noyau sexuellement dimorphique (SDN) de la mPOA (He et al. 2013). Néanmoins, son rôle précis dans le contrôle du comportement sexuel n'est pas encore élucidé.

Les niveaux d'expression de la calbindine ont donc été estimés par Western blot dans la mPOA d'animaux naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E) (Figure 65).



**Figure 65 : L'expérience sexuelle augmente les niveaux d'expression de la calbindine dans la mPOA**

*Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression de la calbindine détectée dans la mPOA de N : mâle naïf sacrifié dans sa cage de stabulation, E : mâle sacrifié 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.*

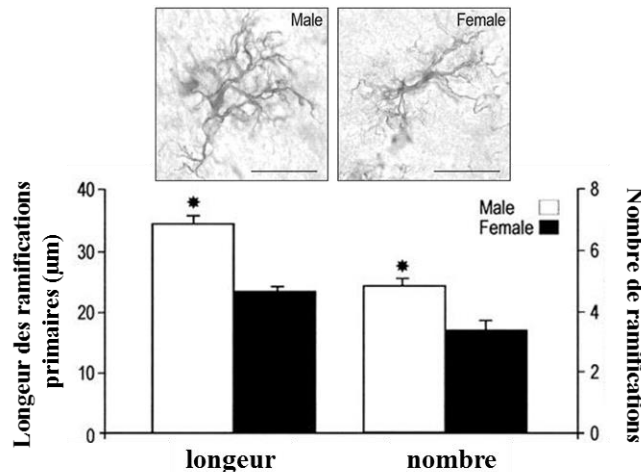
Les niveaux de calbindine sont plus élevés dans la mPOA des mâles sexuellement expérimentés. L'augmentation des niveaux d'expression de cette protéine, permettant de tamponner les variations importantes de calcium intracellulaire, confirme la potentialisation de la réponse post-synaptique chez les mâles sexuellement expérimentés. Ainsi, l'augmentation de la sensibilité de la mPOA au glutamate *via* des mécanismes NMDA dépendants entraînerait un fort afflux de calcium dont le retour à une valeur de consigne serait permis par l'augmentation des niveaux de calbindine.

Afin de poursuivre la caractérisation des modifications induites par l'expérience sexuelle, nous nous sommes intéressés à la participation des cellules gliales. Etant donné les modifications de la neurotransmission glutamatergique observées jusqu'alors chez les souris sexuellement expérimentés, il est envisageable que les astrocytes participent aux mécanismes de potentialisation de la mPOA associés à l'expérience sexuelle. En effet, les astrocytes sont impliqués dans la régulation de nombreux mécanismes de plasticité synaptique (Barker et Ullian, 2010). Cette implication est due à leur rôle important joué dans la recapture active du glutamate de la fente synaptique grâce au transporteur EAAT (Excitatory Amino Acid Transporter). Ce transporteur est mécaniquement associé à la GFAP (Glial fibrillary acidic protein), marqueur spécifique des astrocytes. Cette protéine du cytosquelette assure la localisation du transporteur à la membrane et participe au maintien de la morphologie des prolongements cellulaires qui contactent des synapses (Sullivan et al. 2007).

Les astrocytes semblent jouer un rôle dans le contrôle du comportement sexuel et de l'expérience sexuelle. En effet, le nombre d'astrocytes détecté au niveau de la mPOA corrèle avec un certains nombre de paramètres du comportement sexuel, comme la durée des

intervalles post-éjaculatoires chez le rat. De façon intéressante, ces corrélations semblent évoluer suite à l'induction de l'expérience sexuelle (Will et al. 2015).

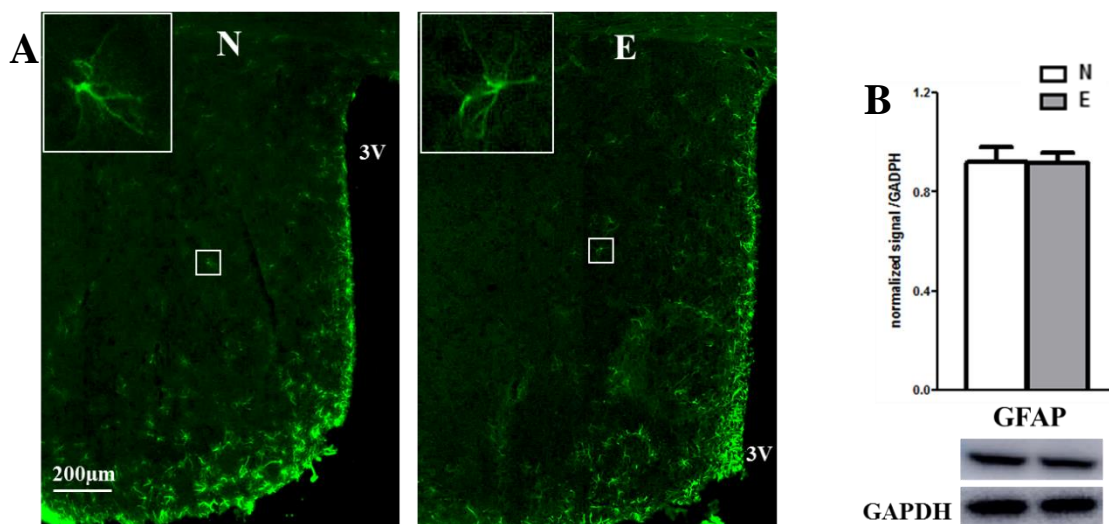
De plus, la morphologie des astrocytes observée en période périnatale (PN2) est dimorphique dans la mPOA : les mâles possèdent des astrocytes présentant des ramifications plus longues et plus nombreuses que les astrocytes des femelles (McCarthy et al. 2002) (Figure 66).



**Figure 66 : Morphologie dimorphique des astrocytes dans la mPOA de rats âgés de 2 jours (McCarthy et al. 2002)**

*En période périnatale, les mâles possèdent des astrocytes aux ramifications plus longues et plus nombreuses que les femelles.*

Le nombre d'astrocytes, leur morphologie ainsi que les niveaux de GFAP ont été estimés par IHC et par Western blot détectant la GFAP dans la mPOA de mâles naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E) (Figure 67).



**Figure 67 : Effet de l'expérience sexuelle sur la morphologie des astrocytes et l'expression de GFAP dans la mPOA de souris**

*(A) IHC détectant la GFAP dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.*

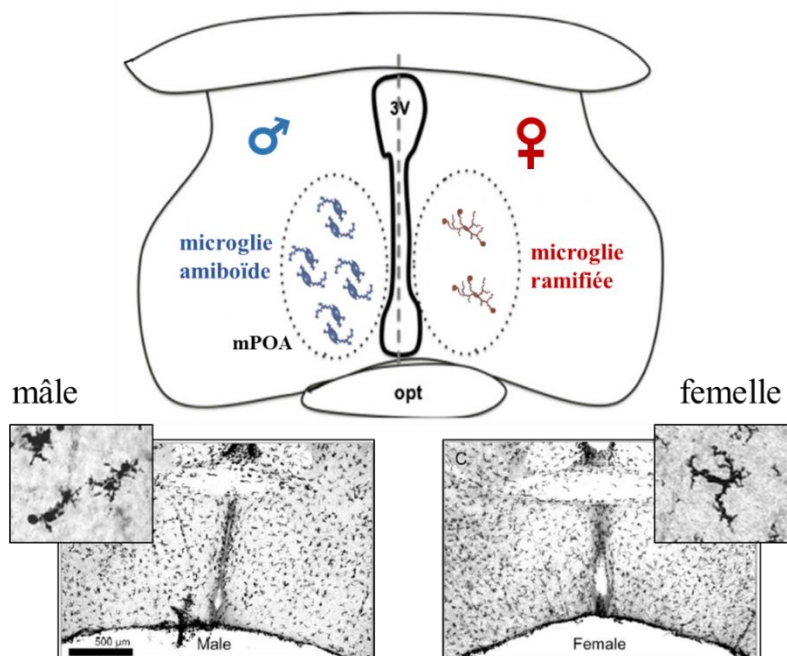
*(B) Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression de la GFAP détectée dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.*



Aucune différence concernant les niveaux d'expression de GFAP, le nombre d'astrocytes ainsi que dans leur morphologie n'a été détecté entre les deux groupes d'animaux. Ces résultats indiquent que l'expérience sexuelle n'est pas associée à une modification du réseau astrocytaire dans la mPOA. Cependant, des modifications fonctionnelles (capacité de recapture du glutamate et participation au métabolisme neuronal) ne sont pas à exclure et mériteraient d'être explorées.

Les effets de l'expérience sexuelle sur une autre population de cellules gliales, la microglie, ont également été étudiés. La microglie, initialement décrite pour son rôle immunitaire, est capable de phagocyter des éléments reconnus comme étrangers au niveau cérébral. Elle joue également un rôle important dans la régulation de nombreux processus neuro-développementaux comme le guidage axonal, la croissance neuritique, l'apoptose ou encore l'élagage synaptique (Cunningham et al. 2013; Paolicelli et al. 2011; Squarzoni et al. 2015).

Au niveau de la mPOA chez le rat, la microglie est organisée de façon dimorphique en période périnatale : les mâles possèdent davantage de cellules microgliales que les femelles. De plus, leur morphologie est différente : la microglie des mâles se présente sous une forme majoritairement amiboïde alors que celle des femelles adopte une forme préférentiellement ramifiée (Figure 68).

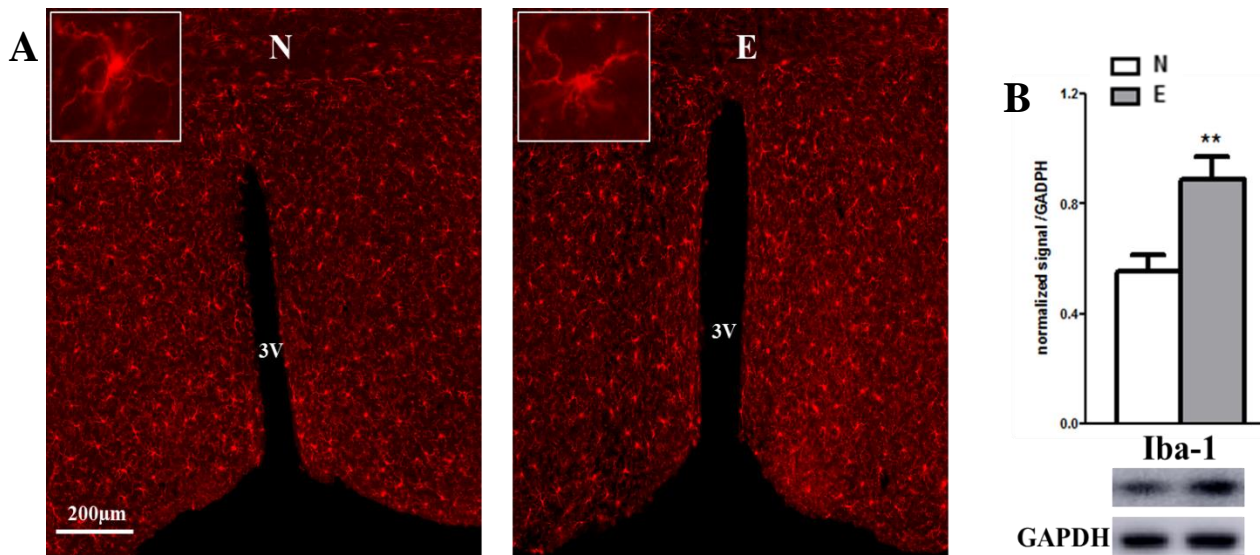


**Figure 68 : La morphologie et le nombre de cellules microgliales sont dimorphiques dans la mPOA de rats âgés de 2 jours, adapté de Lenz et al. (2013) et McCarthy et al. (2015)**  
*Les mâles possèdent une quantité importante de cellules microgliales et de forme amiboïde alors que les femelles possèdent peu de cellules et de forme ramifiée.*

Cette morphologie microgliale est interprétée dans la littérature comme un reflet de l'état d'activation. Ainsi, la forme amiboïde représente un état activé alors que la forme ramifiée représente un état quiescent (Lenz et McCarthy, 2015). Ce dimorphisme, régulé par l'œstradiol (Amateau et McCarthy, 2004), participe à l'établissement du dimorphisme sexuel du nombre d'épines dendritiques décrit auparavant (Lenz et McCarthy, 2015).

En revanche, la compréhension du rôle que joue la microglie dans les mécanismes de plasticité du cerveau adulte n'est que très partielle (Parkhurst et al. 2013) alors que son rôle dans le contrôle cérébral du comportement sexuel est totalement inconnu.

Le nombre de cellules microgliales, leur morphologie ainsi que les niveaux d'expression d'Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), protéine spécifique de la microglie, ont été estimés par IHC et par Western blot dans la mPOA de mâles naïfs (N) et sexuellement expérimentés (Figure 69).



**Figure 69 : Effet de l'expérience sexuelle sur la morphologie de la microglie et sur l'expression d'Iba-1 dans la mPOA de souris**

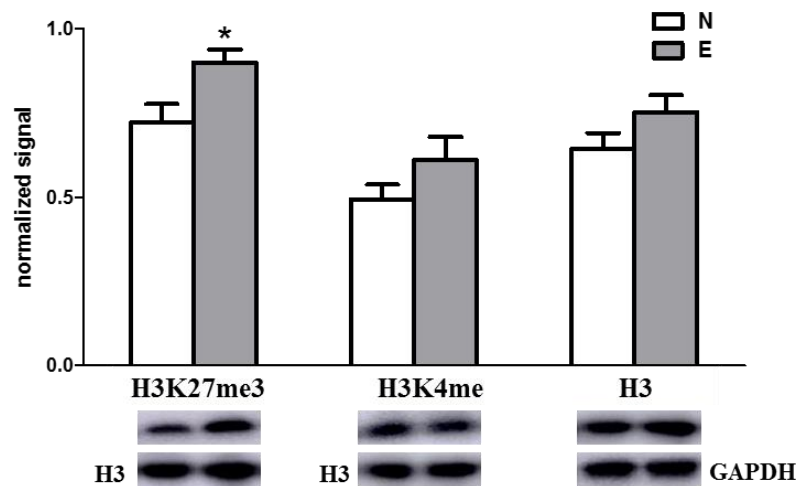
(A) IHC détectant Iba-1 dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

(B) Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression d'Iba-1 détectée dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.

Le nombre de cellules microgliales ainsi que leur morphologie presque exclusivement ramifiée, est identique entre mâles naïfs et sexuellement expérimentés. En revanche, les niveaux d'Iba-1 estimés par Western blot sont plus élevés chez les mâles sexuellement expérimentés. Cette augmentation, encore jamais décrite dans un contexte non pathologique, atteste de la participation possible de la microglie dans les mécanismes de plasticité se déroulant dans la mPOA.



Enfin, prenant en compte le fait que l'expérience sexuelle augmente les niveaux d'expression de plusieurs protéines (PSD-95, GluN1, calbindine et Iba-1), induit des modifications de l'arborisation dendritique observables 14 jours après le premier accouplement et partant du constat que l'inhibition de la traduction altère l'amélioration comportementale chez le rat (Fleming et Kucera, 1991), il est envisageable que le premier accouplement provoque des modifications épigénétiques dans la mPOA. Afin d'identifier de tels marqueurs de modification à long terme de l'expression génique, les niveaux d'histones H3 tri-méthylées sur la lysine 27 (H3K27me3) ainsi que les niveaux d'histones H3 méthylées sur la lysine 4 (H3K4me) ont été détectés par Western blot dans la mPOA d'animaux naïfs (N) et sexuellement expérimentés (E) (Figure 70). Ces deux modifications épigénétiques sont connues pour leur rôle respectivement inhibiteur (Sengoku et Yokoyama, 2011) et activateur (Barski et al. 2007) de la transcription.



**Figure 70 : L'expérience sexuelle induit des modifications épigénétiques dans la mPOA de souris**

*Western blot représentatif et quantification des niveaux d'expression des histones H3 tri-méthylées sur la lysine 27 (H3K27me3), des histones H3 méthylées sur la lysine 4 (H3K4me) et des histones H3 détectés dans la mPOA de N : mâles naïfs sacrifiés dans leur cage de stabulation, E : mâles sacrifiés 14 jours après avoir passé 10h avec une femelle réceptive.*

Les mâles sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'histone H3K27me3, contrairement aux niveaux d'histone H3K4me et d'histone H3 qui sont similaires entre les deux groupes d'animaux. Ces résultats indiquent que l'expérience sexuelle est accompagnée de modifications épigénétiques dans la mPOA, qui peuvent être à l'origine des modifications à long terme du niveau d'expression de protéines participant à l'amélioration comportementale observée.

En résumé, cette étude a permis de caractériser certaines modifications à long terme de la mPOA induites par un unique accouplement. La coloration de Golgi-Cox a permis de mettre en évidence que les mâles sexuellement expérimentés possèdent une densité accrue en épines dendritiques de type « mushroom » sans variation de la densité totale d'épines. Cette modification de l'arborisation dendritique est associée à une augmentation des niveaux de PSD-95 contrairement aux niveaux de synaptotagmine et de spinophiline, identiques entre les mâles naïfs et sexuellement expérimentés.

Les dosages d'hormones stéroïdes ont mis en évidence que l'éjaculation chez la souris est associée à une chute importante des taux plasmatiques de testostérone en parallèle d'une augmentation des taux de corticostérone et de progestérone. Néanmoins, ces changements ne sont pas impactés par l'expérience sexuelle tout comme les niveaux d'expression des récepteurs AR et ER $\alpha$  de la mPOA.

L'expérience sexuelle est également accompagnée d'une augmentation des niveaux de GluN1 et de calbindine, deux marqueurs protéiques indiquant une augmentation de la sensibilité au glutamate dans la mPOA. Bien que le système nitreurgique soit fortement impliqué dans les mécanismes d'expérience sexuelle chez le rat selon un modèle bien établi, aucune différence d'expression ou d'activité enzymatique n'a été détectée chez la souris.

L'amélioration du comportement sexuel chez la souris met vraisemblablement en jeu des interactions cellulaires complexes, encore jamais décrites chez le rat. En effet, l'augmentation des niveaux d'expression d'Iba-1, marqueur spécifique de la microglie, indiquent que d'autres types cellulaires non neuronaux participent aux mécanismes de plasticité induits par l'expérience sexuelle.

Enfin, les modifications structurales et biochimiques de la mPOA sont accompagnées de modifications épigénétiques attestées par l'augmentation des niveaux d'histones H3 triméthylées sur la lysine 27 (H3K27me3) chez les mâles sexuellement expérimentés.

Ainsi, chez la souris, les modifications de la mPOA induites par l'expérience sexuelle sont différentes des modifications observées chez le rat. Cela met en évidence la nécessité de proposer et d'affiner un modèle explicatif propre à la souris.

## Discussion et perspectives du premier article

Cet article a permis pour la première fois de caractériser les modifications moléculaires et cellulaires à long terme ayant lieu dans la mPOA suite à un unique accouplement chez la souris.

### - **L'expérience sexuelle provoque la maturation des épines dendritiques**

L'étude de la microarchitecture de la mPOA a été réalisée suite à une coloration de Golgi-Cox. Cette technique a permis de mettre en évidence l'augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom » chez les animaux sexuellement expérimentés. Néanmoins, aucune modification de l'arborisation dendritique n'a été observée pour les animaux sacrifiés le lendemain de l'accouplement. Cela indique que les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la maturation du réseau de la mPOA nécessitent un certain temps pour être mis en place, comme cela a déjà été décrit dans le noyau accumbens. En effet, l'expérience sexuelle y induit une augmentation du nombre de dendrites et une augmentation de la densité d'épines dendritiques mais cette augmentation n'est visible qu'à partir de 7 jours après l'arrêt du protocole d'induction d'expérience sexuelle (Pitchers et al. 2010a).

L'expérience sexuelle et l'accouplement n'ont induit aucune modification des niveaux de spinophiline, utilisés par de plusieurs auteurs comme un index de la densité totale d'épines dendritiques (Amateau et McCarthy, 2002; Fester et al. 2009). Cela est cohérent avec l'absence d'effet observée sur ce paramètre après coloration de Golgi-Cox. De plus, aucun effet n'a été observé sur la densité d'épines de type « thin » et « stubby ». Ces résultats indiquent que l'expérience sexuelle induit une maturation et/ou une stabilisation des épines plutôt qu'une formation de nouvelles épines immatures.

Les mâles sexuellement expérimentés possèdent également des niveaux plus importants de PSD-95. Cette augmentation est cohérente avec le rôle joué par cette protéine d'échafaudage dans l'augmentation de la taille et dans la régulation des propriétés électriques des synapses excitatrices (El-Husseini et al. 2000).

Ainsi, le réseau neuronal de la mPOA est potentialisé chez les mâles sexuellement expérimentés, grâce au renforcement fonctionnel et structural des synapses excitatrices, estimé par la densité d'épines de type « mushroom » et par les niveaux de PSD-95 (Maiti et al. 2015).

L'expérience sexuelle et l'accouplement n'ont eu aucun effet sur la longueur et le nombre de ramifications des dendritiques. Cette absence d'effet peut être imputable à la coloration employée, à l'origine d'une certaine variabilité entre les neurones d'un même individu. En effet, la coloration de Golgi-Cox est une coloration élective qui aboutit à la coloration aléatoire d'un nombre croissant de cellules selon le temps d'imprégnation (Pasternak et Woolsey, 1975). Bien que les neurones quantifiés dans cet article soient tous localisés au même niveau de la mPOA, il n'est pas exclu qu'ils possèdent des propriétés biochimiques et morphologiques différentes. Ainsi, il serait intéressant de coupler l'étude de l'arborisation dendritique à des IHC permettant d'identifier clairement le type de neurone étudié.

- **Expérience sexuelle, éjaculation, et taux d'hormone stéroïdes**

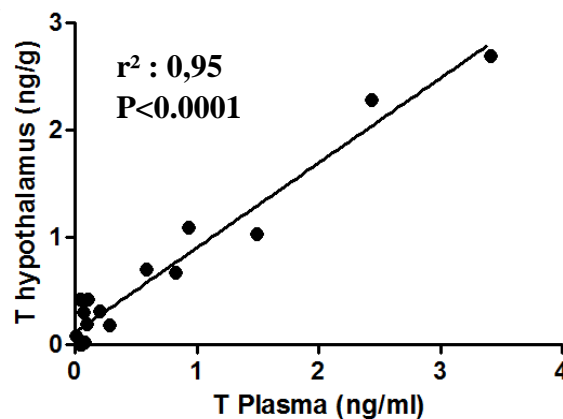
Afin de caractériser les modifications endocrines associées à l'expérience sexuelle, les taux plasmatiques de testostérone, œstradiol, progestérone et corticostérone ont été dosés chez des mâles naïfs et des mâles sexuellement expérimentés. Les résultats de ce premier article indiquent que l'éjaculation est associée, chez la souris, à un effondrement des taux de testostérone contrairement aux données de la littérature obtenues chez le rat (Bonilla-Jaime et al. 2006; Kamel et al. 1975). Cette différence peut s'expliquer par la différence de comportement sexuel entre ces deux rongeurs. En effet, le rat réalise une dizaine d'éjaculations avant d'atteindre la phase de satiété sexuelle alors que la plupart des souches de souris, dont les C57Bl6, entrent dans cette phase après une seule éjaculation. Ainsi, les dosages réalisés chez le rat ont été effectués après une première éjaculation et non pas lors de la dernière éjaculation qui marque l'arrêt du comportement sexuel et qui est connue pour être associée à une diminution importante des taux de testostérone pendant plusieurs jours (Romano-Torres et al. 2007). Il est alors envisageable que des résultats similaires auraient été obtenus chez le rat lors d'un dosage réalisé au moment de la dernière éjaculation, s'il était possible d'anticiper ce moment.

Les dosages réalisés ont permis de mettre en évidence que l'éjaculation chez la souris est associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de progestérone et de corticostérone. Les taux de corticostérone obtenus sont identiques aux taux classiquement retrouvés lors de tâches motrices ou lors d'interactions avec un partenaire (Bonilla-Jaime et al. 2006; Malisch et al. 2007), ce qui indique une absence de stress au cours de l'expérience.

L'augmentation des taux de progestérone associée à l'éjaculation n'avait encore jamais été mise en évidence. Ce résultat renforce l'idée que cette hormone stéroïde, dont le

rôle est très peu étudié chez le mâle (chapitre 2, Partie III-C), possède sûrement un rôle majeur dans la régulation de nombreux mécanismes cérébraux et périphériques associés à la réalisation du comportement sexuel.

Afin de mettre en évidence des mécanismes de synthèse locale de stéroïdes dans la mPOA, des dosages hypothalamiques ont été effectués. Aucune des concentrations en métabolite n'a été significativement modifiée par l'éjaculation ou par l'expérience sexuelle. Néanmoins, les dosages hypothalamiques indiquent une tendance similaire aux résultats obtenus lors de dosages plasmatiques. En effet, les mâles possédant les taux plasmatiques de testostérone les plus élevés présentent également les concentrations hypothalamiques les plus importantes (Figure 71)



**Figure 71 : Corrélation entre les concentrations hypothalamiques et plasmatiques de testostérone chez la souris**

*Les taux de testostérone plasmatiques et hypothalamiques reportés sur ce graphique proviennent de l'ensemble des animaux utilisés pour ce premier article : naïfs et sexuellement expérimentés, restant dans leur cage ou sacrifiés au moment de l'éjaculation.*

L'absence d'effet de l'expérience sexuelle sur l'ensemble des concentrations hormonales testées est cohérente avec l'absence d'effet sur les niveaux d'expression de l'AR et de l'ER $\alpha$  détectées dans la mPOA. En effet, les niveaux d'expression de ces récepteurs sont positivement régulés par les taux circulants de testostérone et d'œstradiol (Coolen et Wood, 1999; Handa et al. 1996).

Néanmoins, cette observation est en contradiction avec une des rares études s'étant intéressée à l'expérience sexuelle chez la souris mâle. En effet, les résultats obtenus par Swaney et al. (2012) indiquent que les mâles sexuellement expérimentés possèdent davantage de cellules AR immuno-réactive dans la mPOA. Cette contradiction est vraisemblablement due à la différence de protocole expérimental utilisé pour induire l'expérience sexuelle : une stabulation de 3 semaines en présence de plusieurs femelles réceptives dans l'étude de Swaney contre un unique accouplement de 10h dans ce premier article.

- **L'expérience sexuelle modifie les niveaux de protéines associées à la neurotransmission glutamatergique**

Etant donné la grande implication du glutamate dans le contrôle du comportement sexuel (chapitre 2, Partie II-B) et dans les mécanismes d'apprentissage (Riedel et al. 2003), plusieurs protéines associées à ce système de neurotransmission ont été détectées par Western blot dans la mPOA de mâles naïfs ou sexuellement expérimentés. Les mâles sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA. Cette augmentation est cohérente avec l'augmentation des niveaux de PSD-95. En effet, cette protéine post-synaptique est impliquée dans le maintien de la localisation des récepteurs NMDA au niveau de la membrane synaptique (Losi et al. 2003). Néanmoins l'interaction directe entre la PSD-95 et les récepteurs NMDA s'effectue *via* les sous-unités GluN2 dont les niveaux ne sont pas modifiés par l'expérience sexuelle.

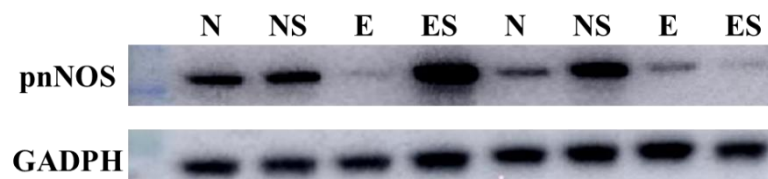
Une hypothèse permettant d'expliquer ce résultat serait que l'expérience sexuelle aboutit à un changement de composition en sous-unités NMDA sans que les niveaux d'expression totaux ne soient modifiés. Il apparaît assez délicat de caractériser précisément les différents types de tétramères retrouvés dans la mPOA et l'évolution de leur composition avec l'expérience sexuelle, tant cette composition peut évoluer au sein du même neurone selon la dendrite considérée (Sobczyk et al. 2005). Il serait plus aisé de préciser l'augmentation de l'expression des différentes sous-unités selon leur localisation cellulaire en réalisant des Western blot sur des fractions enrichies en membrane ou en cytosol (Pitchers et al. 2012).

L'augmentation des niveaux de calbindine observée chez les animaux sexuellement expérimentés est compatible avec une potentialisation de la réponse NMDA dans la mPOA. En effet, l'expérience sexuelle pourrait être associée à une augmentation de l'entrée de calcium suite à l'ouverture des récepteurs NMDA, ce qui permettrait la mise en place de mécanismes de plasticité, associés à l'expression de cette protéine jouant le rôle de tampon intracellulaire du calcium (Lüscher et Malenka, 2012).

- **L'expérience sexuelle ne modifie pas le système nitreurgique**

D'après le modèle de Hull (Figure 23, chapitre 2, Partie II-C), le NO joue un rôle central dans les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de l'expérience sexuelle chez le rat. En effet, il est à l'origine de la libération de dopamine, activatrice du comportement sexuel, suite à la libération de glutamate dans la mPOA. Contrairement à ce modèle établi chez le rat, aucune augmentation du nombre de cellules exprimant la nNOS et aucune augmentation de l'activité enzymatique NOS n'ont été détectées chez les mâles sexuellement expérimentés.

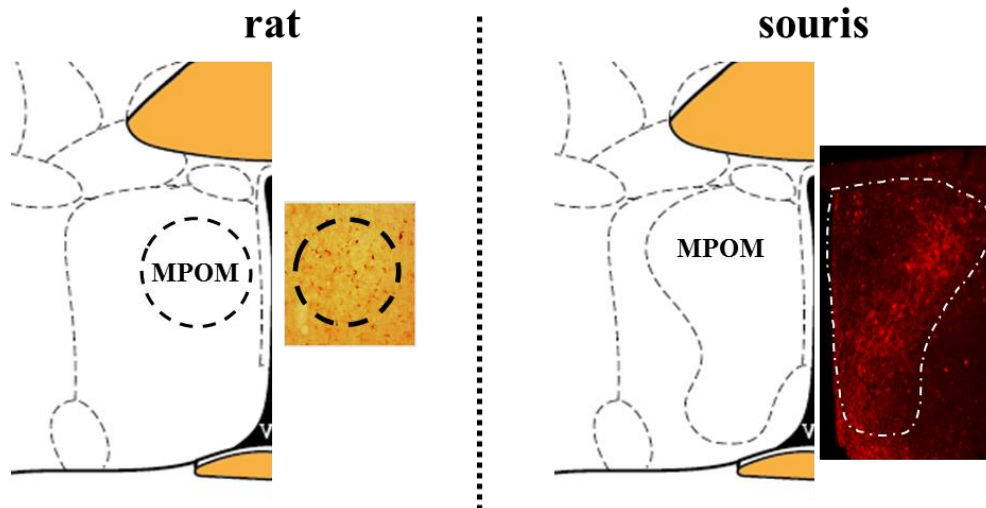
Néanmoins, il est possible que des régulations de l'activité enzymatiques aient lieu sur des cinétiques plus courtes au moment de l'accouplement, notamment par des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations. Afin de tester cette hypothèse, des Western blots détectant la forme phosphorylée active de la nNOS (pnNOS phosphorylée sur la sérine 1412) ont été réalisés chez des animaux naïfs et sexuellement expérimentés, sacrifiés dans leur cage ou pendant l'accouplement. Aucune différence significative n'a été détectée à cause d'une trop grande variabilité entre les individus d'un même groupe expérimental (Figure 72).



**Figure 72 : La variabilité individuelle ne permet pas de conclure quant à une modification des niveaux de pnNOS dans la mPOA par l'expérience sexuelle**

*Les niveaux de nNOS phosphorylées sur la sérine 1412 (phosphorylation activatrice) sont très variables chez les mâles naïfs sacrifiés dans leur cage (N) ou pendant l'accouplement (NS) ainsi que chez les mâles sexuellement expérimentés sacrifiés dans leur cage (E) ou pendant l'accouplement(ES).*

Ainsi, les mécanismes moléculaires associés à l'expérience sexuelle diffèrent chez la souris et le rat, notamment quant à l'implication de la nNOS. Cette différence est confortée par la différence de répartition de l'immuno-réactivité nNOS dans l'aire pré-optique de ces deux rongeurs. En effet, les cellules nNOS-positives sont essentiellement exprimées dans une sous-région de la mPOA au niveau du MPN (noyau médian pré-optique). Ce noyau est de taille assez réduite chez le rat contrairement à la souris (Figure 73).



**Figure 73 : Répartition de l'immuno-réactivité nNOS dans l'aire pré-optique de rat et de souris, adapté de Putnam et al. (2003)**

*Les cellules exprimant la nNOS sont essentiellement localisées dans le MPN (noyau médian pré-optique) dont la surface est plus importante chez la souris que chez le rat.*

- **Participation de la glie aux mécanismes moléculaires associés à l'expérience sexuelle**

La participation des astrocytes a été évaluée en étudiant la morphologie et le nombre de cellules exprimant GFAP dans la mPOA. Les niveaux de GFAP ont également été estimés par Western blot. L'ensemble de ces paramètres sont similaires entre les mâles naïfs et sexuellement expérimentés. Néanmoins, étant donné l'augmentation de la densité d'épines de type « mushroom » et l'augmentation de l'expression de protéines associées à la transmission glutamatergique, il est envisageable que les propriétés métaboliques et les capacités de recapture du glutamate par les astrocytes soient augmentées, sans modification des niveaux de GFAP et sans modification de leur morphologie. Cela pourrait être confirmé en détectant les niveaux d'enzymes responsables de la conversion du pyruvate en lactate dans les astrocytes (LDH5), les niveaux de glutamine synthétase (conversion du glutamate en glutamine) ou encore les niveaux d'expression des transporteurs de glutamate de la famille des EAAT (excitatory amino acid transporter) (Bélanger et al. 2011).

Les mâles sexuellement expérimentés présentent une augmentation des niveaux d'expression d'Iba-1, marqueur spécifique de la microglie. Néanmoins, aucune différence dans le nombre et la morphologie des cellules microgliales n'a été détectée entre les mâles naïfs et sexuellement expérimentés. En effet, ces cellules sont réparties de façon homogène et sous une morphologie essentiellement ramifiée. Il est possible que cette absence de modification morphologique ne reflète pas l'état d'activation. En effet, l'augmentation des niveaux d'expression d'Iba-1 n'a été documentée que dans des contextes pathologiques



d'activation microgliale comme notamment lors d'ischémies cérébrales (Ito et al. 2001). Le rôle que peut jouer cette protéine dans les mécanismes de plasticité en condition non pathologique n'est pas encore compris mais elle semble être impliquée dans l'activation et la mobilité des cellules microgliales suite à l'activation de voies de signalisation calcium-dépendantes (Ito et al. 2001; Ohsawa et al. 2000).

- **L'expérience sexuelle induit des modifications épigénétiques**

Les modifications d'arborisation dendritique et des niveaux d'expression des différentes protéines ont été estimées 14 jours après un premier accouplement. Le fait que ces modifications ne soient pas détectables le lendemain du premier accouplement, indique que des mécanismes de régulation se déroulant sur des temps long sont probablement à l'œuvre.

En effet, l'expérience sexuelle est associée à une augmentation des niveaux d'histones H3 tri-méthylées sur la lysine 27 (H3K27me3). Cette forme tri-méthylée de l'histone H3 est co-localisée avec de l'ADN condensé sous forme d'hétérochromatine et fonctionnellement associée à une inhibition de la transcription de plusieurs gènes étudiés dans de nombreux modèles cellulaires (Barski et al. 2007; Nielsen et al. 2001; Roh et al. 2006). Ces résultats indiquent que l'expérience sexuelle est associée à des modifications transcriptionnelles à long terme, qui pourraient être impliquées dans la potentialisation de la mPOA et dans l'amélioration comportementale observée. En effet, il a été montré chez le rat que des apprentissages de conditionnement par la peur aboutissent à des modifications des niveaux d'histone H3 méthylée dans l'hippocampe. De plus, l'inhibition de la méthyltransferase spécifique de cette modification épigénétique altère l'apprentissage, indiquant que les modifications épigénétiques sont requises pour la potentialisation du circuit hippocampique impliqué dans le conditionnement par la peur (Gupta et al. 2010).

La présence de modifications épigénétiques induites par l'expérience sexuelle est cohérente avec les résultats obtenus par Fleming et Kucera (1991). Cette étude démontre que l'expérience sexuelle nécessite la néo-synthèse de protéines puisque l'injection d'un inhibiteur de la traduction avant chaque accouplement aboutit à une altération de l'amélioration comportementale classiquement associée à l'expérience sexuelle chez le rat.

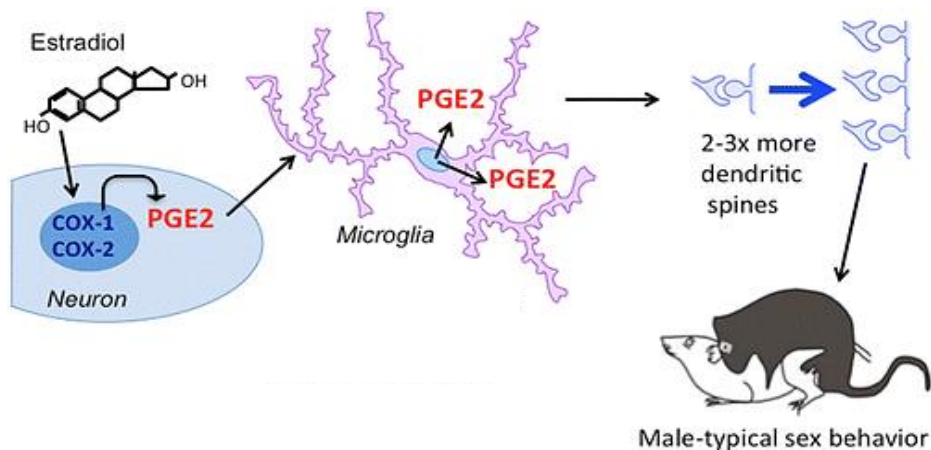
Il serait intéressant d'identifier précisément les gènes régulés par ces modifications épigénétiques en réalisant des expériences de co-immuno-précipitation entre les formes méthylées des histones et les séquences cibles, ultérieurement caractérisées par PCR. Il serait également envisageable de caractériser les modifications de transcription induites par l'expérience sexuelle en comparant le transcriptome de la mPOA de mâles naïfs et

sexuellement expérimentés grâce à l'utilisation de puces à ARN. Enfin, ces études pourraient être complétées par des études de protéomique permettant de confirmer que les modifications de transcription aboutissent à des modifications d'expression protéique.

- **L'expérience sexuelle : maturation finale de la mPOA ?**

Cet article a permis de mettre en évidence que l'expérience sexuelle chez la souris est à l'origine d'une augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom », des niveaux d'expression d'Iba-1 ainsi que d'une augmentation des niveaux de calbindine et de GluN1, protéines associées à la transmission glutamatergique. De façon intéressante, ces modifications rappellent certains mécanismes connus pour réguler, en période périnatale, la mise en place du dimorphisme sexuel de la mPOA, nécessaire à l'expression adulte du comportement mâle.

Ainsi, d'après le modèle proposé par Lenz et McCarthy (2015), la testostérone produite chez le mâle entre E18 et PN10 provoque la masculinisation du cerveau par le mécanisme illustré figure 74. La testostérone, aromatisée en œstradiol au niveau de la mPOA, induit la synthèse de deux cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2 dans les neurones et la microglie. Ces enzymes synthétisent alors de la prostaglandine PGE2, qui diffuse jusqu'aux astrocytes ce qui aboutit à une augmentation locale de la concentration en glutamate selon des mécanismes encore mal compris. Cette augmentation de la concentration en glutamate provoque l'augmentation de la densité d'épines dendritiques nécessaire à l'expression du comportement sexuel mâle à l'âge adulte.



**Figure 74 : Mécanismes périnataux impliqués dans la mise en place du dimorphisme de la mPOA chez le rat (Lenz et McCarthy, 2015)**

*Chez le mâle, la testostérone périnatale produite par les testicules est convertie au niveau de la mPOA en œstradiol. Cette augmentation locale de la concentration d'œstradiol induit une augmentation des niveaux de COX-1 et COX-2 dans les neurones et la microglie. Ces enzymes produisent de la prostaglandine (PGE2) responsable de l'augmentation de la densité d'épines dendritiques par une augmentation des concentrations en glutamate via un mécanisme faisant probablement intervenir les astrocytes. L'ensemble de ces mécanismes aboutissent à l'expression à l'âge adulte du comportement sexuel mâle.*

Ainsi, la capacité d'un individu mâle à s'accoupler nécessite la mise en place de structures et de mécanismes spécifiques dès la période embryonnaire sous contrôle des hormones stéroïdes sexuelles. Il est envisageable que certains de ces acteurs, exprimés de façon dimorphique dans la mPOA, soient impliqués dans l'amélioration du comportement sexuel mâle à l'âge adulte selon des modalités semblables aux mécanismes se déroulant en période périnatale. En effet, le premier accouplement aboutit à une augmentation de la densité d'épines dendritiques matures grâce à l'intervention probable de la microglie et une augmentation de la transmission glutamatergique.

Il apparaît donc que ce dimorphisme n'est pas une expression figée de différents marqueurs de la mPOA mais possède un véritable rôle fonctionnel dans l'expression du comportement sexuel mâle. En effet, la forte densité d'épines dendritiques et les hauts niveaux de calbindine retrouvés chez le mâle adulte permettent une réponse comportementale adaptée à la libération massive de glutamate lors de l'accouplement.

Ainsi, la potentialisation fonctionnelle de ces acteurs par l'expérience sexuelle permet de réaliser plus efficacement, avec un seuil de stimulation diminué et/ou plus rapidement un comportement sexuel mâle qui se retrouve donc amélioré.

Il serait alors intéressant d'éliminer un de ces acteurs, comme notamment la microglie dans le cerveau adulte par l'injection de PLX3397 (Elmore et al. 2014) ou d'inhiber la production de prostaglandine par l'injection d'anti-inflammatoires comme l'indométacine (Amateau et McCarthy, 2002), afin d'observer les éventuels effets sur la mise en place de l'expérience sexuelle.

A la lumière de ces éléments, le premier comportement sexuel représenterait le dernier stade de maturation de la mPOA. Il permettrait l'acquisition d'un comportement sexuel efficace et pleinement mature par opposition au comportement sexuel encore immature d'un mâle naïf.



## **Deuxième article**

**Phospho-ERK and sex steroids in the mPOA : involvement in male mouse sexual behaviour**

**Arnaud JEAN**, Anne-Charlotte Trouillet, Njiva Andry Andrianarivelo, Sakina Mhaouty-Kodja and Hélène Hardin-Pouzet

Journal of Endocrinology . 2017 Mar 29. pii: JOE-17-0025. doi: 10.1530/JOE-17-0025



La présentation de cet article est composée d'une première partie exposant la méthodologie employée et les résultats obtenus. Elle est suivie d'une deuxième partie visant à discuter les résultats et permettant détailler les perspectives qui en découlent. Les figures présentant des résultats originaux qui ne sont pas issus de la littérature possèdent une légende de couleur bleue.

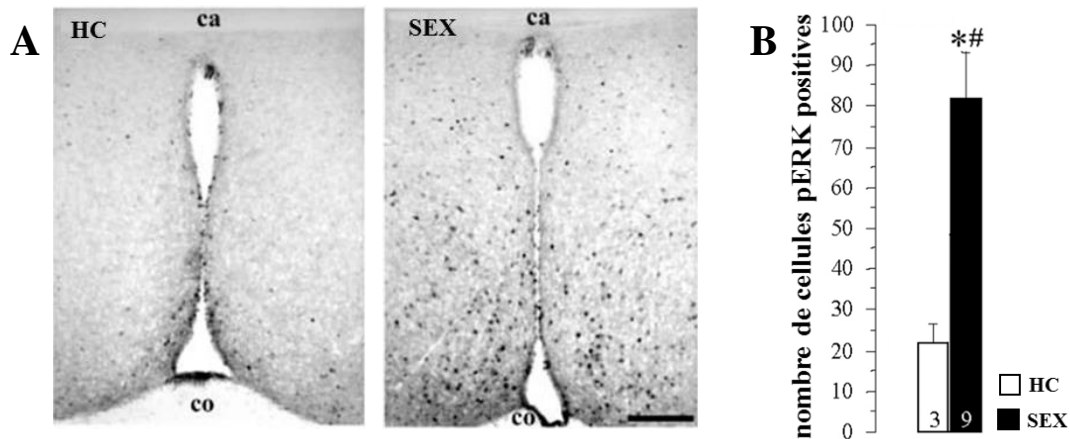
## Méthodologies et résultats

Ce deuxième article s'est intéressé à l'effet de l'expérience sexuelle sur la modulation de voies de signalisations intracellulaires. Un bon candidat pour cette étude devait être une voie de signalisation rapidement activée dans la mPOA lors de l'accouplement et potentiellement régulée par des stéroïdes sexuels ou des neurotransmetteurs présents dans cette région hypothalamique. Nous avons choisi de porter notre attention sur la voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase).

Cette voie de signalisation, évolutivement très conservée (Buscà et al. 2015), régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la migration ou encore la survie. Elle est également impliquée dans la régulation de multiples fonctions physiologiques associées au métabolisme (Gehart et al. 2010), à l'immunité (Arthur et Ley, 2013), aux processus de plasticité cérébrale (Peng et al. 2010) mais aussi aux fonctions de reproduction (Kanasaki et al. 2011; Li et al. 2009).

Son activation est déclenchée par l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase, de récepteurs couplés aux protéines G, de récepteurs des stéroïdes, de récepteurs d'adhérence, de récepteurs des cytokines ou encore par une élévation de la concentration intracellulaire en calcium (Buscà et al. 2015; Ramos, 2008; Shaul et Seger, 2007). Ces événements aboutissent à l'activation d'une cascade de trois kinases : Raf (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase : MAPKKK), MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase : MAPKK) et ERK1/2 (Mitogen-activated protein kinase : MAPK). Alors que Raf et MEK1/2 sont exclusivement localisées dans le cytoplasme, la forme phosphorylée active de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) possède la capacité de phosphoryler plus de 270 molécules cibles (von Kriegsheim et al. 2009) localisées dans le cytoplasme ou dans le noyau (Buscà et al. 2016).

Néanmoins, la participation de cette voie de signalisation au contrôle cérébral du comportement sexuel mâle n'est pas encore complètement établie. Taziaux et al. (2011) ont montré que la voie ERK1/2 est activée, chez des souris mâles sexuellement expérimentées, lors de l'accouplement. Cette activation, estimée par la détection de la forme phosphorylée pERK1/2 par IHC est retrouvée dans la mPOA (Figure 75).



**Figure 75 : La copulation induit la phosphorylation de ERK1/2 dans la mPOA de souris mâles sexuellement expérimentées, adapté de Taziaux et al. (2011)**

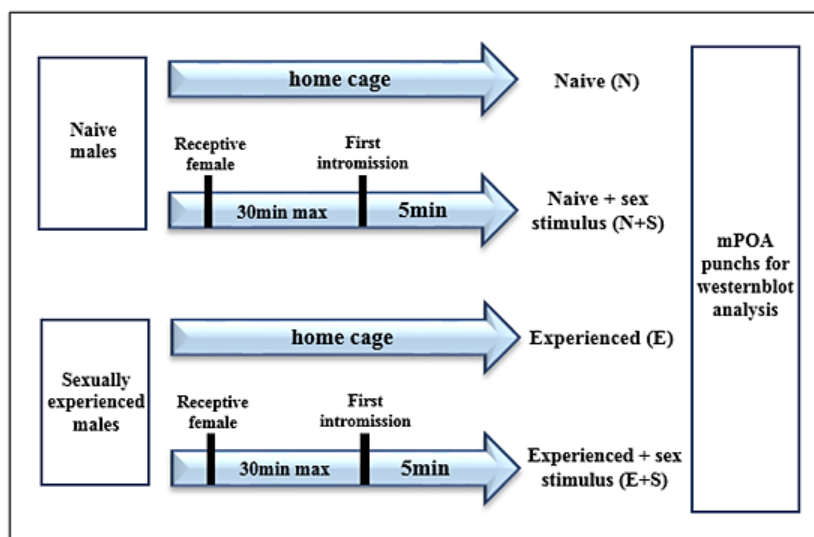
(A) Illustration de l'immunohistochimie détectant pERK1/2 dans la mPOA de souris sexuellement expérimentées restant dans leur cage (HC) ou s'accouplant (SEX)

(B) Quantification du nombre de cellules pERK1/2 positives dans la mPOA de souris sexuellement expérimentées restant dans leur cage (HC) ou s'accouplant (SEX).

Nous nous sommes alors intéressés à l'implication de cette voie de signalisation dans l'acquisition de l'expérience sexuelle. En effet, la participation de la voie ERK1/2 aux mécanismes moléculaires sous-tendant des apprentissages comportementaux complexes comme le conditionnement par la peur ou la navigation spatiale (Davis et Laroche, 2006) ainsi que son implication dans la régulation de la plasticité synaptique hippocampique (Kelleher et al. 2004) en font un bon candidat comme support moléculaire possible de l'expérience sexuelle.

Dans un premier temps, nous avons voulu identifier une possible modulation de cette voie de signalisation par l'expérience sexuelle. Pour cela, la forme active phosphorylée pERK1/2 a été détectée par Western blot dans la mPOA de mâles naïfs et sexuellement expérimentés restant dans leur cage de stabulation ou sacrifiés 5 minutes après la première montée avec intromissions (Figure 76). Les mâles sexuellement expérimentés correspondent à des mâles ayant réalisé un premier accouplement 14 jours avant leur utilisation.

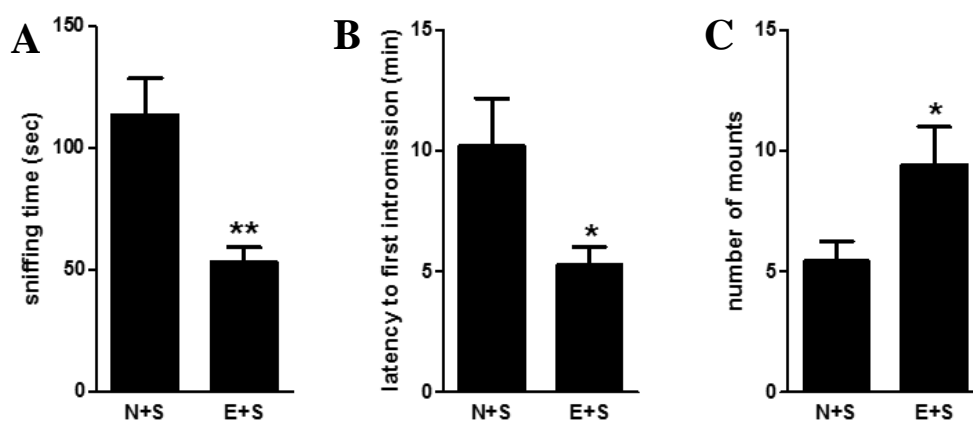




**Figure 76 : Protocole expérimental utilisé pour étudier les effets de l'expérience sexuelle sur l'activation de la voie ERK1/2**

Des mâles naïfs ou sexuellement expérimentés sont sacrifiés dans leur cage de stabulation ou 5 minutes après la première intromission. La forme phosphorylée pERK1/2 est ensuite détectée dans la mPOA par Western blot. N : mâle naïf restant dans sa cage, N+S : mâle naïf sacrifié 5 minutes après la première montée avec intromissions, E : mâle sexuellement expérimenté restant dans sa cage, E+S : mâle sexuellement expérimenté sacrifié 5 minutes après la première montée avec intromissions.

Tout d'abord, nous avons comparé le comportement sexuel des mâles naïfs (N+S) et des mâles sexuellement expérimentés (E+S) (Figure 77).



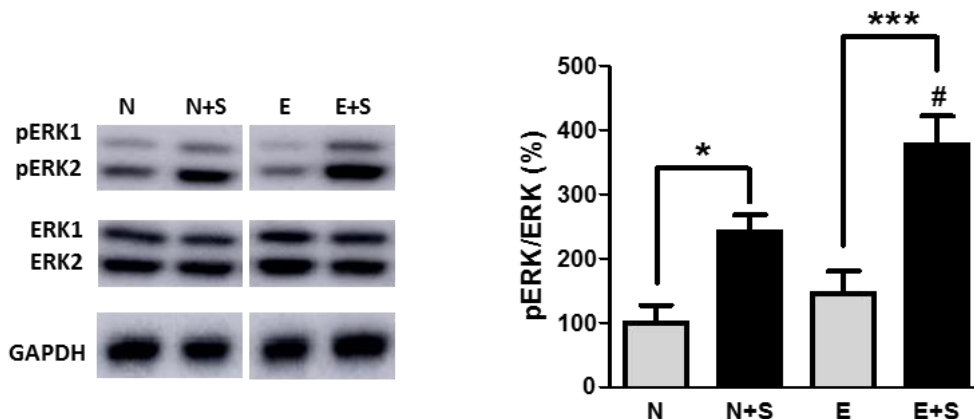
**Figure 77 : Amélioration du comportement sexuel chez les souris mâles sexuellement expérimentées**

Des mâles naïfs (N+S) ou sexuellement expérimentés (E+S) sont mis en présence d'une femelle réceptive pendant 30 minutes puis sont sacrifiés 5 minutes après la première intromission. Le temps passé à renifler la femelle avant la première montée (A) et la latence de première montée avec intromissions (B) sont diminués chez les mâles sexuellement expérimentés alors que le nombre de montées (C) réalisées durant les 5 minutes est augmenté.

Les mâles sexuellement expérimentés présentent une réduction du temps passé en investigations ano-génitales ainsi qu'une diminution des latences de première montée. Cela indique que les mâles sexuellement expérimentés nécessitent moins de temps pour initier la copulation. De plus, le nombre de montées réalisées durant les 5 minutes du test est augmenté.

Ces données confirment que les mâles sexuellement expérimentés présentent une amélioration de leur comportement sexuel qui concerne la phase motivationnelle et la phase copulatoire. Ces résultats, cohérents avec les analyses comportementales du premier article, indiquent que le protocole expérimental utilisé est pertinent pour induire l'expérience sexuelle par un unique accouplement.

L'analyse des Western blots a permis de mettre en évidence que la phosphorylation de ERK1/2 est significativement augmentée lors de l'accouplement de tous les animaux. De façon intéressante, cette augmentation est encore plus importante chez les mâles sexuellement expérimentés (Figure 78).

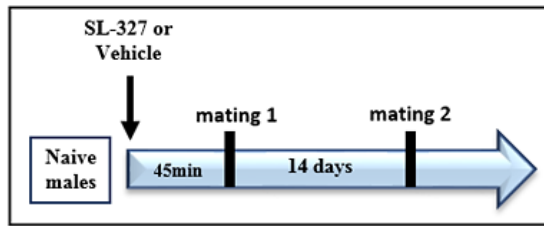


**Figure 78 : L'expérience sexuelle augmente l'activation de ERK1/2 induite par l'accouplement**

Western blot représentatif et quantification du signal pERK/ERK détecté dans la mPOA de N : mâle naïf restant dans sa cage, N+S : mâle naïf sacrifié 5 minutes après la première montée avec intromissions, E : mâle sexuellement expérimenté restant dans sa cage, E+S : mâle sexuellement expérimenté sacrifié 5 minutes après la première montée avec intromissions. # $p < 0.05$  comparé au groupe N+S.

Ces résultats indiquent que l'activation de la voie ERK1/2 dans la mPOA déclenchée lors des premiers instants de la copulation, est augmentée par l'expérience sexuelle.

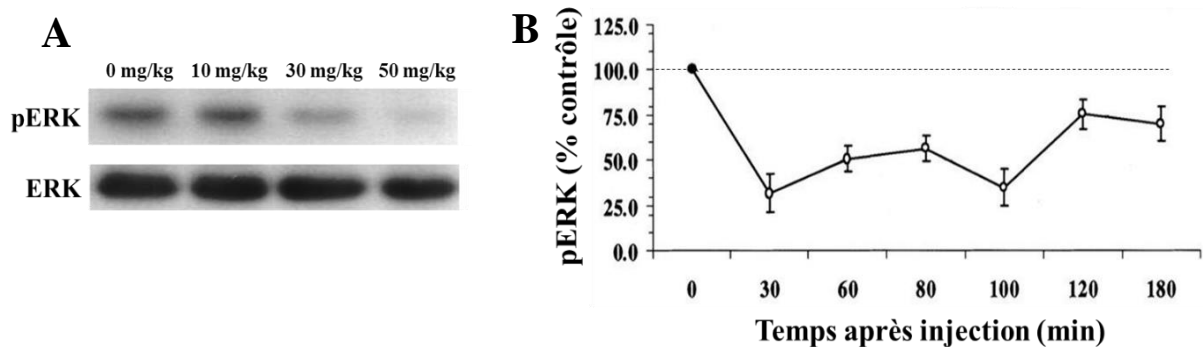
Afin de déterminer le rôle fonctionnel de pERK1/2 dans la régulation du comportement sexuel et dans l'induction de l'expérience sexuelle, un inhibiteur de MEK1/2, le SL-327, a été administré de façon systémique à des mâles naïfs et 45 minutes avant la mise en présence avec une femelle réceptive. Le comportement sexuel des mâles est ensuite analysé lors du premier accouplement ainsi que lors d'un deuxième accouplement réalisé 14 jours plus tard sans aucune injection (Figure 79).



**Figure 79 : Protocole expérimental utilisé pour étudier le rôle de la voie ERK1/2 dans l'induction de l'expérience sexuelle**

*Des mâles naïfs sont injectés de façon intrapéritonéale avec du SL-327 ou la solution contrôle, 45 minutes avant leur premier accouplement. Les paramètres du comportement sexuel sont ensuite analysés lors du premier et d'un second accouplement, réalisé 14 jours plus tard.*

L'injection intrapéritonéale de SL-327 a été réalisée à une dose de 30 mg/kg. Cette dose permet de diminuer de 50 % les niveaux de pERK1/2 sans modifier l'expression globale de ERK1/2 (Valjent et al. 2006) (Figure 80-A). L'injection a été réalisée 45 minutes avant la mise en présence avec une femelle réceptive. Ce timing assure une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 pendant toute la durée de l'accouplement (Valjent et al. 2006) (Figure 80-B) tout en permettant de limiter l'effet du stress associé à l'injection qui est connu pour exercer une action inhibitrice sur le comportement sexuel (Menendez-Patterson et al. 1980).

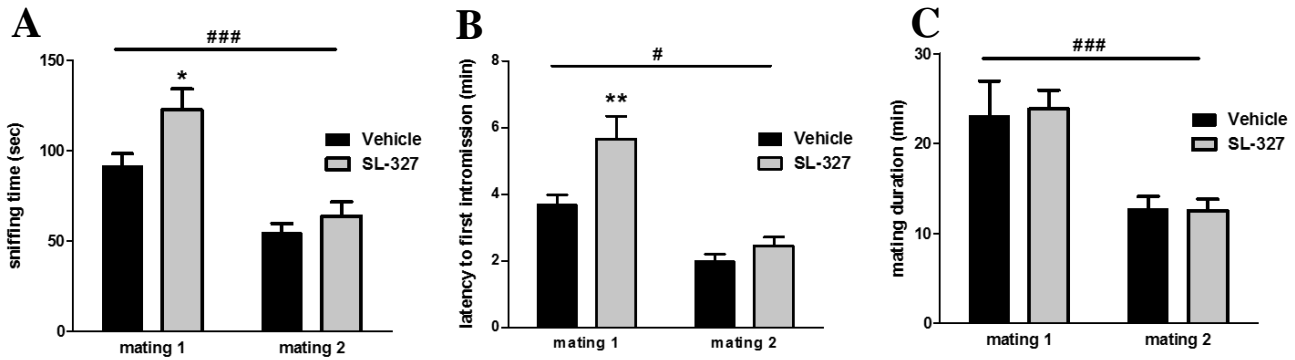


**Figure 80 : Choix de la dose et du timing d'injection du SL-327, adapté de (Selcher et al. 1999; Valjent et al. 2006)**

*(A) Le SL-327 inhibe de façon dose-dépendante la phosphorylation de ERK détectée dans l'hippocampe 1 heure après l'injection sans diminuer les niveaux d'expression de ERK.*

*(B) Les niveaux de pERK dans l'hippocampe sont significativement diminués pendant les 3 heures qui suivent l'injection de SL-327 à 30 mg/kg.*

Chez les mâles ayant reçu une injection de SL-327, l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 provoque une diminution de la motivation sexuelle (augmentation de la latence de première montée avec intromissions et augmentation de la durée des investigations anogénitales) sans altérer le déroulement de la phase copulatoire. L'analyse du deuxième comportement sexuel, réalisée 14 jours plus tard, met en évidence l'amélioration du comportement sexuel pour les deux groupes de mâles ainsi que la disparition des différences comportementales observées lors du premier accouplement (Figure 81).



### Figure 81 : Inhibition de la voie ERK1/2 et induction de l'expérience sexuelle

Des mâles naïfs sont injectés avec une solution contrôle (Vehicle) ou avec du SL-327 (SL-327) avant le premier accouplement.

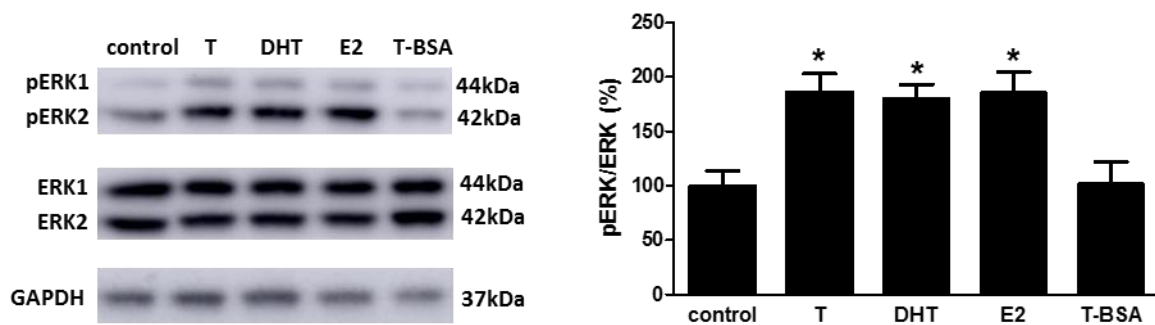
(A) Durée des investigations ano-génitales, (B) Latences de première montée avec intromissions et (C) Durée d'accouplement lors du premier (mating 1) et du deuxième comportement sexuel (mating 2).

L'effet inhibiteur du SL-327 sur la motivation sexuelle, également observé chez des mâles sexuellement expérimentés (voir Figure 4-B-C de l'article 2 en annexe), n'est pas dû à une altération de la préférence olfactive ou à une altération de la locomotion (voir Figure 4-D-E-F-G de l'article 2 en annexe).

Ces résultats indiquent que l'inhibition ponctuelle de la voie ERK1/2 avant le premier accouplement, altère la motivation sexuelle de façon réversible et ne perturbe pas l'acquisition de l'expérience sexuelle.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes qui pourraient déclencher l'activation de cette voie de signalisation au niveau de la mPOA en nous focalisant sur l'action des hormones stéroïdes sexuelles comme la testostérone et ses métabolites, la dihydrotestostérone (DHT) et l'œstradiol (E2). En effet, la voie ERK1/2 est connue pour être activée par les hormones sexuelles comme cela a été montré dans différentes aires cérébrales comme l'hippocampe (Zhao et Brinton, 2007) et le cervelet (Wong et al. 2003) mais également dans différents organes comme le muscle squelettique (Estrada et al. 2003) et la prostate (Liao et al. 2013). De plus, la mPOA est une région riche en récepteurs des androgènes AR (Raskin et al. 2009), et des œstrogènes ER $\alpha$  (Swaney et al. 2012) et ER $\beta$  (Orikasa et al. 2002).

Pour cela, nous avons utilisé une approche *ex vivo* dans laquelle des tranches d'hypothalamus ont été maintenues en survie et traitées 30 minutes avec de la testostérone, de la dihydrotestostérone ou de l'œstradiol à des concentrations similaires à celle retrouvées dans le plasma de souris mâles qui s'accouplent. Nous avons également incubé des tranches d'hypothalamus avec de la testostérone couplée à de l'albumine (BSA), une version de la testostérone ne pouvant traverser la membrane plasmique. Les niveaux de pERK1/2 ont ensuite été analysés par Western blot (Figure 82).



**Figure 82 : Activation de la voie ERK1/2 dans la mPOA de souris par la testostérone et ses métabolites**

Western blot représentatif et quantification du signal pERK/ERK détecté dans la mPOA après 30 minutes d'incubation avec du liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) (control), de la testostérone à 100nM (T), de la dihydrotestostérone à 100nM (DHT), de l'œstradiol à 100nM (E2) ou de la testostérone 3-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA à 100nM (T-BSA)

L'analyse des Western blots indique que la voie ERK1/2 est rapidement (30 minutes) activée dans la mPOA par la testostérone et ses métabolites (dihydrotestostérone et œstradiol) de façon comparable aux résultats obtenus *in vivo* (Figure 77). Cette activation n'est pas retrouvée lors de l'incubation avec de la testostérone-BSA, ce qui indique l'absence de participation des récepteurs membranaires de la testostérone.

En résumé, cet article a permis de mettre en évidence que la voie ERK1/2, activée durant le comportement sexuel, est potentialisée par l'expérience sexuelle. Bien que cette voie soit impliquée dans de nombreux processus d'apprentissage et de renforcements comportementaux, elle ne semble pas être le support moléculaire de l'expérience sexuelle. En effet, son inhibition altère de façon réversible la motivation sexuelle mais n'abolit pas l'amélioration comportementale observée lors d'un deuxième accouplement. Enfin, cette voie de signalisation peut être activée *ex vivo* par des mécanismes rapides mettant en jeu les hormones stéroïdes comme la testostérone et ses métabolites.

## Discussion et perspectives du deuxième article

Cet article s'est intéressé pour la première fois aux mécanismes déclenchant la phosphorylation de ERK1/2 dans la mPOA ainsi qu'à son rôle dans l'induction de l'expérience sexuelle.

### - L'expérience sexuelle augmente l'activation de la voie ERK1/2 dans la mPOA

Il était connu que la réalisation d'intromissions durant une exposition de 10 minutes à une femelle réceptive provoquait une augmentation du nombre de cellules pERK1/2 immuno-réactives dans la mPOA de souris mâles sexuellement expérimentées (Taziaux et al. 2011). Ceci est confirmé par nos résultats, bien qu'obtenus avec un protocole légèrement différent : les mâles sexuellement expérimentés, sacrifiés 5 minutes après la première intromission, présentent une augmentation plus importante des niveaux de pERK1/2 que des mâles naïfs. Ces résultats indiquent que l'expérience sexuelle est à l'origine d'une augmentation de la réponse de la mPOA lors du comportement sexuel. Cette observation est cohérente avec les résultats de détection immuno-histochimique de c-Fos. En effet, l'accouplement induit un plus grand nombre de cellules c-Fos immuno-réactives chez des mâles sexuellement expérimentés que chez des mâles naïfs (Lumley et Hull, 1999; Swaney et al. 2007) (chapitre 3, partie II-A et partie II-B).

Les mâles ont été sacrifiés 5 minutes après la première intromission. Le choix de ce paradigme expérimental a permis de comparer l'état de la mPOA d'un groupe homogène d'individus qui sont arrivés au même point de leur comportement sexuel. En effet, définir l'instant du sacrifice par un intervalle de temps au contact d'une femelle réceptive aboutirait à sacrifier des animaux ayant uniquement effectués des investigations olfactives, d'autres ayant réalisés des montées sans intromission, des montées avec intromissions ou même ayant atteint l'éjaculation pour certains, ce qui rendrait l'interprétation des résultats délicate.

La phosphorylation de ERK1/2, détectée 5 minutes après la première intromission, est vraisemblablement déclenchée par des événements cellulaires qui se déroulent durant la phase motivationnelle. En effet, les différentes études de la littérature indiquent que l'activation de cette voie de signalisation n'est détectable qu'après un délai supérieur à 5 minutes à partir de la stimulation comportementale ou pharmacologique. Ainsi, l'événement déclencheur de la phosphorylation de ERK1/2 a lieu au moins 5 minutes avant le sacrifice donc pendant la phase motivationnelle. Il serait d'ailleurs intéressant de caractériser plus précisément les événements comportementaux à l'origine de cette phosphorylation en exposant des mâles

naïfs et sexuellement expérimentés à différents stimuli comme de l'urine de femelle réceptive ou une femelle réceptive inaccessible placée derrière un grille.

- **Effets du SL-327 sur le comportement sexuel et sur l'induction de l'expérience sexuelle**

L'injection intrapéritonéale de SL-327, 45 minutes avant la mise en présence avec une femelle réceptive, provoque les mêmes effets sur des mâles naïfs et sexuellement expérimentés. L'injection de cet inhibiteur de MEK1/2 n'a aucun effet sur le déroulement de la phase copulatoire mais augmente les latences de première montée et la durée des investigations olfactives. Ces augmentations, qui ne sont pas dues à des déficits de locomotion ou à des déficits de préférence olfactive, sont interprétées comme une diminution de la motivation sexuelle (Fiorino et Phillips, 1999).

L'implication de la voie ERK1/2 dans le contrôle de la motivation sexuelle pourrait être déterminée plus précisément en utilisant d'autres tests comportementaux comme les chambres à plusieurs niveaux (multi-level chambers). Dans ce test comportemental, le mâle est habitué à rencontrer une femelle réceptive ou son odeur dans une des chambres. Le mâle est ensuite libre de se déplacer entre les différentes chambres le jour du test. Un mâle présentant une forte motivation sexuelle effectuera de nombreux et fréquents changements de niveaux lors à la recherche de la femelle ou de son odeur (Mendelson et Pfau, 1989). Il est également possible de tester la motivation à s'accoupler en évaluant le nombre d'appuis sur un levier (Woodson et Balleine, 2002) ou le nombre de « nose poke » (Cummings et Becker, 2012) réalisés par un mâle afin d'avoir accès à une femelle réceptive inaccessible placée derrière une grille.

Un des mécanismes expliquant l'implication de pERK1/2 dans le contrôle de la motivation sexuelle pourrait faire intervenir les récepteurs des stéroïdes. En effet, les résultats de cet article indiquent que les stéroïdes peuvent activer la voie ERK1/2 dans la mPOA. De plus, l'injection intra-cérébro-ventriculaire de stéroïdes sexuels, notamment l'œstradiol, augmente la motivation sexuelle chez la caille par un mécanisme de transduction du signal passant par la voie non-classique (Seredynski et al. 2013). Il est envisageable que l'inhibition exercée par le SL-327 perturbe la voie de transduction du signal, en aval des récepteurs des stéroïdes de la voie non-classique, ce qui aboutirait à une diminution de la motivation sexuelle.

Bien que la mPOA soit particulièrement impliquée dans la régulation de la phase motivationnelle du comportement sexuel (Chapitre 2, partie I-A), la méthodologie utilisée

dans cet article ne permet pas d'écartier la participation d'autres aires cérébrales. En effet, le SL-327 injecté de façon intrapéritonéale possède la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique et d'exercer son action dans tout l'encéphale. Des données de la littérature ainsi que des IHC préliminaires indiquent que la copulation induit une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 dans l'amygdale (Frohman et al. 2010; Taziaux et al. 2011), le striatum (Goto et al. 2015), le noyau paraventriculaire ou encore le septum chez la souris. Il serait alors pertinent d'injecter cet inhibiteur uniquement dans la mPOA afin d'identifier précisément son implication dans le contrôle du comportement sexuel mâle.

Alors que la voie ERK1/2 est connue pour être impliquée dans le contrôle de nombreux processus d'apprentissage et de mémorisation (Davis et Laroche, 2006), son inhibition chez des animaux naïfs n'affecte pas l'amélioration des paramètres comportementaux associés à l'expérience sexuelle. Ainsi, cette voie de signalisation ne semble pas être un des principaux supports moléculaires impliqué dans l'induction de l'expérience sexuelle.

- **pERK1/2 dans la mPOA : index de la motivation et marqueur d'activité cellulaire**

Les mâles sexuellement expérimentés présentent des latences de première montée et des durées d'investigation olfactive réduites par rapport aux mâles naïfs. Cette augmentation de la motivation sexuelle est associée à une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 dans la mPOA. De plus, l'inhibition de cette phosphorylation diminue la motivation sexuelle de façon réversible. Bien que ces résultats ne soient que corrélatifs, ils semblent suggérer un lien entre motivation sexuelle et niveau de phosphorylation de ERK1/2 dans la mPOA chez la souris. L'utilisation de pERK1/2 comme index de la motivation et de l'efficacité copulatoire a déjà été suggérée par Taziaux et al. (2011) qui a mis en évidence une corrélation entre le nombre de montées et le nombre de cellules pERK immuno-réactives dans la mPOA. Il serait alors intéressant de tester l'activation de cette voie de signalisation dans des modèles d'études présentant des déficits de motivation sexuelle comme par exemple des animaux traités par des perturbateurs endocriniens anti-androgéniques (Bisphénol A ou Phtalate bis(2-éthylhexyle – DEHP). Néanmoins, la méthodologie utilisée pour cet article ne permet pas de conclure quant à un tel rôle. Il est envisageable que la phosphorylation de ERK1/2 dans la mPOA ne soit qu'un reflet d'une augmentation de l'activité cellulaire. Dans ces conditions, l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 observée lors du comportement sexuel serait un marqueur pertinent de l'activation cellulaire grâce à sa résolution temporelle. En effet,



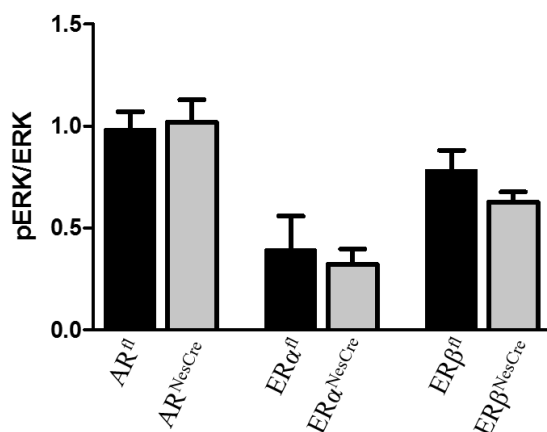
contrairement aux gènes d'activation précoce, comme c-Fos, qui nécessitent plus de 60 minutes avant d'être détectables, l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 est observable après seulement 30 minutes d'incubation *ex vivo* avec des stéroïdes sexuels ou 5 minutes après la réalisation de la première intromission.

- **Les stéroïdes activent la voie ERK1/2**

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 dans la mPOA ne sont pas connus. Cet article a permis de mettre en évidence que les stéroïdes sexuels sont potentiellement impliqués dans la phosphorylation de ERK1/2 détectée lors de l'accouplement. Pour cela, des tranches maintenues en survie ont été stimulées pendant 30 minutes avec différents stéroïdes. Cette durée d'incubation a été choisie car elle correspond à la durée moyenne de l'accouplement d'un animal naïf. Les stimulations réalisées avec la testostérone, la dihydrotestostérone ou l'œstradiol ont aboutit à une activation de la voie ERK1/2 comparable à celle obtenue *in vivo*. Le traitement des tranches par la testostérone couplée à de la BSA n'a eu aucun effet sur la phosphorylation de ERK1/2. Ces résultats indiquent que la testostérone est capable d'activer la voie ERK1/2 *via* un mécanisme mettant en jeu des récepteurs AR intracellulaires ou par l'intermédiaire de ses métabolites actifs mettant vraisemblablement en jeu un mécanisme passant par la voie non-classique de transduction du signal sans activation transcriptionnelle (chapitre 2, partie III-B-2).

Afin de préciser l'implication des différents types de récepteurs mis en jeu, la phosphorylation de ERK1/2 a également été estimée suite à une incubation de 30 minutes avec de la testostérone sur des lignées mutantes. Ces lignées possèdent la propriété de ne pas exprimer les récepteurs AR, ER $\alpha$  ou ER $\beta$  au niveau des neurones et des astrocytes du système nerveux central (Figure 83).

L'incubation avec la testostérone aboutit, chez les trois lignées de mutants, à une activation de la voie ERK1/2 comparable aux souris contrôles. Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à l'implication majoritaire d'un type de récepteur des stéroïdes sexuels.



**Figure 83 : Effet de la testostérone sur l'activation de la voie ERK1/2 chez trois lignées mutantes**

Quantification du signal pERK/ERK détecté dans la mPOA après 30 minutes d'incubation avec de la testostérone à 100nM chez des animaux contrôles (AR<sup>fl/fl</sup>, ERα<sup>fl/fl</sup> et ERβ<sup>fl/fl</sup>) ou mutant n'exprimant pas le récepteur AR (AR<sup>NesCre</sup>), ERα (ERα<sup>NesCre</sup>) ou ERβ (ERβ<sup>NesCre</sup>) dans le système nerveux central.

Dans un second temps, afin de tester d'éventuels mécanismes de synergie, des incubations ont été réalisées simultanément avec de la dihydrotestostérone et de l'œstradiol. Cette incubation aboutit à un niveau de phosphorylation de ERK1/2 comparable aux incubations réalisées avec de la testostérone, de la dihydrotestostérone ou de l'œstradiol seuls.

Ainsi, il ne semble pas exister de synergie entre les métabolites de la testostérone en ce qui concerne l'activation de la voie ERK1/2 dans la mPOA. Au contraire, l'activation des récepteurs des stéroïdes sexuels pourrait converger vers les mêmes acteurs moléculaires. Cela pourrait notamment être le cas des protéines de la famille c-Src, connues pour interagir avec les AR, les ER et Ras (chapitre 2, partie III-B).

Enfin, ces expériences *ex vivo* n'ont été réalisées que sur des animaux naïfs. Il serait intéressant de réaliser ces mêmes incubations sur des animaux sexuellement expérimentés afin d'identifier de possibles mécanismes impliqués dans l'augmentation de la capacité à phosphoryler ERK1/2.

- **Mécanismes hypothétiques impliqués dans l'augmentation de l'activation de la voie ERK1/2 chez les mâles sexuellement expérimentés**

D'après les résultats obtenus *ex vivo*, il est envisageable que la capacité à phosphoryler ERK1/2 soit dépendante de l'action des stéroïdes dans la mPOA. Tout d'abord, il est possible que les mâles sexuellement expérimentés possèdent, lors de l'accouplement, un taux de testostérone plus élevé comme cela a été décrit dans deux études réalisées chez le rat (Bonilla-Jaime et al. 2006; Kamel et al. 1975) (Chapitre 3, partie III). En effet, les dosages du premier article, réalisés au moment de l'éjaculation, ne permettent pas d'exclure cette possibilité.

Il est également possible que la capacité à activer la voie ERK1/2 soit dépendante des propriétés des récepteurs des stéroïdes. En effet, bien que les récepteurs AR et ER $\alpha$  ne soient pas davantage exprimés dans la mPOA de mâles sexuellement expérimentés, comme cela est détaillé dans le premier article, il est possible que leur activité soit augmentée par des modifications post-traductionnelles comme notamment des phosphorylations (Foradori et al. 2008).

La forte activation de la voie ERK1/2 retrouvée chez les mâles sexuellement expérimentés pourrait également être due à une élévation locale plus importante de la concentration en métabolites actifs durant l'accouplement. Cela serait permis par l'augmentation de l'activité de certaines enzymes comme la 5 $\alpha$ -réductase et l'aromatase. Il serait possible de tester cette hypothèse en comparant l'activité de ces deux enzymes dans la mPOA de mâles naïfs ou sexuellement expérimentés. Afin de confirmer qu'une concentration locale plus importante en œstradiol et en dihydrotestostérone est capable d'augmenter les niveaux de phosphorylation de ERK1/2, il serait possible d'incuber des tranches avec des concentrations croissantes en stéroïdes afin d'observer une éventuelle augmentation dose-dépendante du niveau de phosphorylation de ERK1/2.

Enfin, une dernière hypothèse impliquerait la participation du glutamate dans les mécanismes de potentialisation de la voie ERK1/2 chez les mâles sexuellement expérimentés. En effet, les résultats du premier article ont démontré des modifications de l'arborisation dendritique et de l'expression de certaines protéines associées à la neurotransmission glutamatergique dans la mPOA. L'expérience sexuelle aboutit, entre autre, à une augmentation des niveaux de calbindine, de PSD-95 et de GluN1. Cela suggère que les mâles sexuellement expérimentés possèdent une sensibilité accrue au glutamate libéré dans la mPOA durant le comportement sexuel, ce qui aboutirait à une élévation plus importante du calcium intracellulaire et donc à l'augmentation de l'activation de la voie ERK1/2 (Chuderland et Seger, 2008; Schmitt et al. 2004).

- **Rôle cellulaire de pERK1/2 dans la mPOA**

Le rôle cellulaire précis que joue pERK1/2 dans la mPOA est actuellement inconnu. Elk-1, une des cibles de pERK1/2, est connue pour réguler la transcription de gènes impliqués dans les processus de mémorisation et d'addiction aux drogues (Besnard et al. 2011). Afin de mettre en évidence sa potentielle implication dans les mécanismes d'induction de l'expérience sexuelle, des Western blots détectant la forme phosphorylée pElk-1 ont été réalisés sur des mâles naïfs et sexuellement expérimentés, restant dans leur cage de stabulation ou sacrifié 5 minutes après la première montée avec intromissions. Cependant, l'effet de l'accouplement et de l'expérience sexuelle sur la phosphorylation de Elk-1 n'a pas pu être quantifiée à cause d'un signal trop faible et très bruité.

Afin de déterminer de potentielles cibles cellulaires, il serait intéressant de réaliser des fractionnements cellulaires et des études en microscopie confocale permettant d'identifier la localisation cytotologique ou nucléaire de pERK1/2. Il serait également pertinent de caractériser précisément l'identité biochimique des cellules exprimant pERK1/2 afin d'identifier de possibles cibles associées à la régulation des différents systèmes de neurotransmission.

- **Des rôles différents pour pERK1 et pERK2 ?**

Les niveaux de phosphorylation présentés dans ce deuxième article sont exprimés sous la forme pERK/ERK. Ce ratio est obtenu en effectuant le rapport  $(pERK1 + pERK2) / (ERK1 + ERK2)$ . Bien que les niveaux de ERK1 et ERK2 soient comparables, la forme phosphorylée pERK1 est toujours plus faiblement exprimé que pERK2. Cela est souvent retrouvé dans la plupart des tissus des Mammifères (Buscà et al. 2015). Néanmoins, les stimulations réalisées sur tranches ainsi que le comportement sexuel aboutissent à une augmentation de la phosphorylation des deux isoformes. Il serait envisageable que ces deux protéines, codées par des deux gènes différents, puissent exercer des rôles distincts dans la mPOA. Néanmoins, dans plusieurs modèles d'études, ERK1 et ERK2 possèdent de nombreuses redondances fonctionnelles puisque qu'ils entrent en compétition au niveau des sites actifs de MEK1/2 (Lefloch et al. 2008) et partagent les mêmes cibles cellulaires (von Kriegsheim et al. 2009). De nombreux résultats obtenus suite à des expériences de « silencing » de ERK1 ou ERK2 ont permis de d'identifier certains mécanismes cellulaires majoritairement contrôlés par l'une ou l'autre de ces protéines. Ces résultats, parfois contradictoires, semblent spécifiques du type de culture cellulaire et des tissus étudiés (Buscà et al. 2016). Ainsi, les rôles respectifs de ERK1 et ERK2 n'étant pas clairement identifiés

dans la mPOA, l'expression des résultats sous la forme  $\text{pERK}_{(\text{total})}/\text{ERK}_{(\text{total})}$  semble la plus pertinente dans l'état actuel des connaissances.



# **Discussion générale**





Mon travail de thèse a permis de caractériser des mécanismes d'activation de la mPOA ainsi que des modifications induites par l'expérience sexuelle. Ils ont mis en évidence qu'un seul accouplement est suffisant chez la souris pour induire une amélioration comportementale qui concerne aussi bien la phase motivationnelle que la phase copulatoire. Le premier article a permis de démontrer que cette amélioration comportementale est associée à une maturation de l'arborisation dendritique, à des modifications épigénétiques ainsi qu'à une augmentation des niveaux d'expression de protéines associées à la neurotransmission glutamatergique et à la microglie. Le deuxième article a permis de mettre en évidence la potentialisation de la voie de signalisation ERK1/2 chez les mâles sexuellement expérimentés. Les expériences réalisées *ex vivo* ont permis de démontrer que cette voie de signalisation est activable rapidement par la testostérone et ses métabolites. En revanche, l'inhibition de cette voie, par le SL-327, altère la composante motivationnelle du comportement sexuel sans perturber l'induction de l'expérience sexuelle.

- **Quel lien possible entre les deux articles ?**

Le premier accouplement de mâles naïfs active la voie ERK1/2. Cette voie de signalisation est connue pour réguler les processus de spinogénèse (Alonso et al. 2004; Thomas et Huganir, 2004) et pour induire des modifications épigénétiques, comme la phosphorylation transitoire des histones H3 (Brami-Cherrier et al. 2009) ou la try-méthylation indirecte des histone H3 (H3K27me3) (Hosogane et al. 2016). Ainsi, l'augmentation des niveaux de pERK1/2 observée lors du premier accouplement pourrait être à l'origine d'une partie des modifications à long terme observée dans le premier article (augmentation des niveaux de H3K27me3 et augmentation de la densité d'épines dendritiques de type « mushroom »). Néanmoins, l'inhibition de la voie ERK1/2 réalisée avant le premier accouplement n'altère pas l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle. Il semble donc que pERK1/2 ne soit pas l'élément central à l'origine des modifications observée dans la mPOA de mâles sexuellement expérimentés. Il serait intéressant de confirmer cet élément en analysant l'arborisation dendritique ainsi que les niveaux d'histone H3K27me3 chez les mâles sexuellement expérimentés ayant réalisé leur premier accouplement sous l'effet du SL-327.

- **Causes distales de Tinbergen et expérience sexuelle**

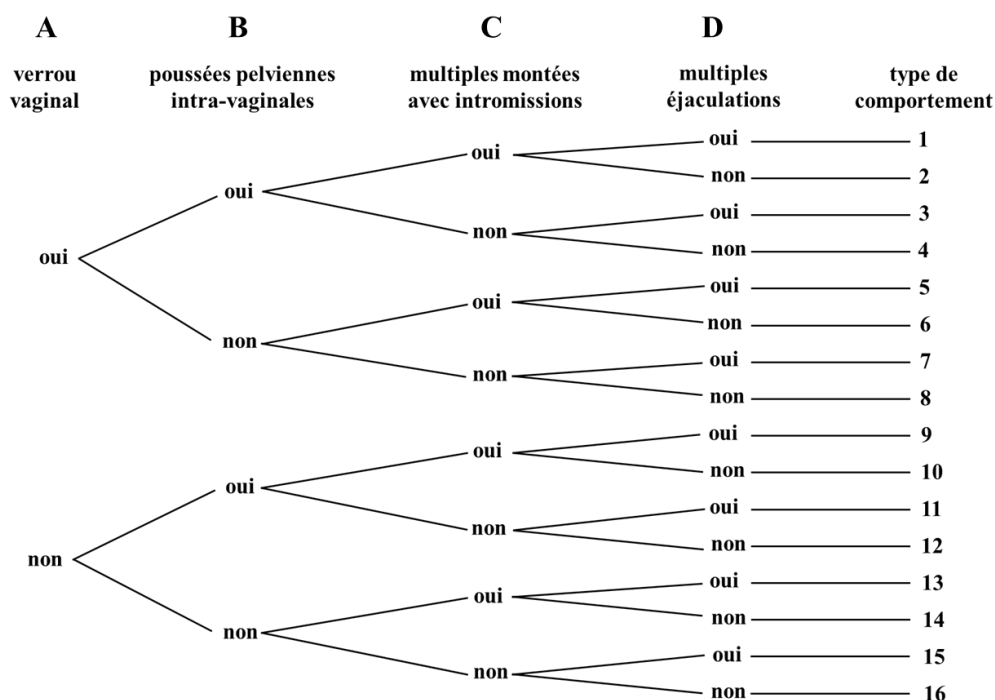
Dans le préambule, l'étude du comportement sexuel est appréhendée par l'intermédiaire de quatre domaines de recherche (Figure 6). Sa caractérisation exhaustive est possible par l'étude des causes proximales (« comment ça marche ? ») et des causes distales (« à quoi ça sert ? »).

L'expérience sexuelle induit une amélioration comportementale qui est associée à des modifications moléculaires de la mPOA. Ainsi, les expériences présentées dans ce manuscrit se sont uniquement intéressées aux causes proximales. Elles s'inscrivent à l'intersection de l'ontogenèse et de la mécanistique en répondant à la question : comment les mécanismes qui régulent le comportement sexuel sont modifiés durant la vie de l'individu ?

- **Phylogénèse et expérience sexuelle**

Plusieurs résultats décrits dans le premier article sont différents des études réalisées chez le rat. Il est possible de questionner ces différences à la lumière des causes distales de Tinbergen par l'étude de la phylogénèse du comportement sexuel.

Un énorme travail a été réalisé sur ce sujet par Dewsbury dans les années 1980 avec la caractérisation du comportement sexuel mâle de centaines d'espèces différentes. Pour cela, quatre critères ont été utilisés : la présence ou l'absence de verrou vaginal, c'est-à-dire tout dispositif anatomique s'opposant au retrait du pénis hors du vagin, la réalisation de plusieurs poussées pelviennes intra-vaginales, la réalisation de plusieurs montées avec intromissions et la réalisation de plusieurs éjaculations avant d'atteindre la satiété sexuelle. La combinaison de ces 4 caractéristiques permet d'identifier 16 types de comportement sexuel mâle (Figure 84).



**Figure 84 : Critères de classification du comportement sexuel mâle, adapté de Dewsbury (1975)**

*Le comportement sexuel peut être classé en 16 types grâce à l'absence ou à la présence de 4 caractéristiques : (A) Présence d'un verrou vaginal, c'est-à-dire présence d'un dispositif anatomique s'opposant au retrait du pénis hors du vagin.*

*(B) Réalisation de plusieurs poussées pelviennes intra-vaginales lors d'une montée.*

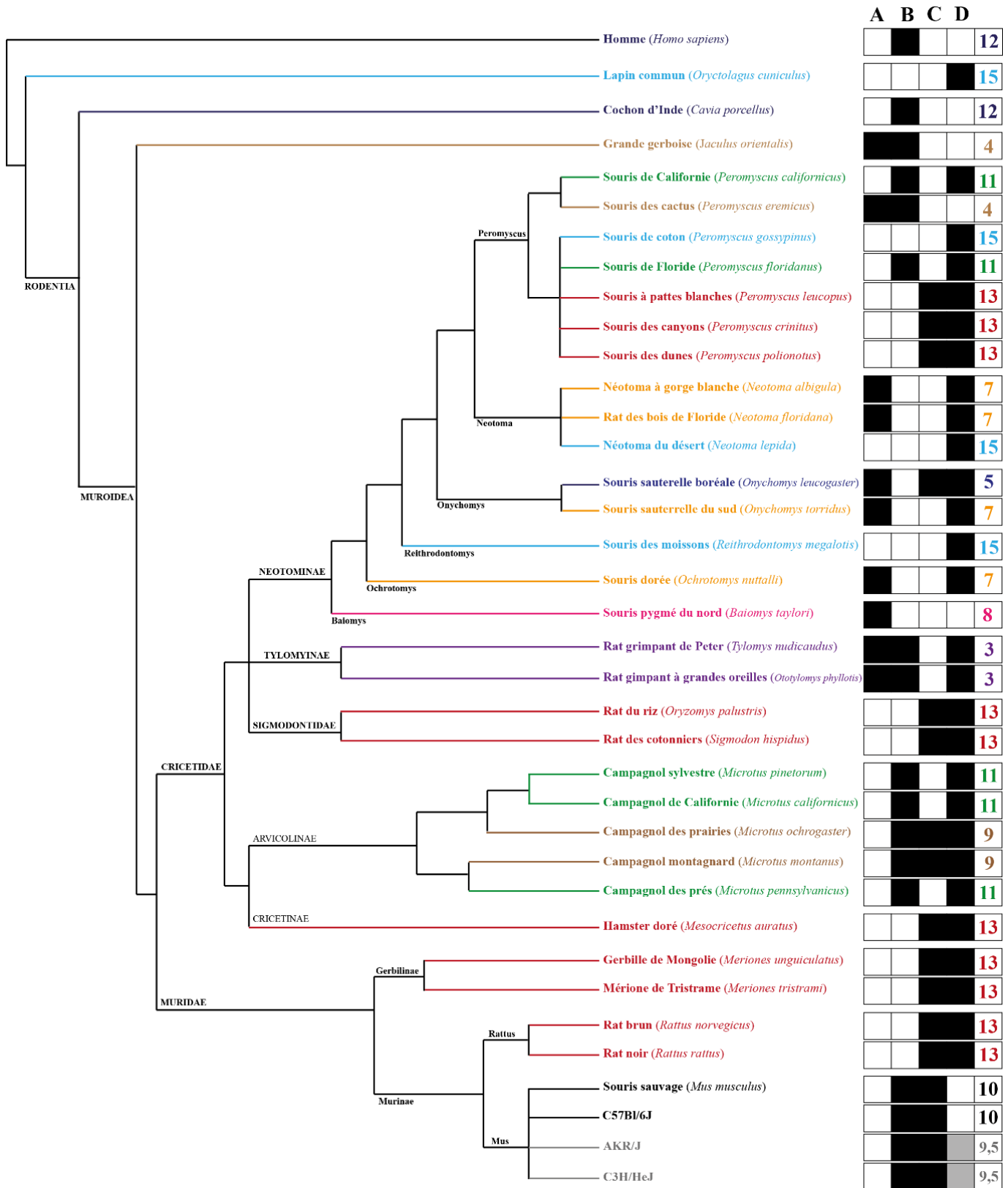
*(C) Réalisation de plusieurs montées avec une ou des intromissions intra-vaginales.*

*(D) Réalisation de multiples éjaculations avant d'atteindre la satiété sexuelle.*

Les souris C57Bl6/J, utilisées pour cette thèse, possèdent un comportement sexuel de type 10. En effet, elles ne possèdent pas de verrou vaginal, réalisent des poussées pelviennes intra-vaginales ainsi que des montées avec intromission. De plus, la phase de satiété est atteinte après une seule éjaculation. Néanmoins, certaines souches de souris comme les souches AKR/J et C3H/HeJ sont parfois capables de réaliser une nouvelle copulation quelques minutes après la première éjaculation. Ce phénomène est accéléré lorsque le mâle est mis en présence d'une nouvelle femelle réceptive. Ces souches possèdent donc un comportement sexuel intermédiaire de type 9,5 (Mosig and Dewsbury, 1976).

Le rat possède quant à lui un comportement sexuel de type 13. En effet, les rats ne possèdent pas de verrou vaginal, ne réalisent pas de poussées pelviennes intra-vaginales mais réalisent plusieurs montées avec intromission et plusieurs éjaculations.

Le type de comportement sexuel de 34 Rongeurs, replacé sur un arbre phylogénétique, permet de mettre en évidence quelques propriétés évolutives associées au comportement sexuel (Figure 85).



**Figure 85 : Phylogénie et comportement sexuel mâle, adapté de Blanga-Kanfi et al. (2009); Cox et Hautier (2015); Dewsbury (1975), (1972); Estep et al. (1975); Jansa et al. (2009); Jansa et Weksler (2004); Morali et al. (2003); Mosig et Dewsbury (1976); Neumann et al. (2006); Reeder et Bradley (2004)**

Le comportement sexuel de 34 espèces de rongeurs est reporté sur un arbre phylogénétique simplifié. Les longueurs des branches n'ont aucune valeur évolutive. Le type de comportement sexuel est obtenu en appliquant les critères de Dewsbury (1975) grâce à l'absence (carré blanc) ou à la présence (carré noir) de 4 caractéristiques :

A : présence d'un verrou vaginal, c'est-à-dire présence d'un dispositif anatomique s'opposant au retrait du pénis hors du vagin. B : réalisation de plusieurs poussées pelviennes intra-vaginales lors d'une montée. C : réalisation de plusieurs montées avec une ou des intrusions intra-vaginales. D : réalisation de multiples éjaculations avant d'atteindre la satiété sexuelle.

Ainsi, les Rongeurs possèdent une grande diversité de comportements sexuels répartis en 11 types (3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 15). Il est intéressant de noter que la souris sauvage et la souche C57Bl/6J sont les seules à posséder un comportement sexuel de type 10. Parmi les centaines d'espèces étudiées par Dewsbury, seules deux autres espèces, la Musaraigne des maisons (*Suncus murinus*) et le Rat taupe méditerranéen (*Spalax ehrenbergi*), possèdent ce type de comportement. Il apparaît donc que le comportement sexuel de la souris est un comportement rare parmi les Rongeurs, contrairement au comportement sexuel du rat (type 13) qui est retrouvé dans de nombreux taxa différents.

Cet arbre met en évidence la répartition hétérogène des types de comportement sexuel, sans lien apparent avec la proximité phylogénétique. En effet, plusieurs types de comportements sexuels cohabitent souvent au sein du même genre. Cela est notamment le cas du genre *Peromyscus* dont les 7 espèces se répartissent en 4 types différents (4, 11, 13 et 15).

Aucune hypothèse évolutive n'est avancée dans la littérature quant aux possibles causes expliquant la diversité de ces comportements. Etant donné la grande variété de comportements sexuels dans des taxa proches, il est raisonnable de penser que les contraintes écologiques prévalent sur de possibles contraintes s'exerçant sur un comportement sexuel hérité d'un ancêtre commun aux Rongeurs.

Ces éléments mettent en évidence le fait que la transposition d'études réalisées sur différentes espèces doit être effectuée avec une certaine prudence. En effet, le Cochon d'Inde (*Cavia porcellus*), en apparence très semblable à n'importe quel autre Rongeur, possède un comportement sexuel similaire à celui de l'Homme (type 12) mais très différent de celui de la Souris des canyons (*Peromyscus crinitus*) (type 13).

Ainsi, la diversité des comportements sexuels des Rongeurs explique que les mécanismes moléculaires sous-tendant l'expérience sexuelle s'effectuent selon des modalités différentes (au moins aussi différentes que les comportements sexuels eux-mêmes) selon l'espèce considérée.

#### - Fonction adaptative de l'expérience sexuelle

La deuxième question permettant de caractériser les causes distales d'un comportement concerne sa fonction adaptative. La première copulation d'un mâle augmente sa préférence olfactive (Hayashi et Kimura, 1974) et son activité locomotrice en présence d'urine de femelle réceptive (Mendelson et Pfaus, 1989). De plus, le nombre de vocalisations ultrasonores émises (Arriaga et al. 2012; Ferhat et al. 2016) ainsi que la capacité d'attraction de son urine augmentent (Taylor et al. 1983).

Ces éléments permettent d'augmenter les chances de rencontrer un potentiel partenaire. Ils participent ainsi à la réduction de la phase d'attraction (Figure 7) qui est associée à une exploration territoriale nécessitant de l'énergie et comportant de hauts risques de prédation (Dewsbury, 1982).

L'expérience sexuelle est également à l'origine d'une augmentation de l'efficacité du comportement sexuel par une réduction de la durée des phases motivationnelles et copulatoires. Ces améliorations permettent de limiter le temps passé à réaliser une tâche comportementale durant lequel le mâle et la femelle représentent des proies faciles pour des prédateurs.

Les mâles sexuellement expérimentés sont également moins sensibles aux perturbations qui aboutissent à l'arrêt du comportement sexuel (Pfaff et Joels, 2016; Pfaus et al. 2001). Or, l'arrêt de la copulation avant l'éjaculation représente, d'un point de vue évolutif, une grande perte de temps et d'énergie. En effet, les nombreuses actions réalisées durant les 3 phases du comportement sexuel s'avèrent inutiles d'un point de vue évolutif si elles n'aboutissent pas à une fécondation et donc *a fortiori* à une éjaculation.

Enfin, une étude indique que les mâles sexuellement expérimentés présentent une augmentation de leur fertilité. Néanmoins, les résultats de cette étude sont peu convaincants à cause de l'absence de reproductibilité entre les différents groupes d'animaux utilisés pour la même conditions expérimentale (Rastogi et al. 1981).

#### - **Implication de zones extra-hypothalamiques dans l'expérience sexuelle**

Les expériences réalisées dans les deux articles de cette thèse se sont focalisés sur les modifications de la mPOA, région cérébrale majoritairement impliquée dans le contrôle du comportement sexuel mâle. Néanmoins, il est très probable que plusieurs modifications aient également lieu dans d'autres zones cérébrales, comme cela a été mis en évidence chez le rat (Chapitre 3, Partie II).

Le circuit de la récompense pourrait notamment être l'objet de modifications induites par l'expérience sexuelle comme cela est suggéré par la forte valeur de récompense associée au comportement sexuel (Chapitre 3, Partie I-B-2). Certaines de ces modifications, uniquement étudiées chez le rat, aboutissent à une augmentation de la réponse du système mésolimbique lors d'un nouvel accouplement (Chapitre 3, Partie II-B-2).

Néanmoins, l'expérience sexuelle ne se limite pas uniquement à une potentialisation du circuit de la récompense et à un renforcement comportemental basé sur la seule valeur hédonique de l'accouplement. En effet, l'inhibition des neurones dopaminergiques de l'aire

tegmentale ventrale, réalisée avant chaque accouplement, n'altère pas la mise en place de l'expérience sexuelle (Beloate et al. 2016a).

Chez l'Homme, l'implication du système mésolimbique dans la réalisation de comportements sexuels excessifs et répétés est assez peu documentée. Cela est notamment dû à la difficulté de diagnostiquer les troubles psychiatriques associés à l'addiction sexuelle. En effet, de nombreuses études traitant du sujet sont en désaccord quant au terme le plus approprié : addiction sexuelle, addiction au sexe, hypersexualité, addiction pornographique ou encore comportement sexuel compulsif. A cela s'ajoutent une grande diversité de méthodologies cliniques qui utilisent des critères différents pour caractériser ces troubles comportementaux (Garcia et Thibaut, 2010).

Ces éléments expliquent que l'addiction sexuelle soit absente de la dernière version du DSM-V (Diagnostic and statistical manual of mental disorders). En effet, les symptômes retenus par l'American Psychiatric Association ne remplissent pas tous les critères nécessaires au classement de ces troubles comportementaux en tant qu'addiction. Le DSM-V utilise plutôt les termes assez vagues de désordres sexuels compulsifs paraphiles (regroupant notamment les comportements pédophiles) et non-paraphiles (regroupant des comportements comme la masturbation compulsive ou l'hypersexualité au sein du couple) (Fong, 2006 ; Krueger, 2016). Ces aspects de potentialisation du circuit de la récompense par l'expérience sexuelle sont également associés à d'autres thématiques de recherche traitant de l'addiction aux drogues.

#### - **Expérience sexuelle et addiction aux drogues**

L'étude des mécanismes moléculaires sous-tendant l'expérience sexuelle revêt un intérêt dans un autre domaine actuellement en plein essor. Il s'agit de la sensibilisation croisée à certaines drogues. Plusieurs auteurs ont fait l'hypothèse que les comportements associés à la prise de drogue partagent les mêmes substrats moléculaires que les comportements associés à des récompenses naturelles, comme le comportement sexuel (Acerbo et Johnson, 2011). En effet, les récompenses naturelles et les prises de drogues ont pour point commun d'activer le système mésolimbique et d'y induire des mécanismes de plasticité parfois similaires.

Ainsi, des rats sexuellement expérimentés présentent une réponse locomotrice plus importante à l'injection d'amphétamines par rapport à des rats naïfs. De plus, l'abstinence de rats sexuellement expérimentés induit une augmentation importante de la valeur hédonique des amphétamines, estimée par des expérience de conditionnement de place, par rapport à des rats naïfs (Pitchers et al. 2016, 2010a). Au niveau moléculaire, ce mécanisme de

sensibilisation croisée est dépendant des récepteurs NMDA dans le noyau accumbens (Beloate et al. 2016b) ainsi que de la dopamine libérée par les neurones de l'aire tegmentale ventrale (Beloate et al. 2016b). Ces résultats indiquent que le circuit de la récompense potentialisé par l'expérience sexuelle est davantage sensible à une activation par des drogues d'abus. De façon intéressante, la réciproque est également observée : l'injection chronique d'amphétamines augmente la motivation sexuelle des mâles (Nocjar et Panksepp, 2002).

Certains des mécanismes impliqués dans cette sensibilisation croisée sont susceptibles de se dérouler dans la mPOA. En effet, certains interneurons de cette région hypothalamique projettent vers l'aire tegmentale ventrale et sont capables d'inhiber les effets de la cocaïne sur l'augmentation de la concentration en dopamine dans le noyau accumbens (Tobiansky et al. 2016).

Ainsi, l'étude des mécanismes de plasticité induits par l'expérience sexuelle se révèle être pertinent à la compréhension des mécanismes moléculaires associées aux comportements d'addiction aux drogues.

Ce travail de thèse a montré que le comportement sexuel des souris mâles est amélioré par un premier accouplement. Cette amélioration comportementale est associée à des modifications à long terme de l'arborisation dendritique, à des modifications épigénétiques ainsi qu'à une augmentation des niveaux d'expression de protéines associées à la neurotransmission glutamatergique et à la microglie dans mPOA.

L'expérience sexuelle est également associée à une potentialisation de la voie de signalisation ERK1/2 dans la mPOA qui peut être activée *ex vivo* par la testostérone et ses métabolites. L'inhibition de cette voie de signalisation diminue la motivation sexuelle de façon réversible sans altérer la mise en place de l'expérience sexuelle.

En revanche, plusieurs acteurs moléculaires connus pour être impliqués dans les mécanismes moléculaires associés à l'expérience sexuelle chez le rat ne sont pas modifiés chez la souris. Cela indique la nécessité d'élaborer un nouveau modèle propre à la souris, dans lequel le premier accouplement représenterait le dernier stade de maturation de la mPOA permettant l'expression d'un comportement sexuel pleinement mature. Ces éléments, appuyés par des considérations phylogénétiques, confirment que la transposition d'études réalisées sur différentes espèces de rongeurs doit être effectuée avec prudence.



## **Références bibliographiques**



- Acerbo, M.J., Johnson, A.K., 2011. Behavioral cross-sensitization between DOCA-induced sodium appetite and cocaine-induced locomotor behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98, 440–448. doi:10.1016/j.pbb.2011.02.016
- Ågmo, A., 1976. Sexual Behaviour following Castration in Experienced and Inexperienced Male Rabbits. *Z. Für Tierpsychol.* 40, 390–395. doi:10.1111/j.1439-0310.1976.tb00943.x
- Ågmo, A., Soulairac, M.-L., Soulairac, A., 1977. Preoptic lesions, sexual behavior, and spontaneous ejaculation in the rat. *Scand. J. Psychol.* 18, 345–347. doi:10.1111/j.1467-9450.1977.tb00297.x
- Ahlenius, S., Larsson, K., 1990. Effects of selective dopamine D1 and D2 antagonists on male rat sexual behavior. *Experientia* 46, 1026–1028.
- Ahmad, N., Haltmeyer, G.C., Eik-Nes, K.B., 1975. Maintenance of Spermatogenesis with Testosterone or Dihydrotestosterone in Hypophysectomized Rats. *J. Reprod. Fertil.* 44, 103–107. doi:10.1530/jrf.0.0440103
- Aikey, J.L., Nyby, J.G., Anmuth, D.M., James, P.J., 2002. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (*Mus musculus*). *Horm. Behav.* 42, 448–460.
- Alonso, M., Medina, J.H., Pozzo-Miller, L., 2004. ERK1/2 Activation Is Necessary for BDNF to Increase Dendritic Spine Density in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Learn. Mem.* 11, 172–178. doi:10.1101/lm.67804
- Alvarenga, T.A., Andersen, M.L., Tufik, S., 2010. Influence of Progesterone on Sexual Performance in Male Rats. *J. Sex. Med.* 7, 2435–2444. doi:10.1111/j.1743-6109.2010.01851.x
- Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2004. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat. Neurosci.* 7, 643–650. doi:10.1038/nn1254
- Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2002. A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8586–8596.
- Amstislavskaya, T.G., Khrapova, M.V., 2002. Effect of genotype on behavioral and hormonal components of sexual activation of male mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 133, 475–477.
- Amstislavskaya, T.G., Popova, N.K., 2004. Female-induced sexual arousal in male mice and rats: behavioral and testosterone response. *Horm. Behav.* 46, 544–550. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.05.010
- Andersen, M.L., Martins, R.C., Alvarenga, T.A., Antunes, I.B., Papale, L.A., Tufik, S., 2007. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 7. doi:10.1186/1477-7827-5-7
- Andersen, M.L., Papale, L.A., Tufik, S., 2004. Diurnal variation in the genital reflexes and hormone levels induced by paradoxical sleep deprivation and cocaine in male rats. *Brain Res. Bull.* 64, 215–220. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.07.007
- Andersen, M.L., Tufik, S., 2006. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res. Rev.* 51, 136–143. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.10.005
- Anon, 1970. Effects of Sexual Activity on Beard Growth in Man. *Nature* 226, 869–870. doi:10.1038/226869a0
- Arevalo, M.-A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 17–29. doi:10.1038/nrn3856
- Argiolas, A., Melis, M.R., 2004. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol. Behav.* 83, 309–317. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.019
- Arnedo, M.T., Salvador, A., Martínez-Sanchis, S., Gonzalez-Bono, E., 2000. Rewarding properties of testosterone in intact male mice: a pilot study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 327–332.
- Arnedo, M.T., Salvador, A., Martínez-Sanchís, S., Pellicer, O., 2002. Similar rewarding effects of testosterone in mice rated as short and long attack latency individuals. *Addict. Biol.* 7, 373–379. doi:10.1080/1355621021000005955
- Arriaga, G., Zhou, E.P., Jarvis, E.D., 2012. Of Mice, Birds, and Men: The Mouse Ultrasonic Song System Has Some Features Similar to Humans and Song-Learning Birds. *PLOS ONE* 7, e46610. doi:10.1371/journal.pone.0046610
- Arteaga, M., Morali, G., 1997. Characteristics of the motor and genital copulatory responses of the male hamster. *J. Physiol. Paris* 91, 311–316.

- Arthur, J.S.C., Ley, S.C., 2013. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 679–692. doi:10.1038/nri3495
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., Kikusui, T., 2014. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fnins.2014.00231
- Attila, M., Oksala, R., Agmo, A., 2010. Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Horm. Behav.* 58, 341–351. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.08.011
- Aucoin, M.W., Wassersug, R.J., 2006. The sexuality and social performance of androgen-deprived (castrated) men throughout history: implications for modern day cancer patients. *Soc. Sci. Med.* 1982 63, 3162–3173. doi:10.1016/j.socscimed.2006.08.007
- Ayalon, 1999. Eunuchs, caliphs, and sultans: A study in power relationships.
- Azad, A.A., Zoubeidi, A., Gleave, M.E., Chi, K.N., 2015. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 12, 26–36. doi:10.1038/nrurol.2014.320
- Baimbridge, K.G., Miller, J.J., Parkes, C.O., 1982. Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res.* 239, 519–525. doi:10.1016/0006-8993(82)90526-1
- Balfour, M.E., Yu, L., Coolen, L.M., 2004. Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 718–730. doi:10.1038/sj.npp.1300350
- Balin, M.S., Schwartz, N.B., 1976. Effects of mating on serum LH, FSH, and prolactin and accessory tissue weight in male rats. *Endocrinology* 98, 522–526. doi:10.1210/endo-98-2-522
- Ball, G.F., Balthazart, J., 2008. How useful is the appetitive and consummatory distinction for our understanding of the neuroendocrine control of sexual behavior? *Horm. Behav.* 53, 307–318. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.09.023
- Ballaré, C., Uhrig, M., Bechtold, T., Sancho, E., Di Domenico, M., Migliaccio, A., Auricchio, F., Beato, M., 2003. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1994–2008.
- Balthazart, J., Baillien, M., Cornil, C.A., Ball, G.F., 2004. Preoptic aromatase modulates male sexual behavior: slow and fast mechanisms of action. *Physiol. Behav.* 83, 247–270. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.025
- Balthazart, J., Ball, G.F., 2007. Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Front. Neuroendocrinol.* 28, 161–178. doi:10.1016/j.yfrne.2007.05.003
- Barfield, R.J., Sachs, B.D., 1968. Sexual behavior: stimulation by painful electrical shock to skin in male rats. *Science* 161, 392–393.
- Barker, A.J., Ullian, E.M., 2010. Astrocytes and synaptic plasticity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 16, 40–50. doi:10.1177/1073858409339215
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- Batty, J., 1978. Acute changes in plasma testosterone levels and their relation to measures of sexual behaviour in the male house mouse (*Mus musculus*). *Anim. Behav.* 26, 349–357. doi:10.1016/0003-3472(78)90053-2
- Baum, M.J., Everitt, B.J., 1992. Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* 50, 627–646.
- Bazzett, T., Lumley, L., Bitran, D., Markowski, V., Warner, R., Hull, E., 1992. Male rat copulation following 6-OHDA lesions of the medial preoptic area: resistance to repeated administration and rapid behavioral recovery. *Brain Res.* 580, 164–170.
- Bélangier, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.016
- Beloate, L.N., Omrani, A., Adan, R.A., Webb, I.C., Coolen, L.M., 2016a. Ventral Tegmental Area Dopamine Cell Activation during Male Rat Sexual Behavior Regulates Neuroplasticity and d-Amphetamine Cross-Sensitization following Sex Abstinence. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 9949–9961. doi:10.1523/JNEUROSCI.0937-16.2016

- Beloate, L.N., Weems, P.W., Casey, G.R., Webb, I.C., Coolen, L.M., 2016b. Nucleus accumbens NMDA receptor activation regulates amphetamine cross-sensitization and deltaFosB expression following sexual experience in male rats. *Neuropharmacology* 101, 154–164. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.023
- Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2011. Elk-1 a Transcription Factor with Multiple Facets in the Brain. *Front. Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnins.2011.00035
- Beyer, C., Contreras, J.L., Larsson, K., Olmedo, M., Moralí, G., 1982. Patterns of motor and seminal vesicle activities during copulation in the male rat. *Physiol. Behav.* 29, 495–500.
- Beyer, C., Contreras, J.L., Moralí, G., Larsson, K., 1981. Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern of the rat. *Physiol. Behav.* 27, 727–730. doi:10.1016/0031-9384(81)90247-X
- Bialy, M., Kalata, U., Nikolaev-Diak, A., Nikolaev, E., 2010. D1 receptors involved in the acquisition of sexual experience in male rats. *Behav. Brain Res.* 206, 166–176. doi:10.1016/j.bbr.2009.09.008
- Bialy, M., Rydz, M., Kaczmarek, L., 2000. Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav. Neurosci.* 114, 983–990.
- Bon, C.L.M., Garthwaite, J., 2003. On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 23, 1941–1948.
- Bonhoeffer, 2016. How Experience Changes Synapses in the Mammalian Brain. *Abstr. Conf.*
- Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Arteaga-Silva, M., Retana-Márquez, S., 2006. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm. Behav.* 49, 376–382. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.08.005
- Borg, K.E., Esbenschade, K.L., Johnson, B.H., Lunstra, D.D., Ford, J.J., 1992. Effects of sexual experience, season, and mating stimuli on endocrine concentrations in the adult ram. *Horm. Behav.* 26, 87–109.
- Boulant, J.A., 2000. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 31 Suppl 5, S157-161. doi:10.1086/317521
- Bourne, J.N., Harris, K.M., 2008. Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47–67. doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646
- Bowers, M.B., Van Woert, M., Davis, L., 1971. Sexual behavior during L-dopa treatment for Parkinsonism. *Am. J. Psychiatry* 127, 1691–1693. doi:10.1176/ajp.127.12.1691
- Brami-Cherrier, K., Roze, E., Girault, J.-A., Betuing, S., Caboche, J., 2009. Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J. Neurochem.* 108, 1323–1335. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05879.x
- Brann, D.W., Mahesh, V.B., 1994. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 15, 3–49. doi:10.1006/frne.1994.1002
- Bruce, H.M., 1959. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184, 105.
- Brudzynski, S.M., Pniak, A., 2002. Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *J. Comp. Psychol. Wash. DC* 1983 116, 73–82.
- Bunnell, B.N., Kimmel, M.E., 1965. Some effects of copulatory experience on postcastration mating behavior in the male hamster. *Psychon. Sci.* 3, 179–180. doi:10.3758/BF03343082
- Burns-Cusato, M., Scordalakes, E.M., Rissman, E.F., 2004. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol. Behav., Male Sexual Function* 83, 217–232. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.015
- Burt, A., 2000. Perspective: sex, recombination, and the efficacy of selection--was Weismann right? *Evol. Int. J. Org. Evol.* 54, 337–351.
- Buscà, R., Christen, R., Lovern, M., Clifford, A.M., Yue, J.-X., Goss, G.G., Pouysségur, J., Lenormand, P., 2015. ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1. *BMC Evol. Biol.* 15, 179. doi:10.1186/s12862-015-0450-x
- Buscà, R., Pouysségur, J., Lenormand, P., 2016. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front. Cell Dev. Biol.* 4. doi:10.3389/fcell.2016.00053
- Camacho, F., Sandoval, C., Paredes, R.G., 2004. Sexual experience and conditioned place preference in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 419–425. doi:10.1016/j.pbb.2004.04.015

- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1994. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348, 41–79. doi:10.1002/cne.903480103
- Carlisle, H.J., Fink, A.E., Grant, S.G.N., O'Dell, T.J., 2008. Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J. Physiol.* 586, 5885–5900. doi:10.1113/jphysiol.2008.163469
- Carlsson, S.G., Larsson, K., 1962. Intromission Frequency and Intromission Duration in the Male Rat Mating Behavior. *Scand. J. Psychol.* 3, 189–191. doi:10.1111/j.1467-9450.1962.tb01266.x
- Caroom, D., Bronson, F.H., 1971. Responsiveness of female mice to preputial attractant: effects of sexual experience and ovarian hormones. *Physiol. Behav.* 7, 659–662.
- Carreau, S., Hess, R.A., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1517–1535. doi:10.1098/rstb.2009.0235
- Cerda-Molina, A.L., Hernández-López, L., de la O, C.E., Chavira-Ramírez, R., Mondragón-Ceballos, R., 2013. Changes in Men's Salivary Testosterone and Cortisol Levels, and in Sexual Desire after Smelling Female Axillary and Vulvar Scents. *Front. Endocrinol.* 4. doi:10.3389/fendo.2013.00159
- Champagne, F.A., Weaver, I.C.G., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M.J., 2003. Natural variations in maternal care are associated with estrogen receptor alpha expression and estrogen sensitivity in the medial preoptic area. *Endocrinology* 144, 4720–4724. doi:10.1210/en.2003-0564
- Chater, T.E., Goda, Y., 2014. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fncel.2014.00401
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., Brecht, D.S., 1999. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* 274, 27467–27473.
- Chuderland, D., Seger, R., 2008. Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Commun. Integr. Biol.* 1, 4–5.
- Clancy, A.N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R.A., Noble, E.P., 1984. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 4, 2222–2229.
- Clancy, A.N., Zumpe, D., Michael, R.P., 1995. Intracerebral Infusion of an Aromatase Inhibitor, Sexual Behavior and Brain Estrogen Receptor-Like Immunoreactivity in Intact Male Rats. *Neuroendocrinology* 61, 98–111. doi:10.1159/000126830
- Clemens, L.G., Wee, B.E.F., Weaver, D.R., Roy, E.J., Goldman, B.D., Rakerd, B., 1988. Retention of masculine sexual behavior following castration in male B6D2F1 mice. *Physiol. Behav.* 42, 69–76. doi:10.1016/0031-9384(88)90262-4
- Collins, G.T., Truccone, A., Haji-Abdi, F., Newman, A.H., Grundt, P., Rice, K.C., Husbands, S.M., Greedy, B.M., Enguehard-Gueiffier, C., Gueiffier, A., Chen, J., Wang, S., Katz, J.L., Grandy, D.K., Sunahara, R.K., Woods, J.H., 2009. Proerectile Effects of Dopamine D2-Like Agonists Are Mediated by the D3 Receptor in Rats and Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 210–217. doi:10.1124/jpet.108.144048
- Contreras, J.L., Beyer, C., 1979. A polygraphic analysis of mounting and ejaculation in the New Zealand white rabbit. *Physiol. Behav.* 23, 939–943.
- Cook, C.J., Crewther, B.T., 2012. Changes in salivary testosterone concentrations and subsequent voluntary squat performance following the presentation of short video clips. *Horm. Behav.* 61, 17–22. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.09.006
- Cooke, B.M., Breedlove, S.M., Jordan, C.L., 2003. Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Horm. Behav.* 43, 336–346.
- Coolen, L.M., Wood, R.I., 1999. Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification. *Behav. Brain Res.* 98, 143–153.
- Coquelin, A., Bronson, F.H., 1980. Secretion of luteinizing hormone in male mice: factors that influence release during sexual encounters. *Endocrinology* 106, 1224–1229. doi:10.1210/endo-106-4-1224

- Couse, J.F., Korach, K.S., 1998. Exploring the role of sex steroids through studies of receptor deficient mice. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 76, 497–511.
- Cross, E., Roselli, C.E., 1999. 17beta-estradiol rapidly facilitates chemoinvestigation and mounting in castrated male rats. *Am. J. Physiol.* 276, R1346-1350.
- Culotta, E., Koshland, D.E., 1992. NO news is good news. *Science* 258, 1862–1865.
- Cummings, J.A., Becker, J.B., 2012. Quantitative Assessment of Female Sexual Motivation in the Rat: Hormonal Control of Motivation. *J. Neurosci. Methods* 204, 227–233. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.11.017
- Cunningham, C.L., Martínez-Cerdeño, V., Noctor, S.C., 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 4216–4233. doi:10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013
- Cunningham, R.L., Lumia, A.R., McGinnis, M.Y., 2012. Androgen Receptors, Sex Behaviour, and Aggression. *Neuroendocrinology* 96, 131–140. doi:10.1159/000337663
- Dabbs Jr., J.M., Mohammed, S., 1992. Male and female salivary testosterone concentrations before and after sexual activity. *Physiol. Behav.* 52, 195–197. doi:10.1016/0031-9384(92)90453-9
- Damsma, G., Pfaus, J.G., Wenkstern, D., Phillips, A.G., Fibiger, H.C., 1992. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav. Neurosci.* 106, 181–191.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Ackroyd, K.J., Chatzidaki, E.E., Colledge, W.H., 2010. Kisspeptin signaling is required for peripheral but not central stimulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by NMDA. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8581–8590. doi:10.1523/JNEUROSCI.5486-09.2010
- Darwin, E., 1803. *The temple of nature; or, The origin of society: a poem, with philosophical notes.* London, J. Johnson.
- Davis, S., Laroche, S., 2006. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav.* 5, 61–72. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00230.x
- de Jong, T.R., Veening, J.G., Waldinger, M.D., Cools, A.R., Olivier, B., 2006. Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 893–907. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.01.001
- Dean, M.D., Findlay, G.D., Hoopmann, M.R., Wu, C.C., MacCoss, M.J., Swanson, W.J., Nachman, M.W., 2011. Identification of ejaculated proteins in the house mouse (*Mus domesticus*) via isotopic labeling. *BMC Genomics* 12, 306. doi:10.1186/1471-2164-12-306
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. doi:10.1038/nrn2822
- DeVries, M.S., Cordes, M.A., Stevenson, S.A., Riters, L.V., 2015. Differential relationships between D1 and D2 dopamine receptor expression in the medial preoptic nucleus and sexually-motivated song in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Neuroscience* 301, 289–297. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.011
- Dewsbury, D.A., 1982. Ejaculate Cost and Male Choice. *Am. Nat.* 119, 601–610.
- Dewsbury, D.A., 1975. Diversity and Adaptation in Rodent Copulatory Behavior. *Science* 190, 947–954.
- Dewsbury, D.A., 1969. Copulatory behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim. Behav.* 17, 217–223.
- Dominguez, J.M., 2006. Preoptic Glutamate Facilitates Male Sexual Behavior. *J. Neurosci.* 26, 1699–1703. doi:10.1523/JNEUROSCI.4176-05.2006
- Dominguez, J.M., Brann, J.H., Gil, M., Hull, E.M., 2006a. Sexual experience increases nitric oxide synthase in the medial preoptic area of male rats. *Behav. Neurosci.* 120, 1389–1394. doi:10.1037/0735-7044.120.6.1389
- Dominguez, J.M., Gil, M., Hull, E.M., 2006b. Preoptic glutamate facilitates male sexual behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1699–1703. doi:10.1523/JNEUROSCI.4176-05.2006
- Dominguez, J.M., Hull, E.M., 2010. Serotonin impairs copulation and attenuates ejaculation-induced glutamate activity in the medial preoptic area. *Behav. Neurosci.* 124, 554–557. doi:10.1037/a0020353

- Dominguez, J.M., Hull, E.M., 2005. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiol. Behav.*, Florida State University Special Issue Florida State University Special Issue 86, 356–368. doi:10.1016/j.physbeh.2005.08.006
- Dominguez, J.M., Muschamp, J.W., Schmich, J.M., Hull, E.M., 2004. Nitric oxide mediates glutamate-evoked dopamine release in the medial preoptic area. *Neuroscience* 125, 203–210. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.022
- Dong, Q., Hardy, M.P., 2004. Leydig Cell Function in Man 23–43. doi:10.1007/978-1-59259-727-7\_2
- Drago, F., Busă, L., 1997. Dose-dependent effects of acute kainic acid treatment on sexual behavior of male rats. *Brain Res.* 778, 135–139.
- Driggers, P.H., Segars, J.H., 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 13, 422–427.
- Du, J., Hull, E.M., 1999. Effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase. *Brain Res.* 836, 90–98.
- Du, J., Lorrain, D.S., Hull, E.M., 1998. Castration decreases extracellular, but increases intracellular, dopamine in medial preoptic area of male rats. *Brain Res.* 782, 11–17.
- Edinger, K.L., Frye, C.A., 2007. Sexual experience of male rats influences anxiety-like behavior and androgen levels. *Physiol. Behav.* 92, 443–453. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.018
- Edinger, K.L., Frye, C.A., 2004. Testosterone's analgesic, anxiolytic, and cognitive-enhancing effects may be due in part to actions of its 5alpha-reduced metabolites in the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 118, 1352–1364. doi:10.1037/0735-7044.118.6.1352
- Edinger, K.L., Lee, B., Frye, C.A., 2004. Mnemonic effects of testosterone and its 5alpha-reduced metabolites in the conditioned fear and inhibitory avoidance tasks. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 559–568. doi:10.1016/j.pbb.2004.04.024
- Edwards, D.A., Thompson, M.L., Burge, K.G., 1972. Olfactory bulb removal vs peripherally induced anosmia: differential effects on the aggressive behavior of male mice. *Behav. Biol.* 7, 823–828.
- Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., Malinow, R., 2007. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 4176–4181. doi:10.1073/pnas.0609307104
- El-Din, M.M., Senbel, A.M., Daabees, T.T., Sharabi, F.M., 2007. Peripheral modulation of dopaminergic receptors affects erectile responses in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 100, 225–232. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.00013.x
- El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., Bredt, D.S., 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368.
- Elmore, M.R.P., Najafi, A.R., Koike, M.A., Dagher, N.N., Spangenberg, E.E., Rice, R.A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B.L., Green, K.N., 2014. CSF1 receptor signaling is necessary for microglia viability, which unmasks a cell that rapidly repopulates the microglia-depleted adult brain. *Neuron* 82, 380–397. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.040
- Erpino, M.J., 1973. Temporary inhibition by progesterone of sexual behavior in intact male mice. *Horm. Behav.* 4, 335–339. doi:10.1016/0018-506X(73)90033-0
- Errico, S., Shohreh, R., Barone, E., Pusateri, A., Mores, N., Mancuso, C., 2010. Heme oxygenase-derived carbon monoxide modulates gonadotropin-releasing hormone release in immortalized hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 471, 175–178. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.036
- Escasa, M.J., Casey, J.F., Gray, P.B., 2011. Salivary Testosterone Levels in Men at a U.S. Sex Club. *Arch. Sex. Behav.* 40, 921–926. doi:10.1007/s10508-010-9711-3
- Estep, D.Q., Lanier, D.L., Dewsbury, D.A., 1975. Copulatory behavior and nest building behavior of wild house mice (*Mus musculus*). *Anim. Learn. Behav.* 3, 329–336. doi:10.3758/BF03213455
- Estrada, M., Espinosa, A., Müller, M., Jaimovich, E., 2003. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 144, 3586–3597. doi:10.1210/en.2002-0164
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9287–9292.



- Ferguson, G.D., Anagnostaras, S.G., Silva, A.J., Herschman, H.R., 2000. Deficits in memory and motor performance in synaptotagmin IV mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5598–5603.
- Ferhat, A.-T., Torquet, N., Le Sourd, A.-M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Faure, P., Bourgeron, T., Ey, E., 2016. Recording Mouse Ultrasonic Vocalizations to Evaluate Social Communication. *J. Vis. Exp. JoVE*. doi:10.3791/53871
- Fernández-Guasti, A., Escalante, A.L., Ahlenius, S., Hillegaart, V., Larsson, K., 1992. Stimulation of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behaviour. *Eur. J. Pharmacol.* 210, 121–129.
- Fernandez-Guasti, A., Larsson, K., Beyer, C., 1986. Effect of bicuculline on sexual activity in castrated male rats. *Physiol. Behav.* 36, 235–237.
- Fernández-Guasti, A., Larsson, K., Beyer, C., 1986. GABAergic control of masculine sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 1065–1070. doi:10.1016/0091-3057(86)90456-9
- Ferrero, D.M., Moeller, L.M., Osakada, T., Horio, N., Li, Q., Roy, D.S., Cichy, A., Spehr, M., Touhara, K., Liberles, S.D., 2013. A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system. *Nature* 502, 368–371. doi:10.1038/nature12579
- Fester, L., Zhou, L., Bütow, A., Huber, C., von Lossow, R., Prange-Kiel, J., Jarry, H., Rune, G.M., 2009. Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus* 19, 692–705. doi:10.1002/hipo.20548
- Fiorino, D.F., Cury, A., Phillips, A.G., 1997. Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 4849–4855.
- Fiorino, D.F., Phillips, A.G., 1999. Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 456–463.
- Flanagan-Cato, L.M., 2011. Sex differences in the neural circuit that mediates female sexual receptivity. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 124–136. doi:10.1016/j.yfrne.2011.02.008
- Fleming, A.S., Kucera, C., 1991. Sexual experience effects are blocked both by the protein-synthesis inhibitor, cycloheximide, and by the noncompetitive NMDA antagonist, MK-801. *Behav. Neural Biol.* 56, 319–328.
- Fong TW 2006 Understanding and Managing Compulsive Sexual Behaviors. *Psychiatry (Edgmont)* 3 51–58.
- Foradori, C.D., Weiser, M.J., Handa, R.J., 2008. Non-genomic Actions of Androgens. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 169–181. doi:10.1016/j.yfrne.2007.10.005
- Foresta, C., Rossato, M., Mioni, R., Zorzi, M., 1992. Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 24, 33–35.
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
- Frohman KS, Wiskerke J, Wise RA, Lehman MN & Coolen LM 2010 Methamphetamine acts on subpopulations of neurons regulating sexual behavior in male rats. *Neuroscience* 166 771–784. (doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.070)
- Garcia FD & Thibaut F 2010 Sexual addictions. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 36 254–260. (doi:10.3109/00952990.2010.503823)
- Garellick, T., Swann, J., 2014. Testosterone regulates the density of dendritic spines in the male preoptic area. *Horm. Behav.* 65, 249–253. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.01.008
- Geerling, J.C., Shin, J.-W., Chimenti, P.C., Loewy, A.D., 2010. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J. Comp. Neurol.* 518, 1460–1499. doi:10.1002/cne.22283
- Gehart, H., Kumpf, S., Ittner, A., Ricci, R., 2010. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 11, 834–840. doi:10.1038/embor.2010.160
- Gil, M., Bhatt, R., Picotte, K.B., Hull, E.M., 2011. Oxytocin in the medial preoptic area facilitates male sexual behavior in the rat. *Horm. Behav.* 59, 435–443. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.12.012
- Gil, M., Bhatt, R., Picotte, K.G., Hull, E.M., 2013. SEXUAL EXPERIENCE INCREASES OXYTOCIN RECEPTOR GENE EXPRESSION AND PROTEIN IN THE MEDIAL

- PREOPTIC AREA OF THE MALE RAT. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1688–1697. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.02.002
- Giuliano, F., Allard, J., 2001. Dopamine and male sexual function. *Eur. Urol.* 40, 601–608.
- Giuliano, F., Rampin, O., Brown, K., Courtois, F., Benoit, G., Jardin, A., 1996. Stimulation of the medial preoptic area of the hypothalamus in the rat elicits increases in intracavernous pressure. *Neurosci. Lett.* 209, 1–4.
- Gladue, B.A., Clemens, L.G., 1980. Flutamide inhibits testosterone-induced masculine sexual behavior in male and female rats. *Endocrinology* 106, 1917–1922. doi:10.1210/endo-106-6-1917
- Glasper, E.R., Gould, E., 2013. Sexual experience restores age-related decline in adult neurogenesis and hippocampal function. *Hippocampus* 23, 303–312. doi:10.1002/hipo.22090
- Glasper, E.R., LaMarca, E.A., Bocarsly, M.E., Fasolino, M., Opendak, M., Gould, E., 2015. Sexual experience enhances cognitive flexibility and dendritic spine density in the medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 125, 73–79. doi:10.1016/j.nlm.2015.07.007
- Gombe, S., Hall, W.C., McEntee, K., Hansel, W., Pickett, B.W., 1973. Regulation of blood levels of LH in bulls: influence of age, breed, sexual stimulation and temporal fluctuations. *J. Reprod. Fertil.* 35, 493–503.
- Goto, A., Nakahara, I., Yamaguchi, T., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Matsuda, M., Nakanishi, S., Funabiki, K., 2015. Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6718–6723. doi:10.1073/pnas.1507121112
- Gouyon, P.-H., 2009. Aux origines de la sexualité. Fayard.
- Gouyon P-H, Giraud T, 2009a. Le sexe et l'évolution. *Mondes Darwiniens Sci. L'évolution Aujourd'hui.*
- Gouyon P-H, Giraud T, 2009b. Tout est-il vraiment pour le mieux dans le meilleur des mondes sexués?
- Guevara-Guzman, R., Emson, P.C., Kendrick, K.M., 1994. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J. Neurochem.* 62, 807–810.
- Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., Muñoz, F.J., 2005. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76, 126–152. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.001
- Gupta, D., Zarzycki, J., Rager, K., 1975. Plasma testosterone and dihydrotestosterone in male rats during sexual maturation and following orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism. *Steroids* 25, 33–42. doi:10.1016/S0039-128X(75)80005-5
- Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., Lubin, F.D., 2010. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 3589–3599. doi:10.1523/JNEUROSCI.3732-09.2010
- Hamilton, W.D., Axelrod, R., Tanese, R., 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3566–3573.
- Handa, R.J., Kerr, J.E., DonCarlos, L.L., McGivern, R.F., Hejna, G., 1996. Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39, 57–67.
- Hardingham, N., Dachtler, J., Fox, K., 2013. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 190. doi:10.3389/fncel.2013.00190
- Harris, E.P., Abel, J.M., Tejada, L.D., Rissman, E.F., 2016. Calbindin Knockout Alters Sex-Specific Regulation of Behavior and Gene Expression in Amygdala and Prefrontal Cortex. *Endocrinology* 157, 1967–1979. doi:10.1210/en.2016-1055
- Harris, K.M., Jensen, F.E., Tsao, B., 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J. Neurosci.* 1992 Aug;12(8):following table of contents]. *J. Neurosci.* 12, 2685–2705.
- Harris, M.E., Bartke, A., Weisz, J., Watson, D., 1977. Effects of Testosterone and Dihydrotestosterone on Spermatogenesis, Rete Testis Fluid, and Peripheral Androgen Levels in Hypophysectomized Rats\*. *Fertil. Steril.* 28, 1113–1117. doi:10.1016/S0015-0282(16)42865-7
- Hart, B.L., 1968. Role of prior experience in the effects of castration on sexual behavior of male dogs. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66, 719–725.

- Hayashi, S., Kimura, T., 1974. Sex-attractant emitted by female mice. *Physiol. Behav.* 13, 563–567. doi:10.1016/0031-9384(74)90287-X
- He, Z., Ferguson, S.A., Cui, L., Greenfield, L.J., Paule, M.G., 2013. Development of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and the influence of estrogen-like compounds. *Neural Regen. Res.* 8, 2763–2774. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.29.008
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2007. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* 87, 905–931. doi:10.1152/physrev.00026.2006
- Heller, C.G., Laidlaw, W.M., Harvey, H.T., Nelson, W.O., 1958. Effects of progestational compounds on the reproductive processes of the human male. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 71, 649–665.
- Hering, H., Sheng, M., 2001. Dendritic spines : structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 880–888. doi:10.1038/35104061
- Herman, M.A., Ackermann, F., Trimbuch, T., Rosenmund, C., 2014. Vesicular Glutamate Transporter Expression Level Affects Synaptic Vesicle Release Probability at Hippocampal Synapses in Culture. *J. Neurosci.* 34, 11781–11791. doi:10.1523/JNEUROSCI.1444-14.2014
- Holy, T.E., Guo, Z., 2005. Ultrasonic Songs of Male Mice. *PLOS Biol.* 3, e386. doi:10.1371/journal.pbio.0030386
- Horio, T., Shimura, T., Hanada, M., Shimokochi, M., 1986. Multiple unit activities recorded from the medial preoptic area during copulatory behavior in freely moving male rats. *Neurosci. Res.* doi:10.1016/0168-0102(86)90023-4
- Hosogane, M., Funayama, R., Shirota, M., Nakayama, K., 2016. Lack of Transcription Triggers H3K27me3 Accumulation in the Gene Body. *Cell Rep.* 16, 696–706. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.034
- Huddleston, G.G., Paisley, J.C., Graham, S., Grober, M.S., Clancy, A.N., 2007. Implants of estradiol conjugated to bovine serum albumin in the male rat medial preoptic area promote copulatory behavior. *Neuroendocrinology* 86, 249–259. doi:10.1159/000107695
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2007. SEXUAL BEHAVIOR IN MALE RODENTS. *Horm. Behav.* 52, 45–55. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.030
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2006. Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res., Sex, Genes and Steroids* 1126, 66–75. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.031
- Hull, E.M., Du, J., Lorrain, D.S., Matuszewich, L., 1997. Testosterone, Preoptic Dopamine, and Copulation in Male Rats. *Brain Res. Bull.* 44, 327–333. doi:10.1016/S0361-9230(97)00211-6
- Hull, E.M., Du, J., Lorrain, D.S., Matuszewich, L., 1995. Extracellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 7465–7471.
- Hull, E.M., Lorrain, D.S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L.A., Putnam, S.K., Moses, J., 1999. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 105, 105–116. doi:10.1016/S0166-4328(99)00086-8
- Hull, E.M., Lumley, L.A., Matuszewich, L., Dominguez, J., Moses, J., Lorrain, D.S., 1994. The roles of nitric oxide in sexual function of male rats. *Neuropharmacology* 33, 1499–1504.
- Hull, E.M., Meisel, R.L., Sachs, B.D., 2002. 1 - Male Sexual Behavior A2 - Pfaff, Donald W., in: Arnold, A.P., Fahrbach, S.E., Etgen, A.M., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 3–137.
- Hull, E.M., Muschamp, J.W., Sato, S., 2004. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol. Behav.* 83, 291–307. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.018
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., Fukuuchi, Y., 2001. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32, 1208–1215.
- James, P.J., Nyby, J.G., 2002. Testosterone rapidly affects the expression of copulatory behavior in house mice (*Mus musculus*). *Physiol. Behav.* 75, 287–294.
- Johansen, J.A., Clemens, L.G., Nunez, A.A., 2008. Characterization of Copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating. *Physiol. Behav.* 95, 425–429. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.004

- Kamel, F., Mock, E.J., Wright, W.W., Frankel, A.I., 1975. Alterations in plasma concentrations of testosterone, LH, and prolactin associated with mating in the male rat. *Horm. Behav.* 6, 277–288. doi:10.1016/0018-506X(75)90014-8
- Kanasaki, H., Purwana, I., Oride, A., Mijiddorj, T., Miyazaki, K., 2011. Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 Induction by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone in Pituitary Gonadotrophs. *J. Signal Transduct.* 2012, e198527. doi:10.1155/2012/198527
- Karlson, P., Luscher, M., 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55–56.
- Keith, D.J., El-Husseini, A., 2008. Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse. *Front. Mol. Neurosci.* 1. doi:10.3389/neuro.02.004.2008
- Kelleher, R.J., Govindarajan, A., Jung, H.-Y., Kang, H., Tonegawa, S., 2004. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116, 467–479.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006. Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate--lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem. Senses* 31, 753–762. doi:10.1093/chemse/bjl018
- Kim, M.J., Futai, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K., Sheng, M., 2007. Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56, 488–502. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.007
- Kirchner, L., Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Url, A., Schmidt, P., Engelmann, M., Villar, S.R., Fountoulakis, M., Lubec, G., Lubec, B., 2004. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric Oxide* 11, 316–330. doi:10.1016/j.niox.2004.10.005
- Kocsis, K., Kiss, J., Csáki, A., Halász, B., 2003. Location of putative glutamatergic neurons projecting to the medial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 61, 459–468.
- Krueger RB 2016 Diagnosis of hypersexual or compulsive sexual behavior can be made using ICD-10 and DSM-5 despite rejection of this diagnosis by the American Psychiatric Association. *Addiction* 111 2110–2111. (doi:10.1111/add.13366)
- Lagoda, G., Muschamp, J.W., Vighorchik, A., Hull, E.M., 2004. A nitric oxide synthesis inhibitor in the medial preoptic area inhibits copulation and stimulus sensitization in male rats. *Behav. Neurosci.* 118, 1317–1323. doi:10.1037/0735-7044.118.6.1317
- Lannigan, D.A., 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1–9.
- Laredo, S.A., Villalon Landeros, R., Trainor, B.C., 2014. Rapid effects of estrogens on behavior: Environmental modulation and molecular mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 447–458. doi:10.1016/j.yfrne.2014.03.005
- Larriva-Sahd, J., 1991. Ultrastructural Evidence of a Sexual Dimorphism in the Neuropil of the Medial Preoptic Nucleus of the Rat: A Quantitative Study. *Neuroendocrinology* 54, 416–419. doi:10.1159/000125923
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 413–426. doi:10.1038/nrn2153
- Lauber, A.H., Romano, G.J., Pfaff, D.W., 1991. Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 53–62.
- Lee, S.J., Romeo, R.D., Svenningsson, P., Campomanes, C.R., Allen, P.B., Greengard, P., McEwen, B.S., 2004. Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females. *Neuroscience* 127, 983–988. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.049
- Lefloch, R., Pouysségur, J., Lenormand, P., 2008. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol. Cell. Biol.* 28, 511–527. doi:10.1128/MCB.00800-07
- Lenz, K.M., McCarthy, M.M., 2015. A starring role for microglia in brain sex differences. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 21, 306–321. doi:10.1177/1073858414536468
- Lenz, K.M., Nugent, B.M., Haliyur, R., McCarthy, M.M., 2013. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2761–2772. doi:10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013

- Leray, C., 2012. Introduction to lipidomics: From Bacteria to Man. CRC Press
- Leuner, B., Glasper, E.R., Gould, E., 2010. Sexual Experience Promotes Adult Neurogenesis in the Hippocampus Despite an Initial Elevation in Stress Hormones. *PLOS ONE* 5, e11597. doi:10.1371/journal.pone.0011597
- Leuner, B., Shors, T.J., 2004. New Spines, New Memories. *Mol. Neurobiol.* 29, 117–130. doi:10.1385/MN:29:2:117
- Li, C., Brake, W.G., Romeo, R.D., Dunlop, J.C., Gordon, M., Buzescu, R., Magarinos, A.M., Allen, P.B., Greengard, P., Luine, V., McEwen, B.S., 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2185–2190. doi:10.1073/pnas.0307313101
- Li, M., Masugi-Tokita, M., Takanami, K., Yamada, S., Kawata, M., 2012. Testosterone has sublayer-specific effects on dendritic spine maturation mediated by BDNF and PSD-95 in pyramidal neurons in the hippocampus CA1 area. *Brain Res.* 1484, 76–84. doi:10.1016/j.brainres.2012.09.028
- Li, M.W.M., Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2009. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. *Trends Mol. Med.* 15, 159–168. doi:10.1016/j.molmed.2009.02.002
- Li, X., Higley, A., Song, R., Xi, Z.-X., 2013. Effects of metabotropic glutamate receptor ligands on male sexual behavior in rats. *Neuropharmacology* 66, 373–381. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.08.006
- Liao, R.S., Ma, S., Miao, L., Li, R., Yin, Y., Raj, G.V., 2013. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl. Androl. Urol.* 2, 187–196. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07
- Liu, Y.-F., Chen, H., Yu, L., Kuo, Y.-M., Wu, F.-S., Chuang, J.-I., Liao, P.-C., Jen, C.J., 2008. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 81–89. doi:10.1016/j.nlm.2008.02.005
- Lodé, T., 2011. Biodiversité amoureuse (La): Sexe et évolution. Odile Jacob.
- Lorenz, 1950. The comparative method in studying innate behavior patterns.
- Lorrain, D.S., Matuszewich, L., Friedman, R.D., Hull, E.M., 1997. Extracellular Serotonin in the Lateral Hypothalamic Area Is Increased during the Postejaculatory Interval and Impairs Copulation in Male Rats. *J. Neurosci.* 17, 9361–9366.
- Lorrain, D.S., Matuszewich, L., Howard, R.V., Du, J., Hull, E.M., 1996. Nitric oxide promotes medial preoptic dopamine release during male rat copulation. *Neuroreport* 8, 31–34.
- Losi, G., Prybylowski, K., Fu, Z., Luo, J., Wenthold, R.J., Vicini, S., 2003. PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat. *J. Physiol.* 548, 21–29. doi:10.1113/jphysiol.2002.034918
- Lugg, J.A., Rajfer, J., González-Cadavid, N.F., 1995. Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology* 136, 1495–1501. doi:10.1210/endo.136.4.7534702
- Lumley, L.A., Hull, E.M., 1999. Effects of a D1 antagonist and of sexual experience on copulation-induced Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic nucleus. *Brain Res.* 829, 55–68.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. doi:10.1101/cshperspect.a005710
- MacCalman, C.D., Getsios, S., Farookhi, R., Blaschuk, O.W., 1997. Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 138, 41–48. doi:10.1210/endo.138.1.4831
- Mahmoud, R.R., Sase, S., Aher, Y.D., Sase, A., Gröger, M., Mokhtar, M., Höger, H., Lubec, G., 2015. Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines. *PloS One* 10, e0139739. doi:10.1371/journal.pone.0139739
- Maiti, P., Manna, J., Ilavazhagan, G., Rossignol, J., Dunbar, G.L., 2015. Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 59, 208–237. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.09.020

- Malisch, J.L., Saltzman, W., Gomes, F.R., Rezende, E.L., Jeske, D.R., Garland, T., Jr, 2007. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *Physiol. Biochem. Zool.* PBZ 80, 146–156.
- Mallet, J., 2010. Group selection and the development of the biological species concept. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1853–1863. doi:10.1098/rstb.2010.0040
- Mallick, H., Manchanda, S.K., Kumar, V.M., 1996. beta-adrenergic modulation of male sexual behavior elicited from the medial preoptic area in rats. *Behav. Brain Res.* 74, 181–187.
- Malmnäs, C.O., 1977. Short-latency effect of testosterone on copulatory behaviour and ejaculation in sexually experienced intact male rats. *J. Reprod. Fertil.* 51, 351–354.
- Malsbury, C.W., 1971. Facilitation of male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. *Physiol. Behav.* 7, 797–805. doi:10.1016/0031-9384(71)90042-4
- Mancuso, C., Navarra, P., Preziosi, P., 2010. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Neurochem.* 113, 563–575. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06606.x
- Mandiyani, V.S., Coats, J.K., Shah, N.M., 2005. Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat. Neurosci.* 8, 1660–1662. doi:10.1038/nn1589
- Maruniak, J.A., Bronson, F.H., 1976. Gonadotropic responses of male mice to female urine. *Endocrinology* 99, 963–969. doi:10.1210/endo-99-4-963
- Mathew, V., Bantwal, G., 2012. Male contraception. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16, 910–917. doi:10.4103/2230-8210.102991
- Mayer, M.L., 2005. Glutamate receptor ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 282–288. doi:10.1016/j.conb.2005.05.004
- McCarthy, M.M., Amateau, S.K., Mong, J.A., 2002. Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. *Biol. Reprod.* 67, 691–698.
- McCarthy, M.M., Pickett, L.A., VanRyzin, J.W., Kight, K.E., 2015. Surprising origins of sex differences in the brain. *Horm. Behav., Annual Conference SBN 2014* 76, 3–10. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.04.013
- McGill, T.E., 1962. Sexual Behavior in Three Inbred Strains of Mice. *Behaviour* 19, 341–350. doi:10.1163/156853962X00087
- McGill, T.E., Blight, W.C., 1963. Effects of genotype on the recovery in the male mouse. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 56, 887–888.
- McGill, T.E., Ransom, T.W., 1968. Genotypic change affecting conclusions regarding the mode of inheritance of elements of behaviour. *Anim. Behav.* 16, 88–91.
- McGill, T.E., Tucker, G.R., 1964. Genotype and sex drive in intact and in castrated male mice. *Science* 145, 514–515.
- McGinnis, M.Y., Dreifuss, R.M., 1989. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology* 124, 618–626. doi:10.1210/endo-124-2-618
- McGinnis, M.Y., Kahn, D.F., 1997. Inhibition of male sexual behavior by intracranial implants of the protein synthesis inhibitor anisomycin into the medial preoptic area of the rat. *Horm. Behav.* 31, 15–23. doi:10.1006/hbeh.1997.1367
- McGinnis, M.Y., Williams, G.W., Lumia, A.R., 1996. Inhibition of male sex behavior by androgen receptor blockade in preoptic area or hypothalamus, but not amygdala or septum. *Physiol. Behav.* 60, 783–789. doi:10.1016/0031-9384(96)00088-1
- McHenry, J.A., Bell, G.A., Parrish, B.P., Hull, E.M., 2012a. Dopamine D1 receptors and phosphorylation of dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein-32 in the medial preoptic area are involved in experience-induced enhancement of male sexual behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 126, 523–529. doi:10.1037/a0028707
- McHenry, J.A., Bell, G.A., Parrish, B.P., Hull, E.M., 2012b. Dopamine D1 Receptor Signaling in the Medial Preoptic Area Facilitates Experience-induced Enhancement of Mating Behavior in Male Rats. *Behav. Neurosci.* 126, 523–529. doi:10.1037/a0028707
- McIntosh, T.K., Barfield, R.J., 1984a. Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. I. Serotonin and the post-ejaculatory refractory period. *Behav. Brain Res.* 12, 255–265.

- McIntosh, T.K., Barfield, R.J., 1984b. Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. III. Norepinephrine and the post-ejaculatory refractory period. *Behav. Brain Res.* 12, 275–281.
- Meachem, S.J., Schlatt, S., Ruwanpura, S.M., Stanton, P.G., 2007. The effect of testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol on the re-initiation of spermatogenesis in the adult photoinhibited Djungarian hamster. *J. Endocrinol.* 192, 553–561. doi:10.1677/JOE-06-0136
- Melis, M.R., Argiolas, A., 1995. Dopamine and sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 19–38. doi:10.1016/0149-7634(94)00020-2
- Melis, M.R., Melis, T., Cocco, C., Succu, S., Sanna, F., Pillolla, G., Boi, A., Ferri, G.-L., Argiolas, A., 2007. Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1026–1035. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05721.x
- Mellone, M., Stanic, J., Hernandez, L.F., Iglesias, E., Zianni, E., Longhi, A., Prigent, A., Picconi, B., Calabresi, P., Hirsch, E.C., Obeso, J.A., Di Luca, M., Gardoni, F., 2015. NMDA receptor GluN2A/GluN2B subunit ratio as synaptic trait of levodopa-induced dyskinesias: from experimental models to patients. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fncel.2015.00245
- Mendelson, S.D., Pfaus, J.G., 1989. Level searching: a new assay of sexual motivation in the male rat. *Physiol. Behav.* 45, 337–341.
- Menendez-Patterson, A., Florez-Lozano, J., Fernandez, S., Marin, B., 1980. Stress and sexual behavior in male rats. *Physiol. Behav.* 24. doi:10.1016/0031-9384(80)90106-7
- Merari, A., Ginton, A., 1975. Characteristics of exaggerated sexual behavior induced by electrical stimulation of the medial preoptic area in male rats. *Brain Res.* 86, 97–108.
- Micevych, P., Dominguez, R., 2009. Membrane estradiol signaling in the brain. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 315–327. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.011
- Micevych, P.E., Kelly, M.J., 2012. Membrane estrogen receptor regulation of hypothalamic function. *Neuroendocrinology* 96, 103–110. doi:10.1159/000338400
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M.V., Ametrano, D., Zannini, M.S., Abbondanza, C., Auricchio, F., 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 19, 5406–5417. doi:10.1093/emboj/19.20.5406
- Mogenson, G.J., Swanson, L.W., Wu, M., 1983. Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 3, 189–202.
- Moncho-Bogani, J., Martinez-Garcia, F., Novejarque, A., Lanuza, E., 2005. Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2186–2198. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04036.x
- Moralí, G., Asunción Pía Soto, M., Luis Contreras, J., Arteaga, M., González-Vidal, M.D., Beyer, C., 2003. Detailed analysis of the male copulatory motor pattern in mammals: hormonal bases. *Scand. J. Psychol.* 44, 279–288.
- Morin, L.P., Studholme, K.M., 2014. Retinofugal Projections in the Mouse. *J. Comp. Neurol.* 522, 3733–3753. doi:10.1002/cne.23635
- Mos, J., Mollet, I., Tolboom, J.T., Waldinger, M.D., Olivier, B., 1999. A comparison of the effects of different serotonin reuptake blockers on sexual behaviour of the male rat. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 9, 123–135.
- Mosig, D.W., Dewsbury, D.A., 1976. Studies of the copulatory behavior of house mice (*Mus musculus*). *Behav. Biol.* 16, 463–473.
- Muller, H.J., 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* 106, 2–9.
- Muller, H.J., 1932. Some Genetic Aspects of Sex. *Am. Nat.* 66, 118–138.
- Nakagawa, K., Iwasaki, A., Oishi, Y., Horisaki, R., Tsukamoto, A., Nakamura, A., Hirosawa, K., Liao, H., Ushida, T., Goda, K., Kannari, F., Sakuma, I., 2014. Sequentially timed all-optical mapping photography (STAMP). *Nat. Photonics* 8, 695–700. doi:10.1038/nphoton.2014.163

- Nakhla, A.M., Leonard, J., Hryb, D.J., Rosner, W., 1999. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids* 64, 213–216.
- Naulé, L., Marie-Luce, C., Parmentier, C., Martini, M., Albac, C., Trouillet, A.-C., Keller, M., Hardin-Pouzet, H., Mhaouty-Kodja, S., 2016. Revisiting the neural role of estrogen receptor beta in male sexual behavior by conditional mutagenesis. *Horm. Behav.* 80, 1–9. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.01.014
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O’Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., Kouzarides, T., 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561–565. doi:10.1038/35087620
- Nieschlag, E., Nieschlag, S., 2014. Testosterone deficiency: a historical perspective. *Asian J. Androl.* 16, 161–168. doi:10.4103/1008-682X.122358
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K., 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–353. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008
- Nocjar, C., Panksepp, J., 2002. Chronic intermittent amphetamine pretreatment enhances future appetitive behavior for drug- and natural-reward: interaction with environmental variables. *Behav. Brain Res.* 128, 189–203.
- Nutsch, V.L., Will, R.G., Robison, C.L., Martz, J.R., Tobiansky, D.J., Dominguez, J.M., 2016. Colocalization of Mating-Induced Fos and D2-Like Dopamine Receptors in the Medial Preoptic Area: Influence of Sexual Experience. *Front. Behav. Neurosci.* 10. doi:10.3389/fnbeh.2016.00075
- Nyby, J.G., 2008. Reflexive Testosterone Release: A Model System for Studying the Nongenomic Effects of Testosterone Upon Male Behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 199–210. doi:10.1016/j.yfrne.2007.09.001
- O’Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 22, 289–318. doi:10.1210/edrv.22.3.0431
- Oettel, M., Mukhopadhyay, A.K., 2004. Progesterone: the forgotten hormone in men? *Aging Male Off. J. Int. Soc. Study Aging Male* 7, 236–257.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y., Kohsaka, S., 2000. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 17), 3073–3084.
- Ondo, J.G., Pass, K.A., Baldwin, R., 1976. The effects of neurally active amino acids on pituitary gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology* 21, 79–87.
- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B.S., Sakuma, Y., 2002. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor  $\beta$  in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: Implication in luteinizing hormone surge. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3306–3311. doi:10.1073/pnas.052707299
- Orikasa, C., Sakuma, Y., 2010. Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J. Comp. Neurol.* 518, 3618–3629. doi:10.1002/cne.22419
- Otto, S.P., Lenormand, T., 2002. Resolving the paradox of sex and recombination. *Nat. Rev. Genet.* 3, 252–261. doi:10.1038/nrg761
- Pak, D.T.S., Yang, S., Rudolph-Correia, S., Kim, E., Sheng, M., 2001. Regulation of Dendritic Spine Morphology by SPAR, a PSD-95-Associated RapGAP. *Neuron* 31, 289–303. doi:10.1016/S0896-6273(01)00355-5
- Pankevich, D.E., Baum, M.J., Cherry, J.A., 2004. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9451–9457. doi:10.1523/JNEUROSCI.2376-04.2004
- Panthier, J.-J.A., 2003. *Génétique de la souris : les organismes modèles*. Belin. Paris.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Sica, M., Gotti, S., Martini, M., Pinos, H., Carrillo, B., Collado, P., 2006. Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience* 138, 987–995. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.07.052
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. doi:10.1038/nrn3504
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic pruning by



- microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458. doi:10.1126/science.1202529
- Paradiso, K., Zhang, J., Steinbach, J.H., 2001. The C terminus of the human nicotinic alpha4beta2 receptor forms a binding site required for potentiation by an estrogenic steroid. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6561–6568.
- Paredes, R.G., 2003. Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand. J. Psychol.* 44, 203–212. doi:10.1111/1467-9450.00337
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.-B., 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell* 155, 1596–1609. doi:10.1016/j.cell.2013.11.030
- Pasternak, J.F., Woolsey, T.A., 1975. On the “selectivity” of the Golgi-Cox method. *J. Comp. Neurol.* 160, 307–312. doi:10.1002/cne.901600304
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing.
- Pednekar, J.R., Mulgaonker, V.K., 1995. Role of testosterone on pain threshold in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39, 423–424.
- Peirce, J.T., Nuttall, R.L., 1961. Duration of sexual contacts in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 54, 585–587. doi:10.1037/h0047468
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ren, B., 2010. ERK in Learning and Memory: A Review of Recent Research. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 222–232. doi:10.3390/ijms11010222
- Perkins, A., Roselli, C.E., 2007. The Ram as a Model for Behavioral Neuroendocrinology. *Horm. Behav.* 52, 70–77. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.016
- Peters, A.D., Otto, S.P., 2003. Liberating genetic variance through sex. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 533–537. doi:10.1002/bies.10291
- Petersen, S.L., McCrone, S., Keller, M., Gardner, E., 1991. Rapid increase in LHRH mRNA levels following NMDA. *Endocrinology* 129, 1679–1681. doi:10.1210/endo-129-3-1679
- Pfaff, D.W., Joels, M., 2016. *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press.
- Pfaff, D.W., Kow, L.-M., Loose, M.D., Flanagan-Cato, L.M., 2008. Reverse engineering the lordosis behavior circuit. *Horm. Behav.* 54, 347–354. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.03.012
- Pfaus, J.G., 1996. Frank A. Beach award. Homologies of animal and human sexual behaviors. *Horm. Behav.* 30, 187–200. doi:10.1006/hbeh.1996.0024
- Pfaus, J.G., Damsma, G., Nomikos, G.G., Wenkstern, D.G., Blaha, C.D., Phillips, A.G., Fibiger, H.C., 1990. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res.* 530, 345–348.
- Pfaus, J.G., Kippin, T.E., Centeno, S., 2001. Conditioning and sexual behavior: a review. *Horm. Behav.* 40, 291–321. doi:10.1006/hbeh.2001.1686
- Pfaus, J.G., Phillips, A.G., 1989. Differential effects of dopamine receptor antagonists on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 98, 363–368.
- Phelps, S.M., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Crews, D., 1998. Regulation of Male Sexual Behavior by Progesterone Receptor, Sexual Experience, and Androgen. *Horm. Behav.* 34, 294–302. doi:10.1006/hbeh.1998.1485
- Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A., Young, W.C., 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65, 369–382. doi:10.1210/endo-65-3-369
- Picot, M., Naulé, L., Marie-Luce, C., Martini, M., Raskin, K., Grange-Messent, V., Franceschini, I., Keller, M., Mhaouty-Kodja, S., 2014. Vulnerability of the neural circuitry underlying sexual behavior to chronic adult exposure to oral bisphenol a in male mice. *Endocrinology* 155, 502–512. doi:10.1210/en.2013-1639
- Ping, L., Mahesh, V.B., Brann, D.W., 1995. Effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on pulsatile luteinizing hormone secretion in the adult male rat. *Neuroendocrinology* 61, 226–234.
- Pitchers, K.K., Balfour, M.E., Lehman, M.N., Richtand, N.M., Yu, L., Coolen, L.M., 2010a. Neuroplasticity in the mesolimbic system induced by natural reward and subsequent reward abstinence. *Biol. Psychiatry* 67, 872–879. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.036

- Pitchers, K.K., Di Sebastiano, A.R., Coolen, L.M., 2016. mGluR5 activation in the nucleus accumbens is not essential for sexual behavior or cross-sensitization of amphetamine responses by sexual experience. *Neuropharmacology* 107, 122–130. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.002
- Pitchers, K.K., Frohmader, K.S., Vialou, V., Mouzon, E., Nestler, E.J., Lehman, M.N., Coolen, L.M., 2010b. DeltaFosB in the nucleus accumbens is critical for reinforcing effects of sexual reward. *Genes Brain Behav.* 9, 831–840. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00621.x
- Pitchers, K.K., Schmid, S., Di Sebastiano, A.R., Wang, X., Laviolette, S.R., Lehman, M.N., Coolen, L.M., 2012. Natural Reward Experience Alters AMPA and NMDA Receptor Distribution and Function in the Nucleus Accumbens. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034700
- Politis, M., Loane, C., Wu, K., O’Sullivan, S.S., Woodhead, Z., Kiferle, L., Lawrence, A.D., Lees, A.J., Piccini, P., 2013. Neural response to visual sexual cues in dopamine treatment-linked hypersexuality in Parkinson’s disease. *Brain J. Neurol.* 136, 400–411. doi:10.1093/brain/aws326
- Powell, W.S., Dominguez, J.M., Hull, E.M., 2003. An NMDA antagonist impairs copulation and the experience-induced enhancement of male sexual behavior in the rat. *Behav. Neurosci.* 117, 69–75.
- Purvis, K., Haynes, N.B., 1978. Effect of the odour of female rat urine on plasma testosterone concentrations in male rats. *J. Reprod. Fertil.* 53, 63–65.
- Putnam, S.K., Du, J., Sato, S., Hull, E.M., 2001. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm. Behav.* 39, 216–224. doi:10.1006/hbeh.2001.1648
- Putnam, S.K., Sato, S., Hull, E.M., 2003. Effects of testosterone metabolites on copulation and medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm. Behav.* 44, 419–426.
- Quiring, 1944. Transplantation of testes (by A. A. Bethold).
- Qureshi, G.A., Södersten, P., 1986. Sexual activity alters the concentration of amino acids in the cerebrospinal fluid of male rats. *Neurosci. Lett.* 70, 374–378.
- Rahman, F., Christian, H.C., 2007. Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 371–378. doi:10.1016/j.tem.2007.09.004
- Rahman, M., Lindblad, C., Johansson, I.-M., Bäckström, T., Wang, M.-D., 2006. Neurosteroid modulation of recombinant rat alpha5beta2gamma2L and alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors in *Xenopus* oocyte. *Eur. J. Pharmacol.* 547, 37–44. doi:10.1016/j.ejphar.2006.07.039
- Rajfer, J., 2000. Relationship Between Testosterone and Erectile Dysfunction. *Rev. Urol.* 2, 122–128.
- Ramos, J.W., 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2707–2719. doi:10.1016/j.biocel.2008.04.009
- Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., Mhaouty-Kodja, S., 2009. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4461–4470. doi:10.1523/JNEUROSCI.0296-09.2009
- Rastogi, R.K., Milone, M., Chieffi, G., 1981. Impact of socio-sexual conditions on the epididymis and fertility in the male mouse. *J. Reprod. Fertil.* 63, 331–334. doi:10.1530/jrf.0.0630331
- Restrepo, D., Arellano, J., Oliva, A.M., Schaefer, M.L., Lin, W., 2004. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm. Behav.* 46, 247–256. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.02.009
- Ridley, M., 2000. *The Cooperative Gene: How Mendel’s Demon Explains the Evolution of Complex Beings.* Simon and Schuster.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 140, 1–47.
- Risher, W.C., Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J., Eroglu, C., 2014. Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0107591
- Riters, L.V., Pawlisch, B.A., Kelm-Nelson, C.A., Stevenson, S.A., 2014. Inverted-U shaped effects of D1 dopamine receptor stimulation in the medial preoptic nucleus on sexually-motivated song in male European starlings. *Eur. J. Neurosci.* 39, 650–662. doi:10.1111/ejn.12429

- Rizvi, T.A., Murphy, A.Z., Ennis, M., Behbehani, M.M., Shipley, M.T., 1996. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. *J. Neurosci.* 16, 333–344.
- Robison, C.L., McHenry, J.A., Hull, E.M., 2017. Increased expression of carbon monoxide-producing enzymes in the MPOA after sexual experience in male rats. *Physiol. Behav.* 171, 149–157. doi:10.1016/j.physbeh.2017.01.016
- Rodríguez-Manzo, G., Pellicer, F., Larsson, K., Fernández-Guasti, A., 2000. Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation. *Behav. Neurosci.* 114, 553–560.
- Roh, T.-Y., Cuddapah, S., Cui, K., Zhao, K., 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15782–15787. doi:10.1073/pnas.0607617103
- Romano-Torres, M., Phillips-Farfán, B.V., Chavira, R., Rodríguez-Manzo, G., Fernández-Guasti, A., 2007. Relationship between sexual satiety and brain androgen receptors. *Neuroendocrinology* 85, 16–26. doi:10.1159/000099250
- Roselli, C.E., Cross, E., Poonyagariyagorn, H.K., Stadelman, H.L., 2003. Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 44, 146–151. doi:10.1016/S0018-506X(03)00123-5
- Rosenblatt, J.S., Aronson, L.R., 1958. The Decline of Sexual Behavior in Male Cats After Castration With Special Reference To the Role of Prior Sexual Experience. *Behaviour* 12, 285–338. doi:10.1163/156853958X00019
- Rowland, D.L., Houtsmuller, E.J., 1998. 8-OH-DPAT interacts with sexual experience and testosterone to affect ejaculatory response in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 143–149.
- Rubin, H.B., Azrin, N.H., 1967. Temporal patterns of sexual behavior in rabbits as determined by an automatic recording technique. *J. Exp. Anal. Behav.* 10, 219–231. doi:10.1901/jeab.1967.10-219
- Russell, N.V., Ogaga-Mgbonyebi, E.V., Habteab, B., Dunigan, A.I., Tesfay, M.A., Clancy, A.N., 2012. Sexual responses of the male rat medial preoptic area and medial amygdala to estrogen II: Site specific effects of selective estrogenic drugs. *Horm. Behav.* 62, 58–66. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.04.017
- Sakata, J.T., Gonzalez-Lima, F., Gupta, A., Crews, D., 2002. Repeated interactions with females elevate metabolic capacity in the limbic system of male rats. *Brain Res.* 936, 27–37.
- Sala, C., Segal, M., 2014. Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol. Rev.* 94, 141–188. doi:10.1152/physrev.00012.2013
- Sano, K., Tsuda, M.C., Musatov, S., Sakamoto, T., Ogawa, S., 2013. Differential effects of site-specific knockdown of estrogen receptor  $\alpha$  in the medial amygdala, medial pre-optic area, and ventromedial nucleus of the hypothalamus on sexual and aggressive behavior of male mice. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1308–1319. doi:10.1111/ejn.12131
- Sato, S., Braham, C.S., Putnam, S.K., Hull, E.M., 2005. Neuronal nitric oxide synthase and gonadal steroid interaction in the MPOA of male rats: co-localization and testosterone-induced restoration of copulation and nNOS-immunoreactivity. *Brain Res.* 1043, 205–213. doi:10.1016/j.brainres.2005.02.074
- Sato, S.M., Hull, E.M., 2006. The nitric oxide-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway regulates dopamine efflux in the medial preoptic area and copulation in male rats. *Neuroscience* 139, 417–428. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.019
- Sato, Y., Horita, H., Kurohata, T., Adachi, H., Tsukamoto, T., 1998. Effect of the nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behavior in rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274, R243–R247.
- Scaletta, L.L., Hull, E.M., 1990. Systemic or intracranial apomorphine increases copulation in long-term castrated male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 471–475.
- Schmitt, J.M., Wayman, G.A., Nozaki, N., Soderling, T.R., 2004. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J. Biol. Chem.* 279, 24064–24072. doi:10.1074/jbc.M401501200
- Schulster, M., Bernie, A.M., Ramasamy, R., 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J. Androl.* 18, 435–440. doi:10.4103/1008-682X.173932

- Schwaller, B., 2010. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. doi:10.1101/cshperspect.a004051
- Selcher, J.C., Atkins, C.M., Trzaskos, J.M., Paylor, R., Sweatt, J.D., 1999. A Necessity for MAP Kinase Activation in Mammalian Spatial Learning. *Learn. Mem.* 6, 478–490.
- Sengoku, T., Yokoyama, S., 2011. Structural basis for histone H3 Lys 27 demethylation by UTX/KDM6A. *Genes Dev.* 25, 2266–2277. doi:10.1101/gad.172296.111
- Sequeira, S.M., Ambrósio, A.F., Malva, J.O., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., 1997. Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 1, 315–329. doi:10.1006/niox.1997.0144
- Seredynski, A.L., Balthazart, J., Ball, G.F., Cornil, C.A., 2015. Estrogen Receptor  $\beta$  Activation Rapidly Modulates Male Sexual Motivation through the Transactivation of Metabotropic Glutamate Receptor 1a. *J. Neurosci.* 35, 13110–13123. doi:10.1523/JNEUROSCI.2056-15.2015
- Seredynski, A.L., Balthazart, J., Christophe, V.J., Ball, G.F., Cornil, C.A., 2013. Neuroestrogens Rapidly Regulate Sexual Motivation But Not Performance. *J. Neurosci.* 33, 164–174. doi:10.1523/JNEUROSCI.2557-12.2013
- Shamloul, R., el Nashaar, A., 2005. Idiopathic stuttering priapism treated successfully with low-dose ethinyl estradiol: a single case report. *J. Sex. Med.* 2, 732–734. doi:10.1111/j.1743-6109.2005.00106.x
- Shaul, Y.D., Seger, R., 2007. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease* 1773, 1213–1226. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.005
- Sheng, M., Sala, C., 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1–29. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1
- Shepard, K.N., Liu, R.C., 2011. Experience restores innate female preference for male ultrasonic vocalizations. *Genes Brain Behav.* 10, 28–34. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00580.x
- Shimura, T., Yamamoto, T., Shimokochi, M., 1994. The medial preoptic area is involved in both sexual arousal and performance in male rats: re-evaluation of neuron activity in freely moving animals. *Brain Res.* 640, 215–222.
- Shulman, L.M., Spritzer, M.D., 2014. Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. *Physiol. Behav.* 133, 8–13. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.001
- Sickel, M.J., McCarthy, M.M., 2000. Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation. *J. Neuroendocrinol.* 12, 397–402.
- Simerly, R.B., Gorski, R.A., Swanson, L.W., 1986. Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: an immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 246, 343–363. doi:10.1002/cne.902460305
- Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1988. Projections of the medial preoptic nucleus: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270, 209–242. doi:10.1002/cne.902700205
- Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1986. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 246, 312–342. doi:10.1002/cne.902460304
- Simmons, D.A., Yahr, P., 2003. GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils. *J. Comp. Neurol.* 459, 290–300. doi:10.1002/cne.10605
- Singer, A.G., Clancy, A.N., Macrides, F., Agosta, W.C., Bronson, F.H., 1988. Chemical properties of a female mouse pheromone that stimulates gonadotropin secretion in males. *Biol. Reprod.* 38, 193–199.
- Sipos, M.L., Kerchner, M., Nyby, J.G., 1992. An ephemeral sex pheromone in the urine of female house mice (*Mus domesticus*). *Behav. Neural Biol.* 58, 138–143.
- Smith, J.M., 1978. *The Evolution of Sex*. CUP Archive.
- Smith J.M., 1971. The origin and maintenance of sex. In: *Group Selection: A Controversy in Biology*.

- Sobczyk, A., Scheuss, V., Svoboda, K., 2005. NMDA receptor subunit-dependent [Ca<sup>2+</sup>] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6037–6046. doi:10.1523/JNEUROSCI.1221-05.2005
- Spehr, M., Kelliher, K.R., Li, X.-H., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2006. Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1961–1970. doi:10.1523/JNEUROSCI.4939-05.2006
- Squarzoni, P., Thion, M.S., Garel, S., 2015. Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: usual and novel guideposts. *Front. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnins.2015.00248
- Srilatha, B., Adaikan, P.G., 2004. Estrogen and phytoestrogen predispose to erectile dysfunction: do ER-alpha and ER-beta in the cavernosum play a role? *Urology* 63, 382–386. doi:10.1016/j.urology.2003.08.042
- Stearns, S.C., 2013. *The Evolution of Sex and its Consequences*. Birkhäuser.
- Stone, C.P., Ferguson, L.W., 1940. Temporal relationships in the copulatory acts of adult male rats. *J. Comp. Psychol.* 30, 419–434. doi:10.1037/h0061214
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., Koentges, G., 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493–1500. doi:10.1126/science.1069259
- Strobl, F.J., Luderer, U., Besecke, L., Wolfe, A., Schwartz, N.B., Levine, J.E., 1993. Differential gonadotropin responses to N-methyl-D,L-aspartate in intact and castrated male rats. *Biol. Reprod.* 48, 867–873. doi:10.1095/biolreprod48.4.867
- Succu, S., Sanna, F., Melis, T., Boi, A., Argiolas, A., Melis, M.R., 2007. Stimulation of dopamine receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats induces penile erection and increases extra-cellular dopamine in the nucleus accumbens: Involvement of central oxytocin. *Neuropharmacology* 52, 1034–1043. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.10.019
- Sullivan, S.M., Lee, A., Björkman, S.T., Miller, S.M., Sullivan, R.K.P., Poronnik, P., Colditz, P.B., Pow, D.V., 2007. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *J. Biol. Chem.* 282, 29414–29423. doi:10.1074/jbc.M704152200
- Sung, H.H., Kim, J.J., Han, D.H., Kang, S.J., Chae, M.R., Kim, C.Y., Park, J.K., Lee, S.W., 2015. New Methodology for Investigating Ejaculation Dysfunction: Measuring Intraluminal Seminal Vesicle Pressure in Rats with a Telemetric Device. *J. Sex. Med.* 12, 2134–2140. doi:10.1111/jsm.13025
- Swaney, W.T., Curley, J.P., Champagne, F.A., Keverne, E.B., 2007. Genomic imprinting mediates sexual experience-dependent olfactory learning in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6084–6089. doi:10.1073/pnas.0609471104
- Swaney, W.T., Dubose, B.N., Curley, J.P., Champagne, F.A., 2012. Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Horm. Behav.* 61, 472–478. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.01.001
- Szymusiak, R., Steininger, T., Alam, N., McGinty, D., 2001. Preoptic area sleep-regulating mechanisms. *Arch. Ital. Biol.* 139, 77–92.
- Taylor, G.T., Regan, D., Haller, J., 1983. Sexual experience, androgens and female choice of a mate in laboratory rats. *J. Endocrinol.* 96, 43–52.
- Taziaux, M., Keller, M., Balthazart, J., Bakker, J., 2011. Rapid activation of phosphorylated mitogen-activated protein kinase after sexual stimulation in male mice: *NeuroReport* 22, 294–298. doi:10.1097/WNR.0b013e3283460f35
- Tenk, C.M., Wilson, H., Zhang, Q., Pitchers, K.K., Coolen, L.M., 2009. Sexual reward in male rats: Effects of sexual experience on conditioned place preferences associated with ejaculation and intromissions. *Horm. Behav.* 55, 93–97. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.08.012
- Thackare, H., Nicholson, H.D., Whittington, K., 2006. Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum. Reprod. Update* 12, 437–448. doi:10.1093/humupd/dmk002
- Thibault, C., Levasseur, M.-C., 2001. *La reproduction chez les mammifères et l’homme*. Editions Quae.

- Thomas, G.M., Haganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183. doi:10.1038/nrn1346
- Tinbergen, N., 1963. On aims and methods of Ethology. *Z. Für Tierpsychol.* 20, 410–433. doi:10.1111/j.1439-0310.1963.tb01161.x
- Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., Menini, A., 2009. From pheromones to behavior. *Physiol. Rev.* 89, 921–956. doi:10.1152/physrev.00037.2008
- Tobiansky, D.J., Roma, P.G., Hattori, T., Will, R.G., Nutsch, V.L., Dominguez, J.M., 2013. The medial preoptic area modulates cocaine-induced activity in female rats. *Behav. Neurosci.* 127, 293–302. doi:10.1037/a0031949
- Tobiansky, D.J., Will, R.G., Lominac, K.D., Turner, J.M., Hattori, T., Krishnan, K., Martz, J.R., Nutsch, V.L., Dominguez, J.M., 2016. Estradiol in the Preoptic Area Regulates the Dopaminergic Response to Cocaine in the Nucleus Accumbens. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 1897–1906. doi:10.1038/npp.2015.360
- Tordera, R.M., Pei, Q., Sharp, T., 2005. Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT1, by a course of antidepressant treatment. *J. Neurochem.* 94, 875–883. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03192.x
- Vagell, M.E., McGinnis, M.Y., 1998. The Role of Gonadal Steroid Receptor Activation in the Restoration of Sociosexual Behavior in Adult Male Rats. *Horm. Behav.* 33, 163–179. doi:10.1006/hbeh.1998.1445
- Valjent, E., Corvol, J.-C., Trzaskos, J.M., Girault, J.-A., Hervé, D., 2006. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* 7, 20. doi:10.1186/1471-2202-7-20
- Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M.I., Mann, G.E., Vergara, C., Latorre, R., 1999. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285, 1929–1931.
- Vandenbergh, J.G., 1969. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 84, 658–660. doi:10.1210/endo-84-3-658
- Varricchio, L., Migliaccio, A., Castoria, G., Yamaguchi, H., de Falco, A., Di Domenico, M., Giovannelli, P., Farrar, W., Appella, E., Auricchio, F., 2007. Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Mol. Cancer Res. MCR* 5, 1213–1221. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0150
- Verma, S., Chhina, G.S., Mohan Kumar, V., Singh, B., 1989. Inhibition of male sexual behavior by serotonin application in the medial preoptic area. *Physiol. Behav.* 46, 327–330.
- Vigdorchik, A.V., Parrish, B.P., Lagoda, G.A., McHenry, J.A., Hull, E.M., 2012. AN NMDA ANTAGONIST IN THE MPOA IMPAIRS COPULATION AND STIMULUS SENSITIZATION IN MALE RATS. *Behav. Neurosci.* 126, 186–195. doi:10.1037/a0026460
- Vogel, H.P., Schiffter, R., 1983. Hypersexuality - a Complication of Dopaminergic Therapy in Parkinson's Disease. *Pharmacopsychiatry* 16, 107–110. doi:10.1055/s-2007-1017459
- Vol.1, No.1, 1-30, L. Van Valen, A New Evolutionary Law. [WWW Document], n.d. . Scribd. URL <https://fr.scribd.com/document/190017091/Vol-1-No-1-1-30-L-Van-Valen-A-New-Evolutionary-Law> (accessed 11.9.16).
- von Kriegsheim, A., Baiocchi, D., Birtwistle, M., Sumpton, D., Bienvenut, W., Morrice, N., Yamada, K., Lamond, A., Kalna, G., Orton, R., Gilbert, D., Kolch, W., 2009. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat. Cell Biol.* 11, 1458–1464. doi:10.1038/ncb1994
- Wang, C., Swerdloff, R.S., 2010. Hormonal Approaches to Male contraception. *Curr. Opin. Urol.* 20, 520–524. doi:10.1097/MOU.0b013e32833f1b4a
- Wang, Moralí, Sachs, 1989. Constraints on allometry of rhythmic motor activities during copulation in rats, prairie voles, and house mice. *21st Conf. Reprod. Behav.* p.32.
- Watts, A.G., Khan, A.M., Sanchez-Watts, G., Salter, D., Neuner, C.M., 2006. Activation in neural networks controlling ingestive behaviors: what does it mean, and how do we map and measure it? *Physiol. Behav.* 89, 501–510. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.025

- Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Engidawork, E., Engelmann, M., Singewald, N., Lubec, G., Lubec, B., 2004. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 10, 130–140. doi:10.1016/j.niox.2004.03.007
- Whitten, W.K., Bronson, F.H., Greenstein, J.A., 1968. Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air. *Science* 161, 584–585.
- Will, R.G., Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2014. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav., Psychopharmacology of Male and Female Sexual Behavior* 121, 115–123. doi:10.1016/j.pbb.2014.02.005
- Will, R.G., Nutsch, V.L., Turner, J.M., Hattori, T., Tobiansky, D.J., Dominguez, J.M., 2015. Astrocytes in the medial preoptic area modulate ejaculation latency in an experience-dependent fashion. *Behav. Neurosci.* 129, 68–73. doi:10.1037/bne0000026
- Williams, G.C., 1975. *Sex and Evolution*. Princeton University Press.
- Winters, S.J., Troen, P., 1986. Testosterone and estradiol are co-secreted episodically by the human testis. *J. Clin. Invest.* 78, 870–873.
- Witt, D.M., Insel, T.R., 1994. Increased Fos expression in oxytocin neurons following masculine sexual behavior. *J. Neuroendocrinol.* 6, 13–18.
- Witt, D.M., Young, L.J., Crews, D., 1995. Progesterone modulation of androgen-dependent sexual behavior in male rats. *Physiol. Behav.* 57, 307–313. doi:10.1016/0031-9384(94)00247-3
- Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., Rosenmund, C., 2004. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7158–7163. doi:10.1073/pnas.0401764101
- Wong, J.K., Le, H.H., Zsarnovszky, A., Belcher, S.M., 2003. Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 4984–4995.
- Wood, R.I., 2002. Oral testosterone self-administration in male hamsters: dose-response, voluntary exercise, and individual differences. *Horm. Behav.* 41, 247–258. doi:10.1006/hbeh.2002.1769
- Wood, R.I., Johnson, L.R., Chu, L., Schad, C., Self, D.W., 2004. Testosterone reinforcement: intravenous and intracerebroventricular self-administration in male rats and hamsters. *Psychopharmacology (Berl.)* 171, 298–305. doi:10.1007/s00213-003-1587-7
- Woodson, J.C., Balleine, B.W., 2002. An assessment of factors contributing to instrumental performance for sexual reward in the rat. *Q. J. Exp. Psychol. B* 55, 75–88. doi:10.1080/02724990143000199
- Wright, C.L., Burks, S.R., McCarthy, M.M., 2008. Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. *Dev. Neurobiol.* 68, 1406–1419. doi:10.1002/dneu.20665
- Wu, D., Gore, A.C., 2009. Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middle-aged male rats. *Horm. Behav.* 56, 299–308. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.06.007
- Wu, L.-J., Ren, M., Wang, H., Kim, S.S., Cao, X., Zhuo, M., 2008. Neurabin Contributes to Hippocampal Long-Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *PLOS ONE* 3, e1407. doi:10.1371/journal.pone.0001407
- Wysocki, C.J., Katz, Y., Bernhard, R., 1983. Male vomeronasal organ mediates female-induced testosterone surges in mice. *Biol. Reprod.* 28, 917–922.
- Wysocki, C.J., Lepri, J.J., 1991. Consequences of removing the vomeronasal organ. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39, 661–669.
- Yang, X., Guo, Z., Sun, F., Li, W., Alfano, A., Shimelis, H., Chen, M., Brodie, A.M.H., Chen, H., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Qiu, Y., 2011. Novel membrane-associated androgen receptor splice variant potentiates proliferative and survival responses in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 36152–36160. doi:10.1074/jbc.M111.265124
- Yoon, H., Enquist, L.W., Dulac, C., 2005. Olfactory Inputs to Hypothalamic Neurons Controlling Reproduction and Fertility. *Cell* 123, 669–682. doi:10.1016/j.cell.2005.08.039
- Younglai, E.V., Moor, B.C., Dimond, P., 1976. Effects of Sexual Activity on Luteinizing Hormone and Testosterone Levels in the Adult Male Rabbit. *J. Endocrinol.* 69, 183–191. doi:10.1677/joe.0.0690183

- Zhao, L., Brinton, R.D., 2007. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res.* 1172, 48–59. doi:10.1016/j.brainres.2007.06.092
- Zhou, L., Zhu, D.-Y., 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 20, 223–230. doi:10.1016/j.niox.2009.03.001
- Zucker, I., Wade, G., 1968. Sexual preferences of male rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66, 816–819. doi:10.1037/h0026560



# **Annexes**



**Revisiting sexual experience in male mouse: induction of dendritic spine maturation and glutamate network sensitivity independently of the nitrenergic pathway and sex steroids within the mPOA**

**Auteurs :** Arnaud JEAN, Pauline Bonnet, Philippe Lière, Sakina MHAOUTY-KODJA and Hélène HARDIN-POUZET

**Adresse:** Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris – Seine; Institut de Biologie Paris Seine, 75005 Paris, France.

**Corresponding author:**

Hélène Hardin-Pouzet

INSERM U1130, CNRS UMR 8246, Université P. & M. Curie

7 quai Saint Bernard

75005 Paris, France

Tel: 33 1 44 27 36 57

Fax: 33 1 44 27 25 08

Mail: helene.pouzet@upmc.fr

**Short title:** mPOA modifications induced by sexual experience in male mouse

**Keywords:** sexual experience, mPOA, dendritic spine, steroid, glutamate, nNOS, AR, microglia, H3 methylation

**Highlights:**

- One mating improved sexual behaviour parameters in male mouse.
- Sexual experience increased the density of mushroom dendritic spines and levels of histone H3 tri-methylated at Lys-27, PSD-95, GluN1 and calbindin within the mPOA.
- Ejaculation but not sexual experience decreased plasmatic levels of testosterone and increased plasmatic levels of progesterone and corticosterone.
- Sex steroid receptor expression (AR and ER $\alpha$ ) and nNOS levels and activity were not affected by sexual experience
- Levels of Iba-1, a microglial marker, were increased in sexually experienced mice

## Abstract

Sexual experience is induced by a first exposure to a receptive female and improves sexual efficiency of a second copulation. Many studies have been interested in characterizing cerebral changes underlying this process in rat but still little is known in mouse. In this study, we characterized molecular modifications triggered by a unique mating within the network of the hypothalamic medial preoptic area (mPOA), the main integrative site for male sexual behaviour regulation.

We showed for the first time that one mating was sufficient to induce long lasting behavioral ameliorations and mPOA morphological changes, evidenced by dendritic spine maturation associated with an increase in the tri-methylated form of histone H3 at Lys-27. Ejaculation resulted in increased levels of testosterone and increased levels of progesterone and corticosterone in both naive and experienced mice whereas basal plasmatic and hypothalamic levels of steroids were not modified by sexual experience. In strong contrast with studies carried out in rat, no changes were observed neither in nitrenergic system nor in sex steroid receptor levels (AR and ER $\alpha$ ), although levels of glutamatergic and calcium associated protein such as PSD-95, calbindine and the GluN1 subunit of NMDA receptor were increased. Interestingly, the microglial marker Iba-1 was also increased in sexually experienced males suggesting the involvement of multicellular interactions induced by sexual experience within the mPOA. Taken together, these results indicate that plasticity mechanisms induced by sexual experience are different between rat and mouse, even if both converge to the potentiation of mPOA network.

## Introduction

Male sexual behaviour is a well-conserved behaviour across various species of rodent. It is composed of a motivational phase involving tactile, olfactory and auditive interactions with the female, followed by a consummatory phase of bouts of mounting and intromission. This sequence terminates with ejaculation, triggering a refractory period of reduced interest in receptive females (Hull and Dominguez, 2007). The first exposure to a receptive female leads to a sustainable improvement of this innate behaviour, which has been widely studied in rat : sexually experienced male rats show increased preference for being with a receptive female (López et al., 1999) and increased sexual motivation characterized by the reduced latency to initiate the copulation (Lumley and Hull, 1999; Vigdorichik et al., 2012). The improvement of sexual behavior also concerns the copulatory phase, since sexually experienced rats need less mounts and intromissions, and less time to achieve the ejaculation (Sura et al., 2001). Mating behaviour is governed by complex cerebral interactions between different systems which process sensory inputs, regulate rewards and integrate hormonal signals (Hull et al., 2002). The medial preoptic area of the hypothalamus (mPOA) is the main integrative site for male sexual behaviour regulation in rats and mice (Bean et al., 1981; De Jonge et al., 1989) and its pharmacological inhibition result in the disruption of sexual experience induction in rats (Lagoda et al., 2004; Vigdorichik et al., 2012). Nevertheless, the molecular changes underlying performance amelioration are still poorly understood, particularly in mouse. In this current study, we thus characterized mPOA long lasting changes induced by a unique mating in male mouse.

The structural changes induced by sexual experience were first investigated by analysing the modifications of mPOA dendritic spines. Since, learning paradigms are known to induce morphological changes (Mahmmoud et al., 2015) and increase dendritic spine density (Leuner and Shors, 2004) in the hippocampus and cortex, the effect of mating and sexual experience were analyzed on dendritic spine properties by Golgi-Cox staining and Western blot analysis of associated pre- and post-synaptic markers: synaptotagmin, spinophilin and PSD 95, which have been demonstrated to be involved in the regulation of plasticity processes and dendritic spines stabilization (Feng et al., 2000; Morimoto et al., 1998; Sala and Segal, 2014).

The level of histone H3 trimethylated at Lys-27 (H3K27me3), known to compact chromatin and inhibit gene transcription (Sengoku and Yokoyama, 2011), and H3 methylated at Lys-5 (H3K4me), known to enhance gene transcription (Barski et al., 2007) were also investigated as an index of long term persistence of transcriptional changes within the mPOA.

In a second part, we investigated whether changes in sex steroid hormones level could be implicated in the mechanisms underlying sexual experience. Sexual experience is known to increase baseline (Edinger and Frye, 2007; Wu and Gore, 2009) or ejaculation related (Bonilla-Jaime et al., 2006; Kamel et al., 1975) levels of circulating testosterone in rat, but nothing is currently known in mouse. We thus investigated the effects of sexual experience on plasmatic and hypothalamic post-ejaculation levels of testosterone (T) and its aromatized derivative estradiol (E2). Changes in plasmatic levels of corticosterone (C) and progesterone (P), whose participation in male sexual behavior is still unclear (Andersen and Tufik, 2006), were also measured. Furthermore, variations of androgen (AR) and estrogen (ER $\alpha$ ) receptors were investigated after sexual experience, since it is still debated if sexual experience increase (Swaney et al., 2012) or not (Wu and Gore, 2009) AR levels within the mPOA.

Finally, to go further in the comprehension of molecular and cellular mechanisms involved in sexual experience acquisition, we investigated the participation of different neurotransmission systems in the processes underlying sexual learning. We first turned to the nitrenergic and the glutamatergic systems of the mPOA since they are known to be impacted by the sexual status in the rat (Dominguez et al., 2006; Will et al., 2014a). The effect of sexual experience on nNOS levels and activity was assessed by Western blot, immunohistochemistry and NADPH-diaphorase staining in the mPOA. Changes in glutamatergic neurotransmission were evaluated by Western blot analysis of glutamatergic associated protein, such as pre-synaptic vesicular transporters vGluT1 and vGluT2, NMDA receptors subunits (GLUN1, GLUN2A and GLUN2B), AMPA receptors subunit (GLUR2) and calbindin, a dimorphic marker associated with glutamatergic transmission whose role in the control of sexual behavior is still unclear (Gilmore et al., 2012). The effects of sexual experience on glial cells was also investigated since astrocytes and microglia have been implicated in the control of male sexual behavior (Amateau and McCarthy, 2002; Lenz et al., 2013) and in the control of plasticity mechanisms associated with learning (Ben Menachem-Zidon et al., 2011; Parkhurst et al., 2013). Thus, the expression of the astrocytic marker GFAP and the microglial marker Iba-1 were compared between naïve and sexually experienced males.

## **Material and methods**

### ***Animals***

All the experiments were conducted in accordance with French and European laws (Decrees 2013-118, L214 and R214-87/130, 2013/63/ECC) and approved by the “Charles Darwin” ethical committee (project number 01490-01).

C57Bl/6J mice (Janvier Breeding Centre, Le Genest, France) were bred in our animal facility and housed under a controlled photoperiod (12h light and 12h darkness cycle - lights on at 2 a.m.) at  $20 \pm 2$  °C with food and water *ad libitum*. Ten weeks old-adult males were isolated for two weeks before any behavioural experiment.

### ***Preparation of receptive females***

C57Bl/6J females were ovariectomized under general anaesthesia (xylazine 10 mg/kg - ketamine 100 mg/kg, i.p.) and implanted with Silastic (Dow Corning) implants filled with 50 µg of estradiol-benzoate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) in 30 µl of sesame oil. Four to five hours before the tests, they were subcutaneously treated with 1 mg of progesterone (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) in 100 µl of sesame oil, as previously reported (Raskin et al., 2009). Female receptivity was verified before the beginning of experiments with a sexually experienced male. The female was considered receptive when she displayed a lordosis posture with the four paws grounded, the hind region lifted and the back arched in response to male mounts.

### ***Male sexual behaviour***

Males were assigned to four different groups (figure 1-A): naive male staying in home cage (Naive: N), naive male allowed to mate for the first time with a receptive female during 10h (Naive mated: N+M), naive male mating for the first time with a receptive female during 10h and then kept in home cage for 14 days (sexually experienced: E) and naive male mating for the first time with a receptive female during 10h, kept in home cage for 14 days and allowed to mate a second time during 10h (sexually experienced mated: E+M).

Tests were conducted under red-light illumination 2h after lights off and videotaped for further analyses. After 4h of habituation, each male was tested in its home cage for 10h after the introduction of a receptive female. Male sexual behaviour was analysed by scoring the latency to the first intromission, the number of mounts with intromissions and the mating duration defined as the time from the first intromission to ejaculation. Males showing no sexual behaviour during 30 minutes (at the first or the second mating) were removed from the study and identified as bad matters.

Males of each condition were randomly assigned to Golgi-Cox staining (4 per group). N and E males were used for Western blot analysis (7 per group), IHC experiment (6 per group) or NADPH-diaphorase staining (7 per group).

### ***Golgi-Cox staining***

Males were decapitated and the brain rapidly removed, fixed for 10 days in Golgi-Cox solution (NovaUltra Golgi-Cox Stain kit, Interchim, Montluçon, France), washed 2 days in phosphate buffered saline (PBS) and coronal slices were cut with a vibratome (Leica Microsystems VTC1000S, Wetzlar, Germany). Using the anterior commissure as a landmark, 30- $\mu$ m-thick hypothalamic sections including the mPOA were immersed in post-impregnation solution for 10 minutes, washed in PBS and mounted with Mowiol. For each animal, 10 neurons homogeneously distributed in the mPOA were analysed. Number of dendritic spines were normalized to 10  $\mu$ m segments. Subtypes of dendritic spines were determined by applying Harris criteria (Harris et al., 1992).

### ***Immunohistochemistry***

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150 mg/kg, i.p.) and perfused with 4 % paraformaldehyde (PFA) in 0,1M phosphate buffer (PB). Brains were post-fixed 4h, then sliced into 30  $\mu$ m coronal sections with a vibratome (Leica Microsystems VTC1000S, Wetzlar, Germany). Sections including the mPOA were incubated 2h in PBS containing 1 % bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and 0.2% Triton X-100 and then incubated 72 h at 4°C with primary antibodies against nNOS (1:1000, produced in goat, Abcam, Cambridge, UK) and AR (1:300, produced in rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). After PBS washes, slices were incubated for 2h with Alexa Fluor 596-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and an Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-goat secondary antibody in PBS (1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), then mounted with Mowiol. The number of AR and nNOS immunoreactive cells were counted bilaterally on two areas of 0.8 mm<sup>2</sup> localized on the same section within the mPOA. Anatomically matched sections were identified using the Mouse Brain Atlas of Paxinos and Franklin (2004) (plate 30).

### ***NADPH-diaphorase staining***

Animals were perfused as mentioned above. Brains were cryoprotected and 30- $\mu$ m-thick frozen floating sections (Leica CM 3050S, Wetzlar, Germany) were washed in Tris buffer pH 8. NADPH-diaphorase enzymatic activity was performed using the reduction of 0,2mM nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) with 1,2mM  $\beta$ -NADPH (tetrazolium salt, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) in Tris buffer pH 8, 0.2 % Triton X-100 at 37°C during 2h. Sections including



the mPOA were dehydrated and mounted with Permount mounting medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The number of NADPH-diaphorase positive cells were counted bilaterally on two areas of 0.8 mm<sup>2</sup> localized on the same section, as described for the immunohistochemistry analysis (plate 30).

### **Western blot analysis**

Males were decapitated, the brain rapidly removed and coronal hypothalamic slices were cut with a Vibroslice (World Precision Instrument, Sarasota, USA) in cold 0.1M PB. One 400- $\mu$ m-thick section including the mPOA was punched. Samples were homogenized in 50mM Tris (pH 7.2), 150mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1% Triton-X100 and 1% protease Inhibitor (Roche, Meylan, France) and sonicated 7 times during 30 seconds (Bioruptor Plus Diagenode, Seraing, Belgium). After centrifugation (13 minutes, 13000 rpm at 4°C), protein concentrations were determined in the supernatant with a Coomassie assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Samples were denatured in Laemmli buffer (5 minutes at 95°C). 15  $\mu$ g protein were subjected to electrophoresis (120 V) on 4-12% Bis-Tris NuPAGE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and electrotransferred overnight (30 V at 4°C) onto a PVDF membrane (Millipore, Guyancourt, France). Blots were blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (TBS) and 0.2% Tween 20 (2h) and incubated overnight with primary antibodies against AR (1:300; produced in rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), calbindin (1:2000; produced in mouse, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), ER $\alpha$  (1:300; produced in rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), GAPDH (1:20000; monoclonal mouse; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), GFAP (1:2000; produced in mouse, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), GluN1 (produced in mouse, Millipore, Guyancourt, France), GluN2A (1:500; produced in rabbit, Millipore, Guyancourt, France), GluN2B (1:300; produced in mouse, Abcam, Cambridge, UK), GluR2 (1:750; produced in mouse, Millipore, Guyancourt, France), H3 (1:1000, produced in rabbit, Abcam, Cambridge, UK), H3K27me3 (1:1000, produced in mouse, Diagenode, Liege, Belgium), H3K4me (1:1000, produced in rabbit, Diagenode, Liege, Belgium), Iba-1 (1:750; produced in rabbit, Wako Chemicals, Richmond, USA), nNOS (1:500; produced in mouse, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), PSD-95 (1:500; produced in mouse, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), spinophilin (1:1000; produced in rabbit, Abcam, Cambridge, UK), synaptotagmin (1:1000; produced in goat, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), vGluT1 (1:4000; produced in rabbit, Abcam, Cambridge, UK) or vGluT2 (1:3000; produced in rabbit Abcam, Cambridge, UK) diluted in the same solution. Antibodies binding to blots were detected by 2h incubation with horseradish peroxidase anti-rabbit, anti-goat or anti-mouse secondary antibodies (1:10000; Jackson Immunoresearch, West Grove, USA). Signals were visualized with a pico-Super Signal detection kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with an Amersham Imager 600 (GE

Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) and quantified with ImageJ software (NIH). To determine the level of protein expressed, the protein signal was normalized to the GAPDH or H3signal.

### **Steroid assay**

Males were assigned to four different groups (6 males per group) (figure 5-A): naive male staying in home cage (Naive: N), naive male allowed to mate for the first time and sacrificed just after the ejaculation (Naive + ejaculation : N+Ej), naive male mating for the first time during 10h and then kept in home cage for 14 days (sexually experienced: E) and naive male mating for the first time during 10h, kept in home cage for 14 days, allowed to mate a second time and sacrificed just after the ejaculation (sexually experienced + ejaculation: E+Ej). Males were decapitated and the blood was collected in heparinised tubes and centrifuged at 3000g for 10 minutes at 4°C to collect the plasma. Hypothalamus of the same animals was collected and frozen at -80°C. Steroids were extracted from plasma (200 µl) and hypothalamus (5-10 mg) with methanol, and the following internal standards were introduced into the extracts for steroid quantification: 2 ng of <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-testosterone (Isoscience, PA, USA) for testosterone (T), <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-17β-estradiol for estradiol (E2), <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-progesterone for progesterone (P), and <sup>2</sup>H<sub>8</sub>-corticosterone for corticosterone (C) (CDN Isotopes, Sainte Foy la Grande, France). Samples were purified and fractionated by solid-phase extraction with the recycling procedure (Liere et al, 2004 *J Lipid Res*). Briefly, the extracts were dissolved in 1 ml MeOH and applied to the C18 cartridge (500 mg, 6 ml, International Sorbent Technology (IST)), followed by 5 ml of MeOH/H<sub>2</sub>O (85/15). The flow-through, containing the free steroids, was collected and dried. After a previous re-conditioning of the same cartridge with 5 ml H<sub>2</sub>O, the dried samples were dissolved in MeOH/H<sub>2</sub>O (2/8) and re-applied. The cartridge was then washed with 5 ml H<sub>2</sub>O and 5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1) and unconjugated steroids were eluted with 5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (9/1). The unconjugated steroids-containing fraction was then filtered and further purified and fractionated by HPLC. The HPLC system is composed of a WPS-3000SL analytical autosampler and a LPG-3400SD quaternary pump gradient coupled with a SR-3000 fraction collector (ThermoScientific, USA). The HPLC separation was achieved with a Lichrosorb Diol column (25 cm, 4.6 mm, 5 µm) in a thermostated block at 30°C. The column was equilibrated in a solvent system of 90% hexane and 10% of a mixture composed of hexane/isopropanol (85/15). Elution was performed at a flow-rate of 1 ml/min, first 90% hexane and 10% of hexane/isopropanol (85/15) for 8 min, then with a linear gradient to 100% of hexane/isopropanol (85/15) in 2 min. This mobile phase was kept constant for 10 min and a linear gradient to 100% MeOH was applied. The column was washed with MeOH for 15 min. Two fractions were collected from the HPLC system: T, E2 and P were eluted in the first fraction (13-25 minutes) and were derivatized with 25 µl HFBA (heptafluorobutyric anhydride) and 25 µl anhydrous acetone

for 1h at room temperature. C was eluted in the second fraction (25-33 min) and derivatized with 25  $\mu$ l HFBA and 25  $\mu$ l anhydrous acetonitrile (Hertig et al, 2010). The fractions were dried under a stream of N<sub>2</sub> and resuspended in hexane for GC-MS/MS analysis. GC-MS/MS analysis of the extracts was performed using an AI 1310 autosampler, a Trace 1310 gas chromatograph (GC), and a TSQ 8000 tandem mass spectrometer (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific San Jose, CA) using Argon as collision gas. Injection was performed in the splitless mode at 250°C (1 min of splitless time) and the temperature of the gas chromatograph oven was initially maintained at 50°C for 1 min and ramped between 50 to 200°C at 20°C/min, then ramped to 300°C at 10°C/min and finally ramped to 350°C at 30°C/min. The helium carrier gas flow was maintained constant at 1 ml/min during the analysis. The transfer line and ionization chamber temperatures were 330°C and 200°C, respectively. Electron impact ionization was used for mass spectrometry with ionization energy of 70 eV. GC/MS/MS signals were evaluated using a computer workstation by means of the software Excalibur<sup>®</sup>, release 3.0 (Thermo Scientific, USA). Identification of steroids was supported by their retention time and according to two or three transitions. Quantification was performed according to the major product ion with a previously established calibration curve (Lamy et al., 2016).

The analytical protocol has been validated for all the targeted steroids by using 1 ml from a pool of plasma and 200 mg from a pool of brain of male rat. The precision was in the range 94 – 106% and the limits of quantification between 5 pg/g and 0.05 pg/g. Five aliquots of 1 ml of plasma and 5 aliquots of 200 mg of brain were used at two different times to determine the inter-assay coefficient of variation that was estimated at roughly 5-10% for the targeted steroids.

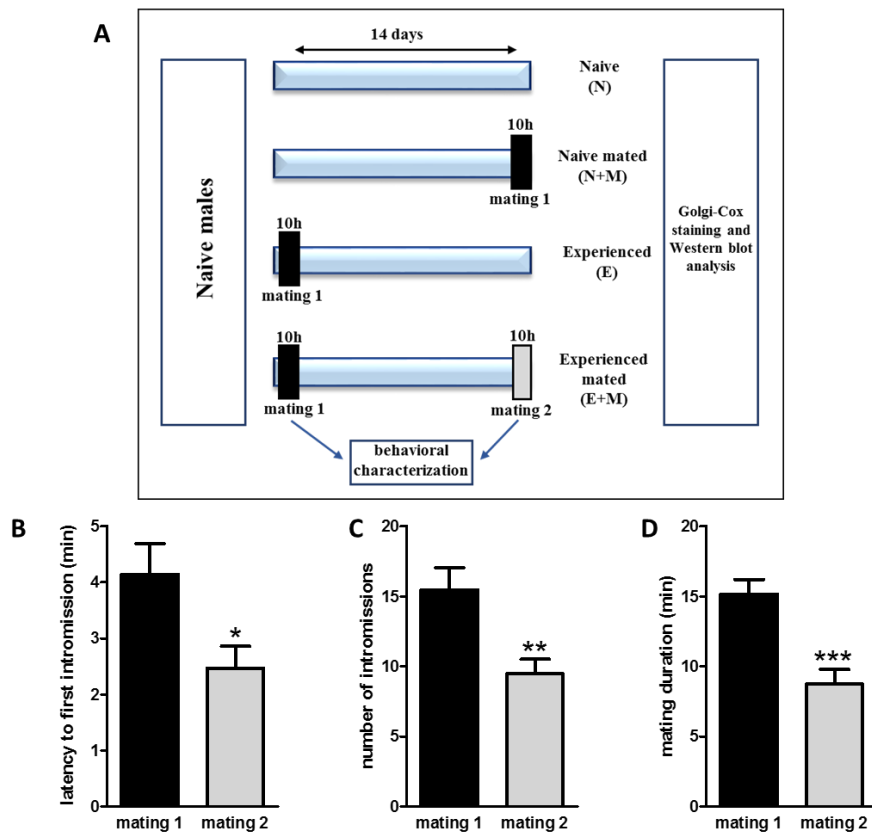
### ***Statistical analysis***

Statistical analysis were performed using Graphpad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Sexual improvement was analysed with paired Student's test. Two-way ANOVA followed by Bonferroni tests were used to analyse the effects of mating and sexual experience on dendritic spine morphology and sex steroid changes. Others data were analysed with Student's test. *p* values of less than 0.05 were considered significant.

## Results

### Sexual experience is induced by a single mating

Most studies have induced sexual experience by long exposure to receptive female (Swaney et al., 2007, 2012). In this study, naive males were exposed to receptive female during a single ten-hour test (mating 1). To characterize sexual experience acquisition, sexual behavior of each animals was assessed fourteen days later (mating 2; figure 1-A). Analyses of sexual parameters showed a 40 % decrease of the latency to first intromission ( $p < 0.05$ ; figure 1-B), a 39 % decrease of the number of intromissions ( $p < 0.01$ ; figure 1-C) and a 42 % reduction of the mating duration ( $p < 0.001$ ; figure 1D) indicating the improvement of sexual behaviour 14 days after a unique mating. This behavior improvement was found to be persistent in a third and a fourth mating realized several weeks later (data not shown).

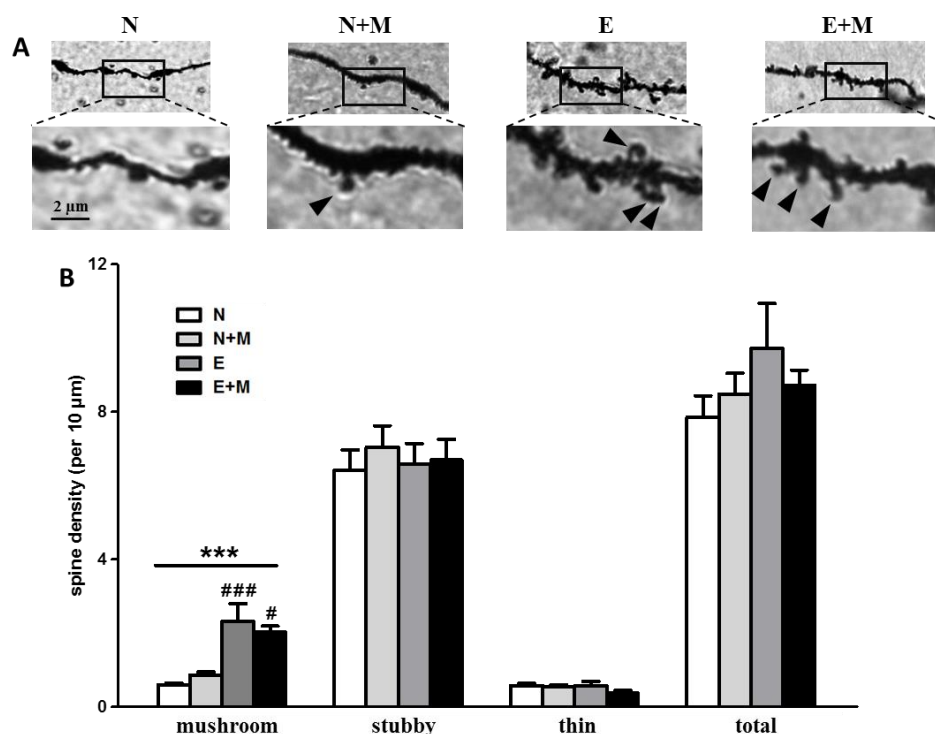


### Figure 1: Sexual experience is induced by a single mating

A: Experimental design used to analyse mPOA modifications induced by sexual experience. N: naive male staying in home cage, N+M: naive male sacrificed after mating with a receptive female, E: male mating with a receptive female and sacrificed 14 days later, E+M: male mating two times 14 days apart with a receptive female and sacrificed after the second mating test. B: Sexual behavior improvement between mating 1 and mating 2 of E+M mice expressed as B: latency to the first intromission, C: number of mounts with intromission and D: mating duration. Results are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n=11$ ) and analyzed by Student's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## Sexual experience increased mature spine density within the mPOA

Golgi-Cox staining was used to characterize dendritic spine density and morphology within the mPOA of naive (N), naive mated (N+M), sexually experienced (E) or sexually experienced mated (E+M) mice (figure 2). Two-way ANOVA demonstrated a significant effect of sexual experience ( $F_{(1-12)}=31.35$ ,  $p<0.001$ ) but no effect of mating ( $F_{(1-12)}=0.01$ ,  $p>0.05$ ) on mushroom spine density. Post hoc analyses showed an increased in mushroom spine density in E group ( $2.32\pm0.48$ ) when compared to N group ( $0.6\pm0.05$ ,  $p<0.001$ ) and in E+M ( $2.04\pm0.16$ ) group when compared to N+M group ( $0.87\pm0.07$ ,  $p<0.05$ ). By contrast, sexual experience had no effect on stubby ( $F_{(1-12)}=0.02$ ,  $p>0.05$ ), thin ( $F_{(1-12)}=0.95$ ,  $p>0.05$ ) and total ( $F_{(1-12)}=1.91$ ,  $p>0.05$ ) spine density. Similarly, mating had no effect on stubby ( $F_{(1-12)}=0.44$ ,  $p>0.05$ ), thin ( $F_{(1-12)}=2.24$ ,  $p>0.05$ ) and total ( $F_{(1-12)}=0.06$ ,  $p>0.05$ ) spine density.



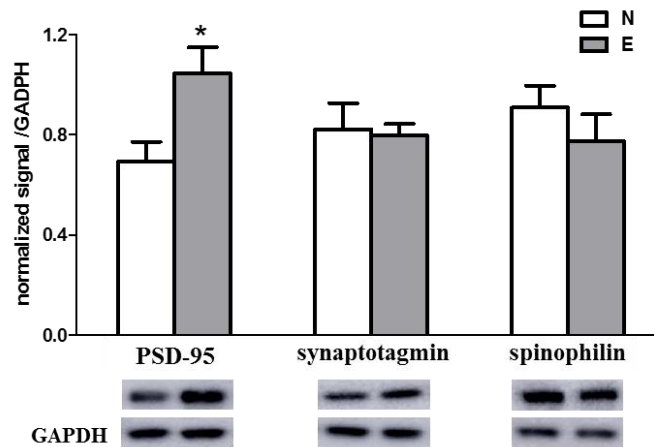
**Figure 2: dendritic spine maturation is induced by sexual experience**

A: representative micrograph of Golgi-Cox impregnated mPOA neurons of naive (N), naive mated (N+M), sexually experienced (E) and sexually experienced mated (E+M) mice. White arrows indicate mushroom dendritic spines.

B: quantification of dendritic spine subtypes ( $n = 4$  mice per group, 10 neurons per mouse). Results are presented as mean  $\pm$  SEM and analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests, \*\*\* $p<0.001$  for sexual experience effect, ### $p<0.001$  when compared to N group, # $p<0.05$  when compared to N+M group.

The level of synaptic markers within the mPOA was evaluated in the N and E groups (figure 3). Western blot analysis showed a 34% increase of the PSD-95 level in E group ( $p<0.05$ ) whereas no difference was detected for synaptotagmin ( $0.82\pm0.1$  vs.  $0.80\pm0.05$ ) and spinophilin ( $0.90\pm0.1$  vs.  $0.77\pm0.11$ ) levels.

Taken together, these results showed that sexual experience induced an increase of mature dendritic spine density associated with an increase of PSD-95 post-synaptic marker within the mPOA.

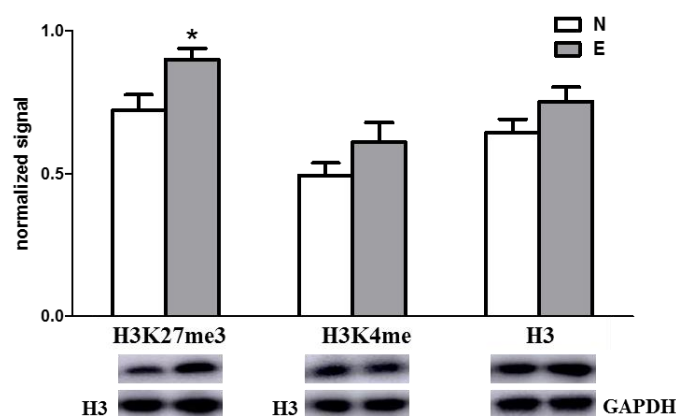


**Figure 3: sexual experience induced increased levels of synaptic markers**

Quantification and representative blot detecting synaptic markers in the mPOA of naïve (N) or sexually experienced males (E) (n = 7 mice per group). Results are presented as mean ± SEM and analyzed by Student's test, \*p<0.05 compared to N group.

#### Sexual experience induced epigenetic modifications within the mPOA

Long lasting epigenetic changes induced by sexual experience were assessed by comparing the levels of H3 trimethylated at Lys-27 (H3K27me3) and H3 methylated at Lys-5 (H3K4me) between N and E groups (figure 4). Western blot analysis indicated a significant 25% increase of H3K27me3 levels in E groups (p<0.05) whereas no difference was detected for H3K4me (0.49±0.4 vs. 0.611±0.07) and H3 levels (0.64±0.5 vs. 0.75±0.05). These results established that sexual experience induced epigenetic changes detectable 14 days after the first mating.



**Figure 4: sexual experience induced epigenetic modifications**

Quantification and representative blot detecting H3 trimethylated at Lys-27 (H3K27me3), H3 methylated at Lys-4 (H3K4me) and total H3 levels. H3K27me3 and H3K4me signals were normalized to H3 whereas H3 levels were normalized to GAPDH. Results are presented as mean ± SEM and analysed by Student's test, \*p<0.05 compared to N group.

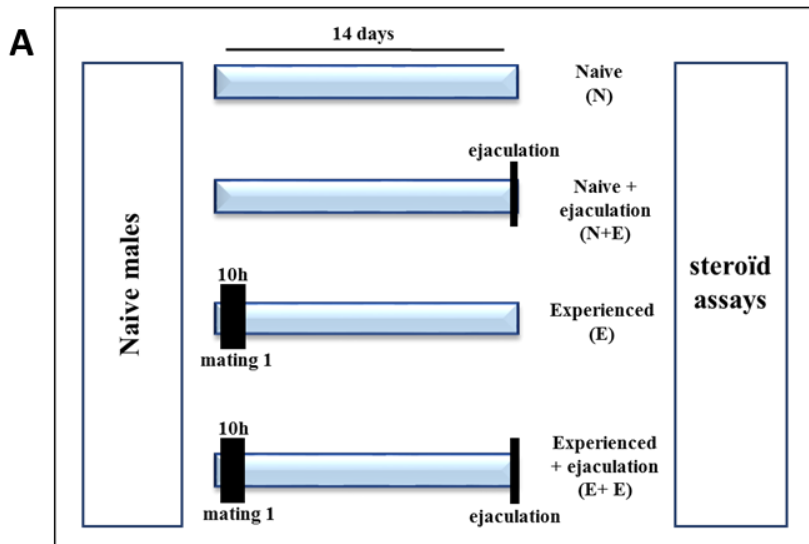
### **Ejaculation but not sexual experience influenced steroid levels**

Hormonal concentrations of steroids were measured in the plasma and in the hypothalamus of naive (N), naive ejaculating (N+Ej), sexually experienced (E) and sexually experienced ejaculating (E+Ej) mice (figure 5). Due to the technical limit of detection, hypothalamic assay was only performed on 4 males of the N groups and 5 males per each other groups.

Two-way ANOVA showed a significant effect of ejaculation on plasmatic testosterone ( $F_{(1-20)}=5.66$ ,  $p<0.05$ ), progesterone ( $F_{(1-20)}=8.16$ ,  $p<0.01$ ) and corticosterone ( $F_{(1-20)}=40.3$ ,  $p<0.001$ ) but not on plasmatic estradiol ( $F_{(1-20)}=0.01$ ,  $p>0.05$ ), hypothalamic testosterone ( $F_{(1-15)}=2.25$ ,  $p>0.05$ ) and hypothalamic estradiol ( $F_{(1-15)}=1.1$ ,  $p>0.05$ ). Sexual experience has no effect on plasmatic testosterone ( $F_{(1-20)}=0.25$ ), estradiol ( $F_{(1-20)}=0.01$ ), progesterone ( $F_{(1-20)}=3.74$ ), corticosterone ( $F_{(1-20)}=0.66$ ), hypothalamic testosterone ( $F_{(1-15)}=0.79$ ) and hypothalamic estradiol ( $F_{(1-15)}=0.63$ ).

Post-hoc analysis showed a significant increase in plasmatic progesterone of N+Ej group when compared to N group ( $p<0.01$ ) or E+Ej group ( $p<0.05$ ). Moreover, plasmatic corticosterone was increased in N+Ej group when compared to N group ( $p<0.001$ ) and in E+Ej group when compared to E group ( $p<0.001$ ).

Taken together, these data showed that ejaculation was associated with a reduction of plasmatic testosterone and an increase of both plasmatic progesterone and corticosterone but sexual experience did not change steroid concentrations.



**B**

	N	N+Ej	E	E+Ej
	<i>plasma (ng/ml ± SEM)</i>			
# T	1,63 ± 0,61	0,08 ± 0,02	1,51 ± 0,69	0,34 ± 0,18
E2	0,012 ± 0,04	0,010 ± 0,004	0,011 ± 0,004	0,011 ± 0,004
## P	0,21 ± 0,07	2 ± 0,95 <sup>a**d*</sup>	0,12 ± 0,004	0,96 ± 0,30
### C	84,1 ± 3,1	166 ± 13,7 <sup>a***</sup>	74,9 ± 7,5	155 ± 20 <sup>c***</sup>
	<i>hypothalamus (ng/g ± SEM)</i>			
T	1,21 ± 0,83	0,23 ± 0,10	1,71 ± 0,87	0,83 ± 0,41
E2	0,155 ± 0,035	0,132 ± 0,054	0,227 ± 0,068	0,102 ± 0,035

**Figure 5: Steroid assays and sexual experience**

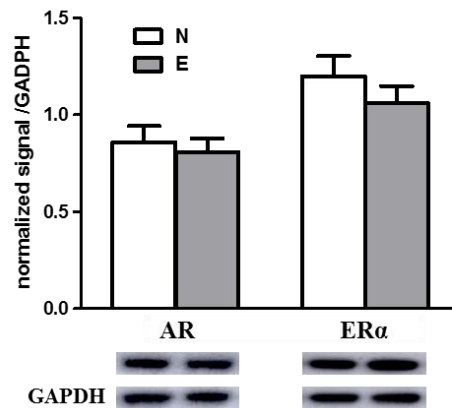
A: Experimental design used to analyse hormonal changes induced by sexual experience. N: naive male sacrificed after 14 days in home cage, N+Ej: naive male sacrificed just after ejaculating during the first mating, E: male mating 10h with a receptive female and sacrificed 14 days later, E+Ej: male mating two times 14 days apart during 10h with a receptive female and sacrificed just after the ejaculation of the second mating.

B: plasmatic and hypothalamic hormonal levels of testosterone (T), 17β-estradiol (E2), progesterone (P) and corticosterone (C). Results are presented as mean ± SEM (n=4-6 per group) and analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 for ejaculation effect, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 when compared to N group (a), to E group (c) or to E+Ej group (d).



### Sexual experience did not change steroid receptor levels in the mPOA

AR and ER $\alpha$  levels were assessed by Western blots in the mPOA of N and E groups (figure 6). No significant changes were detected in AR ( $0.86 \pm 0.08$  vs.  $0.80 \pm 0.07$ ) or ER $\alpha$  levels ( $1.2 \pm 1.1$  vs.  $1.06 \pm 0.09$ ) between the two groups. These results indicate that AR and ER $\alpha$  expression are not influenced by sexual experience in the mPOA.



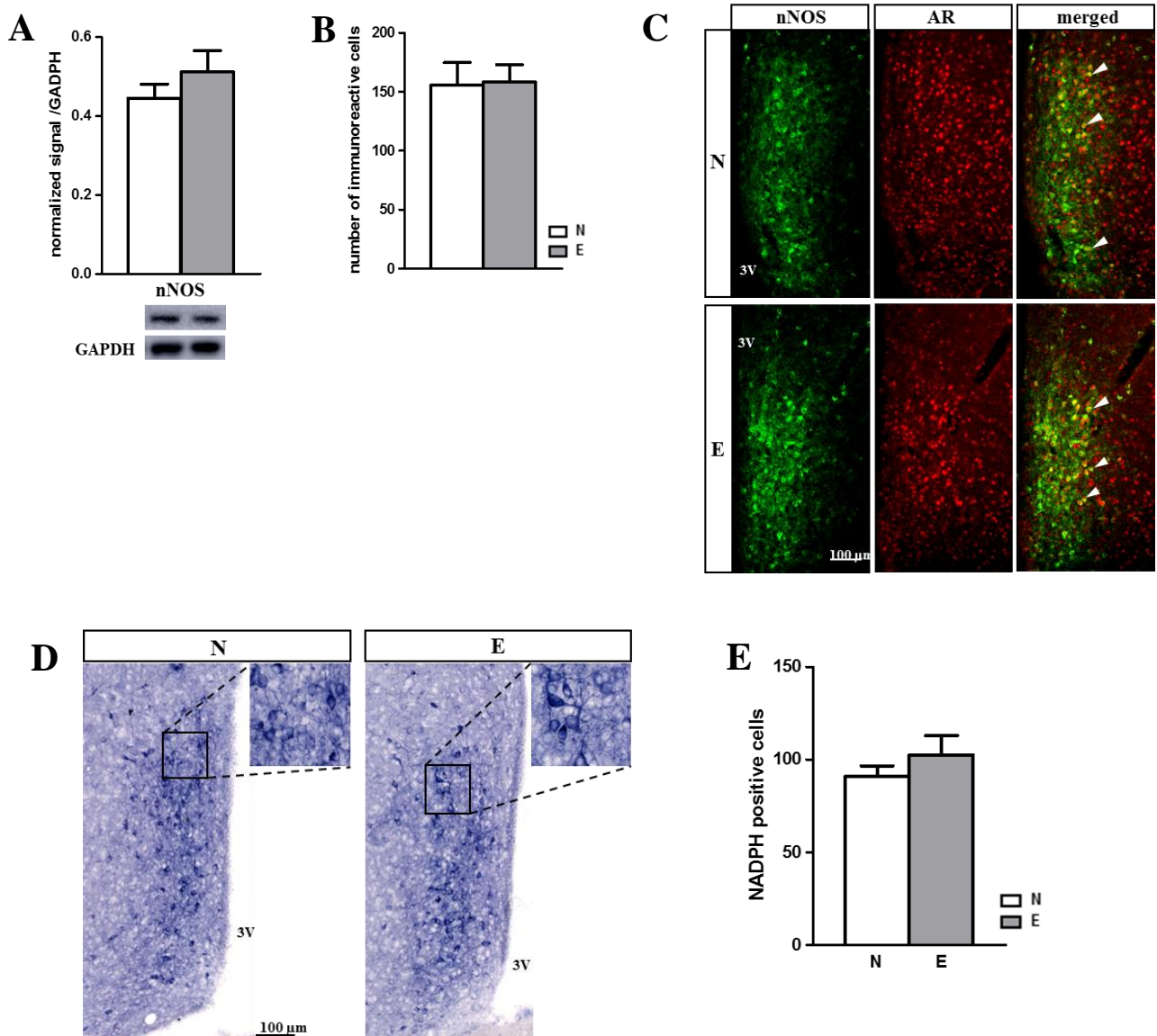
**Figure 6: characterization of steroid receptor expression after sexual experience**

Quantification and representative blot detecting androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER $\alpha$ ) in the mPOA of naïve (N) or sexually experienced males (E) ( $n = 7$  mice per group). Results are presented as mean  $\pm$  SEM and analysed by Student's test, \* $p < 0.05$  compared to N group.

### Sexual experience did not change nitrenergic transmission in the mPOA

Since mPOA nNOS level is known to be sensitive to T and involved in sexual behavior regulation in the rat (Lagoda et al., 2004; Sato et al., 2005), nNOS expression were evaluated by IHC and Western blot in N and E groups (figure 7). The level of nNOS assessed by Western blot ( $0.46 \pm 0.04$  vs.  $0.51 \pm 0.05$ ) (figure 7-A) and the number of cells expressing nNOS ( $154 \pm 16$  vs.  $158 \pm 15$ ) (figure 7-B) were found to be similar between the two groups. Moreover, double IHC revealed that nearly 100 % of the nNOS-expressing cells colocalized with AR in this region of the mPOA figure (figure 7-C).

NADPH-diaphorase staining was used to evaluate nNOS enzymatic activity. No difference was found in the number of cells exhibiting enzymatic activity between N and E groups ( $93 \pm 5$  vs.  $103 \pm 10$ ) (figure 7-D, E). Taken together, these data indicate that sexual experience does not change nitrenergic transmission within the mPOA.



**Figure 7: sexual experience did not change the nitergic system within the mPOA**

A: Quantification and representative blot detecting nNOS in the mPOA of naïve (N) or sexually experienced males (E) (n = 7 mice per group). Results are presented as mean ± SEM and analysed by Student’s test.

B: Quantification of the number of nNOS-expressing cells in the mPOA of naïve (N) or sexually experienced males (E) (n = 6 mice per group). Results are presented as mean ± SEM and analysed by Student’s test

C: representative double-labelling detecting nNOS (red) and AR (green) within the mPOA of naïve (N) or sexually experienced males (E) (n=6). White arrows indicates colocalization of nNOS and AR. 3V: third ventricle

D: representative NADPH-diaphorase staining within the mPOA of naïve (N) and sexually experienced (E) males (n=6). 3V: third ventricle

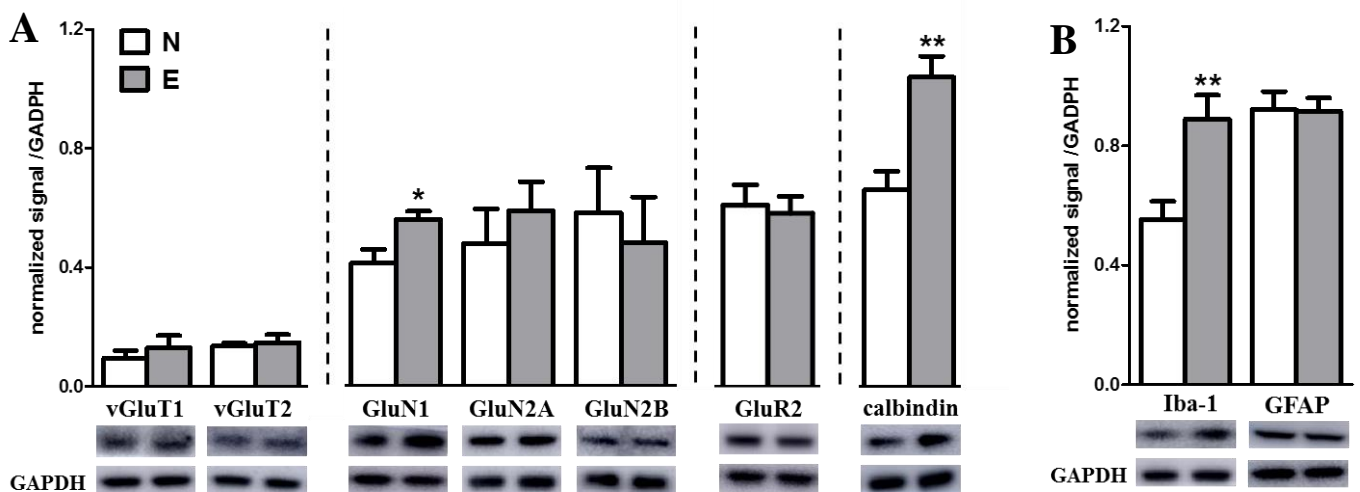
E: Quantification of the number of NADPH-diaphorase positive cells within the mPOA of sexually naïve (N) and experienced (E) males (n=7). Results are presented as mean ± SEM and analysed by Student’s test.

### Sexual experience increase glutamate and microglia associated protein levels within the mPOA

The level of glutamatergic-associated markers was evaluated by Western blot (figure 8). Pre-synaptic vGluT1 ( $0,1 \pm 0,02$  vs.  $0,13 \pm 0,04$ ) and vGluT2 ( $0,14 \pm 0,01$  vs.  $0,15 \pm 0,3$ ) were similar between the two groups. GluN1 level was significantly increased in E group when compared to N group ( $0,75 \pm 0,15$  vs.  $1,2 \pm 0,22$ ;  $p < 0,05$ ) although no difference was seen for others NMDA subunits GluN2A ( $0,48 \pm 0,12$  vs.  $0,59 \pm 0,09$ ), GluN2B ( $0,56 \pm 0,15$  vs.  $0,48 \pm 0,15$ ) and for the AMPA obligatory subunit GluR2 ( $0,61 \pm 0,07$  vs.  $0,58 \pm 0,06$ ). Sexually experienced mice also exhibited higher levels of calbindin ( $0,66 \pm 0,06$  vs.  $1,0 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ).

Moreover, the levels of the astrocytic marker GFAP was unchanged ( $0,92 \pm 0,06$  vs.  $0,91 \pm 0,04$ ;  $p = 0,94$ ) contrary to the microglial marker Iba-1, which was significantly increased after sexual experience ( $0,55 \pm 0,06$  vs.  $0,89 \pm 0,08$ ;  $p < 0,01$ ).

Taken together, these results indicated that sexual experience was associated with higher levels of the NMDA subunit GluN1 in the mPOA. It also increased the levels of calbindin, a protein involved in plasticity and calcium buffering. Finally, variation of Iba-1 levels, suggest an involvement of microglia in the processes underlying sexual experience.



**Figure 8: Effect of sexual experience on mPOA glutamatergic-associated proteins and glial proteins expression**

A: Quantification and representative blot detecting glutamate-associated proteins within the mPOA of naive (N) and sexually experienced (E) male. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (n=7) and analysed by Student's test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

B: Quantification and representative blot detecting glial markers within the mPOA of naive (N) and sexually experienced (E) male. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (n=7) and analysed by Student's test, \*\* $p < 0,01$

## Discussion

Sexual behavioral template, organized successively in motivational and copulatory phases, is subjected to learning processes: sexual performances of a male already mated are increased compared to a naive one. To assess the induction of sexual experience by a unique mating, we compared sexual parameters of naïve males allowed to copulate two times separated by fourteen days. A single 10 h-exposure to a receptive female was sufficient to trigger amelioration of the sexual behavior since males showed a typical decreased latency to initiate copulation and a reduction of the mating duration of their second mating (Jean et al., 2017; Swaney et al., 2012).

These behavioral changes were accompanied by structural and molecular modifications of the mPOA. Indeed, the dendritic spine micro-architecture visualized with a Golgi-Cox staining revealed an increase in the number of mature mushroom spines despite a similar total number of spines in sexually experienced mice. A higher spine density was associated with male sexual behavior retention after castration (Bharadwaj et al., 2013) and has already been demonstrated to be induced in rat by sexual experience in the hippocampus and prefrontal cortex (Glasper et al., 2015). This maturation process of dendritic spines towards a mushroom phenotype, particularly studied in the hippocampus, is characteristic of learning processes (Leuner and Shors, 2004) and associated with modifications of the synaptic strength (Mahmoud et al., 2015; Maiti et al., 2015). The absence of dendritic modification observed the day after the first mating indicated the necessity of a maturation period, consistent with data obtained in the nucleus accumbens where dendritic changes started to be detectable 7 days after the end of sexual experience induction (Pitchers et al., 2010).

To characterize mPOA changes induced by sexual experience at a molecular level, a panel of synaptic markers was analyzed : synaptotagmin, a pre-synaptic  $Ca^{2+}$  sensor involved in exocytosis process (Tucker and Chapman, 2002), spinophilin, a post-synaptic protein known to be dimorphically expressed (Amateau and McCarthy, 2004) and known to positively correlate with male sexual behavior (Wright et al., 2008), and PSD 95, a post-synaptic protein found in excitatory synapses which level correlated with increased size of dendritic spine (El-Husseini et al., 2000). Levels of PSD-95 were increased by sexual experience contrary to the levels of synaptotagmine and spinophilin, suggesting the higher sensitivity of the excitatory network in sexually experienced mice, since PSD-95 is involved in the synaptic membrane localization of NMDA and AMPA glutamate receptors (Kim et al., 2007; Mellone et al., 2015).

To decipher other long-lasting changes induced by sexual experience, we showed that mPOA changes induced by sexual experience also involved epigenetic regulations since experienced males exhibited higher levels of trimethylated H3K27. The involvement of transcriptional mechanisms in sexual experience mechanisms is consistent with data obtained by Fleming and Kucera (1991), showing that sexual experience is abolished by protein synthesis inhibitor. The kinetic of these long-

term stable molecular changes may explain why performance improvement required a 14 days interval to be established and to remain definitive, regardless of the number of copulations performed by the male (data not shown).

To go further in the understanding of signaling pathways underlying the molecular changes induced by sexual experience, we characterized the hormonal status of naive and sexually experienced mice in basal condition or immediately after the ejaculation.

Circulating level of testosterone was decreased just after the ejaculation in both groups. This is in contrast with results obtained in rat by Kamel et al. (1975) and Edinger and Frye (2007) and could be related to the behavioral differences between species : rats are able to multiple ejaculation whereas mouse have a unique one (Hull and Dominguez, 2007). Estradiol levels were unaffected by ejaculation but progesterone and corticosterone were increased just after the ejaculation, as previously described in rats by Bonilla-Jaime et al. (2006). It is noteworthy that the elevated level of corticosterone remained in a physiological range (Bonilla-Jaime et al., 2006; Malisch et al., 2007). This indicates the absence of stress related to the experimental paradigm, this elevation rather being connected to the increased activity of the male during female encounter. Since the local concentration of steroids in the mPOA can be modified by the activity of aromatase which converts T into E2 (Clancy et al., 1995), we measured, for the first time in mouse, the hypothalamic steroid concentration. A decrease tendency in the level of T but not of E2 were observed just after ejaculation, in strong correlation with their plasmatic levels. Our results indicate the absence of detectable local hypothalamic synthesis of steroids in response to sexual activity, in contrast to changes in aromatase enzymatic activity shown in the quail mPOA (de Bournonville et al., 2013; Dickens et al., 2014). Moreover, the comparison between naïve (N) and males sacrificed 14 days after the first mating (E) indicated a similar levels of androgen (AR) and estrogen (ER) receptors within the mPOA, confirming data obtained by Wu and Gore, (2009). These results are consistent with the similar level of testosterone concentration found between naive et sexually experienced males since AR expression is known to be regulated by testosterone levels (Coolen and Wood, 1999; Handa et al., 1996). The absence of AR increase with sexual experience was in opposition with data obtained by Swaney et al., (2012). This was probably due to the different protocol of sexual experience induction, with a two weeks long female exposure. Finally, our results indicate that in mice, as already suggested in rat (Bonilla-Jaime et al., 2006 ; Kamel et al., 1975), testosterone is a permissive signal necessary for sexual experience induction rather than the molecular support triggering the behavioral improvement. This conclusion is sustained by castration-supplementation experiments ensuring a stable testosterone impregnation that still allow sexual experience acquisition (Raskin et al., 2009).

In the rat, the nitroergic system is known to be highly involved in the central control of sexual behavior and in the processes underlying sexual experience induction (Dominguez et al., 2006; Lagoda et al., 2004). We thus examined the involvement of this NO-associated pathway in our model of mouse sexual experience. Our results demonstrated that the number of nNOS-positive cells and the level of nNOS protein were not modified by sexual experience. Furthermore, the enzymatic activity of nNOS, estimated *via* NADPH-diaphorase staining, was found similar between naïve and sexually experienced males. All of these results are in strong contrast with those described in the rat (Dominguez et al., 2006; Nutsch et al., 2014). They suggest that the processes leading to sexual experience are different between the two species and involve other neurochemical pathway in mouse. This is reinforced by our finding that nearly 100 % nNOS cells were expressing AR in the anterior mPOA, whereas Sato et al., (2005) found only 50 % of co-localization in the MPN of rat.

mPOA glutamatergic network could be one of the cerebral system involved in the behavioral improvement induced by sexual experience (Will et al., 2014b), as suggested by the increase in PSD-95 and GluN1 levels found in sexually experienced males. The release of glutamate by afferent terminals in the mPOA seemed to be unaffected by sexual experience since no modifications in the level of vGluT1 and vGluT2 were detected. By contrast, sexually experienced mice specifically exhibited higher levels of GluN1, although GluN2B, GluN2A and AMPA obligatory subunit GluR2 levels remaining similar. The participation of GluN1 is coherent with the increase of its phosphorylated form detected after the mating within the rat mPOA (Dominguez et al., 2007). Nonetheless, despite the absence of changes detected in the level of others glutamate receptor subunits, they may also be involved in the plasticity mechanisms associated with sexual experience *via* the regulation of their subcellular localization as already shown in the mesolimbic area after sexual experience in rat (Pitchers et al., 2012). Finally, our results established that the processes of sexual learning resulted in an increased NMDA, but not AMPA, sensitivity of the mPOA glutamatergic network. This is consistent with several observations : NMDA receptor upregulation are known to be stimulated by an increase in glutamate release (Paoletti et al., 2013) and nearly 100% of cells expressing mating-induced c-Fos also express the GluN1 subunit within the mPOA (Dominguez et al., 2007). Furthermore, the increase in NMDA current triggered by sexual experience, as shown in the mesolimbic area of rat (Pitchers et al., 2010), was associated with increased calcium inputs. This is in agreement with the increased levels of calbindin we found in sexually experienced mice, since this protein is known to act as an intracellular calcium buffer and to be involved in synaptic plasticity mechanisms (Schwaller, 2010). At last, our results could also explain the absence of observed variations of nNOS levels observed between naïve and sexually experienced mice. Indeed, nNOS activity is rapidly modulated by phosphorylations (Zhou and Zhu, 2009) and membrane re-

localization close to NMDA receptors and calcium inputs. This subcellular re-localization, known to be regulated by steroid dependent mechanisms (Parkash et al., 2010), could occur in the early phase of mating and thus would no longer be detected after the 10h-interaction with the female.

In the last part of the work, we wanted to examine the involvement of non-neuronal cell types in the mechanisms underlying sexual experience, since astrocytes and microglia are known to be involved in glutamatergic neurotransmission and spinogenesis regulation (Anderson and Swanson, 2000; Paolicelli et al., 2011). GFAP expression was not modified by sexual experience, confirming data obtained by Will et al., (2015). However, since glutamate exposure is known to increase the expression of the glutamate transporter EAAT1 (Duan et al., 1999), enhanced neural activity triggered by sexual experience may be associated with increased reuptake properties of the astrocytic network, without affecting its morphology. Contrary to astrocytic marker, we observed an increased level of Iba-1, the ionized calcium binding adaptor molecule 1, in sexually experienced mice. Increasing number of studies aimed to characterize the involvement of microglia in neurotransmission regulation and its role in non-pathological brain plasticity mechanisms (Banati, 2002; Branchi et al., 2014). Indeed, microglial cells detect neuronal activity via the expression of a large variety of neurotransmitters receptor (Pocock and Kettenmann, 2007) and particularly NMDA receptors (Kaindl et al., 2012). Also, microglia directly interacts with synapses (Sogn et al., 2013; Tremblay et al., 2010) and releases substances, such as BDNF, known to modulate synaptic plasticity and NMDA receptor properties (Hayashi et al., 2006; Kettenmann et al., 2013). Moreover, in the mPOA the density and the branching of microglia, which are higher in the male compared to the female, regulate the microarchitecture and the dendritic spine density in the developing brain (Lenz and McCarthy, 2015) via a steroid-sensitive pathway (Sierra et al., 2008). It has also been shown that adult depletion of microglia disrupted learning process, dendritic spine formation and modified the glutamatergic synapse composition in glutamate receptor subunits (Parkhurst et al., 2013). These data associated with our results suggest that microglia could actively participate to the plasticity mechanisms triggered by sexual experience in the adult mPOA.

In conclusion, this paper showed for the first time that one mating was sufficient to induce behavioral improvement and mPOA long lasting morphological, molecular and epigenetic changes, such as dendritic spine maturation and increased levels of PSD-95 and H3 histone methylations. Steroid concentrations were not affected by sexual experience, confirming that sex hormones, including testosterone, rather play a permissive role in establishing mPOA changes related to sexual experience.

The first female encounter led to an increase in the sensitivity of the glutamatergic network of the mPOA, assessed by the increased levels of GLuN1 and calbindin. These changes did not involve an increase of nNOS expression but probably involved the participation of microglia.

Although these results are in opposition to several findings described in rat, sexual experience resulted in a similar consequence: the increased sensitivity of the mPOA in sexually experienced male that would accelerate the progression of the successive phases of sexual behavior, leading to a reduction of the mating duration.

More generally and from a developmental point of view, the plasticity mechanisms highlighted in this study allow to consider the acquisition of sexual experience as an ultimate phase of maturation of the cerebral structures controlling sexual behavior. Following the perinatal and pubertal phases, it permit the expression of a fully mature sexual behavior with structural and molecular changes involving some of the same actors such as dendritic spine, glutamate and microglia already involved in perinatal dimorphism and sexual differentiation (Lenz and McCarthy, 2015).



## References

- Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2004. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat. Neurosci.* 7, 643–650. doi:10.1038/nn1254
- Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2002. Sexual Differentiation of Astrocyte Morphology in the Developing Rat Preoptic Area. *J. Neuroendocrinol.* 14, 904–910. doi:10.1046/j.1365-2826.2002.00858.x
- Andersen, M.L., Tufik, S., 2006. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res. Rev.* 51, 136–143. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.10.005
- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.
- Banati, R.B., 2002. Brain plasticity and microglia: is transsynaptic glial activation in the thalamus after limb denervation linked to cortical plasticity and central sensitisation? *J. Physiol. Paris* 96, 289–299.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- Batty, J., 1978. Acute changes in plasma testosterone levels and their relation to measures of sexual behaviour in the male house mouse (*Mus musculus*). *Anim. Behav.* 26, 349–357. doi:10.1016/0003-3472(78)90053-2
- Bean, N.Y., Nunez, A.A., Conner, R., 1981. Effects of medial preoptic lesions on male mouse ultrasonic vocalizations and copulatory behavior. *Brain Res. Bull.* 6, 109–112.
- Ben Menachem-Zidon, O., Avital, A., Ben-Menahem, Y., Goshen, I., Kreisel, T., Shmueli, E.M., Segal, M., Ben Hur, T., Yirmiya, R., 2011. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain. Behav. Immun.* 25, 1008–1016. doi:10.1016/j.bbi.2010.11.007
- Bharadwaj, P., McInnis, C., Madden, A.M.K., Bonthuis, P.J., Zup, S., Rissman, E.F., Park, J.H., 2013. Increased Dendritic Spine Density and Tau Expression Are Associated with Individual Differences in Steroidal Regulation of Male Sexual Behavior. *PLoS ONE* 8, e69672. doi:10.1371/journal.pone.0069672
- Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Arteaga-Silva, M., Retana-Márquez, S., 2006. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm. Behav.* 49, 376–382. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.08.005
- Branchi, I., Alboni, S., Maggi, L., 2014. The role of microglia in mediating the effect of the environment in brain plasticity and behavior. *Front. Cell. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fncel.2014.00390
- Clancy, A.N., Zumpe, D., Michael, R.P., 1995. Intracerebral Infusion of an Aromatase Inhibitor, Sexual Behavior and Brain Estrogen Receptor-Like Immunoreactivity in Intact Male Rats. *Neuroendocrinology* 61, 98–111. doi:10.1159/000126830
- Coolen, L.M., Wood, R.I., 1999. Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification. *Behav. Brain Res.* 98, 143–153.
- de Bournonville, C., Dickens, M.J., Ball, G.F., Balthazart, J., Cornil, C.A., 2013. Dynamic changes in brain aromatase activity following sexual interactions in males: where, when and why? *Psychoneuroendocrinology* 38, 789–799. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.09.001
- De Jonge, F.H., Louwerse, A.L., Ooms, M.P., Evers, P., Endert, E., van de Poll, N.E., 1989. Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. *Brain Res. Bull.* 23, 483–492.
- Dickens, M.J., de Bournonville, C., Balthazart, J., Cornil, C.A., 2014. Relationships between rapid changes in local aromatase activity and estradiol concentrations in male and female quail brain. *Horm. Behav.* 65, 154–164. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.12.011

- Dominguez, J.M., Balfour, M.E., Lee, H.S., Brown, J.L., Davis, B.A., Coolen, L.M., 2007. Mating activates NMDA receptors in the medial preoptic area of male rats. *Behav. Neurosci.* 121, 1023–1031. doi:10.1037/0735-7044.121.5.1023
- Dominguez, J.M., Brann, J.H., Gil, M., Hull, E.M., 2006. Sexual experience increases nitric oxide synthase in the medial preoptic area of male rats. *Behav. Neurosci.* 120, 1389–1394. doi:10.1037/0735-7044.120.6.1389
- Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A., Swanson, R.A., 1999. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 10193–10200.
- Edinger, K.L., Frye, C.A., 2007. Sexual experience of male rats influences anxiety-like behavior and androgen levels. *Physiol. Behav.* 92, 443–453. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.018
- El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., Brecht, D.S., 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368.
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 2000. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9287–9292.
- Fleming, A.S., Kucera, C., 1991. Sexual experience effects are blocked both by the protein-synthesis inhibitor, cycloheximide, and by the noncompetitive NMDA antagonist, MK-801. *Behav. Neural Biol.* 56, 319–328.
- Garelick, T., Swann, J., 2014. Testosterone regulates the density of dendritic spines in the male preoptic area. *Horm. Behav.* 65, 249–253. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.01.008
- Gilmore, R.F., Varnum, M.M., Forger, N.G., 2012. Effects of blocking developmental cell death on sexually dimorphic calbindin cell groups in the preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis. *Biol. Sex Differ.* 3, 5. doi:10.1186/2042-6410-3-5
- Gioeli, D., Paschal, B.M., 2012. Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 352, 70–78. doi:10.1016/j.mce.2011.07.004
- Glasper, E.R., LaMarca, E.A., Bocarsly, M.E., Fasolino, M., Opendak, M., Gould, E., 2015. Sexual experience enhances cognitive flexibility and dendritic spine density in the medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 125, 73–79. doi:10.1016/j.nlm.2015.07.007
- Handa, R.J., Kerr, J.E., DonCarlos, L.L., McGivern, R.F., Hejna, G., 1996. Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39, 57–67.
- Harris, K.M., Jensen, F.E., Tsao, B., 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J. Neurosci.* 1992 Aug;12(8):following table of contents]. *J. Neurosci.* 12, 2685–2705.
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., Nakanishi, H., 2006. Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53, 660–668. doi:10.1002/glia.20322
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2007. SEXUAL BEHAVIOR IN MALE RODENTS. *Horm. Behav.* 52, 45–55. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.030
- Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2006. Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res., Sex, Genes and Steroids* 1126, 66–75. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.031
- Hull, E.M., Meisel, R.L., Sachs, B.D., 2002. 1 - Male Sexual Behavior A2 - Pfaff, Donald W., in: Arnold, A.P., Fahrbach, S.E., Etgen, A.M., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 3–137.
- Jean, A., Trouillet, A.-C., Andrianarivelo, N.A., Mhaouty-Kodja, S., Hardin-Pouzet, H., 2017. phospho-ERK and sex steroids in the mPOA: involvement in male mouse sexual behavior. *J. Endocrinol.* doi:10.1530/JOE-17-0025
- Kaindl, A.M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Josserand, J., Ali, C., Vivien, D., Collingridge, G.L., Lombet, A., Issa, L., Rene, F., Loeffler, J.-P., Kavelaars,

- A., Verney, C., Mantz, J., Gressens, P., 2012. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann. Neurol.* 72, 536–549. doi:10.1002/ana.23626
- Kamel, F., Mock, E.J., Wright, W.W., Frankel, A.I., 1975. Alterations in plasma concentrations of testosterone, LH, and prolactin associated with mating in the male rat. *Horm. Behav.* 6, 277–288. doi:10.1016/0018-506X(75)90014-8
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 77, 10–18. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.023
- Kim, M.J., Futai, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K., Sheng, M., 2007. Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56, 488–502. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.007
- Lagoda, G., Muschamp, J.W., Vighorichik, A., Hull, E.M., 2004. A nitric oxide synthesis inhibitor in the medial preoptic area inhibits copulation and stimulus sensitization in male rats. *Behav. Neurosci.* 118, 1317–1323. doi:10.1037/0735-7044.118.6.1317
- Lamy, J., Liere, P., Pianos, A., Aprahamian, F., Mermillod, P., Saint-Dizier, M., 2016. Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology* 86, 1409–1420. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.086
- Lenz, K.M., McCarthy, M.M., 2015. A starring role for microglia in brain sex differences. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 21, 306–321. doi:10.1177/1073858414536468
- Lenz, K.M., Nugent, B.M., Haliyur, R., McCarthy, M.M., 2013. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2761–2772. doi:10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013
- Leuner, B., Shors, T.J., 2004. New Spines, New Memories. *Mol. Neurobiol.* 29, 117–130. doi:10.1385/MN:29:2:117
- López, H.H., Olster, D.H., Ettenberg, A., 1999. Sexual motivation in the male rat: the role of primary incentives and copulatory experience. *Horm. Behav.* 36, 176–185. doi:10.1006/hbeh.1999.1535
- Lumley, L.A., Hull, E.M., 1999. Effects of a D1 antagonist and of sexual experience on copulation-induced Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic nucleus. *Brain Res.* 829, 55–68. doi:10.1016/S0006-8993(99)01338-4
- Mahmoud, R.R., Sase, S., Aher, Y.D., Sase, A., Gröger, M., Mokhtar, M., Höger, H., Lubec, G., 2015. Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines. *PloS One* 10, e0139739. doi:10.1371/journal.pone.0139739
- Maiti, P., Manna, J., Ilavazhagan, G., Rossignol, J., Dunbar, G.L., 2015. Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 59, 208–237. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.09.020
- Malisch, J.L., Saltzman, W., Gomes, F.R., Rezende, E.L., Jeske, D.R., Garland, T., Jr, 2007. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *Physiol. Biochem. Zool.* PBZ 80, 146–156.
- Mellone, M., Stanic, J., Hernandez, L.F., Iglesias, E., Zianni, E., Longhi, A., Prigent, A., Picconi, B., Calabresi, P., Hirsch, E.C., Obeso, J.A., Di Luca, M., Gardoni, F., 2015. NMDA receptor GluN2A/GluN2B subunit ratio as synaptic trait of levodopa-induced dyskinesias: from experimental models to patients. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fncel.2015.00245
- Morimoto, T., Wang, X.H., Poo, M.M., 1998. Overexpression of synaptotagmin modulates short-term synaptic plasticity at developing neuromuscular junctions. *Neuroscience* 82, 969–978.
- Nutsch, V.L., Will, R.G., Hattori, T., Tobiansky, D.J., Dominguez, J.M., 2014. Sexual experience influences mating-induced activity in nitric oxide synthase-containing neurons in the medial preoptic area. *Neurosci. Lett.* 579, 92–96. doi:10.1016/j.neulet.2014.07.021
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. doi:10.1038/nrn3504

- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458. doi:10.1126/science.1202529
- Parkash, J., D'Anglemon De Tassigny, X., Bellefontaine, N., Campagne, C., Mazure, D., Buée-Scherrer, V., Prevot, V., 2010. Phosphorylation of N-methyl-D-aspartic acid receptor-associated neuronal nitric oxide synthase depends on estrogens and modulates hypothalamic nitric oxide production during the ovarian cycle. *Endocrinology* 151, 2723–2735. doi:10.1210/en.2010-0007
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.-B., 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell* 155, 1596–1609. doi:10.1016/j.cell.2013.11.030
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing.
- Pitchers, K.K., Balfour, M.E., Lehman, M.N., Richtand, N.M., Yu, L., Coolen, L.M., 2010. Neuroplasticity in the mesolimbic system induced by natural reward and subsequent reward abstinence. *Biol. Psychiatry* 67, 872–879. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.036
- Pitchers, K.K., Schmid, S., Di Sebastiano, A.R., Wang, X., Laviolette, S.R., Lehman, M.N., Coolen, L.M., 2012. Natural Reward Experience Alters AMPA and NMDA Receptor Distribution and Function in the Nucleus Accumbens. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034700
- Pocock, J.M., Kettenmann, H., 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527–535. doi:10.1016/j.tins.2007.07.007
- Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., Mhaouty-Kodja, S., 2009. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4461–4470. doi:10.1523/JNEUROSCI.0296-09.2009
- Sala, C., Segal, M., 2014. Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol. Rev.* 94, 141–188. doi:10.1152/physrev.00012.2013
- Sato, S., Braham, C.S., Putnam, S.K., Hull, E.M., 2005. Neuronal nitric oxide synthase and gonadal steroid interaction in the MPOA of male rats: co-localization and testosterone-induced restoration of copulation and nNOS-immunoreactivity. *Brain Res.* 1043, 205–213. doi:10.1016/j.brainres.2005.02.074
- Schwaller, B., 2010. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. doi:10.1101/cshperspect.a004051
- Sengoku, T., Yokoyama, S., 2011. Structural basis for histone H3 Lys 27 demethylation by UTX/KDM6A. *Genes Dev.* 25, 2266–2277. doi:10.1101/gad.172296.111
- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A., Milner, T.A., McEwen, B.S., Bulloch, K., 2008. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia* 56, 659–674. doi:10.1002/glia.20644
- Sogn, C.J.L., Puchades, M., Gundersen, V., 2013. Rare contacts between synapses and microglial processes containing high levels of Iba1 and actin—a postembedding immunogold study in the healthy rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2030–2040. doi:10.1111/ejn.12213
- Sura, A., Overstreet, D.H., Marson, L., 2001. Selectively bred male rat lines differ in naïve and experienced sexual behavior. *Physiol. Behav.* 72, 13–20.
- Swaney, W.T., Curley, J.P., Champagne, F.A., Keverne, E.B., 2007. Genomic imprinting mediates sexual experience-dependent olfactory learning in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6084–6089. doi:10.1073/pnas.0609471104
- Swaney, W.T., Dubose, B.N., Curley, J.P., Champagne, F.A., 2012. Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Horm. Behav.* 61, 472–478. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.01.001
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., Majewska, A.K., 2010. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLOS Biol.* 8, e1000527. doi:10.1371/journal.pbio.1000527

- Tucker, W.C., Chapman, E.R., 2002. Role of synaptotagmin in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Biochem. J.* 366, 1–13. doi:10.1042/BJ20020776
- Vigdorichik, A.V., Parrish, B.P., Lagoda, G.A., McHenry, J.A., Hull, E.M., 2012. AN NMDA ANTAGONIST IN THE MPOA IMPAIRS COPULATION AND STIMULUS SENSITIZATION IN MALE RATS. *Behav. Neurosci.* 126, 186–195. doi:10.1037/a0026460
- Will, R.G., Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2014a. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav., Psychopharmacology of Male and Female Sexual Behavior* 121, 115–123. doi:10.1016/j.pbb.2014.02.005
- Will, R.G., Hull, E.M., Dominguez, J.M., 2014b. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 121, 115–123. doi:10.1016/j.pbb.2014.02.005
- Will, R.G., Nutsch, V.L., Turner, J.M., Hattori, T., Tobiansky, D.J., Dominguez, J.M., 2015. Astrocytes in the medial preoptic area modulate ejaculation latency in an experience-dependent fashion. *Behav. Neurosci.* 129, 68–73. doi:10.1037/bne0000026
- Wright, C.L., Burks, S.R., McCarthy, M.M., 2008. Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. *Dev. Neurobiol.* 68, 1406–1419. doi:10.1002/dneu.20665
- Wu, D., Gore, A.C., 2009. Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middle-aged male rats. *Horm. Behav.* 56, 299–308. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.06.007
- Zhou, L., Zhu, D.-Y., 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 20, 223–230. doi:10.1016/j.niox.2009.03.001



# Phospho-ERK and sex steroids in the mPOA: involvement in male mouse sexual behaviour

Arnaud Jean, Anne-Charlotte Trouillet, Njiva Andry Andrianarivelo, Sakina Mhaouty-Kodja and Hélène Hardin-Pouzet

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris – Seine; Institut de Biologie Paris Seine, Paris, France

Correspondence should be addressed to H Hardin-Pouzet

**Email**  
helene.pouzet@upmc.fr

## Abstract

This paper aimed to investigate the mechanisms triggering ERK phosphorylation and its functional role in male sexual behaviour. ERK1/2-phosphorylated form was detected in the medial preoptic area of the hypothalamus (mPOA) during the sexual stimulation of naive and sexually experienced males who were killed 5 min after the first intromission. This mating-induced ERK phosphorylation was increased in sexually experienced males compared to that in naive mice. The functional role of the ERK1/2 pathway activation during sexual behaviour was explored with the administration of a MEK inhibitor, SL-327 (30 mg/kg, i.p.), 45 min before the contact with a receptive female. Inhibition of ERK phosphorylation was found to decrease sexual motivation in both naive and experienced males without altering their copulatory ability. The mechanisms potentially involved in this rapid ERK1/2 pathway activation were specified *ex vivo* on hypothalamic slices. A thirty-minute incubation with 100 nM of testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) or oestradiol (E2) led to ERK phosphorylation. No changes were observed after incubation with testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime-BSA (T-BSA), an impermeable to the plasma membrane form of testosterone. All these results indicate that ERK phosphorylation within the mPOA could be a key player in the motivational signalling pathway and considered as an index of sexual motivation. They also demonstrate the involvement of oestrogen receptor (ER) and androgen receptor (AR) transduction pathways in steroid-dependent ERK activation.

## Key Words

- ▶ phospho-ERK
- ▶ sexual behaviour
- ▶ SL-327
- ▶ testosterone
- ▶ hypothalamic preoptic area

*Journal of Endocrinology*  
(2017) **233**, 257–267

## Introduction

Sexual behaviour in male rodents can be described as a series of behavioural elements cumulating in ejaculation. These involve approaches and olfactory investigations of the female during the motivational phase of sexual behaviour, which is followed by bouts of mounting, intromission and then ejaculation constituting the copulatory phase. The mating behaviour is governed by complex central interactions between different systems,

which process sensory inputs, regulate rewards and integrate hormonal signals (Hull *et al.* 2002). The medial preoptic area of the hypothalamus (mPOA) represents the critical integrative site for male sexual behaviour regulation because lesions in this area are known to disrupt mounting, intromission and ejaculation in rats (De Jonge *et al.* 1989) and mounting behaviour in mice (Bean *et al.* 1981). Peripheral olfactory signals are received

in sensory neurons of the olfactory epithelium and the vomeronasal organ, processed and relayed to the main and accessory olfactory bulbs and then to the medial amygdala and in bed nucleus of the stria terminalis before finally being integrated in the mPOA (Simerly & Swanson 1986, Hull & Dominguez 2007). In turn, activation of the mPOA network results in the stimulation of premotor areas responsible for the sexual response (Simerly & Swanson 1988) and descending systems providing excitatory stimuli controlling the spinal generators for erection and ejaculation (Giuliano *et al.* 1996, Veening & Coolen 2014).

The mPOA is activated in the first moments of mating as demonstrated by c-Fos mapping of the neural networks underlying the control of sexual behaviour (Baum & Everitt 1992, Pfau & Heeb 1997). This has been confirmed by Taziaux and coworkers (Taziaux *et al.* 2011) by detecting the phosphorylated form of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (pERK), which was increased 10 min after exposure of sexually experienced males to female olfactory cues or after the display of coital behaviour. Hence, measuring pERK levels appeared as an accurate alternative tool to detect mPOA short-term activation as the timeline of kinase-mediated protein phosphorylation is much shorter than the induction of genomic transcription and translation of immediate early genes (IEG) (Murphy & Blenis 2006). ERK phosphorylation is the final step of an intracellular signalling cascade that participates in the regulation of various cellular processes such as proliferation and differentiation (Shaul & Seger 2007). Within the central nervous system, it plays a critical role in the modulation of synaptic plasticity, neuronal excitability, memory formation, storage and processing (Kelleher *et al.* 2004, Thomas & Haganir 2004, Shiflett & Balleine 2011a, Girault 2012), as well as in the control of reward, aversive or learning behaviour (Shiflett & Balleine 2011b, Pascoli *et al.* 2014, Goto *et al.* 2015). Among the different signals triggering the ERK pathway activation, the stimulation of hormonal receptors, namely androgen (AR) and oestrogen receptors (ER), is known to be a potent activator of ERK phosphorylation in different brain areas such as the hippocampus (Zhao & Brinton 2007, Pike *et al.* 2008) and the cerebellum (Wong *et al.* 2003) and also in other cell types in skeletal muscle (Estrada *et al.* 2003), the breast (Chia *et al.* 2011) and prostate (Liao *et al.* 2013).

Although pERK level has been shown to be increased in the mPOA of sexually experienced copulating males, currently no data are available on the hormonal

signals triggering this phosphorylation and its functional relevance.

We first focused on the role of sex steroid hormones as the mPOA highly expresses AR (Raskin *et al.* 2009), which can be activated by testosterone (T) or its metabolite dihydrotestosterone (DHT). mPOA also expresses ER $\alpha$  (Swaney *et al.* 2012) and ER $\beta$  (Orikasa *et al.* 2002) activated by oestradiol (E2), which can be produced by neural aromatisation of T. These experiments were conducted *ex vivo* on hypothalamic slices including the mPOA. This model has been found to efficiently decipher signalling pathways as it has the advantage of maintaining the integrity of the cellular microenvironment while using various pharmacological agents (Maalood *et al.* 2008, St-Louis *et al.* 2014). In the second part of our work, we analysed the functional role of ERK phosphorylation *in vivo*. We first established that ERK is phosphorylated at the beginning of the copulatory phase. We then compared the levels of ERK phosphorylation in naive and sexually experienced mice because ERK phosphorylation is involved in memory consolidation and network potentiation (Adams & Sweatt 2002, Thomas & Haganir 2004, Davis & Laroche 2006). Indeed, although behavioural components of mating are known to be subjected to learning processes (Hull & Dominguez 2006, Swaney *et al.* 2012), the potential role of ERK phosphorylation in this improvement has never been addressed. Finally, we administrated SL-327, an inhibitor of ERK phosphorylation crossing the blood-brain barrier (Atkins *et al.* 1998, Valjent *et al.* 2000), to naive and experienced mice before the interaction with a receptive female to analyse the importance of ERK phosphorylation in conducting the various phases of sexual behaviour.

## Material and methods

### Animals

All the experiments were conducted in accordance with French and European laws (Decrees 2013-118, L214 and R214-87/130 and 2013/63/ECC) and are approved by the 'Charles Darwin' ethical committee (project number 01490-01).

C57Bl/6J mice (Janvier Breeding Centre, Le Genest, France) were bred in our animal facility and housed under a controlled photoperiod (12-h light and 12-h darkness cycle – lights on at 02:00h) at 20 $\pm$ 2°C with food and water *ad libitum*. Ten-week-old adult males were isolated for two weeks before any behavioural experiment.



### Preparation of receptive females

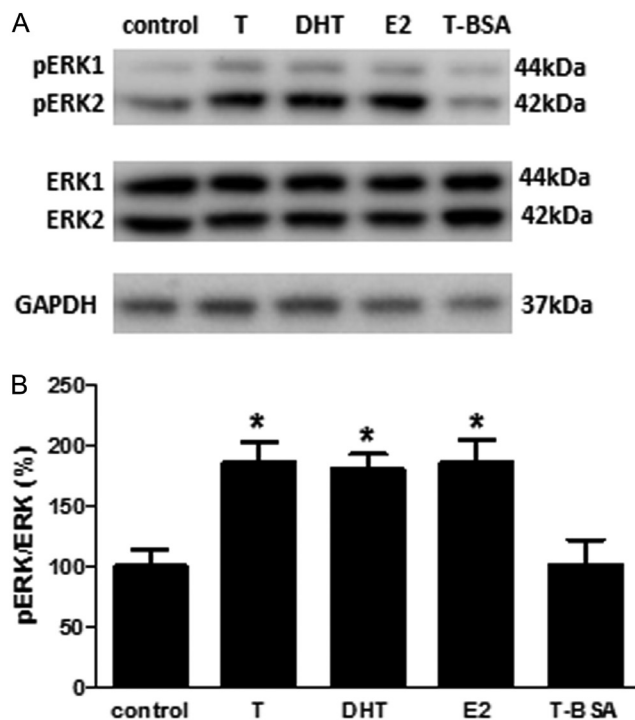
C57BL/6J females were ovariectomised under general anaesthesia (xylazine 10 mg/kg – ketamine 100 mg/kg, i.p.) and implanted with Silastic (Dow Corning) implants filled with 50 µg of oestradiol-benzoate (Sigma-Aldrich) in 30 µL of sesame oil. Four to five hours before the tests, they were subcutaneously treated with 1 mg of progesterone (Sigma-Aldrich) in 100 µL of sesame oil, as previously reported (Raskin *et al.* 2009). Female receptivity was verified before the beginning of experiments with a sexually experienced male.

### Male sexual experience

Sexually experienced males were obtained after a 10-h mating session with a receptive female. The test was conducted under red-light illumination 2 h after lights off, videotaped and analysed to confirm that each male exhibited copulatory behaviour and reached the ejaculation. Male sexual behaviour was analysed by scoring the sniffing time before the first intromission, the latency to first intromission, the number of mounts and the mating duration defined as the time from the first intromission to ejaculation.

### Effect of sex steroid hormones on ERK phosphorylation within the mPOA

Naive males were decapitated, brains were quickly removed and immersed in cooled artificial cerebrospinal fluid (aCSF): 117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM glucose (Maalood *et al.* 2008, St-Louis *et al.* 2014). Coronal hypothalamic slices were cut with a Vibroslice (World Precision Instruments, Sarasota, USA). Using the anterior commissure as a landmark, one 400-µm-thick section including the mPOA was selected for each mouse, transferred to a brain slice chamber system and incubated in aCSF with either testosterone (T, 100 nM; Sigma-Aldrich), dihydrotestosterone (DHT, 100 nM; Sigma-Aldrich), oestradiol (E2, 100 nM; Sigma-Aldrich) or testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime-BSA (T-BSA, 20–30 testosterone molecules per molecule BSA, 100 nM; Sigma-Aldrich) diluted in DMSO (7 males per group). Control slices were incubated with only DMSO. In a pilot experiment, the viability of the slices was verified by Fluoro-Jade staining (Millipore). After 30 min of treatment, mPOA was punched for Western blot analysis.

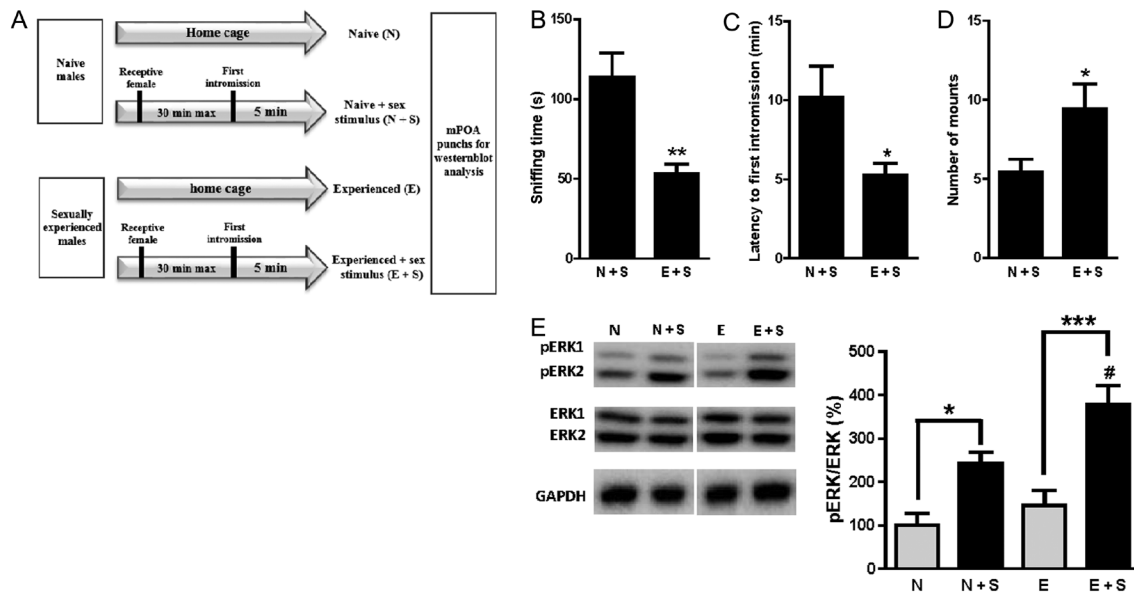


**Figure 1**

Activation of ERK by testosterone and its metabolites. Brain slices including mPOA were incubated 30 min in aCSF + DMSO (control), testosterone (T, 100 nM), dihydrotestosterone (DHT, 100 nM), oestradiol (E2, 100 nM) or testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime-BSA (T-BSA, 100 nM). (A) Representative blot detecting pERK, ERK and GAPDH in the mPOA after 30 min of incubation. (B) Densitometric evaluation of the Western blots. Results (pERK/ERK) are presented as mean percentage of the control group  $\pm$  s.e.m.,  $n=7$  in each group analysed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test, \* $P<0.05$  when compared to control group.

### Effect of sexual experience on mating-induced ERK phosphorylation

Twenty-eight males were assigned to four different groups (7 males per group): naive staying in home cage (Naive: N), naive allowed to mate with a receptive female (Naive + sex stimulus: N+S), sexually experienced (one mating 14 days before the experiment) staying in home cage (sexually experienced: E) and sexually experienced allowed to mate with a receptive female (sexually experienced + sex stimulus: E+S). Males were allowed to mate with a receptive female for 30 min and their sexual behaviour was analysed. Animals showing no sexual behaviour during the 30-min test were removed from the study. Five minutes after the first intromission, they were decapitated and the brain was rapidly removed. One 400-µm-thick hypothalamic section was cut with a Vibroslice in cold 0.1 M phosphate buffer (PB), and the mPOA was punched for Western blot analysis.

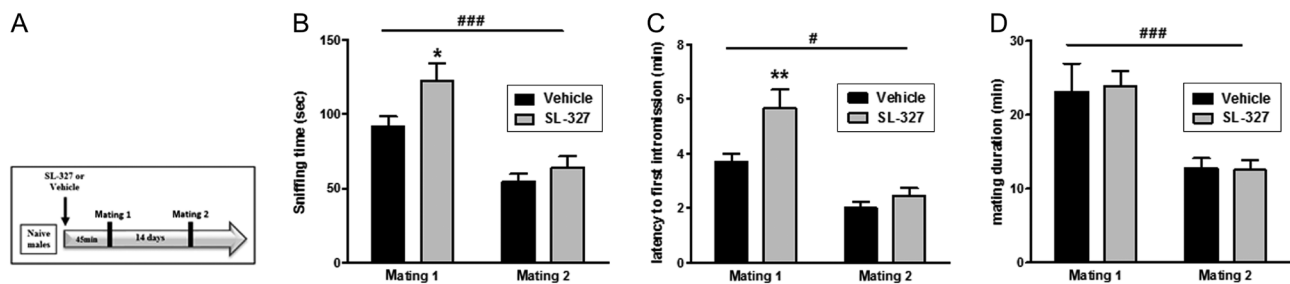
**Figure 2**

Mating-induced ERK phosphorylation in the mPOA and sexual experience. (A) Experimental design used to analyse the effect of mating and sexual experience on ERK phosphorylation in the mPOA. N: naive male staying in home cage, N+S: naive male with sex stimulus killed 5 min after the first intromission, E: experienced male staying in home cage, E+S: experienced male with sex stimulus killed 5 min after the first intromission. Sexual behaviour expressed as (B) total anogenital sniffing time before the first intromission, (C) latency to the first intromission and (D) number of mounts for N+S and E+S males. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m. and analysed by Student's *t* test, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 compared to N+S group. (E) Representative blot detecting pERK, ERK and GAPDH in the mPOA for N, N+S, E and E+S males and densitometric evaluation. Results (pERK/ERK) are presented as mean percentage of the N group  $\pm$  s.e.m. ( $n$  = 7 in each group) and analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests, \* $P$  < 0.05, \*\*\* $P$  < 0.001, # $P$  < 0.05 when compared to N+S group.

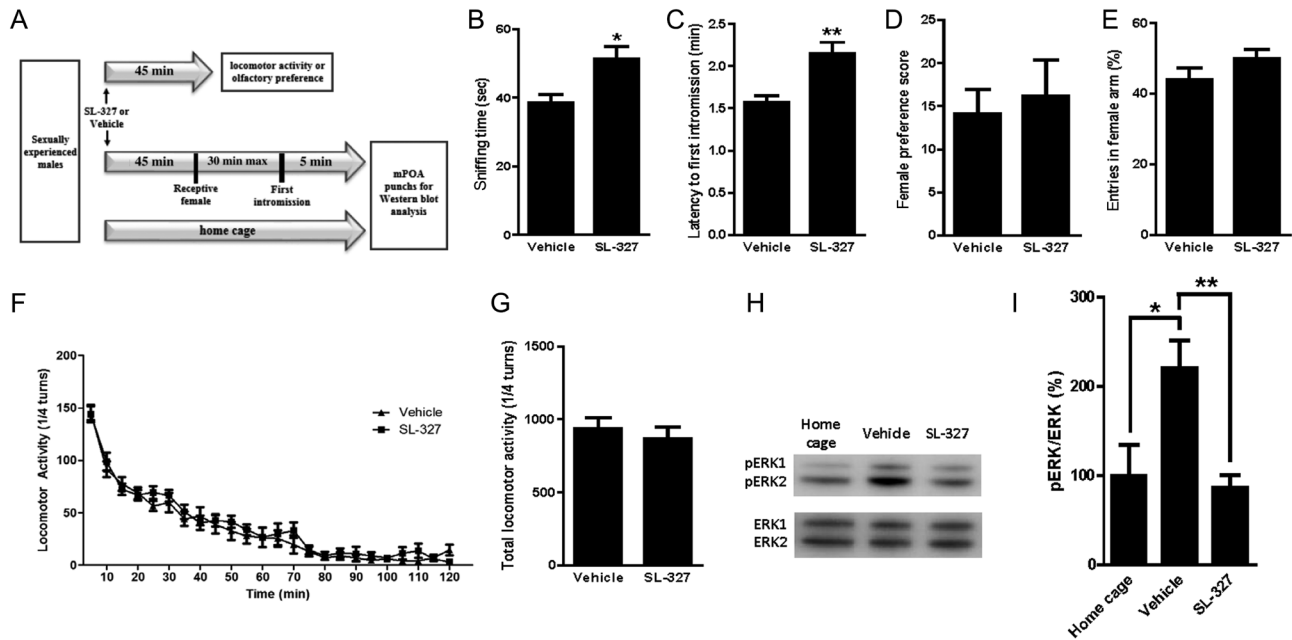
### Involvement of ERK phosphorylation in the induction of sexual experience

Forty-five minutes before mating, 17 naive males received an i.p. injection of SL-327 (Sigma-Aldrich, 30 mg/kg dissolved in 5% DMSO, 5% Tween 20 and 15% polyethylene glycol 400), and 15 males received an i.p.

injection of vehicle (Fig. 3A). Each male was tested in its home cage for 10h after the introduction of a receptive female, and male sexual behaviour was analysed (mating 1). To determine the role of pERK in sexual experience, male sexual behaviour of the same animals was also analysed 14 days later without any injection (mating 2).

**Figure 3**

Involvement of ERK phosphorylation in the induction of male sexual experience. (A) Experimental design used to analyse the effect of a unique administration of the ERK phosphorylation inhibitor SL-327 administration (30 mg/kg, i.p.) on sexual behaviour improvement. SL-327- and vehicle-injected groups were compared during the first and the second mating (separated by 14 days) for (B) total anogenital sniffing time before the first intromission, (C) latency to the first intromission and (D) mating duration. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m. ( $n$  = 15 for vehicle group and  $n$  = 17 for SL-327 group) and analysed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests. # $P$  < 0.05, ### $P$  < 0.001 for sexual experience effect and \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 when compared to mating 1 of vehicle group.



**Figure 4**

Involvement of ERK phosphorylation in sexual behaviour, locomotor activity and olfactory preference of sexually experienced males. (A) Experimental design used to analyse the effect of SL-327 administration (30 mg/kg, i.p.) on sexual behaviour, locomotor activity, olfactory preference and ERK phosphorylation in the mPOA of sexually experienced males. Sexual behaviour expressed as (B) total anogenital sniffing time before the first intromission and (C) latency to the first intromission ( $n=8$  in each group) presented as mean  $\pm$  s.e.m. and analysed by Student's *t* test,  $*P<0.05$  when compared to vehicle group. Olfactory preference score defined as the time spent sniffing the female – time spent sniffing the male/total time sniffing, (E) percentage of entries in female arm analysed by Student's *t* test ( $n=11$  in each group). Locomotor activity in F and G. (F) Locomotor activity during the 120-min test, assessed by counting the number of beam interruptions every 5-min intervals, analysed by two-way repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, (G) total locomotor activity, defined as the total number of beam interruptions during the 120-min test analysed by Student's *t* test ( $n=11$  in each group). (H) Representative blot detecting pERK and ERK in the mPOA of experienced male mice kept in their home cage without a female (home cage) or injected either with SL-327 (SL-327) or vehicle (vehicle), put in the presence of a receptive female and killed 5 min after the first intromission. (I) Densitometric evaluation of the Western blot. Results (pERK/ERK) are expressed as mean percentage of the home cage group  $\pm$  s.e.m. and analysed by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test ( $n=8$  for vehicle and SL-327 groups,  $n=5$  for home cage group).  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  compared to home cage group.

### Involvement of ERK phosphorylation in olfactory preference of sexually experienced males

Twenty-two sexually experienced (one mating 14 days before the experiment) males were tested for olfactory preference (Fig. 4A). Two hours after lights were switched off, each male was placed into an enclosed Plexiglas Y-maze without any stimuli, for 5 min on two consecutive days, allowing them to adapt to the apparatus. On the third day, 45 min after i.p. injection of SL-327 (30 mg/kg) or vehicle, animals (11 per group) were given a choice between an anaesthetised receptive female or an anaesthetised gonadally intact male as previously described (Picot *et al.* 2014). The time spent sniffing at each partition and the number of entrances in the different arms were scored over the nine-minute test. Results were expressed as a preference score ((time spent sniffing the female – time spent sniffing the male)/total time sniffing) and in a percentage of the entries into the

female arm. The maze was cleaned with 10% ethanol between trials.

### Involvement of ERK phosphorylation in locomotor activity of sexually experienced males

Another group of 22 sexually experienced males were i.p. injected either with SL-327 (30 mg/kg) or vehicle (11 per group) 45 min before the test (Fig. 4A). Their locomotor activity was evaluated for 120 min using a circular corridor with four infrared beams placed at every 90° (Imetronic, Pessac, France) in a low luminosity environment as previously described (Valjent *et al.* 2006). Locomotor activity during the 120-min test was assessed by counting the number of beam interruptions every 5-min intervals. The total locomotor activity represents the number of quarters travelled during the 120-min test.

### Involvement of ERK phosphorylation in the sexual behaviour of sexually experienced males

A group of sixty sexually experienced males was either injected with SL-327 (30 mg/kg) or vehicle (8 per group) 45 min before a mating test (Fig. 4A). A control group of 5 sexually experienced males who stayed in their home cage were also analysed. Male sexual behaviour was followed, and five minutes after the first intromission, mPOA was punched for Western blot analysis.

### Western blot analysis

Punches were homogenised in 50 mM Tris (pH 7.2), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1% Triton-X100 and 1% protease inhibitor (Roche) and sonicated 7 times during 30 s (Bioruptor Plus; Diagenode, Seraing, Belgium). After centrifugation (13 min, 15,495 g, at 4°C), protein concentrations were determined in the supernatant with a Coomassie assay (Thermo Fisher Scientific). Samples were denatured in Laemmli buffer (5 min at 95°C). 15 µg protein were subjected to electrophoresis (120 V) on 4–12% Bis-Tris NuPAGE (Thermo Fisher Scientific) and electrotransferred overnight (30 V at 4°C) onto a PVDF membrane (Millipore). Blots were blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (TBS) and 0.2% Tween20 (2 h) and incubated overnight with primary antibodies against pERK1/2 (1:2000; polyclonal rabbit; Cell Signalling Technology), ERK1/2 (1:2000; polyclonal rabbit; Cell Signalling Technology) and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 1:20,000; monoclonal mouse; Santa Cruz Biotechnology) diluted in the same solution. Antibodies binding to blots were detected by 2-h incubation with horseradish peroxidase anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:10,000; Jackson ImmunoResearch). Signals were visualised with a pico-Super Signal detection kit (Thermo Fisher Scientific) with an Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) and quantified with ImageJ software (NIH). To determine the level of ERK activation, the phospho-ERK signal was normalised to the total ERK signal and expressed as a percentage of the control.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software). Data were expressed as mean ± S.E.M. and compared with a Student's test.

One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used to analyse slice treatments. Two-way ANOVA followed by Bonferroni tests were used to analyse the effects of mating and sexual experience on ERK phosphorylation. Two-way repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni tests were used to analyse the effects of SL-327 treatment and the number of mating on sexual behaviour and also to analyse the effects of SL-327 treatment and time on locomotor activity. *P* values of less than 0.05 were considered to be significant.

## Results

### Activation of ERK by testosterone and its metabolites

Slices containing mPOA were incubated with T or T-BSA, a non-aromatisable form of testosterone, which is impermeable to the plasma membrane (Nguyen *et al.* 2005). Incubations were also performed with testosterone metabolites such as DHT or E2. An incubation time of 30 min was chosen to be consistent with the rapid time course of ERK phosphorylation observed *in vivo* (Taziaux *et al.* 2011). Slices were incubated with 100 nM of steroid corresponding to the plasmatic level of testosterone found in copulating mice (Coquelin & Desjardins 1982, James & Nyby 2002).

The level of ERK phosphorylation in the mPOA was analysed by Western blot (Fig. 1A). One-way ANOVA showed a significant effect of treatment on ERK phosphorylation ( $F=5.623$ ,  $P<0.001$ , Fig. 1B). *Post hoc* analyses showed an 86% significant increase in ERK phosphorylation induced by T treatment when compared to the control group ( $P<0.05$ ). This increase was also significant for the incubation with DHT (80%,  $P<0.05$ ) or with E2 (86%,  $P<0.05$ ). By contrast, the levels of pERK were unchanged after incubation with T-BSA.

### Mating-induced ERK phosphorylation in the mPOA is increased by sexual experience

Sexually naive (N+S group) or experienced (E+S group) male mice were faced to a receptive female for 30 min and killed 5 min after the first intromission. Sexually naive (N group) or experienced (S group) control mice were kept in their home cage without any contact with a receptive female (Fig. 2A). The 5-min delay was adapted to the time course of ERK phosphorylation, which is known to be activated in the first 10 min after female exposure (Taziaux *et al.* 2011).



Analyses of sexual parameters showed a 53% reduction of the time spent in anogenital sniffing ( $P < 0.01$ ), a 48% reduction of latency to the first intromission ( $P < 0.05$ ) and a 74% increase in the number of mounts ( $P < 0.05$ ) in the E+S group compared to the N+S group, confirming the improvement of sexual behaviour in experienced mice (Fig. 2B, C and D).

Two-way ANOVA demonstrated a significant effect of mating ( $F_{(1-24)} = 30.4$ ,  $P < 0.001$ ) and sexual experience ( $F_{(1-24)} = 7.28$ ,  $P < 0.05$ ) but no interaction between these main effects ( $F_{(1-24)} = 1.78$ ,  $P > 0.05$ ) on ERK phosphorylation (Fig. 2E). *Post hoc* analyses showed that pERK level was increased for N+S males killed 5 min after the first intromission (N+S:  $241 \pm 26.9$ ,  $P < 0.05$ ), but was unchanged in the control experienced group (E:  $146 \pm 33.9$ ) when both were compared to the control naive group (N:  $100 \pm 27.9$ ). By contrast, ERK phosphorylation was increased in the E+S group when compared to the N+S group (E+S:  $378 \pm 44$ ,  $P < 0.05$ ). The changes in pERK levels were independent of any variation of total ERK protein normalised to the amount of GAPDH, demonstrating a specific regulation on ERK phosphorylation rather than on its protein level.

These results demonstrate that ERK was phosphorylated in the mPOA 5 min after the first intromission. The basal levels of pERK were not modified by sexual experience, but the ability of mPOA to phosphorylate ERK during mating was enhanced by sexual experience.

### Involvement of ERK phosphorylation in the regulation of male sexual behaviour

To determine the role of ERK phosphorylation in the regulation of sexual behaviour, SL-327 (30 mg/kg, i.p.) was administered to naive males 45 min before the introduction of a receptive female (Fig. 3A) and its effect on sexual behaviour was analysed (mating 1). To determine whether the effects of this unique injection of SL-327 are transient or maintained in the long term, males were subjected to a second sexual behavioural test 14 days later (mating 2, Fig. 3B, C and D).

Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of SL-327 treatment on the time spent in anogenital sniffing ( $F_{(1-30)} = 4.74$ ,  $P < 0.0001$ ) and on the latency to first intromission ( $F_{(1-30)} = 51.68$ ,  $P < 0.0001$ ) but not on mating duration ( $F_{(1-30)} = 29.05$ ,  $P = 0.92$ ). A significant effect of sexual experience was also observed on the time spent in anogenital sniffing ( $F_{(1-30)} = 39.87$ ,  $P < 0.0001$ ), the latency to first intromission

( $F_{(1-30)} = 5.78$ ,  $P < 0.05$ ) and the mating duration ( $F_{(1-30)} = 29.05$ ,  $P < 0.0001$ ). SL-327 treatment induced a significant increase by 34% ( $P < 0.01$ ) of the time spent in anogenital sniffing and a 53% increase ( $P < 0.05$ ) of the latency to first intromission for SL-327 treated males compared to the vehicle group in the first mating test.

These behavioural differences were not observed during the second mating test for the sniffing time ( $54.39 \pm 5.2$  vs  $63.8 \pm 7.9$ ), the latency to the first intromission ( $2 \pm 0.21$  vs  $2.46 \pm 0.26$ ) and the mating duration ( $12.7 \pm 1.38$  vs  $12.5 \pm 1.31$ ). This indicates that the SL-327 treatment transiently altered sexual behaviour but did not interfere with sexual improvement assessed two weeks later.

### Involvement of ERK phosphorylation in the control of male sexual behaviour in experienced males

The short-term effect of the SL-327 (30 mg/kg, i.p.) treatment was further analysed on sexually experienced males by comparing the vehicle group and SL-327-injected groups (Fig. 4A). The results showed a significant increase of 34% ( $P < 0.05$ ) in the time spent in anogenital sniffing and an increase of 37% ( $P < 0.05$ ) in the latency to the first intromission in the SL-327-treated group (Fig. 4B and C).

To ensure that SL-327 did not affect behaviours that might interfere with the expression of sexual behaviour controlled by the mPOA, olfactory preference towards female and locomotor activity were analysed 45 min after SL-327 or vehicle injection.

For olfactory preference, tested males were given a choice between an anaesthetised receptive female and an anaesthetised intact male. The total time spent in chemoinvestigation was similar between the groups ( $221 \pm 6.8$  s vs  $242 \pm 11.2$  s). The percentage of entries in the female arm ( $44.1 \pm 3.3$  vs  $50 \pm 2.7$ ) and preference score ( $14.1 \pm 2.9$  vs  $16.1 \pm 4.2$ ) were not modified by SL-327 administration (Fig. 4D and E).

Two-way repeated measures ANOVA demonstrated a significant effect of time ( $F_{(23-460)} = 84.02$ ,  $P < 0.0001$ ) but not of treatment ( $F_{(1-460)} = 0.46$ ,  $P = 0.507$ ) on locomotor activity measured at 5-min intervals (Fig. 4F). The cumulative activity expressed as the total number of quarters crossed during the 2-h test was not different between the two groups ( $933 \pm 77.3$  vs  $864 \pm 85.1$ , Fig. 4G). Taken together, these data indicate that SL-327 does not interfere with olfactory preference and locomotor activity.

### Phospho-ERK inhibition by SL-327

The level of pERK was measured in the mPOA of experienced male mice kept in their home cage without a female (home cage) or injected either with SL-327 (SL-327) or vehicle (vehicle), put in the presence of a receptive female and killed 5 min after the first intromission (Fig. 4A). One-way ANOVA showed the treatment had a significant effect on the ERK phosphorylation level ( $F=8.020$ ,  $P<0.005$ ). Mated mice injected with the vehicle had significantly higher levels of pERK level than unmated males ( $220\pm 31$  vs  $100\pm 34$ ,  $P<0.05$ ). This increase was totally abolished by SL-327 treatment ( $86.4\pm 14$ , Fig. 4H and I).

Taken together, these results demonstrate that blocking ERK phosphorylation increased the time spent in chemoinvestigation and delayed the initiation of sexual behaviour in both naive and experienced mice. These transient effects did not disrupt the sexual improvement of mating and were not due to altered olfactory preference or locomotor activity.

### Discussion

The medial preoptic area of the hypothalamus (mPOA) is considered as the main integrative site for male sexual behaviour regulation (Hull & Dominguez 2006), established for a long time by lesion and stimulation experiments. Studies in a variety of rodents demonstrated an increased expression of immediate early gene (IEG), such as c-Fos, in the mPOA with sexual activity (Robertson *et al.* 1991, Heeb & Yahr 1996, Kollack-Walker & Newman 1997, Nutsch *et al.* 2016). As pERK was induced in the first 10 min of sexually experienced male coital behaviour by Taziaux and coworkers (Taziaux *et al.* 2011), this signalling pathway was suspected to be one of the first events involved in the control of sexual behaviour. This paper investigated the mechanisms triggering ERK phosphorylation and its functional role in male sexual behaviour.

We first confirmed the rapid activation of ERK phosphorylation in the early phases of copulation. pERK was increased 5 min after the first intromission in both naive and experienced males. Given the ability of steroid hormones to induce its phosphorylation (Wong *et al.* 2003, Abrahám *et al.* 2004, Pike *et al.* 2008, Liao *et al.* 2013) and the increased circulating levels of testosterone (T) during an interaction with a female (Batty 1978, Coquelin & Desjardins 1982), we thus investigated whether T or its metabolites were able to

induce ERK phosphorylation within the mPOA. Thirty-minute treatment of hypothalamic slices by T was found to induce ERK activation. By contrast, treatment with the plasma membrane-impermeable T-BSA was inefficient, thereby eliminating a potential membrane-dependent signalling pathway. Furthermore, DHT treatment reproduced T activation of ERK, suggesting the involvement of an intracellular AR-dependent mechanism in agreement with previously described regulation of ERK phosphorylation by the intracellular AR in hippocampal neurons (Nguyen *et al.* 2005). T-induced effects were also mimicked by E2 treatment, evidencing the participation of ER in steroid-mediated ERK phosphorylation. The possibility that steroids might use either the AR or the ER pathway to mediate the same effect has already been described in the male rat namely to restore a complete sexual behaviour after castration (Attila *et al.* 2010). Finally, the rapid ERK activation (30 min) suggests a rapid non-genomic action of sex steroids in the mPOA. In this way, it is now well established that cytoplasmic ER or AR can rapidly activate members of the ERK signalling cascade, via direct interaction with the non-tyrosine kinase receptor Src (Migliaccio *et al.* 2000). Of interest, sex steroids can also activate members of the ERK pathway in hippocampal and cerebellar neurons in less than 15 min (Wong *et al.* 2003, Nguyen *et al.* 2005).

Because the ERK pathway is involved in behavioural learning and reinforcing processes (Adams & Sweatt 2002, Thomas & Haganir 2004), the level of ERK phosphorylation was compared between naive and experienced males. Sexually experienced males showed a typical improved behaviour with decreased anogenital sniffing time and latency to the first intromission and also a higher number of mounts (Hull & Dominguez 2006, Swaney *et al.* 2012), thus demonstrating an enhancement of sexual motivation (Fiorino & Phillips 1999).

ERK phosphorylation was found to be increased within the mPOA 5 min after the first intromission in both naive and experienced males. To our knowledge, no study has reported an increase of ERK phosphorylation in less than 5 min of stimulation. Thus, it can be hypothesised that ERK phosphorylation was triggered by events taking place at least 5 min before the killing, thus during the motivational phase of sexual behaviour. In this line of thought, the level of ERK phosphorylation may thus represent an index of sexual motivation and performance.

Interestingly, mating-induced ERK phosphorylation was more elevated in sexually experienced males who are supposed to be more sensitive to androgen as they display

elevated levels of circulating testosterone and higher AR levels in the mPOA (Swaney *et al.* 2012). They also show an increased number of copulation-induced c-Fos-positive neurons in their mPOA (Lumley & Hull 1999). As we found that T and its metabolites could induce a rapid activation of the MAPK pathway, the increased ability of experienced males to phosphorylate ERK could thus be explained by a higher sensitivity of the mPOA to steroids.

To assess the functional role of ERK phosphorylation in sexual behaviour, males were treated with SL-327, a brain-penetrating selective inhibitor of MAP kinase/ERK kinase (MEK1/2), the enzyme which selectively activates ERK (Selcher *et al.* 1999). Naive males treated with SL-327 showed decreased sexual motivation without altering the copulatory phase as mating duration and copulatory patterns remained similar to the vehicle group. These results are consistent with those obtained by Niessen and coworkers (Niessen *et al.* 2013) in which c-Fos inhibition in the mPOA resulted in the reduction of appetitive male sexual behaviour in the quail. In experienced males treated with SL-327, similar results were observed: anogenital sniffing time and latency to the first intromission were increased compared to experienced males treated with the vehicle. The increase observed in the motivational phase length could be considered specific and not linked to a side effect of the SL-327 treatment as locomotion was not altered. The rapid non-genomic ERK activation mediated by steroids that we exhibited *ex vivo* could be one of the mechanisms involved in mating-induced ERK activation as sexual motivation was shown to be partly regulated by rapid non-classical actions of steroids in the quail (Seredynski *et al.* 2013).

Pre-treatment of naive males with SL-327 before their first sexual behaviour did not alter the improvement of their sexual performance observed during the second mating test. Thus, inhibition of ERK phosphorylation did not disrupt the learning associated with sexual experience even if the motivational phase was prolonged. These results show that ERK phosphorylation is not required for learning processes of sexual experience as it has been previously demonstrated in other brain areas for spatial memory (Blum *et al.* 1999) and fear conditioning (Schafe *et al.* 2008).

To summarise, our results show that ERK phosphorylation probably took place during the motivational phase, that experienced males, who are more motivated than naive males, have an increased level of phosphorylation and that inhibition of ERK

phosphorylation decreased sexual motivation. These results strongly suggest that ERK phosphorylation in the mPOA could be considered as a key player in the motivational signalling pathway transduction and as an index of sexual motivation.

Our results also revealed new aspects regarding the mechanisms leading to olfactory preference as it was not modified by SL-327 treatment although exposure of a male to an oestrous female was found to activate the ERK pathway in the main and accessory olfactory bulb and in the amygdala (Taziaux *et al.* 2011). These data may be linked to the observation that pheromone stimulation of a male mouse causes ERK activation in the vomeronasal organ, in amygdala and in the hypothalamus but not in the accessory olfactory bulb (Dudley *et al.* 2001). Furthermore, even if olfactory interactions are important for the copulatory behaviour (Keller *et al.* 2006), several other neuronal pathways coming from BST, septum and other areas converging on the mPOA (Dhungel *et al.* 2011) are activated when a male is placed in front of a receptive female (Pfaus & Heeb 1997). These results are also consistent with data reported by Satoh and coworkers (Satoh *et al.* 2011) showing that mice lacking ERK2 in the brain have deficits in social interaction without olfactory defect. Taken together, these observations indicate that ERK phosphorylation is not essential to induce olfactory preference. Furthermore, it suggests that the mechanisms controlling the motivational phase and the mPOA activation are integrated downstream the olfactory bulb.

In conclusion, this paper has established for the first time that ERK is phosphorylated within the mPOA during the early events of the male copulation in both naive and sexually experienced males. This phosphorylation can be triggered *ex vivo* by rapid action of testosterone or its metabolites such as DHT or E2. Although the ERK pathway was involved in numerous learning processes, ERK phosphorylation in the mPOA is not an underlying factor in sexual improvement induced by sexual experience. Nevertheless, the level of pERK could be considered as an index of sexual motivation as sexually experienced males exhibited an increase in mating-induced ERK activation, and its inhibition decreased the motivational phase efficiency.

Our results could represent an interesting tool for the investigation of the effects of hormonomimetic molecules able to interfere with the control of sexual behaviour, such as endocrine disruptors. Furthermore, the ability to rapidly activate the ERK pathway on an *ex vivo* model

of mPOA slices could also be a very useful tool to help decipher the negative effects of such molecules perturbing the signalling pathways of steroid hormones.

#### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### Funding

This work was supported by UPMC, CNRS and INSERM.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr J Caboche and Dr P Vanhoutte for sharing their expertise on ERK and their valuable discussion about the manuscript.

#### References

- Abrahám IM, Todman MG, Korach KS & Herbison AE 2004 Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain. *Endocrinology* **145** 3055–3061. (doi:10.1210/en.2003-1676)
- Adams JP & Sweatt JD 2002 Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42** 135–163. (doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.145401)
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM & Sweatt JD 1998 The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience* **1** 602–609. (doi:10.1038/2836)
- Attila M, Oksala R & Agmo A 2010 Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Hormones and Behavior* **58** 341–351. (doi:10.1016/j.yhbeh.2009.08.011)
- Batty J 1978 Acute changes in plasma testosterone levels and their relation to measures of sexual behaviour in the male house mouse (*Mus musculus*). *Animal Behaviour* **26** 349–357. (doi:10.1016/0003-3472(78)90053-2)
- Baum MJ & Everitt BJ 1992 Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* **50** 627–646. (doi:10.1016/0306-4522(92)90452-8)
- Bean NY, Nunez AA & Conner R 1981 Effects of medial preoptic lesions on male mouse ultrasonic vocalizations and copulatory behavior. *Brain Research Bulletin* **6** 109–112. (doi:10.1016/S0361-9230(81)80033-0)
- Blum S, Moore AN, Adams F & Dash PK 1999 A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *Journal of Neuroscience* **19** 3535–3544.
- Chia KM, Liu J, Francis GD & Naderi A 2011 A feedback loop between androgen receptor and ERK signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia* **13** 154–166. (doi:10.1593/neo.101324)
- Coquelin A & Desjardins C 1982 Luteinizing hormone and testosterone secretion in young and old male mice. *American Journal of Physiology* **243** E257–E263.
- Davis S & Laroche S 2006 Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes, Brain and Behavior* **5** 61–72. (doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00230.x)
- De Jonge FH, Louwerse AL, Ooms MP, Evers P, Endert E & van de Poll NE 1989 Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. *Brain Research Bulletin* **23** 483–492. (doi:10.1016/0361-9230(89)90194-9)
- Dhungel S, Urakawa S, Kondo Y & Sakuma Y 2011 Olfactory preference in the male rat depends on multiple chemosensory inputs converging on the preoptic area. *Hormones and Behavior* **59** 193–199. (doi:10.1016/j.yhbeh.2010.11.011)
- Dudley CA, Chakravarty S & Barnea A 2001 Female odors lead to rapid activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in neurons of the vomeronasal system. *Brain Research* **915** 32–46. (doi:10.1016/S0006-8993(01)02820-7)
- Estrada M, Espinosa A, Müller M & Jaimovich E 2003 Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* **144** 3586–3597. (doi:10.1210/en.2002-0164)
- Fiorino DF & Phillips AG 1999 Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization. *Journal of Neuroscience* **19** 456–463.
- Girault J-A 2012 Signaling in striatal neurons: the phosphoproteins of reward, addiction, and dyskinesia. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **106** 33–62. (doi:10.1016/B978-0-12-396456-4.00006-7)
- Giuliano F, Rampin O, Brown K, Courtois F, Benoit G & Jardin A 1996 Stimulation of the medial preoptic area of the hypothalamus in the rat elicits increases in intracavernous pressure. *Neuroscience Letters* **209** 1–4. (doi:10.1016/0304-3940(96)12594-5)
- Goto A, Nakahara I, Yamaguchi T, Kamioka Y, Sumiyama K, Matsuda M, Nakanishi S & Funabiki K 2015 Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *PNAS* **112** 6718–6723. (doi:10.1073/pnas.1507121112)
- Heeb MM & Yahr P 1996 c-Fos immunoreactivity in the sexually dimorphic area of the hypothalamus and related brain regions of male gerbils after exposure to sex-related stimuli or performance of specific sexual behaviors. *Neuroscience* **72** 1049–1071. (doi:10.1016/0306-4522(95)00602-8)
- Hull EM & Dominguez JM 2006 Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Research* **1126** 66–75. (doi:10.1016/j.brainres.2006.08.031)
- Hull EM & Dominguez JM 2007 Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior* **52** 45–55. (doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.030)
- Hull EM, Meisel RL & Sachs BD 2002 1 – Male sexual behavior A2 – Pfaff, Donald W. In *Hormones, Brain and Behavior*, pp 3–137. Eds AP Arnold, SE Fahrbach, AM Etgen & RT Rubin. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- James PJ & Nyby JG 2002 Testosterone rapidly affects the expression of copulatory behavior in house mice (*Mus musculus*). *Physiology and Behavior* **75** 287–294. (doi:10.1016/S0031-9384(01)00666-7)
- Kelleher RJ, Govindarajan A, Jung H-Y, Kang H & Tonegawa S 2004 Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **116** 467–479. (doi:10.1016/S0092-8674(04)00115-1)
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ & Bakker J 2006 Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate—lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chemical Senses* **31** 753–762. (doi:10.1093/chemse/bjl018)
- Kollack-Walker S & Newman SW 1997 Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations. *Journal of Neurobiology* **32** 481–501. (doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199705)32:5<481::AID-NEU4>3.0.CO;2-1)
- Liao RS, Ma S, Miao L, Li R, Yin Y & Raj GV 2013 Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Translational Andrology and Urology* **2** 187–196. (doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07)
- Lumley LA & Hull EM 1999 Effects of a D1 antagonist and of sexual experience on copulation-induced Fos-like immunoreactivity in the



- medial preoptic nucleus. *Brain Research* **829** 55–68. (doi:10.1016/S0006-8993(99)01338-4)
- Maolood N, Hardin-Pouzet H & Grange-Messent V 2008 Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are upregulated by noradrenaline in the mouse neuroendocrine hypothalamus. *European Journal of Neuroscience* **27** 1143–1152. (doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06099.x)
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, et al. 2000 Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO Journal* **19** 5406–5417. (doi:10.1093/emboj/19.20.5406)
- Murphy LO & Blenis J 2006 MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences* **31** 268–275. (doi:10.1016/j.tibs.2006.03.009)
- Nguyen T-VV, Yao M & Pike CJ 2005 Androgens activate mitogen-activated protein kinase signaling: role in neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* **94** 1639–1651. (doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03318.x)
- Niessen N-A, Balthazart J, Ball GF & Charlier TD 2013 c-fos down-regulation inhibits testosterone-dependent male sexual behavior and the associated learning. *European Journal of Neuroscience* **38** 3325–3337. (doi:10.1111/ejn.12321)
- Nutsch VL, Will RG, Robison CL, Martz JR, Tobiansky DJ & Dominguez JM 2016 Colocalization of mating-induced Fos and D2-like dopamine receptors in the medial preoptic area: influence of sexual experience. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **10** 75. (doi:10.3389/fnbeh.2016.00075)
- Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS & Sakuma Y 2002 Sexually dimorphic expression of estrogen receptor  $\beta$  in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *PNAS* **99** 3306–3311. (doi:10.1073/pnas.052707299)
- Pascoli V, Cahill E, Bellivier F, Caboche J & Vanhoutte P 2014 Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biological Psychiatry* **76** 917–926. (doi:10.1016/j.biopsych.2014.04.005)
- Pfaus JG & Heeb MM 1997 Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Research Bulletin* **44** 397–407. (doi:10.1016/S0304-9230(97)00219-0)
- Picot M, Naulé L, Marie-Luce C, Martini M, Raskin K, Grange-Messent V, Franceschini I, Keller M & Mhaouty-Kodja S 2014 Vulnerability of the neural circuitry underlying sexual behavior to chronic adult exposure to oral bisphenol A in male mice. *Endocrinology* **155** 502–512. (doi:10.1210/en.2013-1639)
- Pike CJ, Nguyen T-VV, Ramsden M, Yao M, Murphy MP & Rosario ER 2008 Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Hormones and Behavior* **53** 693–705. (doi:10.1016/j.yhbeh.2007.11.006)
- Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, Tronche F & Mhaouty-Kodja S 2009 Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *Journal of Neuroscience* **29** 4461–4470. (doi:10.1523/JNEUROSCI.0296-09.2009)
- Robertson GS, Pfaus JG, Atkinson LJ, Matsumura H, Phillips AG & Fibiger HC 1991 Sexual behavior increases c-fos expression in the forebrain of the male rat. *Brain Research* **564** 352–357. (doi:10.1016/0006-8993(91)91477-1)
- Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, Takeuchi A, Hiramoto T, Watanabe Y & Kazama T 2011 ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *Journal of Neuroscience* **31** 11953–11967. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2349-11.2011)
- Shafe GE, Swank MW, Rodrigues SM, Debicq J & Doyère V 2008 Phosphorylation of ERK/MAP kinase is required for long-term potentiation in anatomically restricted regions of the lateral amygdala in vivo. *Learning and Memory* **15** 55–62. (doi:10.1101/lm.746808)
- Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R & Sweatt JD 1999 A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learning and Memory* **6** 478–490. (doi:10.1101/lm.6.5.478)
- Seredynski AL, Balthazart J, Christophe VJ, Ball GF & Cornil CA 2013 Neuroestrogens rapidly regulate sexual motivation but not performance. *Journal of Neuroscience* **33** 164–174. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2557-12.2013)
- Shaul YD & Seger R 2007 The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular Cell Research* **1773** 1213–1226. (doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.005)
- Shiflett MW & Balleine BW 2011a Molecular substrates of action control in cortico-striatal circuits. *Progress in Neurobiology* **95** 1–13. (doi:10.1016/j.pneurobio.2011.05.007)
- Shiflett MW & Balleine BW 2011b Contributions of ERK signaling in the striatum to instrumental learning and performance. *Behavioural Brain Research* **218** 240–247. (doi:10.1016/j.bbr.2010.12.010)
- Simerly RB & Swanson LW 1986 The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **246** 312–342. (doi:10.1002/cne.902460304)
- Simerly RB & Swanson LW 1988 Projections of the medial preoptic nucleus: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **270** 209–242. (doi:10.1002/cne.902700205)
- St-Louis R, Parmentier C, Grange-Messent V, Mhaouty-Kodja S & Hardin-Pouzet H 2014 Reactive oxygen species are physiological mediators of the noradrenergic signaling pathway in the mouse supraoptic nucleus. *Free Radical Biology and Medicine* **71** 231–239. (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.024)
- Swaney WT, Dubose BN, Curley JP & Champagne FA 2012 Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Hormones and Behavior* **61** 472–478. (doi:10.1016/j.yhbeh.2012.01.001)
- Taziaux M, Keller M, Balthazart J & Bakker J 2011 Rapid activation of phosphorylated mitogen-activated protein kinase after sexual stimulation in male mice. *NeuroReport* **22** 294–298. (doi:10.1097/WNR.0b013e3283460f35)
- Thomas GM & Huganir RL 2004 MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews: Neuroscience* **5** 173–183. (doi:10.1038/nrn1346)
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R & Caboche J 2000 Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *Journal of Neuroscience* **20** 8701–8709.
- Valjent E, Corvol J-C, Trzaskos JM, Girault J-A & Hervé D 2006 Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neuroscience* **7** 20. (doi:10.1186/1471-2202-7-20)
- Veening JG & Coolen LM 2014 Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* **121** 170–183. (doi:10.1016/j.pbb.2013.12.017)
- Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A & Belcher SM 2003 Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience* **23** 4984–4995.
- Zhao L & Brinton RD 2007 Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Research* **1172** 48–59. (doi:10.1016/j.brainres.2007.06.092)

Received in final form 27 March 2017

Accepted 29 March 2017

Accepted Preprint published online 29 March 2017



# Résumé

Le comportement sexuel de la souris mâle se décompose en deux phases. Durant la première phase dite pré-copulatoire, le mâle effectue des marquages urinaires, des vocalisations ultrasonores et des investigations olfactives de la femelle. Elle est suivie de la phase copulatoire durant laquelle le mâle réalise des montées avec des poussées pelviennes intra-vaginales jusqu'à atteindre l'éjaculation. Bien que ce comportement soit stéréotypé et inné, il est amélioré après un premier accouplement : il s'agit de l'expérience sexuelle.

Ce travail de thèse s'est intéressé à caractériser les modifications moléculaires induites par l'expérience sexuelle dans l'aire pré-optique médiane (mPOA) de l'hypothalamus, principale région cérébrale impliquée dans le contrôle du comportement sexuel mâle.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence l'existence de modifications à long terme de l'arborisation dendritique, de modifications épigénétiques ainsi qu'une augmentation des niveaux d'expression de protéines associées à la neurotransmission glutamatergique et à la microglie dans la mPOA des mâles sexuellement expérimentés. En revanche, les concentrations plasmatiques et hypothalamiques en hormones stéroïdes ainsi que les propriétés du système nitrergique, connues pour être modulés par l'expérience sexuelle chez le rat, ne sont pas modifiées chez les souris mâles sexuellement expérimentées.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'implication de la voie de signalisation ERK1/2 dans la réponse comportementale associée à l'expérience sexuelle. Nous avons montré que cette voie de signalisation, activée dans la mPOA lors de l'accouplement, est potentialisée par l'expérience sexuelle. Nous avons ensuite démontré que son activation est possible par une action rapide (30 minutes) des stéroïdes grâce à des expériences réalisées *ex vivo* sur des tranches d'hypothalamus maintenues en survie. Enfin, nous avons montré que l'inhibition de la voie ERK1/2 avant un premier accouplement n'altère pas la mise en place de l'expérience sexuelle mais diminue de façon réversible la motivation sexuelle des mâles.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que l'expérience sexuelle est à l'origine de modifications structurales et biochimiques à long terme de la mPOA. Ces modifications, différentes de celles connues chez le rat, sont associées à une potentialisation de la voie de signalisation ERK1/2 activée de façon transitoires durant l'accouplement. Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'élaborer un nouveau modèle, différent de celui établi chez le rat, permettant d'expliquer l'amélioration comportementale associée à l'expérience sexuelle chez la souris mâle.