HAL
open science

Rôle de la signalisation hypothalamique TSH/T3 dans la reproduction saisonnière chez les hamsters Djungariens (Phodopus sungorus) et Syriens (Mesocricetus auratus)

Sébastien Milesi

To cite this version:

Sébastien Milesi. Rôle de la signalisation hypothalamique TSH/T3 dans la reproduction saisonnière chez les hamsters Djungariens (Phodopus sungorus) et Syriens (Mesocricetus auratus). Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ023 . tel-01960264

HAL Id: tel-01960264

https://theses.hal.science/tel-01960264v1

Submitted on 19 Dec 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212

THÈSE présentée par :

Sébastien MILESI

Soutenue le : **3 Mai 2018**

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

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Rôle de la signalisation hypothalamique TSH/T3 dans la reproduction saisonnière chez les hamsters djungariens (*Phodopus sungorus*) et syriens (*Mesocricetus auratus*)

THÈSE dirigée par :

Dr. Paul KLOSEN	Maitre de Conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Anne-Marie FRANCOIS-BELLAN	Chargé de Recherches, Université de Marseille,
Dr. Hugues DARDENTE	Chargé de Recherches, INRA

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Sylvie RAISON	Professeur des Universités, Université de Strasbourg
Dr. Valérie SIMONNEAUX	Directrice de Recherches, CNRS
Dr. Vincent PREVOT	Directeur de Recherches, INSERM

Université de Strasbourg

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

INCI

cnrs

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

Rôle de la signalisation hypothalamique TSH/T3 dans la reproduction saisonnière chez les hamsters djungariens (*Phodopus sungorus*) et syriens (*Mesocricetus auratus*)

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (UPR 3212)

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

Défense de thèse: 03 Mai 2018

J'ai passé tellement de temps à chercher

Que je n'en ai plus eu assez pour trouver…

Préface

Le travail présenté dans cette thèse a été intégralement effectué entre Octobre 2014 et Mai 2018 à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives de Strasbourg (Université de Strasbourg, France) dans l'équipe « Mélatonine et Rythmes Saisonniers » dirigée par le Docteur Valérie SIMONNEAUX. Il a été fait sous la direction du Docteur Paul KLOSEN, et le conseil scientifique du Docteur Valérie SIMONNEAUX.

Pour cette thèse, j'ai bénéficié d'une bourse de thèse de 3 ans du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et par un complément couvrant 6 mois supplémentaires provenant du Financement ANR Répramide

Ce travail de recherche a abouti à la préparation et la publication de 3 manuscrits scientifiques :

- **Milesi S.**, Simonneaux V., Klosen P. (2017), "Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters", *Scientific Reports* ***7****(1): 17739*
- **Milesi S.**, Simonneaux V., Klosen P. (2018), "Seasonal Control of the GnRH Neuronal Network as a Means of Uncovering Novel Central Mechanisms Governing Mammalian Reproduction", *The GnRH Neuron and its Control*. Ed. Prof Allan E Herbison FRSNZ, University of Otago, New Zealand & Prof Tony M Plant, University of Pittsburgh, USA. (manuscript révisé et accepté, publication prevue en Avril 2018)
- Cazarez Márquez F., **Milesi S.**, Laran-Chich M.P., Klosen P., Kalsbeek A., Simonneaux V. (2018), Kisspeptin and RFRP3 modulate body mass in the *Phodopus Sungorus* via two different hypothalamic pathways, *Journal of Neuroscience* (soumis)

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Tout d'abord je commencerai par remercier tout particulièrement mon directeur de thèse pour avoir répondu à l'ensemble de mes questions, souvent bêtes, mais dont les réponses m'ont toujours permis de sortir grandi et enrichi scientifiquement. Je voudrais également le remercier pour la grande liberté qu'il m'a laissée dans la gestion des projets scientifiques que nous menions. Cela m'a permis de beaucoup développer mon indépendance scientifique et mes stratégies de gestion de projet.

Je voudrais ensuite remercier Valérie SIMONNEAUX qui a gentiment accepté de m'accueillir dans son équipe. Je la remercie pour ses conseils scientifiques tout au long de ma thèse et pour m'avoir appris les codes d'un bon chercheur. Je la remercie également pour les nombreuses heures qu'elle a perdues à corriger mes fautes d'orthographes et ma syntaxe déplorable.

Je voudrais également remercier l'équipe enseignante des TP de PAM, notamment Sylvie RAISON qui m'a permis de faire mes premiers pas dans l'enseignement et qui m'a guidé dans cette tâche, tout au long de ces 3 ans. Je la remercie également pour son accompagnement dans ma thèse et pour les longs moments passés à débattre sur nos différents conflits d'idées.

Je voudrais aussi remercier Marie-Pierre LARAN-CHICH pour son enseignement de l'hybridation *in situ*, pour sa présence dans les tâches quotidiennes peu gratifiantes et pour son soutien.

Je voudrais aussi dire mille mercis à Dominique CIOCCA pour sa présence inébranlable dans chaque étape de ma thèse que ce soit dans le design des expériences, dans la réalisation des procédures chez l'animal, dans la discussion des résultats, mais aussi dans des moments plus personnels. Je n'oublierai évidemment pas de remercier l'ensemble du personnel du Chronobiotron qui a participé à l'élevage, au soin des animaux et au bon déroulement de mes expériences.

Je les remercie aussi chaleureusement pour leur aide précieuse dans la rédaction et la correction de mes lettres de motivations, bien trop nombreuses.

Je remercie aussi Vincent PREVOT sans qui je n'aurais pas fait cette thèse. Ainsi que les stagiaires que j'ai pu côtoyer, notamment Mathis LEPRETRE et Clarisse QUIGNON qui ont participés à ces études.

Je tiens aussi à remercier Vincent-Joseph POIREL pour sa présence, son humour, son soutien, nos discussions hors contexte scientifique et surtout pour nos moments skis qui je l''espère de tout mon cœur, ne seront pas les derniers.

Je voudrais également remercier Perrine SPINNHIRNY pour être venue m'aider sans hésiter une seconde lorsque les mains issues de mon équipe se faisaient trop peu nombreuses, pour sa participation aux corrections, pour ces petits moments dont elle a le secret qui te font basculer la

journée d'une journée de merde en une journée assez fun. Mais je voudrais surtout la remercier pour son accompagnement au quotidien autant dans ma vie professionnelle que personnelle.

Je remercie aussi Benoît ROSE, pour le temps passé à corriger l'orthographe de ce manuscrit.

Je n'oublie évidemment pas tous les étudiants qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse autant professionnellement, qu'amicalement. Je remercie Fernando CARAREZ, Hassan AINANI, Nora SALABERRY, Eléni ANGELOPOULOU, Jo HENNINGSEN, Raja TALBI, Clarisse QUIGNON, Bastien LECLERCQ, Marine PARKER ….pour les adorables moments passés à raconter des conneries, faire des batailles d'eau ou de glace dans les couloirs de l'INCI, démonter des claviers ou des ordinateurs pour faire une chasse au trésor, ligoter quelqu'un dans du film alimentaire, descendre des bières et encore bien d'autres excellents moments. Une thèse est en fait bien plus qu'une aventure scientifique, c'est surtout une expérience humaine extraordinaire.

Finalement et le plus important, je remercie ma famille, mes amis (Benoit, Nicolas, Quentin, …), mes parents, mes frères et surtout Margaux pour leur présence au quotidien, dans les bons et surtout dans les mauvais moments. Je les remercie aussi pour leur patience et leur compréhension dans cette étape de ma vie qui a tout fait pour que je n'ai pas assez de temps à leur consacrer.

Sommaire

Abréviations.....17

Résumé.....19

Introduction.....27

I) Importance des Rythmes Biologiques 29

a) Contexte environnemental.....29

b) Pourquoi étudier les rythmes saisonniers de la reproduction.....30

c) Définition d'un rythme biologique 30

d) En quoi les rythmes biologiques sont-ils importants ?.....31

e) La saisonnalité au travers des espèces.....32

i) L'adaptation aux saisons est différente d'une espèce à l'autre.....32

ii) Paramètres physiologiques saisonniers.....33

1) La production de phanères est régulée de façon saisonnière.....33

2) L'activité métabolique 33

3) La reproduction.....33

II) La saisonnalité: de l'environnement à la physiologique.....34

a) Les facteurs environnementaux synchronisateurs.....34

i) Le facteur clés.....34

ii) Les facteurs secondaires.....34

b) Décodage du message photopériodique.....35

i) Traduction du signal photopériodique en un signal endocrine : la sécrétion de mélatonine....35

1) Traduction d'un signal photopériodique en un signal électrique.....35

2) Les noyaux suprachiasmatiques accueillent l'horloge biologique centrale.....36

3) Le SCN contrôle l'activité de la glande pinéale.....37

4) Synthèse rythmique de la mélatonine.....38

ii) Cibles de la mélatonine.....39

1) Les récepteurs de la mélatonine.....39

2) Distribution et rôle du récepteur MT1.....40

3) Rôle physiologique de la mélatonine.....41

III) Rôle de l'axe TSH/T3 hypothalamique dans le contrôle des fonctions saisonnières.....43

a) La production de TSH dans la *PT* sous contrôle de la mélatonine.....43

b) La TSH tubéralienne n'est pas équivalente à la TSH produite par la *pars distalis*.....45

c) Les autres molécules photopériodiques de la *PT*.....46

d) Les tanycytes : place centrale du métabolisme thyroïdien hypothalamique saisonnier.....46

i) *Qu'est-ce qu'un tanycyte ?*.....46
ii) Quelles sont leurs fonctions ?.....47
1) Barrière sélective.....47
2) Niche neurogénique.....49
3) Activité de synthèse des tanycytes.....49
4) Activités saisonnières des tanycytes.....51
e) Les cibles des hormones thyroïdiennes.....51
f) Rôles connus des hormones thyroïdiennes.....54
g) L'axe TSH/T3 : une sortie physiologique saisonnière.....54
h) Les paramètres physiologiques saisonniers dirigés par les hormones thyroïdiennes.....55
IV) Quand le contrôle de l'activité reproductrice s'affranchit de la lumière.....56
V) Comparatif et récapitulatif des différences saisonnières entre les espèces.....58
VI) L'axe hypothalamo-hypophysio gonadotrope.....59
a) Le GnRH.....59
i) Les neurones à GnRH : développement.....59
ii) Les neurones à GnRH : anatomie.....59
iii) Régulation de l'activité des neurones à GnRH.....60
1) Activité intrinsèque des neurones à GnRH.....60
2) Les afférences régulatrices.....60
3) Interaction neurones à GnRH/glie.....67
4) Régulation directe ou indirecte de l'activité des neurones à GnRH par des facteurs régulateurs intracellulaires.....68
b) Les gonadotropines.....69
i) Leur régulation différentielle.....69
ii) Leurs cibles.....*70*
c) Les gonades.....71
i) La spermatogenèse.....71
ii) La stéroïdogenèse.....71
1) Principe.....71
2) Régulation de la synthèse de testostérone.....72
3) Cibles de la testostérone.....72
d) Saisonnalité de l'axe reproducteur.....73
VII) Saisonnalité de la reproduction : l'hypothèse de travail reliant les changements de la photopériode aux changements d'activité reproductrice.....73
VIII) Questions, hypothèse et approches.....75
Matériels et Méthodes.....77
I) Approche.....79

II) Animaux.....80
III) Expériences.....81
a) Expérience 1 : Analyse du décours temporel de l'activation photopériodique et photoréfractaire.....81
b) Expérience 2 : Analyse du rôle du RFRP3 dans le processus de réactivation de la reproduction.....82
c) Expérience 3 : Comparaison du profil d'expression de molécules d'intérêt pendant la puberté et dans différents états photopériodiques.....82
d) Expérience 4 : Analyse de l'effet saisonnier photopériodique et endogène photoréfractaire sur l'expression de la Chromogranine A dans la *PT* de l'adénohypophyse.....83
IV) Procédures chirurgicales et d'échantillonnage.....83
a) Echantillonnage des tissus pour immunohistochimie et hybridation *in situ*.....83
b) Placement de mini pompes osmotiques à délivrance intracérébroventriculaire.....83
c) Echantillonnage des tissus pour PCR quantitative.....84
V) Enrobage des cerveaux pour l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*.....84
VI) Hybridation *in situ*.....85
a) Design des ribosondes.....85
b) Hybridation *in situ* non radioactive.....86
VII) Immunohistochimie.....86
a) Simple immunohistochimie.....87
i) Pour Kp.....87
ii) Pour RFRP-3.....88
b) Double Immunohistochimie.....88
i) Double marquage TSHβ-Chromogranine A chez le hamster djungarien.....88
ii) Double marquage αGSU-Chromogranine A 89
VIII) Analyse d'image et statistiques.....90
a) Analyse des images.....90
b) Analyses statistiques.....91
IX) Dosage RIA des concentrations plasmatiques de FSH et 26RFa.....91
X) PCR quantitative en temps réel.....91
a) Extraction des ARN et rétrotranscription.....91
b) Mise au point.....92
c) PCR quantitative en temps réel.....93
d) Méthode et analyses statistiques.....94
Partie N°1 : L'inhibition de la Dio3 est l'élément le plus précoce de la réactivation photopériodique et photoréfractaire de l'axe gonadotrope chez les hamsters saisonniers.....95
I) Introduction.....103

II) Results.....105
III) Discussion.....112
IV) Conclusion.....116
V) Material and Methods.....117
VI) Supplemental Informations.....121
Partie N°2 : Quel est le rôle des neuropeptides dans l'initiation de la réactivation photopériodique de la reproduction.....*123*
I) Introduction.....125
II) Résultats.....126
a) L'infusion chronique de RF3286 n'altère pas l'activité de reproduction induite par la LP.....126
i) Effet du RF3286 sur la prise alimentaire et la masse corporelle du hamster syrien mâle.....127
ii) Effet du RF3286 sur les paramètres reproducteurs du hamster syrien mâle.....129
iii) Effet du RF3286 sur l'expression des gènes codants pour Kp dans le noyau arqué de l'hypothalamus.....130
b) Le 26 RFa n'est pas régulé par la photopériode.....131
i) Chez le hamster syrien.....131
ii) Chez le hamster djungarien.....131
III) Discussion.....132
a) L'inhibition des récepteurs à RFRP3 par le RF3286 n'a pas d'effet significatif sur la physiologie reproductive.....132
b) L'expression du 26RFa dans l'hypothalamus de rongeurs saisonniers n'est pas régulée par la photopériode.....134
IV) Conclusion.....135
Partie N°3 : Recherche de régulateurs potentiels des changements saisonniers précoces de la Dio3.....*137*
I) Introduction.....139
II) Les régulateurs pubertaires MKRN3 et EAP1 ne sont pas régulés photopériodiquement..140
a) Résultats.....140
b) Discussion.....141
III) Les variations endogènes de somatostatine et de la CGA sont trop tardives pour être impliquées dans l'inhibition précoce de la Dio3 lors de la réactivation photoréfractaire endogène.....142
a) Résultats.....142
i) SHH n'est pas régulé photopériodiquement chez le hamster syrien.....142
ii) L'inhibition de l'expression de la somatostatine lors de la réactivation endogène photoréfractaire a lieu après l'inhibition de la Dio3.....143

iii) L'inhibition de l'expression de la CGA lors de la réactivation endogène photorefractaire est postérieure à celle de la Dio3.....144
b) Discussion.....146
IV) Conclusion.....151
Discussion générale.....153
I) Introduction.....155
II) Modèle historique du contrôle photopériodique de la reproduction.....155
III) Limitation et ambigüité du modèle de travail.....157
IV) Nouvelle approche : l'analyse temporelle.....157
a) TSH/Dio2 est activé tardivement voire pas activé du tout lors de l'activation photopériodique et photoréfractaire.....157
i) TSH/Dio2 lors de l'activation photopériodique.....158
ii) TSH/Dio2 lors de l'activation photoréfractaire.....158
iii) Rôle de la PT dans l'activation photopériodique/photoréfractaire endogène de la reproduction ?.....158
b) La régulation de l'expression des neuropeptides Kp et RFRP n'est pas synchronisée avec l'activation de l'axe reproducteur.....159
i) Quel est le rôle de Kp dans l'activation de l'axe reproducteur.....160
ii) Quel est le rôle de RFRP dans l'activation de l'axe reproducteur.....160
iii) Existe-il un autre neuropeptide saisonnier de la famille des RF-amides ?.....162
c) La Dio3 est un facteur modifié avant l'activation de la reproduction.....163
V) Nouveau modèle du contrôle photopériodique de la reproduction.....166
VI) Modèle du contrôle endogène photoréfractaire de la reproduction.....168
VII) Un rôle de la CGA dans la PT des hamsters djungariens.....168
a) Quelles cellules de la PT expriment la CGA.....168
b) L'expression de la CGA est saisonnière.....169
c) Quel est le rôle de la CGA dans la PT.....170
Perspectives.....171
I) Quel est le rôle de TSH/Dio2 dans l'activation de la reproduction chez les espèces saisonnières.....173
II) Quel est le rôle des neuropeptides RFamides dans la reproduction saisonnière ? 175
a) Rôle de Kp.....175
b) Rôle de RFRP3.....176
III) La régulation précoce de Dio3 est-elle à l'origine d'un pic local d'hormones thyroïdiennes ?.....177

Conclusion……179
Bibliographie……183
Revue: Le Contrôle saisonnier des neurones a GnRH : un moyen de découvrir de nouveau mécanismes régulateurs de l'activité reproductrice chez les mammifères ……207

Abréviations

26RFa	Peptide RFamide pyroglutamilé	**MKRN3**	Mankorin ring finger protein 3
AA-NAT	Arylalkylamine N-acétyl transférase	**MT1**	Récepteur à la Mélatonine de type 1
AF1	Fonction d'Activation 1	**MT2**	Récepteur à la Mélatonine de type 2
AF2	Fonction d'Activation 2	**mW**	Milli Watt
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	**NCAM**	Molécules d'adhésion cellulaire neurale
ARNm	Acide Ribonucléique messager	**NFκB**	Nuclear factor-kappa B
AVP	Arginine-Vasopressine	**NPFFR1**	Récepteur au RFRP
CAS9	Protéine 9 associée à CRISPR	**NPFFR2**	Récepteur au RFRP 2 (GPR74)
CGA	Chromogranine A	**NPY**	Neuropeptide Y
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées	**OATP1C1**	Organic-anion-transporting polypeptide 1C1
Cry	Cryptochrome	**PACAP**	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
D2	Diiodothyronine	**PCR**	Réaction en chaîne par polymérase
DAG	Diacylglycérol	**Per**	Period
DARPP32	Protéine régulée par la dopamine et l'adénosine monophosphate	**PGE2**	Prostaglandine E2
DBD	Domaine de liaison à l'ADN	**PIP2**	Phosphatidylinositol bisphosphate
Dio2	Désiodinase 2	**PKC**	Protéine Kinase C
Dio3	Désiodinase 3	**PN**	Jour post natal
DMH	Noyau dorsomédian de l'hypothalamus	**PSA-NCAM**	Molécules d'adhésion cellulaire neurale polysialisée
EAP1	Enhanced At Puberty 1	**PT**	*pars tuberalis* de l'adénohypophyse
ERK	Extracellular signal-regulated kinases	**PVN**	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
FSH	Hormone Follicullo Stimulante	**RFRP**	RFamide Related Peptide
GLUT	Transporteur du glucose	**RISC**	Complexe d'inhibition induit par l'ARN
GnRH	Gonadolibérine	**rT3**	Reverse triiodothyronine
h	Heures	**SCN**	Noyau suprachiasmatique
HIOMT	Hydroxyindole-O-methyltransférase	**SGZ**	Zone subgranulaire
HPG	Hypothalamo hypophysio gonadotrope	**SHH**	Sonic hedgehog
IGF	Insulin-like Growth Factor	**shRNA**	Petit ARN en épingle à cheveux
IP3	Inositol triphosphate	**SP**	Photopériode courte
Kiss1R	Récepteur à kisspeptine	**SVZ**	Zone subventriculaire
KNDy	Kisspeptine-Neurokinine-Dynorphine	**T3**	Triiodothyronine
Kp	Kisspeptine	**T4**	Tétraiodothyronine
LBD	Domaine de liaison au Ligand	**TGF**	Facteur de croissance transformant
LCR	Liquide céphalo rachidien	**TNFα**	Facteur de nécrose tumorale α
LH	Hormone Lutéinisante	**TR α**	Récepteur aux hormones thyroïdiennes α
LP	Photopériode longue	**TR β**	Récepteur aux hormones thyroïdiennes β
m^2	Mètres carrés	**TSHβ**	Sous unité β de la Thyréostimuline
MCT8	Monocarboxylate Transporter 8	**TSH**	Thyréostimuline
miRNA	Micro ARN	**αGSU**	Sous unité α des hormones glycoprotéiques

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

RESUME

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

I) Introduction

La rotation de la terre autour du soleil entraîne des changements annuels environnementaux. Cette alternance des saisons oblige les organismes à adapter leurs fonctions biologiques pour améliorer la survie des individus et de l'espèce. Ainsi, de nombreux mammifères présentent des variations saisonnières de leurs activités reproductrice et métabolique. Il existe deux mécanismes pour adapter l'activité biologique aux changements saisonniers de l'environnement. Le premier est l'induction de modifications sous le contrôle d'un facteur environnemental synchronisateur. Le principal synchroniseur saisonnier est le changement annuel de la durée du jour sur 24h (photopériode), traduit en production nocturne de mélatonine par la glande pinéale, avec une durée plus longue en hiver (photopériode courte SP) qu'en été (photopériode longue LP). Chez les rongeurs saisonniers, le long pic nocturne de mélatonine en SP inhibe l'activité de reproduction. Le deuxième mécanisme est une régulation endogène de ces variations physiologiques qui permet à l'organisme d'anticiper les changements annuels de l'environnement. Il existe essentiellement deux systèmes de régulation endogène : l'un est cyclique et s'exprime sur plusieurs périodes proches d'une année en absence de synchronisateurs environnementaux (rythme circannuel) ; l'autre, plus simple, consiste en une réactivation du phénotype LP alors que les animaux sont maintenus en SP pendant une longue durée (période photoréfractaire). A l'heure actuelle, les mécanismes contrôlant ces variations endogènes sont inconnus.

Des travaux récents ont identifié des sites cellulaires et des acteurs moléculaires régulés de façon différentielle selon que les individus soient maintenus en SP ou en LP, conduisant à l'élaboration d'une voie neuroendocrine hypothétique reliant les changements de photopériode aux changements d'activité reproductrice (Dardente et al., 2014a; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; MILESI et al., 2018). En LP, la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse (PT) produit de l'hormone thyréostimulante (TSH) qui se lie sur ses récepteurs localisés sur les tanycytes (cellules gliales spécialisées bordant la partie ventrale du 3ème ventricule). L'activation du récepteur TSH tanycytaire augmente l'expression de la Désiodinase 2 (DIO2, convertissant la T4 en T3), diminue celle de la Désiodinase 3 (DIO3, catabolisant T3 et T4 en métabolites inactifs) et diminue celle du transporteur MCT8 qui transfère T3 et T4 du sang vers le cerveau. Ceci conduit à une augmentation locale de T3 dans l'hypothalamus médiobasal (Barrett et al., 2007; Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2013) qui est supposée stimuler l'expression des neuropeptides RFamides kisspeptine (Kp) et RFRP3 connus pour contrôler l'activité des neurones à GnRH et en aval l'axe hypophyso-gonadotrope (Ancel et al., 2012; Klosen et al., 2013; Revel et al., 2006a).

Les objectifs de mon projet de thèse étaient 1) de valider la voie neuroendocrine liant les variations photopériodiques de mélatonine à celles de la reproduction par une analyse dynamique des divers éléments moléculaires impliqués, 2) de déterminer si le phénomène de réactivation endogène photoréfractaire partage tout ou une partie de cette voie, 3) d'analyser l'implication de certains neuropeptides RFamides dans la réactivation photopériodique de la reproduction et 4) de

chercher de nouveaux acteurs potentiels intervenant dans la régulation saisonnière de la Dio3 et plus généralement de la reproduction. Ces études ont été menées chez deux espèces de rongeurs saisonniers photopériodiques : le hamster syrien (*Mesocricetus auratus*) et le hamster djungarien (*Phodopus sungorus*).

II) Analyse dynamique des évènements moléculaires et hormonaux impliqués dans l'activation photopériodique de l'activité de reproduction

Les hamsters mâles ont été maintenus pendant 10 semaines en SP (8h jour : 16h nuit) pour inhiber leur axe reproducteur, puis ont été transférés en LP (16h jour : 8h nuit) pour induire une réactivation photopériodique. Les animaux ont été analysés à différents moments entre le début et jusqu'à 6 semaines après ce transfert (où ils sont totalement adaptés à la LP) auxquels, j'ai mesuré l'activité de l'axe gonadotrope (LH et FSH, poids des testicules et des vésicules séminales) et analysé, par hybridation *in situ* non radioactive, les niveaux d'expression des gènes codant pour la TSH dans la PT ; les DIO2, DIO3 et MCT8 dans les tanycytes ; et les neuropeptides Kp et RFRP3 dans l'hypothalamus médiobasal.

De façon inattendue, la première réponse observée est une **diminution de l'expression de DIO3 dès la 1ère semaine** après le transfert en LP. Ensuite, à partir de la 4ème semaine l'expression de MCT8 est diminuée tandis que la FSH et le poids des organes sexuels sont augmentés, attestant d'une activation de l'axe gonadotrope. L'expression des gènes codant pour la TSH, la DIO2 ou les neuropeptides Kp et RFRP-3 n'est modifiée qu'à partir de la 6ème semaine, soit **après** l'activation de l'axe gonadotrope. Une dynamique similaire est observée chez les deux espèces de hamsters, suggérant que les **phénomènes observés sont conservés.**

III) Analyse dynamique des évènements moléculaires et hormonaux lors de la réactivation endogène photoréfractaire (indépendante de la mélatonine) de la reproduction

Les hamsters mâles ont été maintenus en SP pendant 24 semaines pour permettre la réactivation endogène, puis j'ai analysé la voie neuroendocrine d'animaux prélevés à différents moments entre 12 et 24 semaines d'exposition à la SP. De nouveau, chez les deux espèces de hamsters, **la première modification observée est une diminution de DIO3** à la 14ème semaine, suivie à la 20ème semaine d'une baisse de l'expression du transporteur MCT8 et une activation des gonades. L'expression de la TSH et de la DIO2 n'augmentent qu'à partir de la 24ème semaine (hamster djungarien) ou après ce laps de temps (hamster syrien). Le nombre de neurones à Kp et RFRP augmente à partir de la 24ème semaine chez les deux espèces.

En conclusion, ces deux études sur la dynamique de la réactivation photopériodique et endogène de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique posent des questions par rapport à la voie neuroendocrine proposée jusqu'à présent pour expliquer l'activation saisonnière de l'axe reproducteur et démontrent pour la première fois **une inhibition précoce de l'expression de DIO3,**

indépendante de changements notables de TSH et accompagnée d'un maintien initial du transport des hormones thyroïdiennes vers l'hypothalamus. Ces deux conditions pourraient être suffisantes à la **création d'un pic de T3 hypothalamique** conduisant à l'activation gonadique, puisque la stimulation de la voie TSH-DIO2-neuropeptides reproducteurs est postérieure à cette activation. Ainsi, mes résultats confirment l'implication du métabolisme thyroïdien hypothalamique dans les mécanismes de réactivation saisonnière de la reproduction et suggèrent un rôle inédit d'une inhibition précoce de la DIO3, qu'elle soit induite par la lumière ou de façon endogène. Par contre, ils posent des questions non seulement par rapport au le rôle initiateur du système TSH/DIO2 mais aussi par rapport à la place **des régulateurs Kp et RFRP dans l'activation saisonnière de l'axe reproducteur**.

IV) A la recherche du rôle des peptides RFamides dans le contrôle saisonnier de la reproduction

a) Quel est le rôle du RFRP3 dans la réactivation photopériodique de la reproduction

D'après la littérature, les neuropeptides Kp et RFRP3 sont des chaînons indispensables de la réactivation saisonnière de la reproduction, puisqu'ils sont régulés photopériodiquement et que leur administration centrale réactive l'axe reproducteur chez des animaux photoinhibés. Cependant, mes résultats précédents mettent en cause le rôle de ces neuropeptides dans l'initiation de la réactivation photopériodique/photoréfractaire de la reproduction, puisque leurs niveaux d'expression ne changent qu'après l'activation de l'axe gonadotrope. J'ai donc évalué si le RFRP3 est indispensable à la réactivation de la reproduction saisonnière. Pour cela, j'ai infusé chroniquement un antagoniste du récepteur au RFRP3 (le RF3286, généré et validé par le Dr F. Simonin, ESBS, Strasbourg) ou son véhicule au moment de la réactivation photopériodique du hamster syrien mâle par un transfert de SP à LP. Après 6 semaines en LP activatrice, le poids des testicules et des vésicules séminales étaient augmentés de façon similaire chez animaux traités et contrôles, malgré une surexpression de Kp dans le noyau arqué des premiers. Il est possible que la dose utilisée ne soit pas pertinente ou que l'antagoniste ne soit pas suffisamment sélectif du récepteur au RFRP3. Néanmoins, l'augmentation de l'expression de Kp uniquement chez les animaux traités au RF3286 atteste de son activité. Ceci suggère que le **RFRP3 n'est pas essentiel ou suffisant à la réactivation photopériodique de la reproduction.** Alternativement, l'absence du RFRP3 pourrait être compensée par la surexpression de Kp.

b) Y a-t-il un autre neuropeptide saisonnier capable d'induire la réactivation photopériodique de la reproduction ?

La famille des RFamides comprend 5 groupes de peptides (Quillet et al., 2016). En plus des RFRP3 et Kp, un troisième neuropeptide a été proposé pour agir sur les axes métaboliques et reproducteurs, le pyroglumatyl related peptide (QRFP ou 26Rfa) (Chartrel et al., 2005, 2016). Le 26RFa est exprimé

dans l'hypothalamus latéral et ventromédian et stimule la prise alimentaire et l'axe reproducteur (Chartrel et al., 2016; Patel et al., 2008). Aucune information sur son expression saisonnière n'étant publiée, j'ai déterminé s'il présentait des variations photopériodiques de son expression chez les hamsters syriens et djungariens. **Je n'ai trouvé aucune différence d'expression saisonnière** ni par hybridation *in situ* ni par PCR quantitative, suggérant que ce peptide n'intervient pas dans la régulation des fonctions saisonnières.

En conclusion, mon étude pharmacologique remet en question l'importance du rôle du RFRP3 dans la réactivation de la reproduction saisonnière, et mon étude neuroanatomique suggère que le 26Rfa n'intervient pas dans la physiologie saisonnière.

V) Recherche de régulateurs potentiels des changements saisonniers précoces de la Désiodinase 3

Récemment, une régulation saisonnière du morphogène Sonic Hedgehog a été montrée dans l'hypothalamus de mouton (Lomet et al., 2017). De façon intéressante, Sonic Hedgehog est également connu pour inhiber DIO3 dans certains cancers (Dentice et al., 2007). Par ailleurs, l'activation saisonnière de la reproduction est connue pour partager certains gènes régulateurs avec la puberté. Le gène *Kiss1* par exemple est surexprimé lors des deux phénomènes (Ansel et al., 2011; Kauffman et al., 2007a). MKRN3 et EAP1 sont des facteurs de transcription impliqués dans la puberté. J'ai étudié l'expression de l'ensemble de ces gènes d'intérêt dans l'hypothalamus de hamsters syriens adaptés en SP ou LP par PCR quantitative. Je n'ai pu mettre en évidence aucune différence photopériodique de l'expression de ces gènes, **suggérant qu'ils ne sont probablement pas des régulateurs saisonniers de la DIO3.**

J'ai également examiné la cinétique d'expression de deux autres candidats possibles, la somatostatine et la chromogranine A. L'expression de la somatostatine dans l'hypothalamus présente une régulation saisonnière chez le hamster djungarien et ses récepteurs SST2(a) sont présents sur les tanycytes (Klosen et al., 2013). L'expression de la chromogranine A dans la PT du le mouton est saisonnière avec une évolution inverse de celle de la TSH (Wood et al., 2015). J'ai confirmé par hybridation *in situ* l'expression saisonnière de ces deux gènes, mais l'analyse de leur cinétique indique qu'ils sont inhibés 6 semaines après la DIO3, **suggérant que ces deux facteurs ne peuvent pas être des régulateurs précoces de la DIO3.**

VI) Discussion et conclusion générale

L'analyse cinétique des processus de réactivation photopériodique et endogène de la reproduction m'a amené à remettre en cause la voie moléculaire et cellulaire hypothétique précédemment établie. Mes études suggèrent qu'un pic de T3 pourrait survenir suite à l'inhibition précoce de son catabolisme par la DIO3 couplé à un transport maintenu par MCT8. A cause de leur activation tardive, le rôle des neuropeptides Kp et RFRP3 est aussi remis en question : sont-ils des acteurs indispensables ou des modulateurs de l'activation saisonnière de la reproduction ? Je

propose que l'activation photopériodique de la reproduction implique deux voies (Figure1) : Une première voie rapide dépendante du pic de T3 créé par l'inhibition précoce de la DIO3 tanycytaire, la T3 pouvant agir de manière autocrine sur les tanycytes au niveau de l'éminence médiane pour stimuler directement la sécrétion du GnRH. Dans un deuxième temps, une voie TSH-DIO2-Kp/RFRP3 s'activerait de façon plus tardive afin de supporter et stabiliser l'activation par la première voie. Dans le cas de l'activation endogène photoréfractaire de la reproduction, seule la première voie dépendante de la DIO3 serait impliquée puisque, selon l'espèce de hamster, la voie TSH/DIO2 est peu ou pas activée. Mes résultats posent de nouvelles questions sur les mécanismes activant la DIO3, en particulier s'ils dépendent d'une action directe ou indirecte de la lumière ou de la mélatonine et sur le système qui déclenche le moment de l'activation photoréfractaire, DIO3 dépendante, de la reproduction. Toutes ces questions devront être étudiées dans le futur afin d'améliorer la connaissance du contrôle saisonnier de l'axe reproducteur, et j'ai initié des expériences dans ce but. J'ai fait des prélèvements d'explants hypothalamiques de hamsters à 3 moments particuliers de la régulation de DIO3 sur lesquels je prévois d'une part, de doser les hormones T3 et T4 afin de confirmer notre hypothèse d'un pic de ces hormones, et d'autre part, de faire une analyse transcriptomique par ARN-Seq afin d'identifier de nouveaux régulateurs saisonniers de DIO3 qui pourront être sélectionnés à l'aide d'une analyse du promoteur du gène *DIO3.* Enfin, la technique CRISPR-CAS9, qui est en cours de développement dans notre équipe, devrait permettre de déléter des gènes candidats chez les hamsters afin de vérifier leur implication dans la régulation saisonnière de la reproduction.

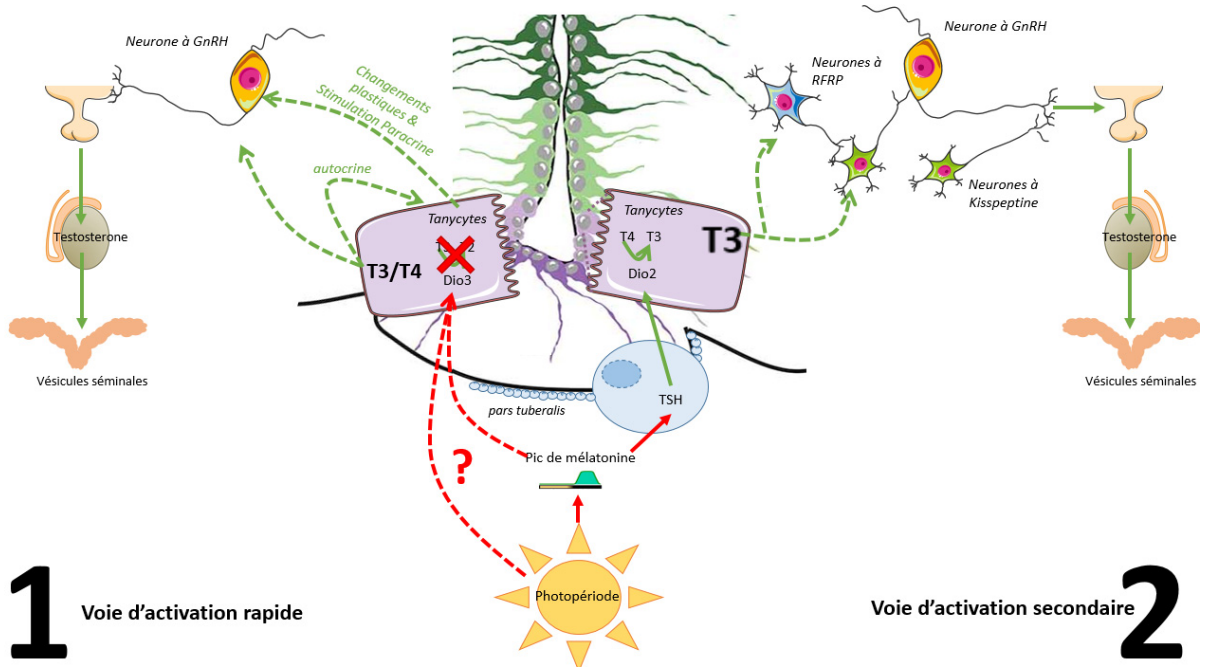
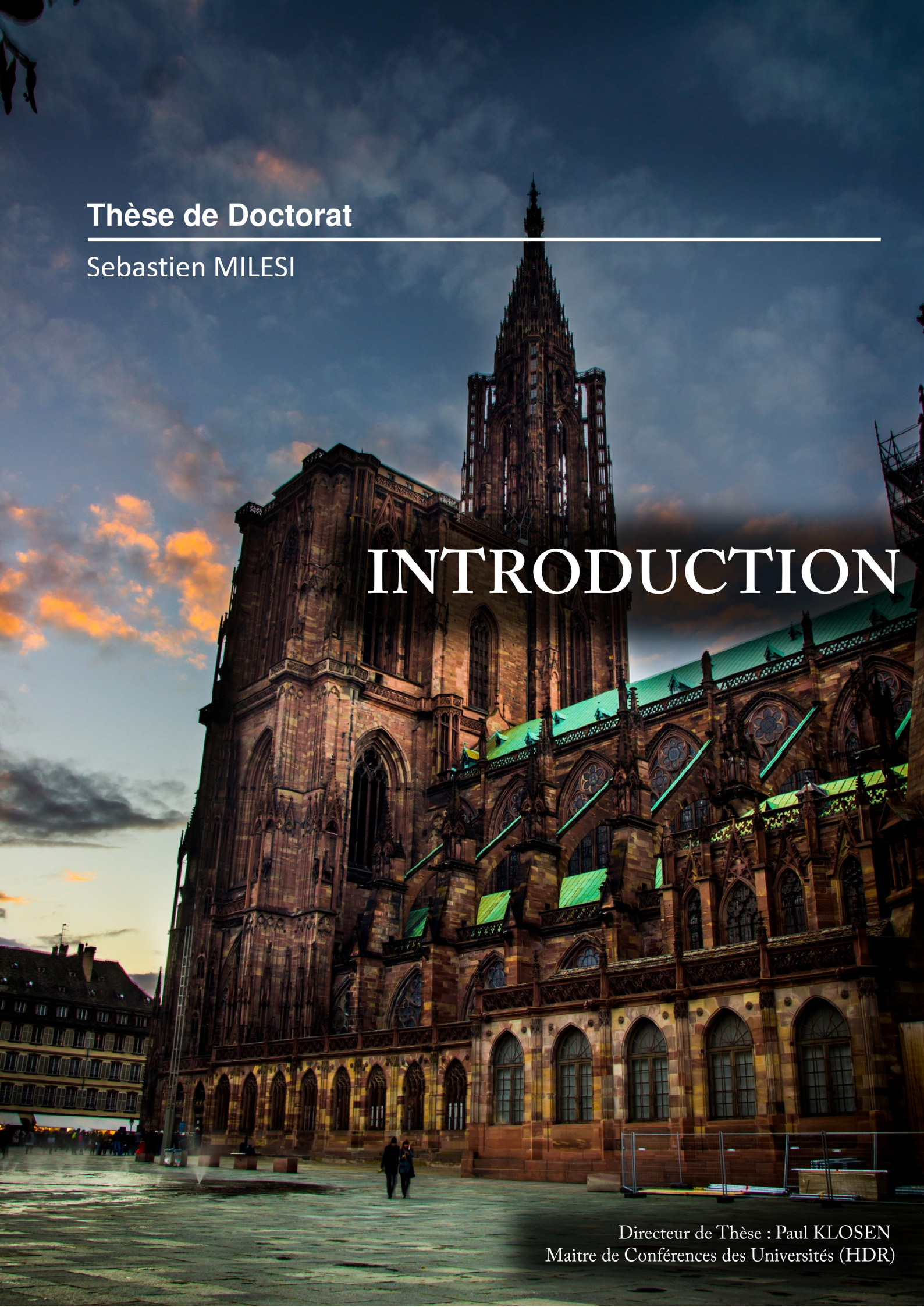


Figure A : Nouveau modèle de travail de la régulation photopériodique de l'activité reproductrice incluant les nouvelles informations acquises pendant ma thèse

Flèches vertes : stimulatrices, flèches rouges : inhibitrices, flèches en pointillés : hypothèses,



Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

INTRODUCTION

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

I) Importance des Rythmes Biologiques

a) Contexte environnemental

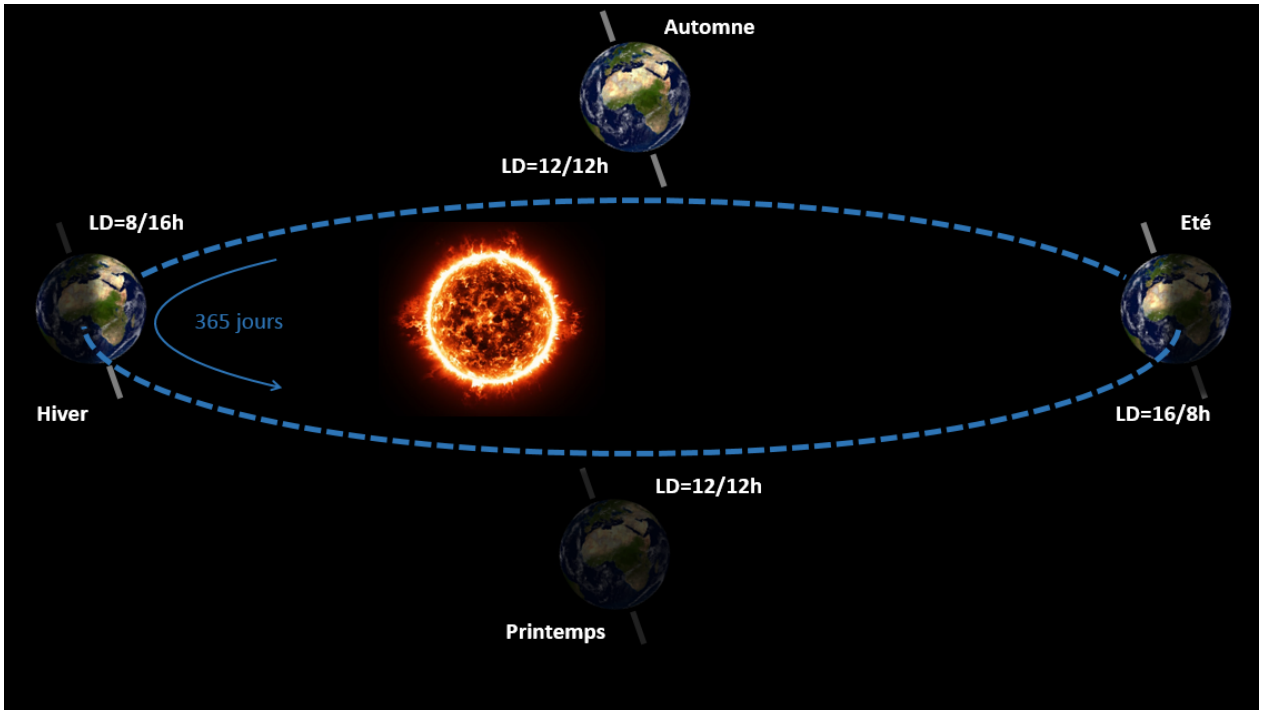


Figure 1 : orbite terrestre autour du Soleil,

Inclinaison de l'axe de la terre 23°, LD=lumière obscurité

La terre tourne autour du soleil en respectant non pas un cercle parfait, mais une ellipse. De plus elle tourne sur elle-même avec une inclinaison de l'axe d'environ 23° **(Fig. 1)**. Ceci entraine des changements environnementaux cycliques dont la période est égale à la durée d'un tour de la terre autour du soleil, c'est-à-dire proche d'une année : ce sont les saisons. Les changements environnementaux sont de différentes natures. L'inclinaison de l'axe de rotation de la terre entraine des changements de la durée de la phase lumineuse quotidienne, appelé photopériode, de la qualité spectrale et de la température. Ceci entraine des changements environnementaux saisonniers secondaires, tels que des changements de disponibilité alimentaire et des changements de prédation. Plus la latitude sera élevée, plus ces changements seront marqués. Les animaux incapables de migrer afin de trouver un climat optimal vont adapter leur physiologie à l'environnement qui les entoure afin d'optimiser leur survie ainsi que celle de leur descendance. Pour cela, ils peuvent modifier différents paramètres biologiques. Le premier sera la modification des spécificités du pelage qui leur permettra d'affronter le froid en hiver. Ils adapteront aussi leur métabolisme afin de pallier au manque de nourriture. Pour cela, ils seront capables de moduler leur prise alimentaire, leur métabolisme de base et leur température corporelle. Certaines espèces sont même capables d'entrer dans un état de dormance contrôlée, appelé torpeur ou hibernation.

b) Pourquoi étudier les rythmes saisonniers de la reproduction ?

Le but des recherches en saisonnalité est notamment de mieux comprendre comment les changements saisonniers contrôlent les changements de l'activité reproductrice. L'apport de ces nouvelles connaissances dans le milieu est crucial par différents aspects. Dans un premier temps, elles ont un enjeu socioéconomique majeur. En effet, de nombreuses espèces saisonnières sont aujourd'hui utilisées en agriculture. Ainsi, il y a par exemple les ovins en Europe ou les dromadaires au Maghreb. L'optimisation de leur reproduction permet une optimisation de la production agricole et alimentaire (lait + viande). Elle est aussi importante au niveau écologique, car de nombreuses espèces sont en voie de disparition, à cause du réchauffement climatique, du changement de leur habitat naturel, mais aussi à cause de difficultés de reproduction liées entre autres à la saisonnalité qui entraine une inhibition de la reproduction sur une partie de l'année. Une meilleure connaissance de cette dernière permettrait peut-être une augmentation des naissances afin de consolider la population des espèces en danger. La reproduction saisonnière est également un modèle unique où on peut inhiber volontairement et physiologiquement la reproduction via la photopériode, ce qui permet une étude plus facile et économique des voies de régulation de l'axe reproducteur, puisqu'il n'y a ni besoin de créer d'animaux transgéniques ni besoin d'utiliser des agents pharmacologiques. Enfin l'étude de la reproduction saisonnière permet une amélioration des connaissances fondamentales en physiologie animale.

c) Définition d'un rythme biologique

Un rythme est selon le Larousse « le retour, à des intervalles réguliers dans le temps, d'un fait, d'un phénomène ». Un rythme biologique est donc la répétition d'un phénomène biologique, d'une durée et d'un motif donné. Si ce rythme est maintenu sans qu'un évènement environnemental ne l'induise, ce rythme sera endogène. Plusieurs paramètres caractérisent un rythme biologique **(Fig. 2)** :

- La période représentant la durée entre deux évènements identiques du cycle
- Le mésor correspondant à la moyenne de la variable biologique
- L'acrophase et la batyphase correspondant respectivement au temps à laquelle la valeur de la variable biologique est la plus haute ou la plus basse du cycle biologique
- L'amplitude représentant l'écart maximal entre le mésor et l'acrophase ou la bathyphase

Un rythme biologique présentant une période de 24 heures est appelé « rythme journalier ou nycthéméral » et un rythme présentant une période d'une année est appelé « rythme annuel ou saisonnier ». Ces rythmes sont en phase avec les changements cycliques de l'environnement, notamment les rythmes de lumière (durée, intensité, qualité spectrale..), mais aussi de température et de disponibilité alimentaire.

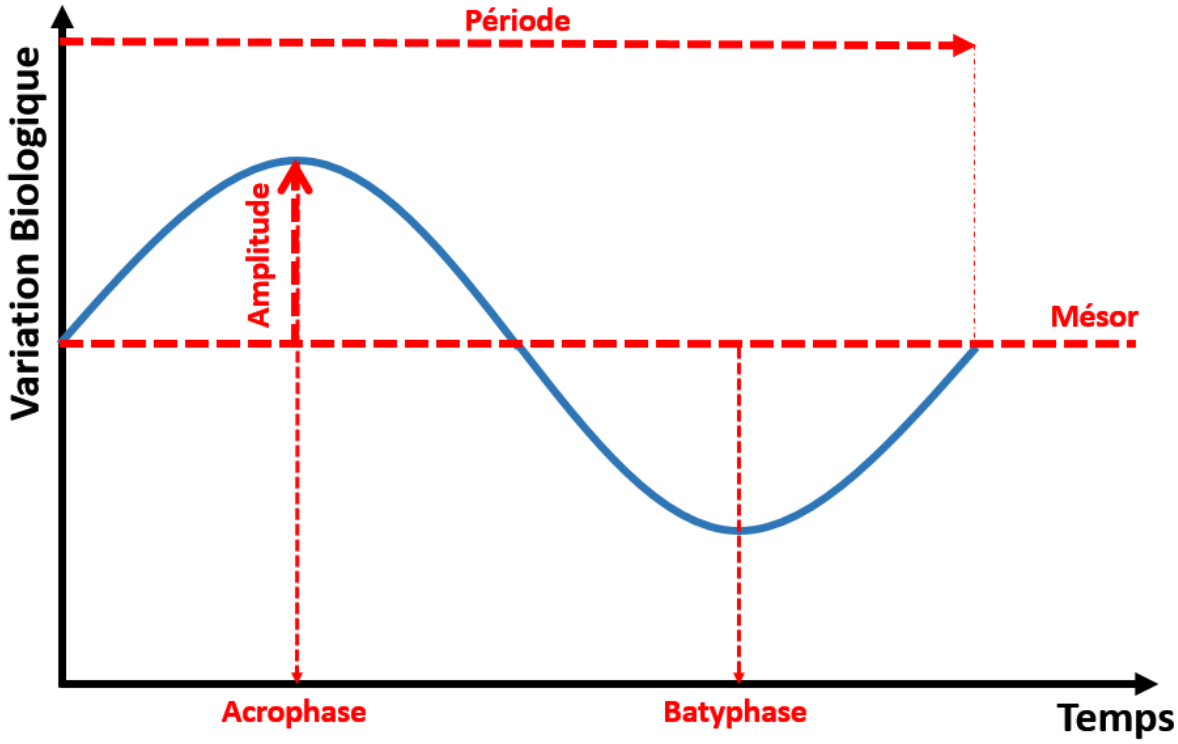


Figure 2 : Description d'un rythme biologique,

d) En quoi les rythmes biologiques sont-ils importants ?

Afin d'optimiser leur survie, les êtres vivants adaptent leur physiologie et leur comportement aux variations des conditions environnementales imposées par les cycles astronomiques. Par exemple, afin de s'adapter aux rythmes journaliers, ils aménagent une phase d'activité et une phase de repos synchronisées avec le cycle jour/nuit de la lumière, de la disponibilité alimentaire, mais aussi des facteurs sociaux (risque de prédation, nécessité de reproduction...). Dans les régions tempérées, où il existe de grandes variations saisonnières de disponibilité alimentaire et de température, les êtres vivants adaptent leur physiologie à l'environnement en période défavorable en diminuant leurs besoins énergétiques et en inhibant leur reproduction.

Cependant, bien plus qu'une simple adaptation réactive, les êtres vivants sont capables d'anticiper les changements cycliques de l'environnement notamment grâce à des horloges endogènes. Par exemple, le système circadien ajuste l'augmentation des concentrations circulantes de l'hormone thyroïdienne et du cortisol juste avant l'apparition de la phase d'activité, ce qui permet la préparation de l'organisme à l'éveil et d'anticiper la phase active (Krieger et al., 1979; Van Cauter et al., 1981). Les changements saisonniers peuvent également être anticipés par exemple chez le mouton au niveau de la fonction de reproduction. Comme la gestation dure 5 mois chez le mouton, son activité reproductrice est activée en automne et en hiver afin que la progéniture puisse naître lors des périodes favorables au printemps et en été (Arendt et al., 1983).

e) La saisonnalité au travers des espèces

i) L'adaptation aux saisons est différente d'une espèce à l'autre

L'adaptation des espèces à leur environnement saisonnier peut être plus ou moins développée en fonction de leur localisation géographique ou de leur capacité à s'affranchir de leur environnement. Ainsi, l'homme contrôle son environnement et en particulier les marqueurs saisonniers que sont la lumière, la température et les apports alimentaires. Néanmoins, il existe encore de réelles variations saisonnières chez l'humain puisque 4000 ARNm du transcriptome présentent des variations saisonnières dans les leucocytes et le tissu adipeux (Dopico et al., 2015). Ces changements transcriptomiques pourraient être liés aux changements saisonniers de l'humeur (Meesters and Gordijn, 2016), de la concentration de testostérone (Stanton et al., 2011) ou encore de la pousse du cheveu (Randall, 2008). Il en est de même pour les espèces commensales à l'homme telles que les rats et les souris, qui profitent de l'environnement créé par l'homme (Ono et al., 2008).

La plupart des espèces présentent cependant de grandes variations saisonnières de leurs fonctions biologiques. Deux groupes d'espèces se distinguent en fonction de leur physiologie saisonnière :

- Les espèces saisonnières circannuelles, telles que le hamster européen (*Cricetus cricetus*) et le mouton (*Ovis aries*), qui montrent une synchronisation de leurs fonctions biologiques avec les saisons, et qui continueront à exprimer des rythmes endogènes avec une période différente, mais proche d'une année, s'ils sont placés en conditions environnementales constantes (Ducker et al., 1973; Masson-Pévet et al., 1994a). A l'heure actuelle, la localisation et le fonctionnement de l'(des) horloge(s) circannuelle(s) responsable(s) de cette rythmicité endogène est/sont mal connus. Chez ces espèces, les variations saisonnières de la photopériode permettent une synchronisation de l'horloge circannuelle avec l'environnement (Monecke et al., 2013).

- Les espèces saisonnières photopériodiques, telles que les hamsters syriens (*Mesocricetus auratus)* et djungariens (*Phodopus sungorus)*, qui montrent des changements physiologiques essentiellement induits par les changements saisonniers de la photopériode (Bartness and Wade, 1985; Figala et al., 1973; Logan and Weatherhead, 1978; Stetson and Watson-Whitmyre, 1986; Wade and Bartness, 1984). Néanmoins, s'ils sont maintenus longtemps en conditions photopériodiques inhibitrices, ils deviennent photoréfractaire à ces conditions et réactivent leurs paramètres physiologiques observés en photopériode activatrice (Herwig et al., 2013; Schlatt et al., 1995). Pour sortir de cet état photoréfractaire, les animaux doivent obligatoirement être de nouveau soumis à une photopériode activatrice (Kauffman et al., 2003).

ii) Paramètres physiologiques saisonniers

1) La production de phanères est régulée de façon saisonnière.

Chez le hamster djungarien, le pelage vire du grisé en été au blanc en hiver (Duncan et al., 1985; Kuhlmann et al., 2003, 2003; Logan and Weatherhead, 1978). Un évènement similaire se produit chez le renard arctique (*Alopex lagopus*) et sa proie le lièvre arctique (*Lepus arcticus*) qui présentent un pelage blanc en hiver et foncé en été. Ceci leur permet en hiver de se fondre dans les paysages enneigés pour pouvoir chasser plus facilement, ou à l'inverse se protéger. La surface corporelle de petits animaux tels que le hamster est aussi très grande par rapport à son poids. Ceci induit de grosses déperditions énergétiques, d'autant plus grandes si les températures sont basses. Les poils du pelage d'hiver seront chez le renard arctique 2 fois plus longs que les poils d'été (Underwood and Reynolds, 1980). Chez le mouton, même si la couleur du pelage ne change pas, la qualité du pelage sera modifiée et la production de laine sera plus importante en été qu'en hiver (Lincoln, 1990). Il en est de même pour les cornes dont la production sera régulée par les mêmes mécanismes (Lincoln, 1990).

2) L'activité métabolique

La déperdition énergétique importante et les changements saisonniers de disponibilité alimentaire entrainer aussi un des changements saisonniers de l'activité métabolique. Ainsi, en été où l'environnement est plus généreux en nourriture, le hamster djungarien augmente sa prise alimentaire et le poids corporel augmentera, ce qui permettra à l'animal de faire des réserves énergétiques. A l'inverse, en hiver il diminue sa prise alimentaire de 20% et réduit de 30% environ sa masse corporelle (Fine and Bartness, 1996; Steinlechner et al., 1983). Ceci lui permet de s'adapter naturellement à un environnement moins riche en hiver en diminuant sa prise alimentaire tout en utilisant les réserves effectuées pendant l'été. Afin d'optimiser ces réserves, les espèces saisonnières ont également acquis la capacité de modifier leur dépense énergétique. En hiver, elles sont capables de diminuer leur température corporelle et leur métabolisme de base afin de diminuer l'énergie dépensée pour le maintien de l'homéostasie thermique (Sáenz de Miera et al., 2014). La plupart sont même capables d'entrer dans un état de dormance contrôlé dans lequel la prise alimentaire, le métabolisme de base et la température corporelle sont diminués. Si cet état est maintenu pendant plusieurs jours à plusieurs semaines il est appelé hibernation, s'il dure de quelques minutes à quelques heures, ce sont des torpeurs. L'hibernation nécessitant des réserves énergétiques conséquentes, les espèces hibernantes seront généralement plus massives que celles utilisant les torpeurs (Ruf and Geiser, 2015).

3) La reproduction

Chez de nombreuses espèces, l'activité reproductrice est également régulée par les changements saisonniers afin de faire naître la progéniture aux périodes favorables de l'année que sont le printemps et l'été. En effet, à ces périodes, la nourriture abondante et les températures clémentes assurent une croissance optimale pour la progéniture et une déperdition énergétique minimale pour les parents. Etant donné que la durée de gestation est variable selon les espèces, l'activation de l'axe reproducteur et l'accouplement n'auront pas lieu au même moment selon que la gestation soit courte ou longue. Chez les espèces à durée de gestation courte (hamsters, …) ou alors proche de 12 mois (cheval), l'axe reproducteur est activé au printemps et ces animaux sont appelés des « reproducteurs de jours longs ». C'est par exemple le cas des hamsters syriens et djungariens, qui ont une durée de gestation inférieure à 20 jours. A l'inverse, quand la durée de gestation est proche de 6 mois, comme par exemple chez le mouton (*OVNIs Ariès*) ou le cerf (*Creus elaphus*), l'axe reproducteur est activé en automne ou en hiver afin que la progéniture naisse au printemps ou en été. Ce sont des « reproducteurs de jours courts ».

II) La saisonnalité : de l'environnement à la physiologique

a) Les facteurs environnementaux synchronisateurs

i) Le facteur clés :

Le facteur environnemental majeur qui synchronise la physiologie saisonnière est la lumière, car sa durée, son intensité et sa qualité spectrale varient de façon notable et reproductible au cours des saisons.

La durée de la phase lumineuse sur 24h est appelée la photopériode. Cette dernière varie en fonction des saisons puisqu'en hiver les jours sont plus courts qu'en été. Cette variation saisonnière de la photopériode est le signal environnemental le plus critique pouvant induire le passage d'un état saisonnier à un autre. Ainsi, en environnement contrôlé où seule la photopériode varie, le hamster djungarien montre des variations d'activité reproductrice (Seegal and Goldman, 1975) et de masse corporelle (Bartness and Wade, 1985). La photopériode charnière en dessous de laquelle l'animal aura une physiologie hivernale et au-dessus de laquelle l'animal aura une physiologie estivale est appelée photopériode critique. Elle est différente selon les espèces et, même au sein d'une même espèce, selon leur localisation géographique. Chez le hamster djungarien, elle est d'environ 13 heures (Hoffmann, 1982) et chez le hamster syrien de 12,5 heures (Walton et al., 2011).

L'effet physiologique de la photopériode et de la durée de la photopériode critique peuvent également être modulé par des facteurs secondaires non photique.

ii) Les facteurs secondaires :

Il existe d'autres facteurs environnementaux, tels que la température ou la disponibilité alimentaire, capables d'influencer la physiologie saisonnière. Chez les mammifères, leurs effets sont moins puissants que celui de la lumière, mais ils peuvent moduler les effets de la photopériode.

⇨ La température : chez les hamsters syriens placés en photopériode inhibitrice, la température peut accélérer l'atrophie testiculaire induite par la photopériode courte sans changer les caractéristiques du pic de mélatonine (Pévet et al., 1989)

⇨ La disponibilité alimentaire : chez les hamsters djungariens placés en photopériode intermédiaire (13.5h de lumière par jour), les hamsters disposant de nourriture à volonté ont leur activité reproductrice maintenue alors que les hamsters en privation alimentaire inhibent leur axe reproducteur (Paul et al., 2009).

⇨ L'historique photopériodique : au cours de l'année une même photopériode sera présente deux fois : une fois au printemps et une fois à l'automne (i.e. : équinoxes). Chez les hamsters djungariens, une même photopériode peut induire des effets opposés en fonction de la photopériode qui précédait. Ainsi, une photopériode de 14 heures induit une régression testiculaire chez des animaux précédemment placés en photopériode activatrice alors qu'elle induit la recrudescence testiculaire si la photopériode précédente était inhibitrice (Prendergast et al., 2004). Ceci indique que les animaux sont plus sensibles à la variation de photopériode qu'à la valeur absolue de cette photopériode.

b) <u>Décodage du message photopériodique</u>

i) Traduction du signal photopériodique en un signal endocrine : la sécrétion de mélatonine

La variation annuelle de la photopériode est traduite en un signal endocrine formé par les changements saisonniers de la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale.

1) Traduction d'un signal photopériodique en un signal électrique.

Chez les mammifères, l'information lumineuse est captée par la rétine, composée de photorécepteurs sensibles à différentes intensités lumineuses et différentes longueurs d'onde et responsables de la phototransduction. On retrouve parmi ces photorécepteurs les cônes et les bâtonnets, respectivement responsables de la vision photopique et scotopique. Cependant, en leur absence, les souris sont toujours capables d'être photo-entrainées malgré leur cécité (Freedman et al., 1999). En effet, il existe un troisième type de cellules photoréceptrices, qui est un sous type des cellules ganglionnaires contenant un pigment photosensible appelé mélanopsine. Ces cellules ne représentent qu'environ 2% des cellules ganglionnaires totales, mais elles prennent part à la perception inconsciente de la lumière et interviennent dans le contrôle des paramètres autonomes telles que la dilatation pupillaire et l'intégration photopériodique (Hatori et al., 2008). Les cellules ganglionnaires à mélanopsine, également appelées ipRGC (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) (Provencio et al., 2000), forment majoritairement le tractus rétino hypothalamique et projettent directement au niveau des noyaux suprachiasmatiques hypothalamiques (SCN) **(Fig.3)** où elles libèrent leur neurotransmetteur : le Glutamate et le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) (Hannibal, 2002)**(Fig.3)**.

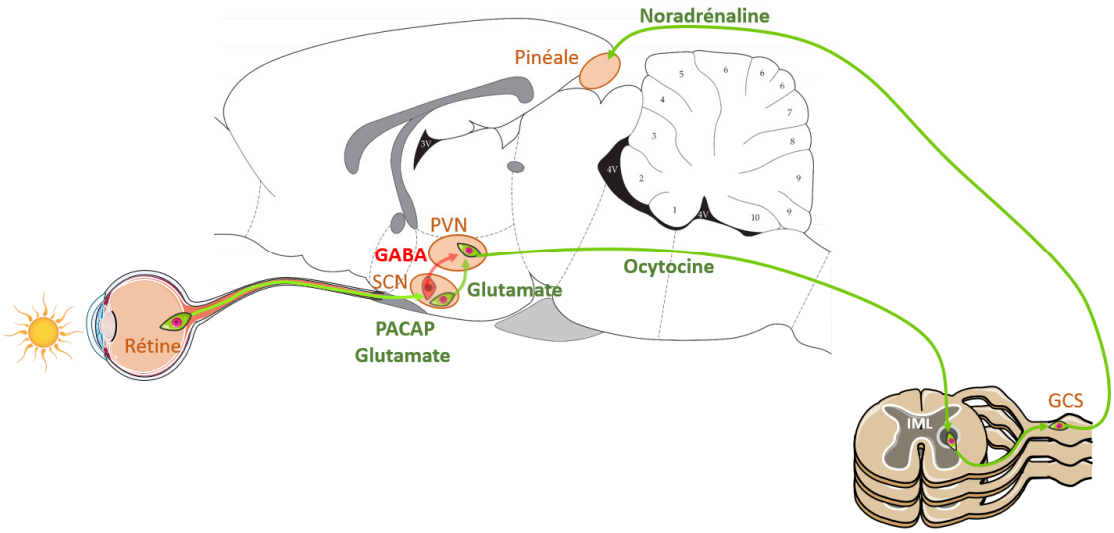


Figure 3 : Voie Rétino-hypothalamique et voie de contrôle de la sécrétion de mélatonine par le SCN,

SCN= noyau suprachiasmatique, PVN= noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, IML= colonne intermédiolatérale de la moelle épinière, GCS= Ganglion cervical supérieur

2) Les noyaux suprachiasmatiques contiennent l'horloge biologique centrale.

Dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN) se trouve l'horloge circadienne centrale de l'organisme. Cette horloge circadienne centrale est responsable de la synchronisation avec l'environnement de l'ensemble des horloges secondaires, présentes dans tous les tissus de l'organisme. Une lésion des SCN entraine une perte de synchronisation des horloges périphériques ainsi qu'une perte de rythmicité totale de l'organisme en absence de signaux environnementaux (Reppert et al., 1981). L'horloge est basée sur une boucle moléculaire robuste à rétrocontrôle négatif impliquant les protéines Clock, Bmal, 3 protéines Période (Per1, Per2 et Per3) et 2 Cryptochromes (Cry1 et Cry2). Les protéines Clock et Bmal s'hétérodimérisent et stimulent, en se fixant sur une séquence Ebox dans les promoteurs, la synthèse des ARN messagers, puis des protéines Période (Per) et Cryptochrome (Cry) **(Fig.4)**. A l'inverse, les protéines Per et Cry en s'hétérodimérisant vont inhiber l'activité de Clock et Bmal sur la séquence Ebox **(Fig.4)**. Cette horloge possède une période proche de 24h. En temps normal, la protéine Per2 est synthétisée pendant la phase diurne (Buhr and Takahashi, 2013). En cas de décalage horaire ou d'allongement de la photopériode, la lumière présente pendant la phase nocturne subjective stimulera via le tractus rétino-hypothalamique et ses neurotransmetteurs, le glutamate et le PACAP, la transcription des gènes Per1/2 originellement peu exprimés durant cette phase **(Fig.4)**(Buhr and Takahashi, 2013). Per1/2 seront augmentés si la lumière est appliquée en début de phase nocturne, ce qui induira un retard de phase. Si la lumière est appliquée pendant la deuxième partie de la nuit, seulement Per1 sera stimulé et cela induira un avancement de phase afin de resynchroniser l'horloge centrale avec l'environnement (Buhr and Takahashi, 2013; Yan and Silver, 2004).

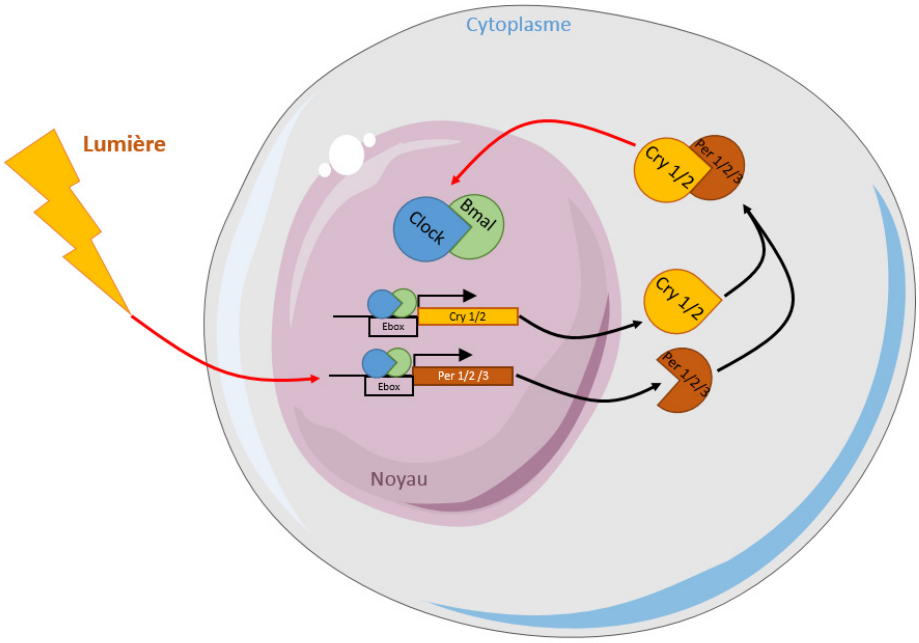


Figure 4 : Horloge circadienne cellulaire

Flèche rouges : Inhibitrice Per=Période, Cry=Cryptochrome, inspiré de (Buhr and Takahashi, 2013)

3) Le SCN contrôle l'activité de la glande pinéale

Les SCN utilisent, entre autres, la mélatonine comme messager hormonal, afin de synchroniser les horloges périphériques. Pour réguler la synthèse de cette hormone, les SCN possèdent des efférences glutamatergiques qui stimulent les noyaux paraventriculaires (PVN) durant la nuit subjective (Perreau-Lenz et al., 2004). A l'inverse, des efférences GABAergiques inhibent le PVN pendant le jour subjectif (Kalsbeek et al., 1996) **(Fig.3)**. Les neurones vasopressinergiques et oxytocinergiques des PVN, activés durant la nuit, stimulent les neurones préganglionnaires sympathiques localisés dans les colonnes intermédiolatérales de la moelle épinière (Hastings and Herbert, 1986; Smale et al., 1989; Teclemariam-Mesbah et al., 1997) **(Fig.3)**. Ces neurones à leur tour activent les neurones noradrénergiques des ganglions cervicaux supérieurs, qui projettent sur la glande pinéale et libèrent de la noradrénaline, un puissant stimulateur de la synthèse de mélatonine, pendant la période nocturne (Drijfhout et al., 1996; Larsen et al., 1998) **(Fig.3)**.

Une inhibition aiguë par la lumière de la production de mélatonine est également possible. Tout comme pour la synchronisation de l'horloge centrale avec l'environnement, la lumière pendant la phase nocturne stimulera les neurones GABAergiques via le tractus rétino-hypothalamique. A leur tour, ils inhiberont les neurones ocytocinergiques du PVN et toute la voie jusqu'à inhibition de la stimulation adrénergique des cellules de la glande pinéale (Kalsbeek et al., 1996; Teclemariam-Mesbah et al., 1997).

4) Synthèse rythmique de la mélatonine

La mélatonine est synthétisée à partir de la sérotonine elle-même dérivée du tryptophane. Le tryptophane est importé dans les pinéalocytes grâce au transporteur d'acides aminés de type T (Slc16a10) (Gutiérrez et al., 2003). Il est rapidement converti en sérotonine qui elle-même est convertie par l'arylalkylamine N-acétyl transférase (AA-NAT) en N-acetylsérotonine, ensuite convertie par l'hydroxyindole-O-methyltransférase (HIOMT) en mélatonine **(fig. 5)**. L'enzyme limitante dans cette cascade de réactions est la AA-NAT dont l'activité, contrairement à celle de l'HIOMT, présente une très grande variation journalière. Le jour, la glande pinéale n'est pas stimulée et l'activité très basse de l'AA-NAT réduit la production de mélatonine. Durant la nuit, la noradrénaline, libérée sous le contrôle des SCN, stimule les récepteurs β1 et α1 adrénergiques des pinéalocytes conduisant à une augmentation importante de la concentration intracellulaire en AMPc, puis une activation de la protéine kinase A. L'augmentation nocturne de l'activité de la protéine kinase A induit plusieurs voies d'activation transcriptionnelles (uniquement chez les rongeurs), mais aussi traductionnelles et post-traductionnelles, qui aboutissent à une augmentation très importante (d'un facteur 10 à 100) de l'AA-NAT et en aval de la synthèse de mélatonine (Schomerus and Korf, 2005; Simonneaux and Ribelayga, 2003). La mélatonine n'est pas stockée dans les pinéalocytes. De par sa nature amphiphile, elle traverse les membranes plasmiques après sa synthèse. A la sortie de la glande pinéale, elle serait relarguée dans le liquide céphalo rachidien (LCR) au niveau du récessus pinéal ce qui explique que sa concentration y est élevée (Tricoire et al., 2002). Lors de son passage dans le sang, elle est rapidement dégradée lors du passage hépatique, ce qui lui confère une demi-vie courte d'environ 20 minutes. En raison de ces différentes caractéristiques, toute modification de la synthèse de mélatonine se traduit par des modifications similaires de sa concentration circulante.

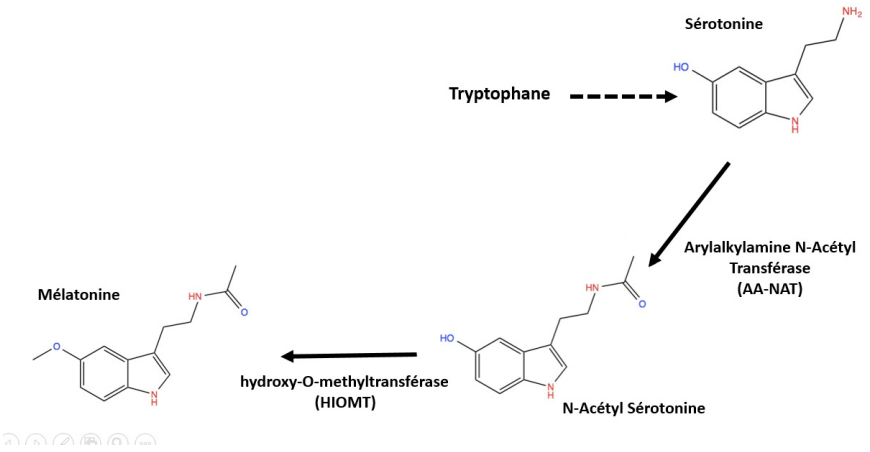


Figure 5 : synthèse de la mélatonine à partir de la Sérotonine

Flèche en pointillés : étapes intermédiaires non citées

La mélatonine est synthétisée chaque nuit de façon proportionnelle à la durée de la nuit. Les nuits d'hiver étant longues, la durée du pic de mélatonine a une durée maximale permise par les SCN. En

été, les jours se rallongent et la lumière du matin et du soir ajustent l'activité des SCN, ce qui conduit à un raccourcissement du pic nocturne de mélatonine. Ainsi, les variations saisonnières de la photopériode sont encodées dans les SCN et sont traduites physiologiquement en un pic de mélatonine, dont la durée dépend de la durée de la nuit (et al., 1991; Karsch et al., 1988). Il est important de noter que ni l'amplitude du pic de mélatonine, ni la quantité quotidiennement délivrée n'influencent le codage physiologique de la photopériode (Karp et al., 1991). C'est la durée du pic de mélatonine qui encodera la photopériode (Bartness et al., 1993).

ii) Cibles de la mélatonine

1) Les récepteurs de la mélatonine

Il existe 2 récepteurs à la mélatonine : le MT1 et le MT2, qui sont des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. De plus, il y a un site de liaison de basse affinité sur la quinine réductase 2 (NQO2) appelé MT3 (Nosjean et al., 2001)

- La comparaison des séquences protéiques montre une haute homologie entre MT1 et MT2 (environ 55% sur la séquence globale et 70% sur les portions transmembranaires). Ce sont tous les deux des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Dubocovich et al., 2003). La faible expression des récepteurs et le manque d'anticorps spécifiques pour l'immunohistochimie entrainent des difficultés pour étudier les différences anatomiques d'expression de MT1 et MT2 dans le cerveau et en périphérie. Une technique avec une sensibilité suffisante est l'utilisation de ^{125}I-iodomélatonine comme radioligand, mais elle ne permet pas la distinction entre MT1 et MT2 (Ng et al., 2017) ni une localisation cellulaire pour un phénotypage des cellules exprimant les récepteurs de la mélatonine. L'analyse des ARNm par PCR (Jockers et al., 2008) et l'hybridation *in situ* (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002) montre une expression de MT1 et MT2 dans le cerveau. MT1 est fortement exprimé dans la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse (PT) (Klosen et al., 2002; Masson-Pévet et al., 1993; Williams and Morgan, 1988) et le SCN (Masson-Pévet et al., 1993; Vaněcek et al., 1987) qui sont deux structures importantes dans les rythmes biologiques. MT1 est aussi exprimé dans l'hypophyse, l'habenula et le noyaux du raphé dorsal, alors que MT2 est exprimé dans les noyaux réticulaires thalamiques (Ng et al., 2017). Dans beaucoup d'autre structures, les deux formes MT1 et MT2 sont coexprimées (cortex, hypothalamus, substance grise périaqueducales, cervelet, …). Afin d'analyser leurs différences fonctionnelles, des études pharmacologiques sur culture cellulaire ont été effectuées avec des radioligands (Legros et al., 2014). Elles ont permis de montrer que par exemple les deux récepteurs étaient capables d'être spontanément précouplés à la protéine G (Devavry et al., 2012). Le même laboratoire a montré plus tard que c'est sous cette forme qu'ils ont des différences d'affinité pour leur ligand alors qu'ils ont la même affinité lorsqu'ils sont découplés (Legros et al., 2014).

- L'activation des récepteurs MT1, couplés aux protéines Gi, induit une inhibition de la voie AMPc-PKA. Dans certains tissus, les MT1 sont également couplés aux protéines Gq qui augmentent le

métabolisme du phosphatidylinositol et le calcium intracellulaire, ou la voie d'activation des MAPKinases (Dubocovich et al., 2003; Ekmekcioglu, 2006).

- Les récepteurs MT2 sont également couplés aux protéines Gi et Gq, et induisent les mêmes effets que le récepteur MT1. Cependant le MT2 n'est pas associé à la voie des MAPK (Dubocovich et al., 2003; Ekmekcioglu, 2006).
- Les sites de liaison MT3 présentent une affinité similaire à la mélatonine et à la N-acetylsérotonine. Elle est d'environ 30 nanomolaires alors que l'affinité de MT1/MT2 est comprise entre 30 et 50 picomolaires. Ce manque d'affinité le rend incompatible avec les concentrations physiologiques circulantes de mélatonine, inférieure au nanomolaire dans le plasma (Gorman et al., 2001) et de la dizaine de nanomolaire dans le liquide céphalo rachidien (Tricoire et al., 2002) au maximum. De plus, des travaux ont montré que le MT3 n'est pas un récepteur transmembranaire mais une enzyme cytosolique, la quinone réductase 2 (Nosjean et al., 2000). L'ensemble de ces informations exclut donc le MT3 de la régulation chronobiologique.

Pour savoir qui du MT1 ou du MT2 transmet le signal photopériodique, Yasuo et al. (2009) ont utilisé des souris déficientes pour MT1, MT2 et MT1/MT2. Ces études ont montré que la mutation du MT1 était capable par elle-même de supprimer la transmission du signal photopériodique. Les hamsters djungariens et syriens, des modèles de rongeurs saisonniers, sont naturellement déficients pour le récepteur MT2, démontrant encore une fois que ce récepteur n'est pas essentiel à l'intégration des informations photopériodiques (Prendergast, 2010; Weaver et al., 1996). Il ne sera donc décrit ici que les cibles MT1-dépendantes de la mélatonine.

2) Distribution et rôle du Récepteur MT1

Chez le rat adulte, MT1 est exprimé dans deux structures associées à la physiologie des rythmes, les SCN et la *pars tuberalis* (PT) de l'adénohypophyse **(Fig. 6)**. Ce sont les deux seules structures qui expriment du MT1 chez toutes les espèces étudiées à ce jour. MT1 est également exprimé dans de nombreuses autres structures cérébrales notamment l'hippocampe, le gyrus denté, les collicules supérieur et inférieur la substance noire, le noyau réticulaire thalamique et la substance grise périaqueducale (Lacoste et al., 2015).

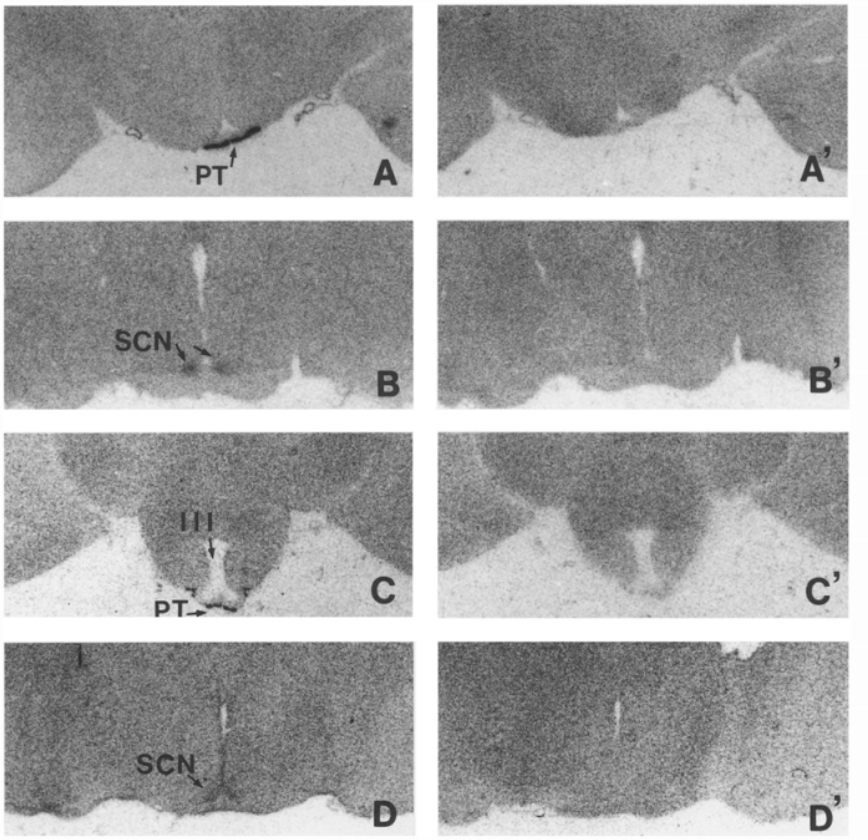


Figure 6 : 2-Iodo^{125}Mélatonine adsorbée sur section de cerveau,

Autoradiogramme de section de cerveau fixé avec une solution de 1% de formaldehyde-cyclohexylamine et incubée avec de la 2-^{125}Iodomélatonine (110pM) **(A)** *pars tuberalis* (PT) de rat, **(B)** noyaux suprachiasmatiques de rat (SCN), **(C)** PT de Hamster, **(D)** SCN de hamster, **(A'-D')** section adjacente incubée avec de la 2-^{125}Iodomélatonine (110pM) plus de la mélatonine (100nM). Figure issue de Masson-Pévet et al. (1993).

- Sur les SCN, la mélatonine exerce un rétrocontrôle négatif MT1 dépendant et inhibe l'activité électrique des neurones pendant la phase nocturne (Liu et al., 1997).
- La *PT* compose, avec la *pars distalis* et la *pars intermédia,* l'adénohypophyse (Dardente et al., 2003, 2003; Lacoste et al., 2015; Liu et al., 1997). La *PT* est une fine couche cellulaire sous l'éminence médiane qui entoure aussi la tige pituitaire. Elle est composée de plusieurs types cellulaires tels que des cellules sécrétrices thyréotropes possédant le récepteur MT1, des cellules folliculostellaires (Wittkowski et al., 1984) ainsi que des cellules endocrines de la *pars distalis* telles que les cellules gonadotropes (Gross, 1983). La *PT* est la structure qui présente la plus forte densité de MT1 chez toutes les espèces.

3) Rôle physiologique de la mélatonine

❖ Rôle chronobiotique de la mélatonine

Le SCN héberge l'horloge centrale circadienne. Son rôle est notamment de synchroniser l'ensemble des horloges périphériques afin que l'ensemble des fonctions physiologiques soit coordonné. Pour synchroniser ces horloges périphériques, le SCN possède deux types de sorties : les sorties nerveuses et hormonales (Pevet and Challet, 2011).

- Par exemple, les SCN projettent des efférences nerveuses à AVP sur les noyaux paraventriculaires qui permettent une inhibition de CRH et de l'axe hypothalamo hypophysio surrénalien pendant la phase inactive diurne chez les rongeurs (Dickmeis, 2009).
- Les SCN contrôlent également la sécrétion de mélatonine qui aura un rôle chronobiotique. Cependant, ce rôle est difficilement observable *in vivo* du fait de la redondance des voies. On peut cependant l'observer sur certain tissus via la suppression du signal mélatoninergique par pinéalectomie, ce qui entrainera la suppression de l'expression rythmique des gènes de l'horloge circadienne Clock, Per2 et Per1 dans le tissu adipeux blanc (de Farias et al., 2015)

❖ Rôle photopériodique de la mélatonine

Les changements de photopériode entrainent via les changements de la longueur du pic de mélatonine de nombreux changements physiologiques tels que des changements d'activité reproductrice, d'activité métabolique, de sécrétion de prolactine ou de couleur du pelage (Bartness and Wade, 1985; Figala et al., 1973; Hoffman and Reiter, 1965; Poulton et al., 1987).

Si des hamsters sont exposés à seulement une heure par jour de lumière, cela entraine une atrophie testiculaire, qui est supprimée si les animaux ont été préalablement pinéalectomisés (Hoffman and Reiter, 1965). De même, des injections quotidiennes de mélatonine faites tous les matins juste après le début de la phase diurne chez des animaux maintenus en photopériode longue entrainent une régression testiculaire et l'inhibition de l'expression de TSH dans la *PT* (Böckers et al., 1995; Turek and Pappas, 1980). Ce n'est pas la quantité de mélatonine ou l'amplitude du pic qui est importante mais la durée du pic. En effet, une même quantité de mélatonine n'a pas d'effet si l'injection dure 6 heures alors qu'elle inhibera la production de LH si l'injection dure 11 à 12 heures (Karp et al., 1991). Les hamsters sont donc considérés comme des reproducteurs de jours longs.

Chez le mouton, à l'inverse du hamster, l'activité reproductrice est activée en photopériode courte, ce sont des reproducteurs de jours courts. Elle dépend d'une horloge interne circannuelle qui fait qu'en photopériode constante les animaux voient toujours leur reproduction alternativement s'activer et s'inhiber (Gómez-Brunet et al., 2008). En fait, dans ces espèces, la mélatonine est le signal synchronisateur qui permet de synchroniser l'horloge interne circannuelle avec le messager environnemental saisonnier qu'est la photopériode (Woodfill et al., 1994). Cependant, des injections de mélatonine mimant un pic de mélatonine de jours courts est capable d'accélérer l'activation de l'activité reproductrice lorsqu'elles sont appliquées en photopériode inhibitrice (Poulton et al., 1987). Tout comme le contrôle de la reproduction, la *PT* est également capable de contrôler la production de prolactine dans l'adénohypophyse. Cette expression est aussi sous contrôle d'une horloge endogène circannuelle, puisque l'alternance est maintenue en photopériode constante (Gómez-Brunet et al., 2008). Si l'hypophyse est isolée du cerveau, l'expression rythmique de prolactine reste synchronisée avec la photopériode et est maintenue sous photopériode constante (Lincoln and Richardson, 1998; Lincoln et al., 2003). Ceci indique donc que chez le mouton :

- La PT reçoit l'information photopériodique, et que cette information est transmise par voie hormonale grâce via la mélatonine puisque les afférences nerveuses sont déconnectées. Ceci est en accord avec le fait que la PT exprime abondamment le récepteur MT1 (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002; Masson-Pévet et al., 1993).
- La PT est capable d'intégrer le message photopériodique en contrôlant une expression différentielle entre SP et LP de TSH dans la PT et de prolactine dans l'adénohypophyse (Lincoln and Richardson, 1998)
- Elle est le siège d'une horloge circannuelle puisque sans changement de photopériode ni du profil mélatoninergique (Gómez-Brunet et al., 2008) et sans afférences neuronales, elle est capable de maintenir un profil circannuel de l'expression de prolactine (Lincoln et al., 2003).

❖ Autre rôle de la mélatonine :

La mélatonine est également connue pour son rôle antioxydant. Grace à sa nature amphiphile, elle traverse facilement les membranes plasmiques et joue un rôle dans la neutralisation des radicaux libres et du stress oxydatif (Poeggeler et al., 1994). De nombreuses études démontrent qu'elle joue un rôle stimulant dans le système immunitaire et qu'elle aurait un rôle anti-inflammatoire lors d'inflammation aiguë (Carrillo-Vico et al., 2013).

III) Rôle de l'axe TSH/T3 hypothalamique dans le contrôle des fonctions saisonnières

La découverte d'une régulation des cellules thyréotropes de la *PT* par la mélatonine (Böckers et al., 1995) associée à des travaux anciens ayant rapportés un rôle critique des hormones thyroïdiennes dans les phénomènes de saisonnalité (Parkinson and Follett, 1995) ont été à l'origine de recherches récentes examinant l'implication de ces cellules dans les effets saisonniers des hormones thyroïdiennes.

a) La production de TSH dans la *PT* sous contrôle de la mélatonine

Wittkowski et al. (1984) est l'une des premières études montrant des changements dépendants de la photopériode dans la *PT* chez le hamster djungarien. Ils ont montré par analyse en microscopie électronique que l'aspect et le nombre de granules de sécrétion dans les cellules sécrétrices de la *PT* différaient en fonction de la photopériode. Quatre ans plus tard, le même groupe (Wittkowski et al., 1988) a rapporté que les cellules sécrétrices de la *PT* expriment la thyréostimuline (TSH) en photopériode longue (LP) alors qu'elles n'en expriment pas en photopériode courte (SP). Plus tard, il a été montré que les cellules à TSH expriment spécifiquement le MT1 (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002; Masson-Pévet et al., 1994b) et que le long pic de mélatonine nocturne en SP inhibe la synthèse de TSH (Bockmann et al., 1996). La TSH est composée de 2 sous unités : la sous unité α (αGSU) commune à l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculostimulante (FSH), l'hormone

chorionique (CH), et la TSH et la sous unité β spécifique de la TSH. Böckers et al. (1997a) ont montré que l'expression des deux sous unités était régulée par la photopériode.

Un mécanisme moléculaire expliquant l'expression différentielle de TSH en fonction de la durée du pic nocturne de mélatonine a été proposé par Dardente et al. (2010) **(Fig. 7)**. Cette étude montre qu'il existe un pic du facteur de transcription Eya3 dans les cellules sécrétrices de la *PT*, 12 heures après l'initiation de la phase nocturne. L'expression d'Eya3 est inhibée par le pic de mélatonine nocturne **(Fig. 7)**. Lors des longues nuits d'hiver, le pic d'Eya3 initié pendant la nuit sera inhibé par la mélatonine. Par contre, lors des nuits courtes d'été, le pic d'Eya3 sera diurne et ne sera donc pas inhibé par la mélatonine qui n'est pas sécrétée le jour **(Fig. 7)**. Cette surexpression d'Eya3 en LP permettra en association avec TEF, un deuxième facteur de transcription, d'augmenter l'expression de TSHβ en stimulant l'élément de réponse D dans le promoteur de TSHβ (Dardente et al., 2010)**(Fig. 7)**. Le complexe Eya3/TEF liera aussi l'élément de réponse D sur le promoteur D'Eya3, ce qui permettra une auto-amplification.

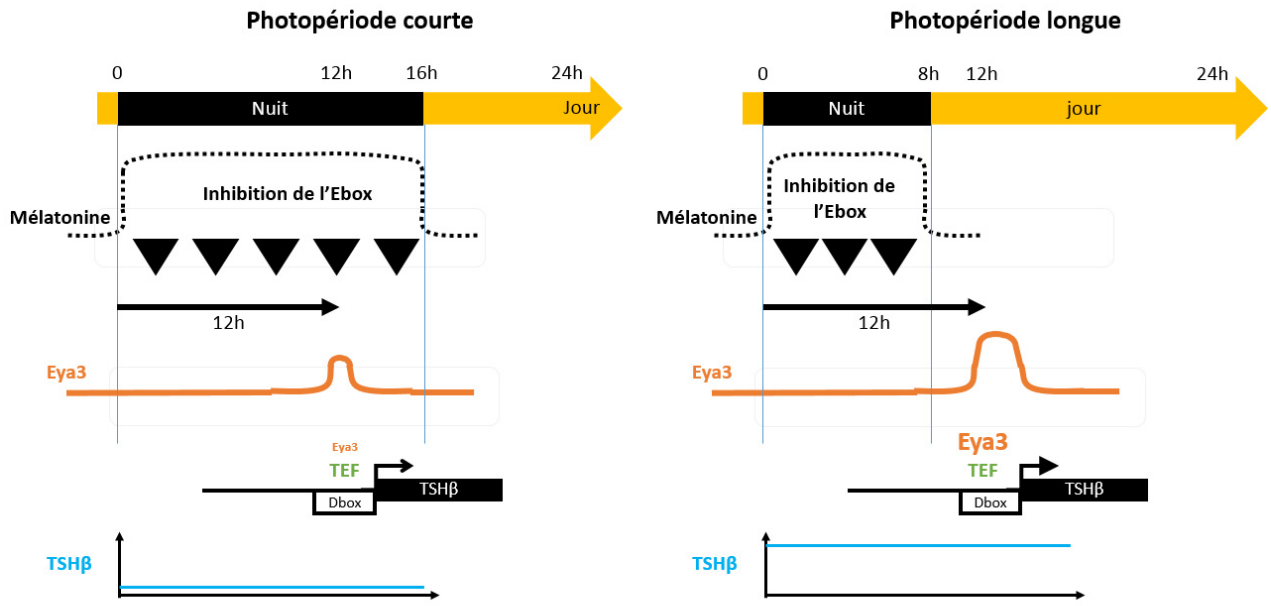


Figure 7 : Modèle d'induction photopériodique d'Eya3 dans la *PT*

Figure issue de (Dardente et al., 2010)

La régulation photopériodique de l'expression de TSHβ par la mélatonine est spécifique du récepteur MT1, puisqu'elle est préservée chez le hamster djungarien, une espèce naturellement déficiente pour le récepteur MT2 (Ono et al., 2008; Weaver et al., 1996). Outre cette régulation photopériodique, l'expression de TSH β dans la *PT* peut être également régulée par d'autres facteurs. Par exemple, chez les espèces circannuelles telles que le mouton ou le hamster européen, l'horloge circannuelle est capable de moduler l'expression de TSHβ sans qu'il n'y ait de changement de la photopériode (Sáenz de Miera et al., 2014). Par contre, chez les espèces photopériodiques comme le hamster djungarien, l'activation endogène spontanée n'induira pas de réaugmentation de

l'expression de TSHβ (Böckers et al., 1997a). En ce qui concerne l'expression d'αGSU, tout comme la TSHβ, elle est modulée par la mélatonine au travers du récepteur MT1 (Böckers et al., 1995). Par contre, à l'inverse de TSHβ, son expression augmente, mais tardivement, lors de la réactivation endogène photoréfractaire chez le hamster djungarien (Böckers et al., 1997a). Le mécanisme de la régulation de l'αGSU n'est pas connu. Tout comme pour le TSHβ, le facteur de transcription Eya3 pourrait être critique. Cependant, les différences dans la chronologie d'activation de TSHβ et αGSU (Böckers et al., 1997a) suggèrent une régulation distincte.

b) La TSH tubéralienne n'est pas équivalente à la TSH produite par la *pars distalis*.

La TSH est exprimée au niveau de deux structures de l'hypophyse, la PT et la *pars distalis.* La première participe aux mécanismes saisonniers alors que la deuxième intervient dans la régulation de la production de l'hormone thyroïdienne par la thyroïde. Malgré une séquence identique, ces deux formes, possèdent des glycosylations post traductionnelles tissu spécifique. La TSH issue de la PT possède des N-glycans multibranchés et sialylés, qui vont entrainer sa liaison avec l'albumine ou les immunoglobulines et son inactivation rapide dans le sang. Ceci permettra donc à la TSH de la PT d'agir au niveau du cerveau pour induire ses effets saisonniers, mais pas au niveau de la glande thyroïdienne (Ikegami et al., 2014).

c) Les autres molécules photopériodiques de la *PT*

Dans la *PT*, d'autres molécules sont aussi modulées photopériodiquement. Par exemple, chez le mouton, la chromogranine A (CGA) est aussi exprimée dans les cellules thyréotropes de la *PT.* Son profil d'expression est strictement inversé par rapport à celui de la TSHβ. C'est-à-dire qu'en SP son expression est élevée alors qu'en LP elle sera faible (Wood et al., 2015). Son expression est aussi contrôlée par l'horloge circannuelle, puisque lorsque les animaux sont gardés en LP constante, l'expression diminue lorsque l'animal devient réfractaire (Wood et al., 2015). Wood et al. (2015) proposent même que cette régulation stricte entre TSH et CGA soit la base de l'horloge circannuelle. Le rôle saisonnier de la CGA est encore inconnu aujourd'hui. Elle intervient dans l'empaquetage et la stabilisation des granules de sécrétion (Montero-Hadjadje et al., 2009). Elle a également un rôle de pro-hormone puisque son clivage libère des peptides tels que la vasostatine ou la catéstatine qui inhibent respectivement la vasoconstriction et la libération de catécholamines par la glande surrénale (Corti et al., 2004; Mahapatra et al., 2006). La Neuromédine U est aussi régulée photopériodiquement tout comme le système endocannabinoïde, qui sont tous les deux plus exprimés en photopériode longue qu'en photopériode courte respectivement chez le rat photopériodique et le hamster syrien (Helfer et al., 2012; Yasuo et al., 2010). C'est la régulation photopériodique des endocannabinoïdes qui est proposé pour être l'élément responsable du contrôle photopériodique de la production de prolactine dans l'adénohypophyse (Yasuo et al., 2010).

La *PT* est donc un décodeur du signal photopériodique et mélatoninergique saisonnier (Dardente et al., 2010) et pourrait également être le siège de l'horloge circannuelle (Wood and Loudon, 2017). A partir de 2003, des travaux réalisés chez la caille japonaise (Nakao et al., 2008; Yoshimura et al., 2003) et le mouton (Hanon et al., 2008) ont permis de faire le lien entre la TSH de la *PT* et le métabolisme local des hormones thyroïdiennes dans les tanycytes pour la transmission du signal saisonnier vers le système nerveux central. Dans ces cellules, il existe une activation locale saisonnière de l'hormone thyroïdienne T4 en sa forme active T3 par désiodination locale. Celle-ci semble cruciale pour la régulation de la reproduction saisonnière chez toutes les espèces étudiées (Hanon et al., 2008; Klosen et al., 2013; Nakao et al., 2008; Yoshimura et al., 2003)

d) Les tanycytes : place centrale du métabolisme thyroïdien hypothalamique saisonnier

i) Qu'est-ce qu'un tanycyte ?

Les tanycytes sont des cellules bipolaires qui présentent un corps cellulaire bordant le bas du troisième ventricule et un prolongement émis vers le neuropile, les vaisseaux présents dans l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane (Rodríguez et al., 2005). Elles présentent des caractéristiques de cellules épendymaires en bordant le troisième ventricule et de cellules gliales de par ses fonctions ou en exprimant par exemple la protéine fibrillaire acide gliale (GFAP). Il n'existe pas de marqueur purement spécifique des tanycytes. Cependant, ils expriment certaines protéines telles que la « dopamine and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein » (DARPP32) (Ouimet et al., 1984) et surtout la Vimentine (Leonhardt et al., 1987) qui permettent un marquage sélectif des tanycytes dans l'hypothalamus médiobasal. Les tanycytes constituent une population hétérogène qui peut être divisée en 4 sous populations :

⇨ Les tanycytes α1 **(Fig.8)** : leurs corps cellulaires bordent le 3ème ventricule au niveau des noyaux ventro médian et dorso médian hypothalamiques (DMH) et leurs prolongements projettent dans ces noyaux.

⇨ Les tanycytes α2 **(Fig.8)** : leurs corps cellulaires bordent le noyau arqué où se terminent aussi leurs prolongements.

⇨ Les tanycytes β1 **(Fig.8)** : leurs corps cellulaires bordent l'évagination du récessus infundibulaire et leurs prolongements se terminent auprès de l'espace périvasculaire du système porte hypothalamique présent dans le sulcus tubéro-infundibulaire (éminence médiane latérale).

⇨ Les tanycytes β2 **(Fig.8)** : leurs corps cellulaires bordent le plancher du récessus infundibulaire et leurs prolongements se terminent auprès du système porte de l'éminence médiane centrale (Rodríguez et al., 2005).

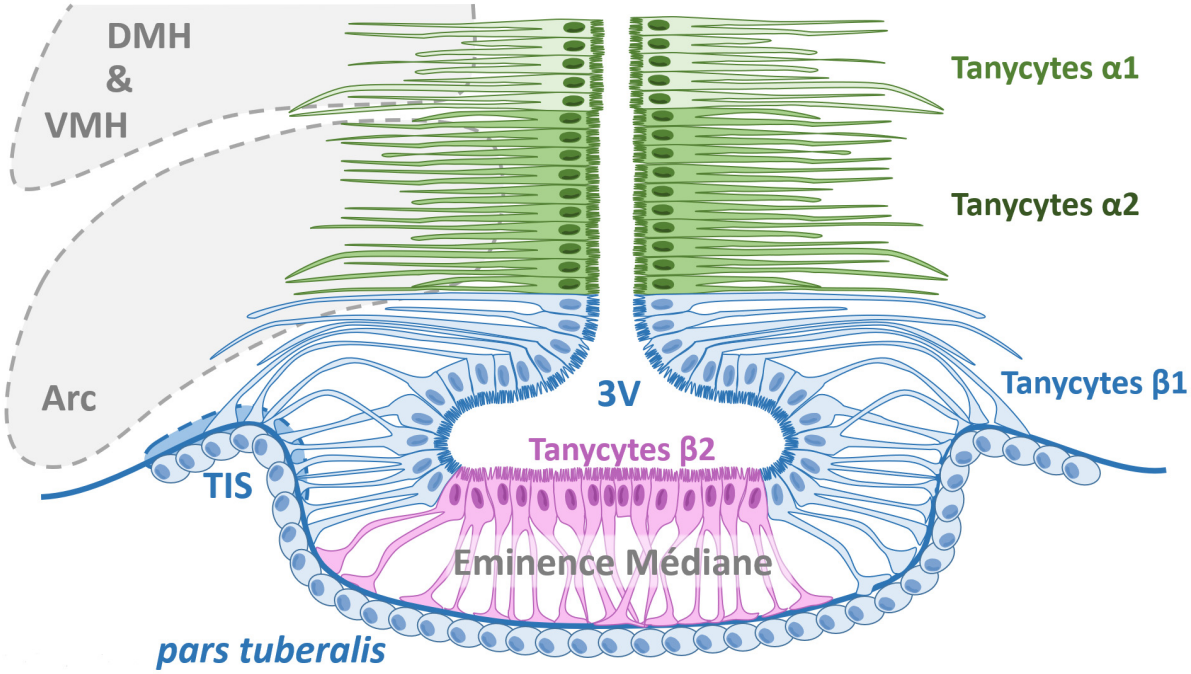


Figure 8 : Schéma descriptif des différentes populations tanycytaires

DMH : noyaux dorso médian hypothalamique, VMH : noyaux ventromédian hypothalamique, Arc : noyau arqué, TIS : sulcus tubéro-infundibulaire, 3V : 3ème ventricule.

ii) Quelles sont leurs fonctions ?

1) Barrière sélective

L'une des premières fonctions des tanycytes est d'être une barrière entre l'éminence médiane et son système porte, qui ne possède pas de barrière hémato-encéphalique, mais aussi entre l'hypothalamus et le liquide céphalorachidien (LCR). Pour cela, les corps cellulaires des tanycytes β2 bordant le bas du troisième ventricule sont reliés entre eux par des jonctions serrées organisées exprimant ZO1 et les claudines 1 et 5, ce qui assure l'étanchéité de la barrière ventriculaire (Mullier et al., 2010). L'éminence médiane est également isolée du noyau arqué grâce aux tanycytes β1, se situant à la frontière entre le noyau arqué et l'éminence médiane. Leurs corps cellulaires bordent le 3ème ventricule et envoient leurs prolongements vers le sulcus tubéro-infundibulaire de l'éminence médiane. L'ensemble de ces prolongements sont liés les uns aux autres par des *zonula* et *macula adherens*, ce qui permettra la formation d'une barrière (Rodríguez et al., 2005). En effet si un traceur est injecté dans le liquide céphalorachidien, il n'atteindra pas l'éminence médiane **(Fig. 9)** .

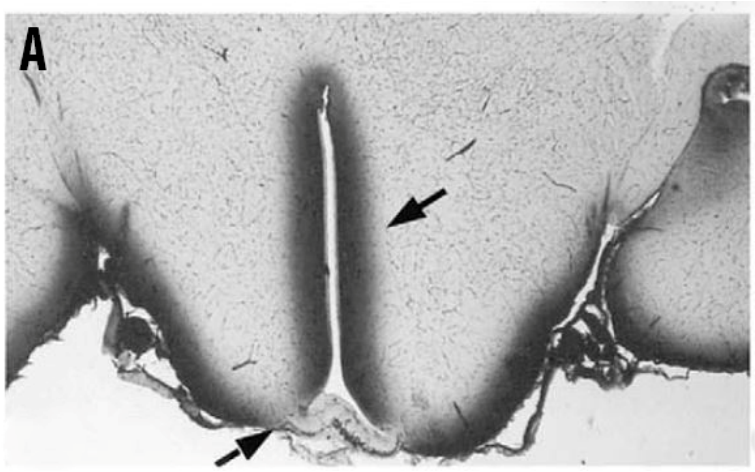


Figure 9 : Distribution de la Peroxydase de Raifort (HRP)

lorsqu'elle est injectée dans le ventricule latéral, issu de Rodríguez et al. (2005)

Ce rôle de barrière implique également les prolongements des tanycytes autour des vaisseaux sanguins. Au niveau du sulcus tubéro-infundibulaire, les pieds tanycytaires viennent se positionner autour des capillaires et de leur lame basale, formant une barrière ajustable régulant les échanges entre les neurones hypothalamiques et le système capillaire (Garcia-Segura et al., 2008; Prevot et al., 1999a, 2003; Yamamura et al., 2004a).

La barrière formée par les tanycytes n'est pas une simple barrière étanche interdisant tout échange entre le sang, le LCR et l'hypothalamus. En effet, grâce à l'expression de nombreux transporteurs, de récepteurs ainsi qu'à une grande plasticité, les tanycytes assurent une communication bidirectionnelle sélective entre l'hypothalamus et la périphérie, régulée entre autres par les saisons et par la photopériode.

Les tanycytes interviennent dans le métabolisme énergétique. Pour cela, ils expriment les transporteurs GLUT1 et GLUT2, qui leur confèreraient la capacité de détecter les concentrations circulantes de glucose (Elizondo-Vega et al., 2015; García et al., 2003). Ils transportent également la leptine de l'éminence médiane à l'hypothalamus médiobasal. Pour cela, ils expriment le récepteur à la leptine, ce qui permet à cette hormone de passer la barrière par transcytose. Chez les animaux obèses, ce transport est altéré et son rétablissement permet une restauration rapide de la sensibilité à la leptine, de l'activation des neurones de l'hypothalamus médiobasal et de la dépense énergétique (Balland et al., 2014). Les tanycytes expriment aussi le récepteur à l'IGF-1. Tout comme pour la leptine, il permet la capture de l'IGF-1 dans la circulation générale, sa transcytose à travers la barrière et son import dans le noyau arqué (Garcia-Segura et al., 2008). Ce transport est modulé par les stéroïdes sexuels et est important pour la puberté et le pic pré ovulatoire de LH (Sun et al., 2011).

Les tanycytes interviennent aussi dans l'import des hormones thyroïdiennes du sang vers le cerveau. Les hormones thyroïdiennes sont synthétisées en périphérie par la glande thyroïdienne et libérées dans le sang où elles sont liées à 99% à des protéines de transport (Transthyrétine, thyroid binding globulines, albumine, etc.). Tout comme dans le sang, dans le LCR, l'hormone est liée à des

molécules de transport telle que la transthyrétine, qui représente 20% des protéines du LCR (Wirth et al., 2014). Afin de faciliter leur accès au cerveau, des transporteurs exprimés par les astrocytes, les tanycytes et les plexus choroïdes permettent le passage des barrières hématoencéphalique et sang-LCR (au niveau des plexus choroïdes) et éventuellement LCR-hypothalamus (au niveau des tanycytes). Différents types de transporteurs existent tel que OATP1 ou MCT8. OATP1 ne sera pas exclusif à l'hormone thyroïdienne et transportera également des anions organiques alors qu'MCT8 est le seul transporteur identifié à ce jour transportant exclusivement ces hormones (Wirth et al., 2014).

L'apport en hormone thyroïdienne au cerveau est crucial pour son développement. De façon intéressante, seule la mutation de MCT8 entraine le syndrome développemental d'Allan Herndon Dudley (Schwartz et al., 2005), ce qui indiquerait que son rôle serait majoritaire et non compensable.

2) Niche neurogénique

Les tanycytes α, mais pas les tanycytes β, ont la particularité d'être des niches neurogéniques, car ils ont la capacité de pouvoir faire une division cellulaire asymétrique (Xu et al., 2005). Ainsi, si on considère une cellule de type A représentant un type cellulaire et une cellule de type B représentant un autre type cellulaire, une cellule de type A donnera en se divisant une autre cellule de type A, mais aussi une cellule de type B. Tout comme la zone subventriculaire (SVZ) et la zone subgranulaire (SGZ), les tanycytes sont donc capables de former de nouvelles cellules, et plus particulièrement de nouveaux neurones, tout en s'auto-renouvelant. Les tanycytes α, qui ont gardé des caractéristiques de glie radiaire embryonnaire, sont capables *in vitro* de se diviser pour former des neurosphères et de former de nouveaux neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes (Cifuentes et al., 2011; Robins et al., 2013; Xu et al., 2005). Les tanycytes se diviseraient asymétriquement *in vivo* au niveau du corps cellulaire afin de donner des nouveaux tanycytes et des progéniteurs. Les progéniteurs utiliseraient alors les prolongements tanycytaires comme des guides qui leur permettraient de migrer jusqu'à leur zone définitive. A la différence des neurones, les progéniteurs gardent la capacité de se diviser pour former des neurones, astrocytes et autres progéniteurs localement (Bolborea and Dale, 2013).

3) Activité de synthèse des tanycytes

Les tanycytes sont des acteurs à part entière de l'activité hypothalamique. Ils sont capables de libérer des gliotransmetteurs qui moduleront l'activité hypothalamique via une action paracrine. Les tanycytes synthétisent des prostaglandines E2 (à partir de l'acide arachidonique via la cyclooxygénase 2) qui agissent sur leurs récepteurs EP1 présents sur les terminaisons des neurones à GnRH (Clasadonte et al., 2011a). L'activation des récepteurs EP1 couplés aux protéines Gq augmente la concentration de calcium intracellulaire, ce qui entraine une augmentation de la libération de

GnRH suite au recrutement d'un plus grand nombre de vésicules (Ojeda and Negro-Vilar, 1985; Ojeda et al., 1988; Rage et al., 1997).

Les tanycytes participent au métabolisme des hormones thyroïdiennes via les Désiodinases 2 (Dio2) et 3 (Dio3). La Dio2 convertit l'hormone thyroïdienne de stockage tétraïodothyronine (T4) en hormone thyroïdienne active triiodothyronine (T3) **(Fig. 10)**. Pour cela, elle supprime l'iode en position 5' pour ne garder que les iodes en position 3, 3' et 5**(Fig. 10)**. La Dio3, elle, catabolise et inactive T4 et T3 en les convertissant respectivement en reverseT3 (rT3) et Diiodothyronine (D2) **(Fig. 10)**. Pour cela, elle supprime l'iode en position 5 (Bianco and Kim, 2006) **(Fig. 10)**.

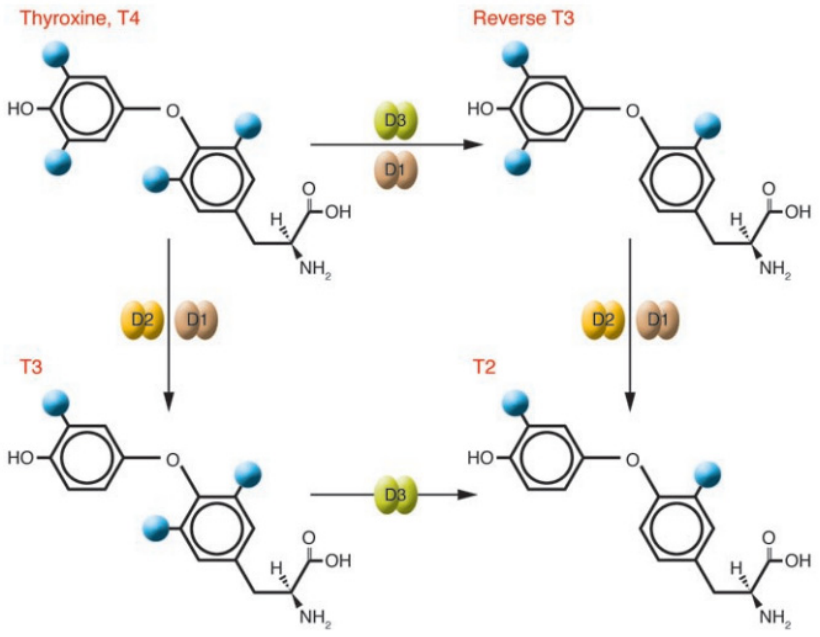


Figure 10 : Désiodination des hormones thyroïdiennes effectuée par les Désiodinases

T4= tétraïodothyronine, T3= triiodothyronine, T2= diiodothyronine, D1= Désiodinase 1, D2= Désiodinase 2 et D3= Désiodinase 3. Chaque rond bleu représente les iodes, issu de Bianco and Kim (2006)

L'expression de Dio2 est stimulée par l'AMPc et ERK1/2, notamment sous contrôle du récepteur au TSH, qui est capable d'activer les protéine Gs et Gq/11 (Allgeier et al., 1994; Aoki et al., 2015; Bolborea et al., 2015). L'expression de Dio2 dans les tanycytes est également stimulée par les lipopolysaccharides bactériens via les molécules pro-inflammatoires telles que TNFα et NFκβ. Cependant, cet effet sera indirect et passera aussi par une stimulation de l'expression de TSHβ dans la *PT* (Sánchez et al., 2010).

L'expression de la Désiodinase 3 est aussi régulée par la TSH qui l'inhibe à l'inverse de Dio2 (Helfer et al., 2013). L'expression de la Dio3 est également stimulée par Sonic Hedgehog (SHH) dans les kératinocytes et les carcinomes (Dentice et al., 2007; Luongo et al., 2014). Dans ces derniers, SHH déstabilise Gli2, un inhibiteur de la Dio3, qui est dégradée (Luongo et al., 2014). La régulation de la balance locale de Dio2/Dio3 permettra de jouer sur la balance activation/ dégradation de l'hormone thyroïdienne active T3 et donc aussi jouer sur sa biodisponibilité.

4) Activités saisonnières des tanycytes

L'ensemble de ces fonctions tanycytaires présente des variations saisonnières et il est de plus en plus admis que les tanycytes ont un rôle essentiel dans l'intégration des informations saisonnières.

Ainsi, ils forment une couverture dynamique saisonnière sur les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH au niveau de l'éminence médiane latérale (Garcia-Segura et al., 2008; Prevot et al., 1999b; Yamamura et al., 2004a). Chez la caille, Yamamura et al. (2004a) ont montré que le nombre de prolongements tanycytaires au contact de la lame basale du système porte diminue et que les terminaisons des neurones à GnRH sont plus proches de la lame basale en LP qu'en SP. Cette plasticité permettrait un relargage plus efficace du GnRH dans la circulation en LP qu'en SP. Chez le hamster djungarien, la NCAM polysialysée (PSA-NCAM) est plus exprimée sur les tanycytes en LP qu'en SP (Bolborea et al., 2011). L'ajout de ce groupement PSA sur les molécules d'adhésion NCAM permet une déstabilisation des interactions NCAM-NCAM et une augmentation de la plasticité en LP.

La capacité neurogénique des tanycytes serait aussi modulée par les saisons, ce qui forme un cycle saisonnier d'histogénèse. Ainsi, chez le mouton, des injections de bromodésoxyuridine marquant l'ADN des cellules nouvellement générées, montrent qu'il y a 2 à 6 fois plus de production cellulaire dans l'hypothalamus et le thalamus en décembre qu'en juillet (Migaud et al., 2011). Ces nouvelles cellules peuvent être des astrocytes ou de la microglie. En effet, 10% des cellules nouvellement générées en hiver expriment le marqueur microglial CD45 (Hazlerigg et al., 2013). En utilisant des marquages pour la double-cortine, un marqueur de neurones immatures en migration, Batailler et al. (2016)ont également montré un plus grand nombre de neurones double-cortine positifs en septembre et en janvier, qu'en juillet dans les noyaux ventro médians de l'hypothalamus (Batailler et al., 2016). Des résultats similaires ont été trouvés chez le hamster syrien, puisque dans l'hypothalamus le nombre de cellules nouvellement produites double en décembre (Huang et al., 1998). Parallèlement, la PT, structure responsable de l'intégration photopériodique, possède aussi un cycle saisonnier d'histogénèse, avec 3 fois plus de cellules nouvellement générées en décembre qu'en juillet. Hazlerigg et Lincoln (2011) proposent qu'un cycle d'histogénèse d'une période d'une année soit à la base de l'horloge circannuelle. En effet, une régulation saisonnière à base d'histogénèse et histolyse est déjà connue pour plusieurs mécanismes comme le chant du mâle chez les oiseaux ou encore la pousse des cornes chez le cerf (Hazlerigg and Lincoln, 2011). Cette horloge circannuelle pourrait être basée sur l'histogénèse tubéralienne et tanycytaire. Afin de faire le lien entre ces deux structures, le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) et l'hormone thyroïdienne pourraient être utilisés. La *pars tuberalis* produit du CNTF et les tanycytes possèdent le CNTF-R. Or l'injection de CNTF est capable d'augmenter le nombre de progéniteurs dans le MBH qui borde les tanycytes. De même, la TSH tubéralienne contrôle la production d'hormone thyroïdienne active par les tanycytes. Cette hormone est aussi capable de réguler l'histogénèse/histolyse (Hazlerigg and Lincoln, 2011).

Une activité saisonnière importante des tanycytes est sa participation au métabolisme des hormones thyroïdiennes. Notamment, l'expression des Dio2 et Dio3 est fortement régulée par la photopériode. De façon générale, le rapport Dio2/Dio3, qui traduit la production de T3, est plus élevé en été/LP qu'en hiver/SP (Dardente et al., 2010; Nakao et al., 2008; Revel et al., 2006b; Ross et al., 2011; Sáenz de Miera et al., 2013; Watanabe et al., 2007). Cependant, les régulations saisonnières individuelles de Dio2 et de Dio3 dépendent des espèces. Chez la plupart des espèces saisonnières (hamster européen, mouton, caille, moineaux), la balance Dio2/Dio3 restera stable tout au long d'un état photopériodique : par exemple, Dio2 sera fortement exprimée et Dio3 sera faiblement exprimée. Chez les espèces circannuelles comme le mouton, cette stabilité sera maintenue par l'horloge circannuelle (Sáenz de Miera et al., 2013). Chez les espèces photopériodiques comme le hamster syrien ou la caille, elle sera maintenue par la photopériode. Tant que l'animal sera en LP, le ratio Dio2/Dio3 sera élevé et inversement en SP (Watanabe et al., 2007). Ce maintien du signal photopériodique est nécessaire puisque la suppression du signal mélatoninergique en SP entraine un retour de l'animal dans sa photopériode par défaut qui est l'état photopériode longue (Stetson and Watson-Whitmyre, 1986). A l'inverse, chez le hamster djungarien, une autre espèce photopériodique, la modification de la balance Dio2/Dio3 ne se fera que pendant les transitions de photopériode courte à longue et inversement (Petri et al., 2016; Watanabe et al., 2007). Chez cette espèce, il semble que l'information photopériodique ne soit nécessaire que pendant les transitions. Si le signal mélatoninergique est supprimé via pinéalectomie, l'animal placé en LP gardera son phénotype estival tout comme un animal placé en SP gardera son phénotype reproductif hivernal jusqu'à ce que la réactivation photoréfractaire s'initie (Stetson and Watson-Whitmyre, 1986).

La capacité des tanycytes à transporter les hormones thyroïdiennes du sang ou du LCR vers l'hypothalamus est également modulée par les saisons puisque l'expression de MCT8 est augmentée et celle de OATP1C1 réduite en SP par rapport à la LP (Herwig et al., 2009; Ross et al., 2011). Le fait que l'expression d'MCT8 soit diminuée en LP pourrait être dû au rétrocontrôle négatif induit par l'augmentation de la concentration locale de T3.

Les tanycytes n'expriment pas de récepteurs MT1, aussi la régulation saisonnière du métabolisme thyroïdien tanycytaire n'est pas due à un effet direct de la mélatonine, mais à un effet indirect via la TSH de la *PT* (Dardente et al., 2017; Nishiwaki-Ohkawa and Yoshimura, 2016). La TSH produite et sécrétée par la *PT* agit sur son récepteur TSH-R localisé sur les tanycytes (Klosen et al., 2013). Ce récepteur, couplé aux protéines Gs, active la voie AMPc-ERK1/2 (Bolborea et al., 2015). De nombreux travaux ont montré que la TSH active l'expression de *Dio2* et diminue l'expression de *Dio3* (Helfer et al., 2013; Klosen et al., 2013; Nakao et al., 2008; Ono et al., 2008; Watanabe et al., 2007). Cette régulation opposée de Dio2 et Dio3 par la TSH, dont la synthèse est plus élevée en LP qu'en SP, conduit à une augmentation de la concentration d'hormones thyroïdiennes localement dans l'hypothalamus médiobasal en LP (Klosen et al., 2013). Ceci est dû à l'augmentation de Dio2, qui

augmente la production de T3 active à partir de T4 et à l'inverse, l'inhibition de Dio3 qui évite la dégradation de la T4 et de la T3 (Prendergast et al., 2002; Ross et al., 2011).

e) Les cibles des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes agissent via leurs récepteurs nucléaires, qui peuvent se lier constitutivement aux éléments de réponse TRE présents sur les gènes cibles des hormones thyroïdiennes. Deux types de récepteurs aux hormones thyroïdiennes existent : les TRα et TRβ **(Fig. 11)**. Ils sont composés de 3 domaines principaux : un domaine amino terminal « Activation Function 1 (AF1) », un domaine central « DNA Binding Domain (DBD) » et un domaine carboxy terminal « Ligand Binding Domain (LBD) » accompagné d'un domaine « Activation Function (AF2) » **(Fig. 11)**. Si le domaine AF2 n'est pas présent comme dans les TRα2 et 3, le récepteur ne sera pas capable de lier l'hormone thyroïdienne (Ortiga-Carvalho et al., 2014). Le domaine LBD permet la spécificité de liaison au ligand et module la capacité du récepteur à s'hétérodimériser. Le domaine DBD permet la liaison à l'ADN, alors que les domaines AF1 et 2 ont une fonction activatrice moins comprise (Ortiga-Carvalho et al., 2014) **(Fig. 11)**. Cependant, ces derniers interviendraient dans la liaison aux molécules co-régulatrices ainsi que dans la spécificité de liaison de chaque récepteur aux éléments de réponse et aux autres récepteurs de la même famille, tels que le récepteur aux rétinoïdes RXR ou celui aux œstrogènes (Ortiga-Carvalho et al., 2014). Le couplage des récepteurs à d'autres récepteurs déterminera les éléments de réponses cibles. Par exemple, le TRα1 se lie préférentiellement aux récepteurs RXR pour réguler positivement les éléments de réponses cibles (Ortiga-Carvalho et al., 2014).

70 à 80% des récepteurs aux hormones thyroïdiennes présents dans le cerveau sont de type TRα1, et sont présents dans la plupart des neurones (Dufourny et al., 2016; Schwartz et al., 1992; Wallis et al., 2010). Il est donc difficile de savoir quelles sont les cibles saisonnières de ces hormones thyroïdiennes.

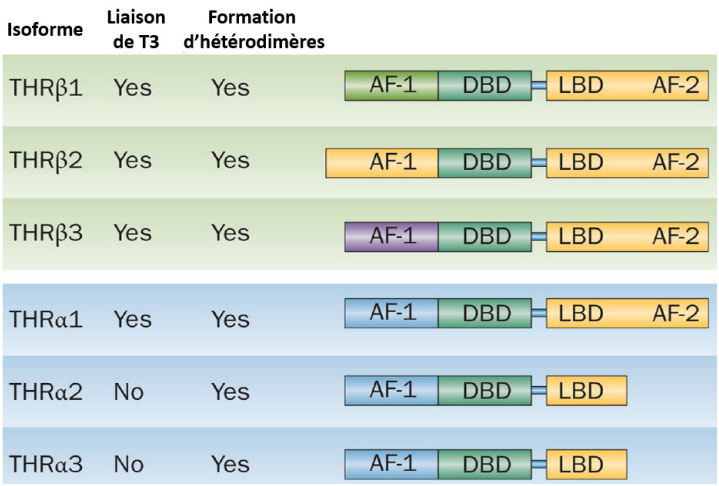


Figure 11 : caractéristiques des isoformes des récepteurs à l'hormone thyroïdienne

LBD :domaine de spécificité de liaison au ligand, module aussi la capacité du récepteur à s'hétérodimériser, DBD : domaine de liaison à l'ADN, AF1 et 2 domaines à fonction activatrice, issu de Ortiga-Carvalho et al. (2014)

f) Rôles connus des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont importantes dans la morphogénèse tissulaire. Par exemple, chez la grenouille, l'activité de la glande thyroïdiennes augmente progressivement jusqu'à atteindre son apogée au moment de la métamorphose (Galton, 1992). Si l'axe thyréotrope de l'embryon est inhibé pharmacologiquement pendant son développement, le cycle développemental s'arrête à un moment précis correspondant au début de la production embryonnaire de l'hormone thyroïdienne. Ceci a permis de montrer que cette hormone est essentielle au maintien du développement embryonnaire. Elle participerait au développement musculaire et au remaniement épidermique pendant la métamorphose (Callery and Elinson, 2000).

Chez les mammifères, les hormones thyroïdiennes sont indispensables au bon développement du cerveau. La mutation du transporteur aux hormones thyroïdiennes, MCT8, responsable de l'import de ces hormones dans le cerveau, entraine le syndrome d'Allan-Herndon-Dudley dans lequel il existe des retards psychomoteurs plus ou moins important selon les patients. Ces troubles peuvent être une masse musculaire réduite et hypotonique accompagnée de problèmes moteurs plus ou moins importants, et un développement cognitif sévèrement impacté (Schwartz et al., 2005). L'hypothyroïdie entraine notamment un mauvais développement du cortex via une neurogenèse et une migration neuronale déficientes (Escobar et al., 2004).

Chez l'adulte, l'hormone thyroïdienne intervient dans différents aspects. Elle intervient dans l'homéostasie métabolique en augmentant la protéogenèse, la thermogénèse, la dépense énergétique et le métabolisme de base (Mullur et al., 2014). Elle stimule aussi la neurogenèse en augmentant la prolifération des progéniteurs et la différentiation cellulaire (Remaud et al., 2014). L'altération de l'homéostasie thyroïdienne entrainerait aussi des problèmes de l'humeur et cognitifs (Ritchie and Yeap, 2015).

g) <u>L'axe TSH/T3 : une sortie physiologique saisonnière</u>

Chez l'adulte, l'ensemble des travaux cités précédemment indiquerait que chez les mammifères, l'axe thyroïdien est impliqué dans les mécanismes saisonniers. La *PT* décode le signal mélatoninergique induit par la photopériode. La diminution du pic nocturne de mélatonine, lorsque les jours s'allongent, supprime l'inhibition de l'expression du facteur de transcription Eya3 conduisant à une augmentation de la production de TSH (Dardente et al., 2010). La libération de TSH induit alors une augmentation de la concentration hypothalamique de T3 (Prendergast et al., 2002; Ross et al., 2011), via une activation de Dio2 (Bolborea et al., 2011; Klosen et al., 2013) et une inhibition de Dio3 dans les tanycytes (Ross et al., 2011; Sáenz de Miera et al., 2013; Watanabe et al., 2007). Il est actuellement admis que les variations photopériodiques de la T3 hypothalamique constituent un marqueur de l'intégration du message mélatoninergique saisonnier. Pourtant, plusieurs questions se posent encore à l'heure actuelle. En particulier, comment est régulé cet axe TSH/T3 hypothalamique en absence de changement saisonnier de la mélatonine, notamment sous le

contrôle de l'horloge circannuelle ou en cas de réactivation photoréfractaire. Dans la première situation, deux études récentes ont montré, chez le mouton et le hamster d'Europe, que le rapport Dio2/Dio3 présente des variations circannuelles contrôlées par la TSH de façon indépendante de la mélatonine, suggérant que l'horloge circannuelle peut contrôler la TSH dans la PT, et par là, la T3 hypothalamique (Sáenz de Miera et al., 2013, 2014). Dans la deuxième situation, des études ont montré au contraire que la réactivation photoréfractaire du statut reproducteur estival du hamster se fait indépendamment de changements notables de la synthèse de TSH dans la PT du hamster djungarien (Böckers et al., 1997) et de Dio2 dans les tanycytes du hamster syrien (Revel et al., 2006), suggérant une autre voie neuroendocrine. Par ailleurs, les cibles anatomiques de la T3 produite de manière saisonnière dans l'hypothalamus ne sont pas connues. En effet, 70 à 80% des récepteurs aux hormones thyroïdiennes présents dans le cerveau sont de type TRα1, et sont présents dans la plupart des neurones (Dufourny et al., 2016; Schwartz et al., 1992; Wallis et al., 2010). Il est donc difficile de déterminer sur quelles cellules la T3 hypothalamique produit son effet saisonnier.

h) Les paramètres physiologiques saisonniers dirigés par les hormones thyroïdiennes

Il y a de bonnes raisons de penser que les voies de signalisation hormone thyroïdienne dépendantes sont importantes pour la physiologie saisonnière. En effet, cette voie de signalisation dérive d'une voie de signalisation sensible à la qualité nutritionnelle chez les végétaux. Chez les plantes, cette voie déclenche la maturation sexuelle lorsque l'environnement le permet (Hazlerigg, 2012). De même, chez les échinodermes, les hormones thyroïdiennes promeuvent l'activité reproductrice (Hazlerigg, 2012). Des travaux précurseurs de thyroïdectomie chez le canard, effectués par Benoit en 1936, ont montré pour la première fois que la suppression de l'hormone thyroïdienne empêchait la réponse saisonnière des gonades. Cette étude a été suivie par d'autres similaires chez le mouton (Nicholls et al., 1988; Parkinson and Follett, 1995), la caille (Follett and Nicholls, 1985) et l'étourneau (Dawson, 1993; Dawson et al., 1986) confirmant le rôle important joué par les hormones thyroïdiennes dans la saisonnalité. En revanche, chez les oiseaux, les études sont souvent contradictoires. Lors de la photostimulation, l'activation des gonades ne semble pas être affectée par la thyroïdectomie (Dawson et al., 1986; Follett and Nicholls, 1985). Par contre son effet sur la décroissance testiculaire semble plus variable (revue par Dawson et al., 2001). Chez la caille, la décroissance testiculaire semble bloquée alors que chez le moineau elle est accélérée (Dawson et al., 1986; Follett and Nicholls, 1985). Une hypothyroïdie induite par la thio-urée chez des hamsters syriens LP, où le niveau hypothalamique d'hormone thyroïdienne est élevé, n'affecte pas le statut saisonnier, ce qui indiquerait que le signal thyroïdien n'est pas nécessaire au maintien de l'état photopériodique (Vriend and Wasserman, 1986). Chez le mouton, par contre, la thyroïdectomie maintien de façon constante la physiologie hivernale (Parkinson and Follett, 1995).

A l'inverse de la thyroïdectomie, l'injection d'hormones thyroïdiennes chez des animaux en photopériode courte a le même effet indépendamment de l'espèce. Chez la caille, l'infusion

d'hormones thyroïdiennes dans les ventricules cérébraux d'animaux en SP induit la réactivation testiculaire (Yamamura et al., 2006; Yoshimura et al., 2003). De même, chez le hamster djungarien, l'infusion d'hormones thyroïdiennes en sous cutanée ou dans l'hypothalamus medio basal chez des animaux SP, où sa concentration est faible, entraine le retour au phénotype LP (Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007; Murphy et al., 2012; Yamamura et al., 2006).

Plusieurs fonctions physiologiques auraient donc une régulation saisonnière dépendante de l'axe TSH/T3 hypothalamique. Comme je viens de l'évoquer, chez de nombreuses espèces, l'activité reproductrice est régulée par les changements saisonniers afin de faire naître la progéniture aux périodes favorables de l'année que sont le printemps et l'été. La régulation photopériodique de la reproduction fait intervenir les hormones thyroïdiennes hypothalamiques. En effet, l'administration de TSH dans le LCR de hamsters syriens ou djungarien (Klosen et al., 2013) ou de T3 dans l'hypothalamus de hamsters djungariens (Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007; Murphy et al., 2012) maintenus en jours courts est capable de rétablir une activité reproductrice identique à celle d'animaux en jours longs. Bien que les cibles exactes des hormones thyroïdiennes hypothalamiques pour le contrôle de la reproduction soient encore inconnues, des travaux récents ont montré que l'injection d'hormone thyroïdienne augmente aussi l'expression de Kisspeptine et RFRP, connus pour contrôler l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (Murphy et al., 2012; Simonneaux et al., 2013).

Un autre changement saisonnier important est celui de l'activité métabolique. Ainsi, le hamster djungarien diminue sa prise alimentaire de 20% et réduit de 30% environ sa masse corporelle en hiver ou en SP (Steinlechner et al., 1983). Ceci serait contrôlé par les modifications saisonnières de l'axe TSH/T3 hypothalamique, puisque l'administration de TSH dans le LCR (Klosen et al., 2013) ou de T3 dans l'hypothalamus d'un hamster djungarien (Barrett et al., 2007; Ebling, 2014) maintenu en jours courts est capable d'augmenter la prise alimentaire et de rétablir la masse corporelle correspondant à un statut de jours longs. Cet effet des hormones thyroïdiennes serait médié par une inhibition de l'expression de la somatostatine et du VGF, tous deux connus pour être des inhibiteurs métaboliques régulés de façon saisonnière (Bartolomucci et al., 2007; Dumbell et al., 2015; Klosen et al., 2013; Petri et al., 2016).

IV) Quand le contrôle de l'activité reproductrice s'affranchit de la lumière

En cas d'absence de variation du signal lumineux, deux types de mécanismes endogènes régulant la reproduction peuvent intervenir :

Chez certaines espèces telles que le hamster européen ou le mouton, il existe une horloge circannuelle (Masson-Pévet et al., 1994a; Woodfill et al., 1994). Chez ces espèces, les animaux placés en conditions photopériodiques constantes sont capables de continuer à cycler avec une période proche d'une année malgré un signal mélatoninergique et photopériodique inchangé (Malpaux et al., 1988; Robinson and Karsch, 1984; Woodfill et al., 1994). Le signal mélatoninergique ne sert qu'à synchroniser l'horloge circannuelle interne avec l'environnement (Woodfill et al., 1994). Ce signal

mélatoninergique n'est même pas nécessaire tout au long de l'année. Trois mois de signal mélatoninergique par an suffisent pour synchroniser les animaux avec leur environnement (Woodfill et al., 1994). Cependant toutes les photopériodes n'ont pas le même pouvoir synchronisateur. Les photopériodes d'été seront les plus efficaces, mais celles représentant le printemps et l'automne le seront moins. A l'inverse, une photopériode hivernale n'aura pas de pouvoir synchronisateur (Woodfill et al., 1994). A l'heure actuelle, la structure hébergeant l'horloge de ce mécanisme reste inconnue. Cependant, de récentes études indiquent que la *PT* pourrait accueillir cette horloge du fait que cette structure conserve des variations circannuelles de TSH (Sáenz de Miera et al., 2013; Wood et al., 2015). De plus, elle est capable de recevoir le signal synchronisateur mélatoninergique via les récepteurs MT1 (de Reviers et al., 1989; Wood and Loudon, 2017).

Le second mécanisme endogène est l'activation photoréfractaire présente par exemple chez le hamster syrien et djungarien. Lorsque la photopériode inhibitrice est maintenue trop longtemps, l'axe reproducteur échappe au contrôle photopériodique et se réactive de façon endogène sans modification du signal mélatoninergique. Chez ces hamsters, ce phénomène se produit entre 16 et 20 semaines d'exposition à une photopériode inhibitrice (Schlatt et al., 1995; Urbanski et al., 1983). A la différence des espèces possédant une horloge circannuelle, lorsque l'animal est photoréfractaire, il restera sexuellement actif indéfiniment. La seule façon de « casser » le statut photoréfractaire et de permettre à l'animal de s'inhiber une nouvelle fois est un passage en photopériode activatrice et un retour en photopériode inhibitrice (Stetson et al., 1977). Ce mécanisme semble être important à la fois comme mécanisme anticipateur du changement photopériodique et comme mécanisme de sauvetage afin d'éviter que l'individu ne reste bloqué en photopériode inhibitrice. A l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur ce mécanisme. Il reste à déterminer le lieu d'initiation et les processus moléculaires impliqués.

Le rôle de l'hormone thyroïdienne dans les mécanismes photoréfractaire semble être dépendant de l'espèce étudiée et reste encore à être précisé. Chez la caille et le moineau, la thyroïdectomie bloque l'évènement photoréfractaire (Bentley et al., 1997; Follett and Nicholls, 1985). Pareillement, chez le mouton, les animaux restent constamment activés tout au long de l'année (Parkinson and Follett, 1995). Chez le hamster djungarien, à l'inverse, la thyroïdectomie par thio-urée, précipite l'état photoréfractaire (Prendergast et al., 2002).

V) Comparatif et récapitulatif des différences saisonnières entre les espèces

	Hamster syrien	Hamster djungarien	Hamster européen	Mouton
Reproduction	Reproducteur de jours longs (Stetson et al., 1976)	Reproducteur de jours longs (Figala et al., 1973)	Reproducteur de jours longs (Monecke and Wollnik, 2005)	Reproducteur de jours courts (Lincoln and Richardson, 1998)
Variation de la prise alimentaire	Etudes contradictoires	Diminue en SP (Figala et al., 1973)	Diminue en SP (Miro et al., 1980)	Dépend des races (Iason et al., 1994; Lincoln and Richardson, 1998)
Variation du poids corporel	Etudes contradictoires	Diminue en SP (Figala et al., 1973)	Diminue en SP (Masson-Pévet et al., 1994a)	Non (Iason et al., 1994)
Hétérothermie	Hibernation : si chute température (Ueda and Ibuka, 1995)	Torpeur (Figala et al., 1973)	Hibernation (Revel et al., 2007; Wassmer and Wollnik, 1997)	Non
Changement de la qualité du pelage	Non	Oui (Figala et al., 1973; Warner et al., 2010).	Non	Oui (Lincoln, 1990)
Effet de la pinéalectomie ou de la suppression des ganglions cervicaux supérieurs (mouton) en LP	Maintien d'une physiologie LP (Stetson and Watson-Whitmyre, 1986)	Maintien d'une physiologie LP (Stetson and Watson-Whitmyre, 1986)	Maintien de l'alternance entre physiologie LP et SP (Masson-Pévet et al., 1994c; Sáenz de Miera et al., 2014)	Maintien de l'alternance entre physiologie LP et SP (Lincoln et al., 1989)
Effet de la pinéalectomie en SP	Retour à la physiologie LP (Stetson and Watson-Whitmyre, 1986)	Maintien de la physiologie SP jusqu'à l'état photoréfractaire (Stetson and Watson-Whitmyre, 1986)		
Mécanisme endogène	Photoréfraction (Turek et al., 1975)	Photoréfraction	Horloge circannuelle (Masson-Pévet et al., 1994c; Monecke et al., 2014)	Horloge circannuelle (Lincoln et al., 2003)
Réponse Dio2/Dio3 au changement de photopériode	Ratio Dio2/Dio3 stable pour photopériode donnée	Variation du ratio Dio2/Dio3 seulement au transfert photopériodique (Petri et al., 2016; Watanabe et al., 2007)	Ratio Dio2/Dio3 stable pour photopériode donnée	Ratio Dio2/Dio3 stable pour photopériode donnée SP : inverse

Table 1 : Comparaison de la réponse saisonnière en fonction des espèces

VI) L'axe hypothalamo-hypophysio gonadotrope

L'axe hypothalamo-hypophysio gonadotrope est constitué comme son nom l'indique d'une partie hypothalamique dans laquelle se trouvent les neurones à GnRH et leurs régulateurs. Ceux-ci contrôlent la sécrétion des gonadotropines FSH et LH dans l'adénohypophyse, qui eux-mêmes contrôlent l'activité des gonades en périphérie. Chez la femelle l'activité reproductrice est régulée à la fois saisonnièrement et par les cycles oestriens. L'interaction des deux mécanismes régulateurs saisonnier et oestrien rendrait l'analyse du mécanisme saisonnier trop complexe. Je ne m'intéresserai donc ici qu'à la reproduction chez le mâle. Dans un deuxième temps, il sera intéressant de savoir si les mécanismes saisonniers trouvés chez le mâle sont aussi présents chez la femelle.

a) Le GnRH

Le GnRH est un décapeptide pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly·NH2 central dans la gestion de la reproduction, car il contrôle à lui seul la libération des gonadotropines FSH et LH.

Il est synthétisé par des neurones situés chez les rongeurs dans l'aire pré-optique de l'hypothalamus et libéré au niveau de l'éminence médiane, dans le réseau capillaire primaire du système porte hypothalamo-hypophysaire.

i) Les neurones à GnRH : développement

Les neurones à GnRH proviennent des placodes olfactives médiales et migrent de l'épithélium olfactif vers l'hypothalamus lors du développement embryonnaire (Balasubramanian et al., 2010; Wray et al., 1989). La migration des neurones à GnRH implique des facteurs chimiotactiques d'attraction et de répulsion (Balasubramanian et al., 2010; Wierman et al., 2011; Wray, 2010). Il existe également des interactions homotypiques entre les neurones à GnRH, ce qui crée des chaînes de neurones à GnRH en migration. Il y a aussi des interactions hétérotypiques où les neurones à GnRH migrent en suivant les axones des neurones voméronasaux aussi en migration. Si un problème apparait dans la génération des neurones à GnRH au niveau de l'épithélium olfactif ou dans la migration des neurones jusqu'à leur cible hypothalamique, cela engendre un hypogonadisme hypogonadotrophique souvent associé à une anosmie, comme dans le cas du syndrome de Kallmann (Forni and Wray, 2015).

ii) Les neurones à GnRH : anatomie

Chez les rongeurs adultes, les corps cellulaires des neurones à GnRH sont situés dans les aires pré-optiques. Leurs axones croissent caudalement en suivant le 3ème ventricule et se terminent dans l'éminence médiane. Ce sont des neurones unipolaires ou bipolaires dont les prolongements possèdent des fonctions dendritiques et axonales. En effet, les principaux prolongements des neurones à GnRH projettent vers l'éminence médiane. Ces prolongements possèdent les

caractéristiques d'un axone avec la possibilité d'être parcourus par des potentiels d'action et un site de génération de ces potentiels. Mais ils possèdent aussi des caractéristiques de dendrites avec la présence d'épines dendritiques et de récepteurs au glutamate et au GABA. Ces prolongements portent le nom de « dendrons ». Ces éléments dendritiques sur les axones peuvent générer de nouveaux potentiels d'action en milieu de projection, sans passer par l'élément initiateur situé en amont du dendron. Ils peuvent aussi moduler les potentiels d'actions, créés en amont des dendrites (Herde et al., 2013; Iremonger and Herbison, 2014).

iii) Régulation de l'activité des neurones à GnRH.

L'activité des neurones à GnRH ainsi que le relargage du peptide dépend de l'activité intrinsèque des neurones, de l'équilibre excitateur/inhibiteur des afférences à la fois sur le corps cellulaire et les dendrons, ainsi que de la couverture dynamique de ces neurones par les prolongements gliaux.

1) Activité intrinsèque des neurones à GnRH

Les neurones à GnRH ont une activité pulsatile endogène chez toutes les espèces étudiées aujourd'hui (singe, mouton, souris, rat) (Constantin, 2011; Constantin et al., 2009; Duittoz and Batailler, 2000; Funabashi et al., 2000; Terasawa et al., 1999a). En effet, des cultures de neurones à GnRH embryonnaires issus des placodes olfactives ont une fréquence de décharge proche de celle observée *in vivo* chez des animaux gonadectomisés (Constantin, 2011). Ces neurones à GnRH embryonnaires montrent également une concentration basale de calcium intracellulaire fluctuante en relation avec l'activité électrique, qui peut aussi être reliée à la sécrétion de la neurohormone (Constantin, 2011; Terasawa et al., 1999b). Cette activité endogène est indépendante dans chaque cellule, mais elle se synchronise périodiquement (Constantin, 2011; Terasawa et al., 1999b).

2) Les afférences régulatrices

Il est difficile de faire une liste exhaustive des afférences synaptiques sur les neurones à GnRH, car elles peuvent être sous-estimées en ne prenant en compte que les terminaisons contactant le corps cellulaire. En effet, il existe des afférences contactant aussi les prolongements. L'innervation majeure des corps cellulaires des neurones à GnRH sont des afférences GABAergiques et glutamatergiques, toutes deux stimulatrices chez les neurones à GnRH (Hrabovszky et al., 2012; Watanabe et al., 2014). Il y a aussi de nombreux autres régulateurs, notamment des neuropeptides :

❖ Les neuropeptides RFamides

Les neuropeptides sont des peptides sécrétés par des neurones. Leur longueur peut aller de quelques acides aminés (9 pour la vasopressine) jusqu'à plusieurs dizaines (203 pour le précurseur du RFRP). Dans cette grande famille, il existe la sous famille des RFamides, qui ont la particularité de se terminer par Arginine (R) - Phénylalanine (F) et dont la fonction carboxyle terminale est amidée, d'où

le nom de RFamide. Ils sont représentés notamment par la kisspeptine (Kp), le RFRP3 ou le Pyroglutamylated RFamide peptide (26Rfa) et leur expression dans le système nerveux central est majoritairement hypothalamique (Findeisen et al., 2011). Kisspeptine représente une exception, puisque à la différence des autres RFamides, sa séquence se terminera par Arginine (A) – Tyrosine (Y) – Amide chez les espèces non primates (Quillet et al., 2016).

A) Kisspeptine (Kp)

La Kp est l'un des stimulateurs les plus puissants des neurones à GnRH. A l'origine, elle a été décrite au cours de recherches sur le cancer où elle inhibe la formation de métastases (Beltramo and Dufourny, 2017; Lee et al., 1996). En 2003, de Roux et al. (2003) ont montré qu'elle participait aussi à la régulation des neurones à GnRH. Kp est en fait une prohormone de 175 acides aminés (AA) clivée par des endopeptidases en une forme active : 57AA. Cette dernière peut être également clivée en formes encore plus courtes contenant les 10 à 17 derniers AA (Colledge, 2008). Ces formes plus courtes seront aussi biologiquement actives. Elles agissent sur le récepteur initialement nommé GPR54, depuis nommé KISS1-R. C'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine Gq **(Fig. 12)**. De par l'action de la phospholipase C délivrant du DAG et de l'IP3 à partir de PIP2, la stimulation du récepteur produit une mobilisation des stocks calciques dans le neurone à GnRH entrainant une plus grande excitabilité et un plus grand relargage de GnRH (Kotani et al., 2001) **(Fig. 12)**. La mutation de Kp ou de son récepteur entraine un hypogonadisme hypogonadotropique (Funes et al., 2003; de Roux et al., 2003) mais à l'inverse son injection est capable d'activer la reproduction d'animaux photoinhibés (Ansel et al., 2011) et d'augmenter la concentration circulante de LH (Caraty, 2017)

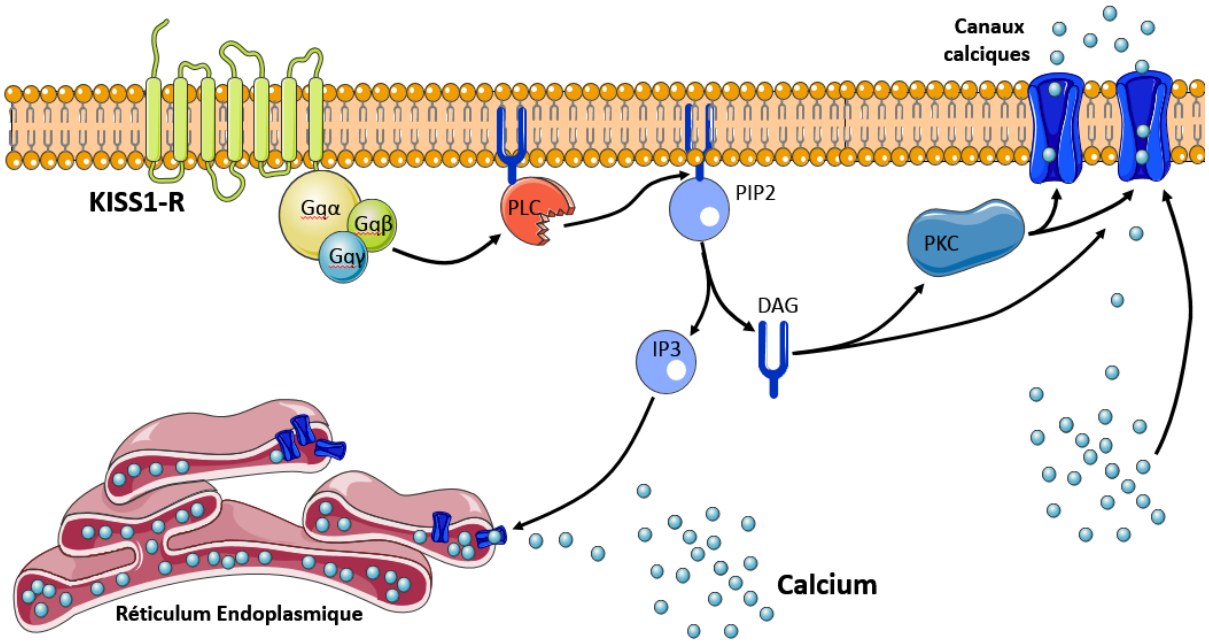


Figure 12 : Signalisation intracellulaire induite par le récepteur à kisspeptine (KISS1R, GPR54)

PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, IP3 : Inositol triphosphate, DAG : Diacylglycérol

Chez les rongeurs, il existe deux populations de neurones à Kp : une dans l'aire antéroventrale périventriculaire (AVPV ou RP3V) et l'autre dans le noyau arqué. Ils auront également 2 principaux sites de projection : les corps cellulaires et les terminaisons axonales des neurones à GnRH **(Fig. 13)**. Seuls les neurones de l'AVPV projettent sur les corps cellulaires des neurones à GnRH et présentent un dimorphisme sexuel marqué. En effet, ils sont plus nombreux chez la femelle où ils sont essentiels dans la régulation du pic préovulatoire de la LH (Kauffman et al., 2007b). Ils sont le siège du rétrocontrôle positif des œstrogènes grâce à la présence de récepteurs aux œstrogènes Erα, qui stimulent la synthèse de Kp (Herbison, 2008).

Les neurones à Kp du noyau arqué agiraient aussi sur les corps cellulaires des neurones à GnRH, mais indirectement en stimulant les neurones à Kp de l'AVPV via des synapses glutamatergiques (Qiu et al., 2016; Yip et al., 2015) **(Fig. 13)**. Mais ils agissent surtout au niveau de la terminaison axonale des neurones à GnRH. Les neurones à Kp du noyau arqué expriment également deux autres neuropeptides, la neurokinine B (NKB) et la dynorphine (Goodman et al., 2007) connus pour être également capables de réguler l'activité des neurones à GnRH. Même si les études ne s'accordent pas encore pour établir si tous les neurones à Kp du noyau arqué coexpriment ces deux autres neuropeptides, ils sont couramment appelés des neurones KNDy (**Kp**-**N**eurokinine B-**Dy**norphine). Ces neurones ont une activité autocrine et projettent aussi vers les terminaisons axonales des neurones à GnRH pour en réguler la libération. Ils sont actuellement considérés comme le site générateur des pulses de GnRH (Navarro et al., 2009; Wakabayashi et al., 2010). En effet, le NKB auto-stimule les neurones KNDy jusqu'à une décharge synchronisée de la population KNDy, qui libèrera massivement Kp et NKB **(Fig.13)**. Kp et NKB agiront respectivement via leur récepteurs KISS1-R et NKR3 (ou TACR3) qui sont des récepteurs membranaires couplés à la protéine Gq exprimées au niveau de la terminaison axonale des neurones à GnRH (Navarro et al. 2009; Noel et al., 2014; Ramaswamy et al., 2010; Todman et al., 2005). Ceci entraine la libération massive de GnRH et la formation du pic de GnRH **(Fig.13)**. Les neurones KNDy libèreront aussi de la dynorphine qui auto-inhibera avec un peu de retard les neurones KNDy, via le récepteur aux opioïdes κ, un récepteur couplé aux protéines Gi (Navarro et al., 2009; Wakabayashi et al., 2010; Weems et al., 2016)**(Fig.13)**. Cela permettra l'extinction de la population, la fin du pic de GnRH et la préparation du pic suivant. Ici, la Kp est l'effecteur du générateur de pulses constitué par le réseau des neurones KNDy et agit de façon rythmique pour activer les neurones à GnRH et la libération du GnRH. Si l'action de la Kp est bloquée par une désensibilisation de son récepteur, il n'y aura plus de pulsatilité LH détectable dans le plasma, mais l'activité électrique rythmique sera toujours présente dans le noyau arqué (Wakabayashi et al., 2011). Les neurones à Kp du noyau arqué ne présentent pas de dimorphisme sexuel marqué et sont la cible d'un rétrocontrôle négatif des stéroïdes sexuels chez les deux sexes (Rasri-Klosen et al., 2017; Smith et al., 2007).

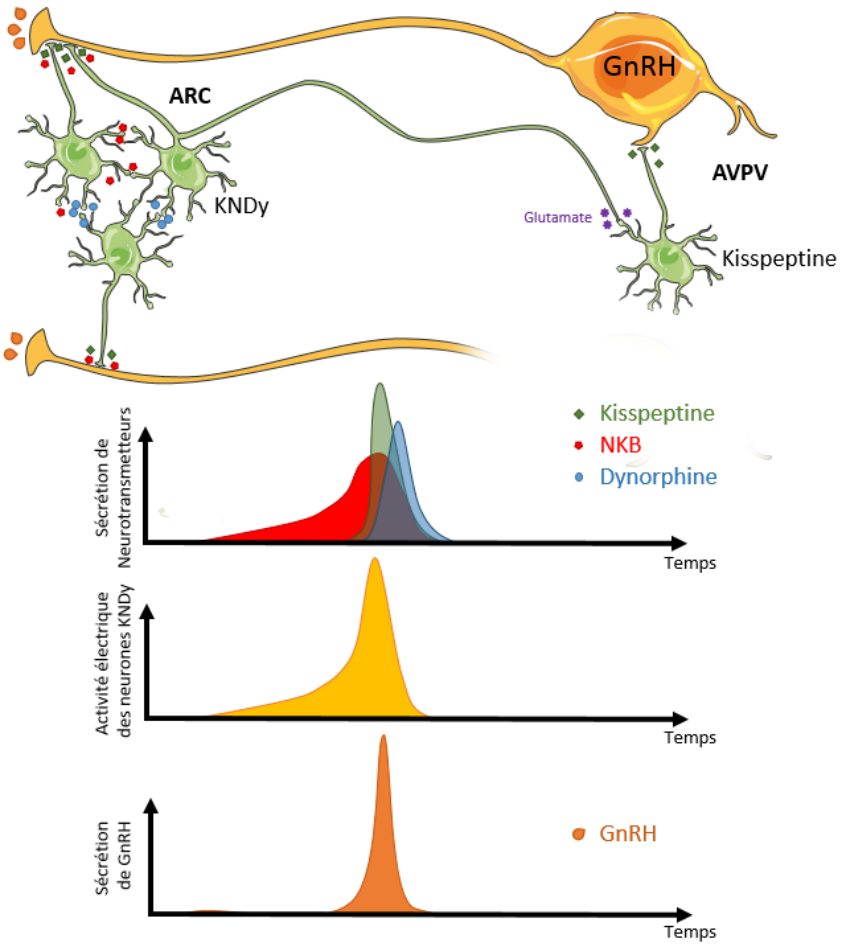


Figure 13 : Proposition du réseau neuronal par lequel l'activation des neurones à Kisspeptine contrôle l'excitabilité des neurones à GnRH.

AVPV= Aire antéroventrale périventriculaire, ARH= noyau arqué, NKB= Neurokinine B, inspiré de Qiu et al. (2016)

B) Le RFRP3

Le RFRP a été découvert en 2000 chez les oiseaux et a été nommé GnIH (gonadotropin inhibitory hormone) car il est une des rares molécules à inhiber directement la libération des gonadotropines au niveau de l'hypophyse chez les oiseaux (Tsutsui et al., 2000). Six ans plus tard, il a été identifié chez les rongeurs (Kriegsfeld et al., 2006). Tout comme Kp, RFRP fait partie de la super famille des RFamides, ce qui signifie qu'il se termine par Arginine (R) - Phénylalanine (F) dont la fonction carboxyle terminale est amidée. Chez la caille, deux GnIH (GnIH1 et GnIH 2) ont été découverts partageant le motif LPXRFamide (X = L ou Q). Une recherche par homologie de séquence a montré qu'il en existe 3 nommés simplement 1, 2 et 3 chez les mammifères. Seuls les 1 et 3 sont des peptides LPXRFamide (Kriegsfeld et al., 2015) et sont produits à partir du même gène NPVF (Ubuka et al., 2012). Les neurones à RFRP sont localisés dans le DMH (Kriegsfeld et al., 2006; Revel et al., 2008) et les fibres sont présentes dans l'hypothalamus antérieur, les noyaux suprachiasmatiques, l'hypothalamus ventro médian et le noyau arqué (Kriegsfeld et al., 2006). Ils projettent en fait sur des neurones à GnRH (Kriegsfeld et al., 2006; Ubuka et al., 2012) et à Kp dans le noyau arqué et l'AVPV (Rizwan et al., 2012). Il a été démontré chez de nombreuses espèces comme la caille, le rat, les moutons ou les bovins que le RFRP3 était inhibiteur de la synthèse et du relargage de GnRH (Clarke

et al., 2008; Johnson et al., 2007; Kadokawa et al., 2009; Kriegsfeld et al., 2006; Murakami et al., 2008; Tsutsui et al., 2000). Chez le hamster syrien, une administration centrale de RFRP3 inhibe la production de LH au moment du proestrus chez les femelles (Henningsen et al., 2016). Mais à l'inverse, une telle injection entraine aussi une stimulation de l'axe reproducteur chez les mâles (Ancel et al., 2012). Chez le hamster djungarien mâle, l'effet central du RFRP3 sur la sécrétion de LH dépend de la photopériode, puisqu'il est inhibiteur en jours longs mais stimulateur en jours courts (Ubuka et al., 2012). De même, l'effet du RFRP3 sur l'activité des neurones à GnRH de souris parait dépendant des doses appliquées (Ducret et al., 2009). L'effet du RFRP3 s'exerce via le NPFFR1 (ou GPR147), un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à des protéines G. La signalisation recrutée par ce récepteur dépend de l'intensité de stimulation. En effet, une stimulation avec des doses de RFRP3 supérieures ou égales à 10^{-5} M produit un recrutement de la protéine Gs puisqu'il y a stimulation de la PKA. A l'inverse, avec des doses moindres, comprises entre 10^{-9} et 10^{-13} M, il y a recrutement de la protéine Gi induisant une inhibition de la PKA (Akazome Y., 2015). Ces effets différentiels dépendant des doses pourraient donc expliquer pourquoi les effets reproducteurs du RFRP3 sont différents selon les espèces, le sexe et même l'environnement.

Afin d'étudier les effets du RFRP via le NPFFR1, un panel d'outils pharmacologiques a été développé avec plus ou moins de succès. Le premier est l'antagoniste RF9 qui est capable de bloquer le GPR147 (NPFFR1) et GPR74 (NPFFR2) avec une affinité de l'ordre du nanomolaire sans effet endogène (Simonin et al., 2006). Cependant, il manque de spécificité et est aussi capable de se lier au KISS1R qu'il active *in vivo* et *in vitro* (Min et al., 2015). Le deuxième produit par la même équipe est le RF313 (Elhabazi et al., 2017). C'est un antagoniste du GPR147 et GPR74 avec une préférence modérée pour le GPR147 puisque son affinité est de 245 nM pour le GPR147 et de 2.24 µM pour le GPR74. Il n'a pas d'activité agoniste sur les récepteurs à Kp et RFRP (Elhabazi et al., 2017). Enfin, il y a le RF3286 en cours de développement, qui est un antagoniste des récepteurs RFRP. *In vivo,* chez le hamster syrien*,* autant le RF313 que le RF3286 sont capables de totalement abolir l'augmentation de la concentration de LH circulante induite par une injection centrale de RFRP3 alors que le RF9, lui, induit une augmentation de LH (Elhabazi et al., 2017; Henningsen, 2016).

C) Le 26RFa

Le Pyroglutamylated RFamide Peptide (26Rfa) est exprimé dans l'hypothalamus latéral et ventromédial du rat (Chartrel et al., 2003). Il est aussi exprimé en périphérie dans l'intestin et le pancréas, qui le libèreront dans le sang (Chartrel et al., 2016). Autant en périphérie qu'en central, le 26RFa agira via le récepteur GPR103 qu'il partage avec le 73RFa qui est une forme allongée du 26RFa. Chez la souris, Chartrel et al. (2003) ont montré qu'il avait un rôle orexigénique lorsqu'il était injecté centralement. Navarro et al. (2006) ont par la suite étudié son effet sur l'axe gonadotrope et montré que le 26RFa avait un effet stimulateur sur la sécrétion de gonadotropines au niveau de l'hypophyse en culture autant chez le rat mâle que chez la femelle. Par contre, ils ont aussi montré qu'injecté

centralement, le 26RFa augmente la sécrétion de gonadotropines chez la femelle, mais pas chez le mâle. Ceci sous-entend donc que 26RFa aurait une action régulatrice sur les neurones à GnRH seulement chez les rats femelles (Navarro et al., 2006a). De façon controversée, le 73RFa qui agit sur le même récepteur que le 26RFa, le GPR103, est capable d'activer la sécrétion de GnRH chez les rats mâles (Patel et al., 2008) alors qu'il n'est pas capable d'activer la sécrétion de gonadotropines quand il est injecté centralement chez ces mêmes animaux (Navarro et al., 2006a).

D) Régulation saisonnière des neuropeptides RFamides

Ces 3 neuropeptides nous permettent 3 approches différentes de la saisonnalité.

Kp a été présenté comme saisonnière en 2006 chez le hamster syrien où il a été montré que son expression était augmentée dans la population de neurones du noyau arqué en photopériode longue (Revel et al., 2006a) **(Fig. 14A)**. Chez cette même espèce, des injections chroniques de Kp sont également capables d'induire un phénotype estival chez des animaux en photopériode courte (Ansel et al., 2011)**(Fig. 14B)**.

A l'inverse, chez le hamster djungarien, l'expression de Kp est diminuée en photopériode longue, mais son injection chronique induit toujours un phénotype estival chez des animaux en photopériode courte (Rasri-Klosen et al., 2017). Des données complémentaires ont montré que la différence saisonnière est en fait minimisée chez les hamsters djungariens castrés (Rasri-Klosen et al., 2017) **(Fig. 14C)**. Ces résultats paradoxaux remettent en question l'aspect saisonnier de Kp chez cette espèce. Ils indiqueraient que la différence photopériodique de l'expression de Kp serait en fait majoritairement une conséquence de la variation du taux de testostérone circulant.

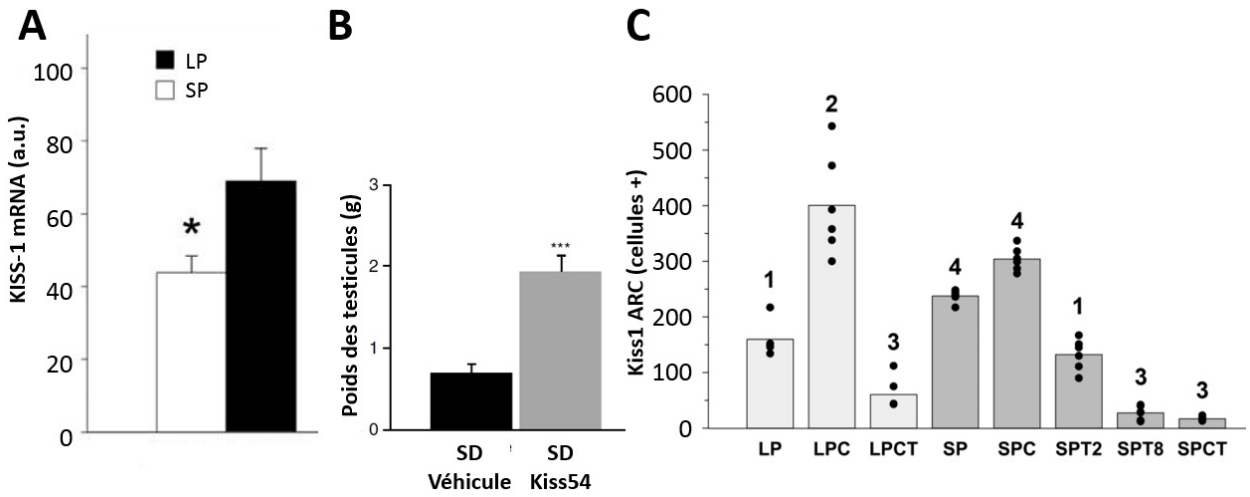


Figure 14 : Régulation photopériodique de kisspeptine et effet de la kisspeptine sur l'activité reproductrice.

(A) quantification par hybridation *in situ* de l'expression de Kiss-1 dans le noyau arqué chez des hamster syriens adaptés en SP et LP (Revel et al., 2006a), (B) Effet sur le poids des testicules d'une injection chronique périphérique de kisspeptine 54 (injection intrapéritonéale: 10nmol/jour) chez des hamsters syriens adaptés en SP (Ansel et al., 2011), (C) quantification par immunohistochimie (anticorps JLV1) des cellules kisspeptine positives dans le noyaux arqué d'animaux LP, SP, LP

castrés, SP castrés, LP castrés complémentés en testostérone pour 2 jours (SPT2), 8jours (SPCT8), 4 semaines (LPCT , SPCT) (Rasri-Klosen et al., 2017)

Pour RFRP, il existe aussi une variation saisonnière et comme pour Kp, il est exprimé plus fortement en photopériode longue (Revel et al., 2008) **(Fig.15A)**. Cette différence d'expression dépend de la photopériode et de la mélatonine **(Fig.15B)**. A l'inverse de Kp, son expression ne dépend pas de la concentration circulante de testostérone (Rasri-Klosen et al., 2017; Revel et al., 2008). Par contre, son effet physiologique peut aussi dépendre de la photopériode. Par exemple, chez le hamster djungarien, il sera activateur en photopériode courte alors qu'il sera inhibiteur en photopériode longue (Ubuka et al., 2012)

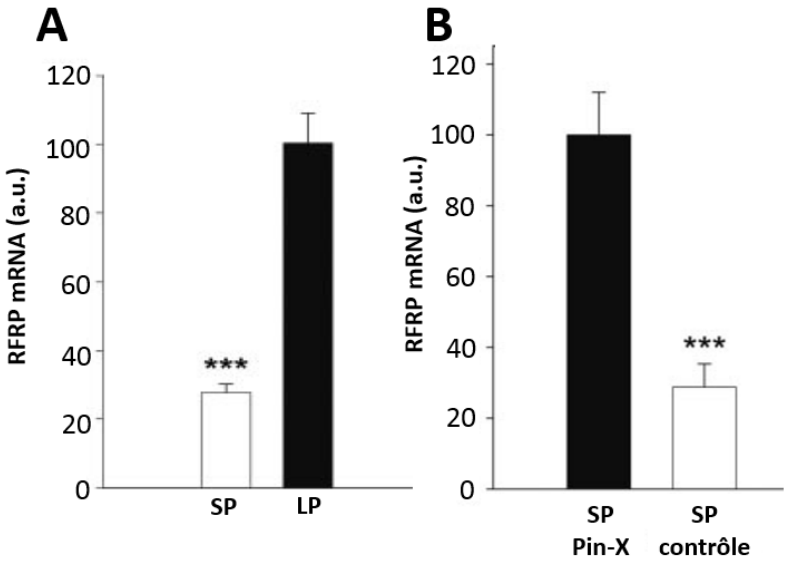


Figure 15 : Régulation photopériodique et par la mélatonine de l'expression de RFRP.

(A) quantification par hybridation *in situ* de l'expression de RFRP dans les noyaux dorso médians chez des hamster syriens adaptés en SP et LP (Revel et al., 2008), (B) quantification par hybridation *in situ* de l'expression de RFRP dans les noyaux dorso médians chez des hamster syrien SP pinéalectomisés et contrôles (Revel et al., 2008).

Enfin, malgré l'implication de 26RFa dans la gestion de l'homéostasie métabolique et la reproduction, deux paramètres régulés de façon saisonnière, aucune étude sur la régulation saisonnière du 26RFa n'a été menée. Il serait donc pertinent d'étudier si le 26RFa peut entrer dans le groupe des régulateurs photopériodiques.

- La corticolibérine (CRH)

Le CRH est le neuropeptide régulateur en amont de la voie de régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes, une des principales voies d'adaptation au stress autant interne qu'environnemental (Aguilera and Liu, 2012). Les neurones à GnRH expriment le récepteur au CRH (Jasoni et al., 2005) et l'administration intracérébroventriculaire de CRH induit une diminution de la fréquence des pulses de LH chez le rat (Cates et al., 2004) ainsi qu'une diminution de l'expression du GnRH chez la brebis (Ciechanowska et al., 2011). CRH permet donc en cas de stress une inhibition directe de la pulsatilité

du GnRH et de la reproduction (Li et al., 2010) dans le but de donner la priorité aux fonctions essentielles nécessaires au combat contre l'élément stressant.

- Le peptide vasoactif intestinal (VIP)

Le peptide vasoactif intestinal (VIP) régule également l'activité des neurones à GnRH. En effet, une application de VIP sur des tranches de cerveaux de souris augmente la sécrétion de GnRH ainsi que la concentration calcique des neurones à GnRH de 50 à 80% (Piet et al., 2016). Le VIP étant une des sorties journalières des noyaux suprachiasmatiques, cet effet montre la possibilité d'une action de l'horloge sur les neurones à GnRH (van der Beek et al., 1994; Piet et al., 2016; Van der Beek et al., 1997).

- Le neuropeptide Y (NPY)

Le neuropeptide Y est connu pour son action orexigénique et peut également contrôler l'activité des neurones à GnRH, dont la partie somatodendritique reçoit des afférences des neurones à NPY du noyau arqué (Li et al., 1999) et possède des récepteurs au NPY (Campbell et al., 2001; Li et al., 1999). Son effet sur les neurones à GnRH dépend de la durée de stimulation et de l'imprégnation en stéroïdes sexuels au moment de la stimulation (Kaynard et al., 1990). Le NPY inhibe les neurones à GnRH conduisant à une inhibition de la production de LH (Kaynard et al., 1990; Sahu et al., 1987).

- La somatostatine,

Cette neurohormone inhibitrice de l'hormone de croissance diminue la dépense énergétique (Atrens and Menéndez, 1993) et le poids corporel (Dumbell et al., 2015). Elle peut également contrôler l'activité des neurones à GnRH. Des études par microscopie confocale montrent que les neurones à somatostatine font des synapses sur les prolongements des neurones à GnRH, mais pas sur leur corps cellulaire (Koyama et al., 2012). De plus, la somatostatine inhibe l'activité électrique des neurones à GnRH en culture et l'infusion intracérébroventriculaire de somatostatine chez le rat inhibe l'activité des neurones à GnRH et supprime le pic préovulatoire de LH (Koyama et al., 2012). Parallèlement, les neurones à Kp reçoivent aussi des afférences à somatostatine. Ceci indique que la somatostatine pourrait aussi inhiber les neurones à GnRH de manière indirecte via les neurones à Kp (Dufourny and Lomet, 2017).

- L'Oxyde Nitrique (NO),

C'est un messager gazeux produit par l'oxyde nitrique synthase à partir de la L-Arginine. Cette enzyme existe sous trois formes : neuronale, endothéliale et inductible exprimée notamment par les macrophages. Des études histochimiques ont montré une proximité entre les neurones produisant du NO et les perikarya des neurones à GnRH. L'application de NO sur ces neurones entraine une inhibition réversible de leur activité de décharge (Clasadonte et al., 2008).

3) Interaction neurones à GnRH/glie

La libération du GnRH est également associée à des changements plastiques qui peuvent être régulés par une activité gliale. Les terminaisons des neurones à GnRH sont couvertes par des

prolongements tanycytaires et cette couverture varie en fonction du cycle œstrien. Chez la rate, le nombre de contacts entre les axones des neurones à GnRH et la lame basale du système porte sont plus nombreux en proestrus qu'en diestrus (Prevot et al., 1999b). Chez la caille, la distance moyenne entre les terminaisons axonales et la lame basale ainsi que le nombre de prolongements tanycytaires contactant cette lame basale sont plus faibles chez des animaux sexuellement actifs que chez des animaux inhibés par la photopériode (Yamamura et al., 2004b, 2006). Ces résultats indiquent que la couverture gliale des terminaisons axonales à GnRH peut se rétracter ou au contraire se développer afin de moduler la facilité de libération du GnRH dans le réseau capillaire du système porte. La voie de signalisation intracellulaire du facteur de croissance transformant α (TGFα) et du récepteur aux facteurs de croissance épidermique 1 (ErbB1) constitue un des facteurs régulant cette interaction neurones-glie. En effet, une stimulation inférieure à 12 heures des tanycytes par le TGFα induit une augmentation de la couverture gliale alors que si la stimulation dure plus de 12h, les tanycytes produisent des prostaglandines E2 qui stimulent la synthèse de TGFβ1 responsable de la rétraction tanycytaire (Prevot et al., 2003). Les prostaglandines E2 agissent également sur leurs récepteurs EP1 situés sur les terminaisons axonales des neurones à GnRH. L'activation de ce récepteur couplé à une protéine Gq entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, ce qui favorise l'exocytose du GnRH, sans changement de l'activité électrique du neurone à GnRH (Clasadonte et al., 2011a; Rage et al., 1997).

4) Régulation directe ou indirecte de l'activité des neurones à GnRH par des facteurs régulateurs intracellulaires.

Lors de la puberté, l'activité des neurones à GnRH est contrôlée par divers facteurs de signalisation intracellulaires qui peuvent être présents dans les neurones à GnRH eux-mêmes ou dans certains de leurs régulateurs. Il peut s'agir d'enzymes de modifications post traductionnelles, de facteurs de transcription ou même de microARN.

La protéine makorin RING-finger protein 3 (MKRN3) est fortement réprimée dans le noyau arqué lors de la puberté concomitamment à l'augmentation de Kp et de Neurokinine B dans ce même noyau. Sa mutation entrainant une perte de sa fonction biologique conduit à une puberté précoce. MKRN3 est donc considérée comme un inhibiteur pubertaire (Abreu et al., 2013). Elle possède des domaines de liaison à l'ARN et un domaine E3 ubiquitine ligase qui permet l'adressage de la protéine cible à la dégradation par le protéasome (Abreu et al., 2013). Cependant, aujourd'hui nous ne savons toujours pas comment elle joue son rôle d'inhibiteur pubertaire. Elle pourrait cependant réprimer l'activité des neurones à Kp au niveau du noyau arqué voire même celle des neurones à GnRH.

« Enhanced at puberty 1 » (EAP1) est activé dans l'hypothalamus médio basal au moment de la puberté. Il est nécessaire à l'activation du gène codant pour la GnRH et réprime des gènes inhibiteurs tels que celui encodant la preproenképhaline (Heger et al., 2007). Son inhibition par ARN interférant entraine une puberté retardée ainsi que des cycles perturbés, ce qui suggère son rôle activateur de la

reproduction (Heger et al., 2007). Comme MKRN3, il possède un domaine E3 ubiquitine ligase qui permet l'adressage de protéines cibles à la dégradation par le protéasome mais aussi des domaines Ring Finger qui permettent la liaison à l'ADN. La mutation de ces derniers entraine l'annulation des effets d'EAP1 sur le GnRH (Heger et al., 2007).

Il existe aussi une régulation de l'activité des neurones à GnRH utilisant les microARN. En effet, la mutation sélective dans les neurones à GnRH de DICER, une RNAase III endonucléase indispensable à la génération endogène de miRNA, entraine une infertilité (Messina et al., 2016). En fait, pendant la période infantile, il y a une augmentation de l'expression des microARN miR-200/729 et miR-155 qui inhibent respectivement Zeb1 et Cebpb, deux répresseurs du promoteur GnRH et qui permettent l'augmentation de l'expression du GnRH créant la « minipuberté » qui est une activation transitoire de l'axe gonadotrope juste après la naissance chez les mammifères (Messina et al., 2016).

b) Les gonadotropines

L'activité des gonades dépend majoritairement de deux hormones : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo stimulante (FSH), produites par les cellules gonadotropes de la glande adénohypophysaire. Ce sont des hétérodimères composés d'une sous unité α, l'αGSU (alpha glycoprotein subunit), commune à FSH, LH, TSH et l'hormone chorionique gonadotrope (CG), et d'une sous unité spécifique qui détermine l'activité biologique de l'hétéromère : la LHβ pour la LH, la FSHβ pour la FSH, la TSHβ pour la TSH et la CHβ pour la CG. La demi-vie de la LH est d'environ 20 minutes alors que celle de la FSH est de deux heures (Weinbauer et al., 2010).

i) Leur régulation différentielle

La sécrétion de LH et FSH est sous contrôle du GnRH. Il se lie sur un récepteur spécifique, le GnRH-R à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine Gq et localisé sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse. L'activation du GnRH-R conduit à la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3) à partir de phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2) **(Fig. 12)**, via l'action de la phospholipase C. L'IP3 agit sur le réticulum endoplasmique où il induit la libération des stocks de calcium. Le DAG active la protéine Kinase C (PKC) induisant ainsi l'ouverture des canaux calciques membranaires **(Fig. 12)**. L'effet final conduit à une élévation de la concentration calcique intracellulaire induisant la libération des gonadotropines (Millar, 2005).

La LH et la FSH synthétisées dans les cellules gonadotropes sont stockées dans des granules de sécrétion distincts et sont libérées également de façon différentielle sous la stimulation du GnRH. La libération de GnRH étant pulsatile, la libération de LH ou de FSH est dictée par sa fréquence de stimulation. L'une des premières expériences le montrant a été faite chez le macaque rhésus (Wildt et al., 1981), mais des résultats similaires ont été trouvés chez le hamster djungarien (Meredith et al., 1998). Lorsque la GnRH est libérée à raison d'un pic toutes les heures avec une délivrance de 1µg/min pendant 6 minutes, LH et FSH sont libérées **(Fig. 16).** Pour une fréquence plus élevée, il y a

un déclin graduel de la réponse des gonadotropines **(Fig. 16).** Pour une fréquence diminuée à un pic toutes les 3 heures, la libération de LH n'est plus stimulée à l'inverse de la FSH dont la concentration circulante reste élevée (Wildt et al., 1981) **(Fig. 16).** L'amplitude des pics de sécrétion de GnRH peut également moduler la libération des gonadotropines comme suit : si la délivrance maximale de GnRH est diminuée à 0.1µg/min pendant 6 minutes, la libération de FSH et de LH est abolie. Si au contraire, la délivrance maximale de GnRH est de 10µg/min pendant 6 minutes, la libération LH n'est pas modifiée tandis que celle de FSH est indétectable (Wildt et al., 1981) **(Fig. 16).**

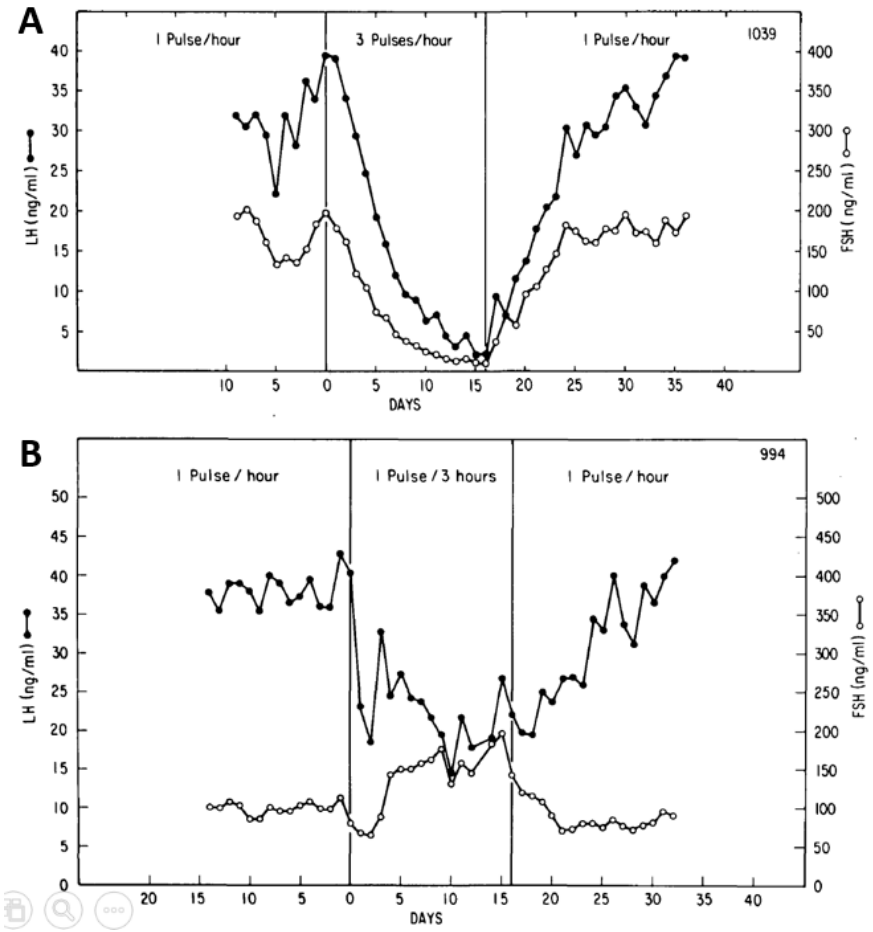


Figure 16 : Effet de la pulsatilité GnRH sur la sécrétion des gonadotropines LH et FSH.

Après lésion des neurones à GnRH endogène chez le singe rhésus, du GnRH a été administré de façon pulsatile. Un pic représente l'injection de 6µg de GnRH en 6minutes **(A)** Effet sur la sécrétion des gonadotropines d'un pic de GnRH par heure, 3 pics par heure et à nouveau un pic par heure **(B)** Effet sur la sécrétion des gonadotropines d'un pic de GnRH par heure, 1 pics toute les 3 heures et à nouveau un pic par heure, issue de (Wildt et al., 1981)

ii) Leurs cibles

Les gonadotropines sont des hormones produites par les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Comme toute hormone, elles agissent à distance sur leurs récepteurs via le sang. Les récepteurs à la LH et à la FSH présentent 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines Gs. Le récepteur à la LH est commun avec celui de la CG alors que la FSH à son propre récepteur (Dufau, 1998; Simoni et al., 1997). Dans les testicules, le récepteur à la LH est exprimé sur les cellules de

Leydig et stimule la production de testostérone alors que le récepteur à la FSH se situe sur les cellules de Sertoli et certaines cellules germinales.

c) Les gonades

Les gonades sont les effecteurs biologiques de la reproduction. Chez la femelle ce sont les ovaires et chez le mâle les testicules. Elles présentent deux composantes : une composante gamétogénique (la lignée germinale et des cellules de soutien de la lignée somatique) et une composante endocrine (la lignée somatique uniquement).

Pour le testicule, la composante gamétogénique est constituée d'une partie tubulaire dans laquelle a lieu la gamétogénèse, c'est-à-dire la production des spermatozoïdes. La composante endocrine consiste en la production de testostérone, qui est responsable d'une stimulation de l'activité gamétogénique par les tubes séminifères, d'un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et du phénotype sexuel secondaire tel que le comportement sexuel (Weinbauer et al., 2010).

i) La spermatogenèse :

Le compartiment tubulaire représente 60 à 80% du volume total du testicule et contient les cellules germinales et deux types de cellules somatiques : les cellules de Sertoli et les cellules péritubulaires

Les cellules péritubulaires entourent les tubes séminifères. Elles ont la particularité d'être contractiles et leur rôle est d'induire une activité péristaltique autour des tubes séminifères favorisant ainsi l'évacuation des gamètes nouvellement générés (Weinbauer et al., 2010).

Les cellules de Sertoli se trouvent dans le tube séminifère entres les cellules germinales. Elles sont considérées comme des cellules de soutien qui facilitent la maturation des cellules germinales. Elles contrôlent l'environnement dans le tube séminifère en produisant le fluide séminal tubulaire (Griswold, 1998; Weinbauer et al., 2010). Elles forment également la barrière hémato-testiculaire qui isole du reste de l'organisme les cellules germinales considérées comme des corps étrangers par le système immunitaire (Mruk and Cheng, 2015). Elles conditionnent également le nombre de cellules germinales, car chaque cellule de Sertoli supporte un nombre défini de cellules germinales (Meachem et al., 2001). Pour augmenter la spermatogénèse, il faut augmenter le nombre de cellules de Sertoli. C'est un des effets de la FSH, notamment lors de la puberté (Griswold, 1998; Orth et al., 1988; Sofikitis et al., 2008).

Les cellules germinales sont contenues dans le tube séminifère. Elles portent différents noms en fonction de leur stade de maturation. Plus ces dernières sont avancées, plus elles se situent vers la lumière du tube. La durée totale de la spermatogenèse est d'environ 51 jours chez le rat et 77 jours chez l'homme (Amann, 2008; Clermont and Harvey, 1965).

ii) La stéroïdogenèse

1) Principe

La stéroïdogenèse se déroule dans l'espace interstitiel du testicule où se trouvent les cellules de Leydig, responsables de la production de testostérone à partir du cholestérol circulant, majoritairement issu de l'alimentation (Weinbauer et al., 2010).

La testostérone agira sur son récepteur, le récepteur aux androgènes (AR). Localement, la testostérone peut être convertie irréversiblement en œstradiol via la P450 aromatase, ce qui lui permet d'avoir des actions locales grâce aux récepteurs aux œstrogènes (ERα) (Abdelgadir et al., 1994). La testostérone pourra être aussi convertie en dihydrotestostérone par la 5α réductase. Cette forme possède une activité similaire à la testostérone sur l'AR mais ne pourra pas être aromatisée en œstrogènes.

2) Régulation de la synthèse de testostérone :

La synthèse de testostérone est régulée par les gonadotropines hypophysaires : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH). La LH se lie sur son récepteur LHCGR exprimé sur les cellules de Leydig (Dufau et al., 1984) alors que la FSH se lie sur son récepteur, le FSHR. Ce sont tous les deux des récepteurs à 7 domaines transmembranaires liés à la protéine Gs (Menon and Menon, 2012; Ulloa-Aguirre et al., 2007). Le FSHR est localisé sur les tubes séminifères, mais pas sur les cellules de Leydig. Cependant sa stimulation régulera secondairement les cellules de Leydig (Kerr and Sharpe, 1985).

3) Cibles de la testostérone :

La testostérone agit sur des récepteurs aux androgènes localisés dans les cellules de Leydig où elle effectue un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse (Stalvey and Clavey, 1992). Elle agit également sur la spermatogénèse via une action sur les cellules de Sertoli et les cellules péritubulaires. Il suffit que le récepteur aux androgènes soit présent dans les cellules de Sertoli, sans être présent dans les cellules germinales, pour que la spermatogénèse fonctionne (Lyon et al., 1975). Ceci permet le maintien d'une spermatogénèse complète, le développement des spermatocytes et des spermatides et le maintien d'une contractilité des tubes séminifères afin d'évacuer les spermatozoïdes formés (Weinbauer et al., 2010).

La testostérone permet aussi la synthèse du liquide séminal via la stimulation des vésicules séminales. Il existe d'ailleurs une corrélation entre la concentration circulante de testostérone et la taille des vésicules séminales (Lindner and Mann, 1960).

La testostérone exerce également un rétrocontrôle négatif à différents niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadotrope. Elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH et LH au niveau de l'adénohypophyse à la fois sous la forme testostérone et sous la forme œstrogène (Bagatell et al., 1994). Elle inhibe également l'activité des neurones à GnRH de l'hypothalamus. Ce rétrocontrôle se réalise sur les neurones à GnRH qui expriment le récepteurs aux œstrogènes (Hrabovszky et al., 2001; Radovick et al., 2012). Il se réalise aussi de manière indirecte, car elle agit en

amont des neurones à GnRH sur les neurones à Kp du noyau arqué qui expriment les AR et ERα (Smith et al., 2005). La testostérone inhibe la synthèse de Kp, qui est un puissant stimulateur des neurones à GnRH (Oakley et al., 2009; Roseweir et al., 2009; Shibata et al., 2007).

La testostérone permet l'apparition des caractères sexuels secondaires (Weinbauer et al., 2010) en agissant sur la peau pour développer la pilosité, le cerveau pour induire le comportement reproducteur mâle, les cordes vocales ce qui induira une voie plus grave, et les muscles qui augmenteront en masse et force musculaire.

d) Saisonnalité de l'axe reproducteur.

Chez de nombreux mammifères saisonniers, l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique présente des changements saisonniers allant jusqu'à une inhibition complète. Chez les rongeurs saisonniers, l'activité reproductrice est activée en été alors qu'elle sera totalement inhibée en hiver (Figala et al., 1973). Chez ces espèces, la concentration circulante de gonadotropines LH et FSH est plus basse en SP qu'en LP (Goldman and Brown, 1979; Schlatt et al., 1993; Turek et al., 1975), ce qui induit, notamment chez le hamster syrien, une inhibition de la spermatogénèse, de la taille des gonades et de la concentration de testostérone circulante en SP (Hikim et al., 1989; Powers et al., 1989). Une activation des paramètres sexuels secondaires telle qu'une augmentation du volume des vésicules séminales est également remarquée en été (Johnson et al., 1987; Klosen et al., 2013). De façon intéressante, chez le hamster djungarien, malgré une concentration en gonadotropines inhibée (Niklowitz et al., 1989; Schlatt et al., 1993) et une spermatogénèse inhibée également (Niklowitz et al., 1989), le niveau de testostérone plasmatique n'est pas significativement différent entre des animaux SP et LP (Greives et al., 2008; Jasnow et al., 2000). La différence de concentration de testostérone chez cette espèce sera seulement observée au niveau intra testiculaire (où la concentration augmente en LP) (Niklowitz et al., 1989) ou via la différence de volume des vésicules séminales, qui est un marqueur indirect de l'imprégnation en testostérone (Klosen et al., 2013). Également, il a été montré que la mélatonine n'agit pas directement sur les neurones à GnRH et que la réponse gonadotrope à la GnRH est indépendante de la photopériode (Urbanski et al., 1991). Seule la sécrétion de GnRH sera inhibée (Urbanski et al., 1991).

VII) Saisonnalité de la reproduction : l'hypothèse de travail reliant les changements de photopériode aux changements d'activité reproductrice.

Des travaux récents sur les hamsters djungarien et syrien et sur le mouton, en partie réalisés dans notre équipe, ont permis d'identifier des sites cellulaires et des acteurs moléculaires centraux régulés de façon différentielle selon le fait que les individus soient maintenus en SP ou LP. Des études histologiques ont montré qu'en LP l'expression de la TSHβ est élevée dans la PT chez l'ensemble des espèces saisonnières (Bockmann et al., 1996; Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002)**(Fig. 17)** et que le ratio Dio2/Dio3 est augmenté dans les tanycytes (Petri et al., 2016; Revel et al., 2006b) **(Fig.**

17). L'expression des neuropeptides régulateurs de l'activité des neurones à GnRH, kisspeptine et RFRP, est quant à elle respectivement augmentée dans le noyau arqué et le DMH (Revel et al., 2006a, 2008). A l'inverse, dans les tanycytes, l'expression d'MCT8 un transporteur aux hormones thyroïdiennes est inhibée en LP par rapport à SP (Petri et al., 2016). Afin de valider l'implication des neuropeptides TSH, Kisspeptine et RFRP dans la reproduction saisonnière, des études pharmacologiques ont été entreprises. Pour cela, les trois molécules ont été injectées séparément de façon chronique dans le LCR d'animaux adaptés à une photopériode inhibitrice (quand leur expression endogène est basse et la reproduction est inhibée). TSH et Kp ont été capables de réactiver la reproduction chez les hamsters syriens et/ou djungariens (Ansel et al., 2011; Klosen et al., 2013; Revel et al., 2006a). RFRP a été capable de la réactiver chez les hamsters syriens (Ancel et al.,. En plus de l'activité de reproduction, la TSH a également été capable de réaugmenter le ratio Dio2/Dio3, et l'expression de RFRP et Kp (Helfer et al., 2013; Klosen et al., 2013). L'augmentation de ce ratio entrainerait l'augmentation de l'activation de l'hormone thyroïdienne T3 et de sa concentration au niveau de l'hypothalamus. Or des injections chroniques intracérébroventriculaire d'hormones thyroïdiennes sont aussi capables de réactiver l'axe reproducteur chez des animaux en photopériode courte (Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007). Ces informations, en association avec le fait que la TSH est exprimée dans une structure sensible à la mélatonine (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002), nous ont permis, premièrement, de suggérer que la TSH est la molécule la plus en amont de la voie de signalisation et est différentiellement régulée par la photopériode et la mélatonine.

De ces observations, un modèle de travail a donc été proposé reliant le système saisonnier au système reproducteur **(Fig. 17)** :

Lorsque l'animal passe en LP, le raccourcissement du pic de mélatonine va diminuer l'inhibition de l'expression de TSHβ qui va donc augmenter dans la *PT* (Bockmann et al., 1997; Dardente et al., 2010) **(Fig. 17)**. La TSH agira sur ses récepteurs présents sur les tanycytes où elle induira une augmentation du ratio Dio2/ Dio3 **(Fig. 17)**. Cela conduit à une augmentation locale de la concentration d'hormone thyroïdienne active (Barrett et al., 2007). Les tanycytes expriment aussi le transporteur MCT8 responsable du transport de l'hormone thyroïdienne du sang vers le cerveau. Ce transporteur est inhibé en LP (Herwig et al., 2009). Ceci pourrait être induit par le rétrocontrôle des hormones thyroïdiennes sur son expression.

A l'heure actuelle, nous savons que les hormones thyroïdiennes semblent importantes dans l'activation de la reproduction saisonnière (Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007), cependant, les cibles de l'hormone thyroïdienne sont peu connues. De par leur expression, également régulée par la photopériode, nous pensons que l'hormone thyroïdienne agirait au niveau des neurones à kisspeptine et RFRP3 pour stimuler les neurones à GnRH **(Fig. 17)** afin d'entrainer l'activation de l'axe hypothalamo hypophysiogonadotope et de l'activité reproductrice **(Fig. 17)**.

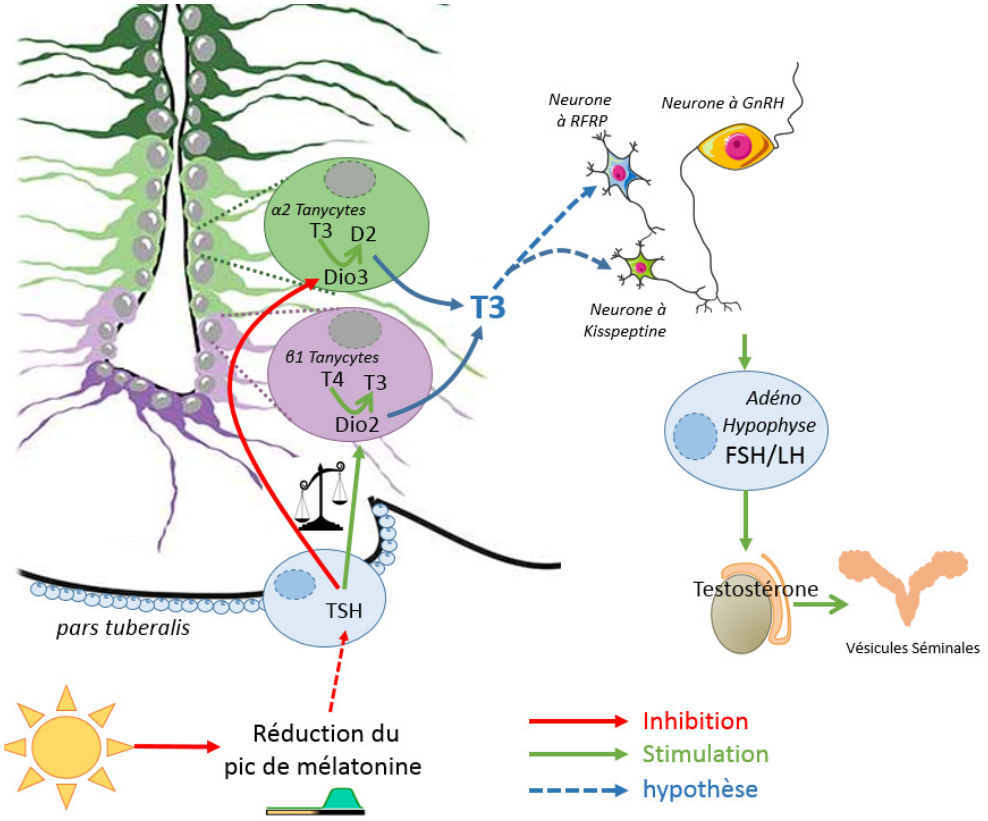


Figure 17 : Voie de signalisation hypothétique conduisant aux changements d'activité reproductrice sous l'influence d'un passage en photopériode longue

TSH : thyréostimuline, Dio2 : Désiodinase 2, Dio3 Désiodinase 3, T3 : triiodothyronine, T4 : Tétraïodothyronine

VIII) Questions, hypothèse et approches

Ce modèle d'étude n'a que rarement été mis à l'épreuve, par manque d'outils génétiques ou d'agents pharmacologiques efficaces chez les espèces saisonnières. Il a été établi en comparant les deux états reproductifs, l'un activé en jours longs et l'autre inhibé en jours courts, sans qu'aucune information temporelle dynamique n'y ait été introduite. Aussi, l'ordre temporel des évènements moléculaires de ce modèle, ainsi que le lien entre le système de décodage photopériodique et le système reproducteur via des hormones thyroïdiennes, restent encore incertains.

Dans la première partie de mes travaux de thèse, j'ai tenté de répondre à cette problématique en analysant la dynamique des changements moléculaires de l'ensemble de la voie TSH/Dios/peptides RFamides/gonadotropines/activité gonadique chez des hamsters syriens et djungariens mâles lors de l'activation de leur système reproducteur suite à un transfert d'une photopériode courte inhibitrice à une photopériode longue activatrice.

Par ailleurs, j'ai comparé les mécanismes d'activation photopériodique, induits par une diminution de la production de mélatonine, à ceux induits de façon spontanée (photoréfractaire), lorsque les hamsters sont maintenus pendant plus de 20 semaines en photopériode inhibitrice. En effet, ni le site d'initiation, ni les mécanismes endocriniens et moléculaires impliqués dans cette réactivation photoréfractaire spontanée de la reproduction ne sont connus. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans ce système, j'ai analysé l'ensemble de la voie TSH/Dios/peptides

RFamides/gonadotropines/activité gonadique au cours de la réactivation de la reproduction chez des hamsters syriens et djungariens mâles maintenus en photopériode courte inhibitrice jusqu'à 24 semaines. La comparaison de ces deux études temporelles, présentées dans un article publié dans Scientific Reports (Milesi et al., 2017) m'a permis d'établir les mécanismes communs et différentiels de ces deux systèmes de réactivation saisonnière.

De par l'activation tardive des neuropeptides kisspeptine et RFRP mis en évidence lors de ces travaux, le rôle des neuropeptides dans l'initiation du contrôle saisonnier de la reproduction a été remis en cause. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de mes travaux, j'ai réalisé une inhibition pharmacologique chronique du RFRP3 grâce à l'antagoniste RF3286 afin d'évaluer son rôle dans la régulation de la reproduction et plus particulièrement dans la reproduction saisonnière. Afin de mettre en évidence un nouveau neuropeptide saisonnier précoce éventuel, j'ai aussi analysé l'implication saisonnière d'un nouveau neuropeptide, le 26RFa, connu pour réguler le métabolisme énergétique et l'axe gonadotrope.

Enfin, mon étude initiale m'a aussi permis de montrer le rôle inédit d'une inhibition précoce de l'expression de la Dio3, indépendante de la TSH, dans les deux types de réactivation. Aussi dans une troisième partie, je présenterai mes recherches de candidats potentiels à la régulation de la Dio3.

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

MATERIELS & METHODES

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

I) Approche

Afin d'effectuer l'analyse dynamique des évènements moléculaires lors d'un évènement de réactivation photopériodique, nous avons décidé d'effectuer une série de 6 points de mesures entre le jour du transfert en photopériode activatrice et la réactivation complète de l'activité reproductrice, estimée à 6 semaines. Pour cela, j'ai effectué un échantillonnage à 0, 2, 7, 14, 28 et 42 jours. Un échantillonnage après seulement 2 jours a été réalisé car une étude a révélé que 2 jours de photopériode stimulatrice suffisent pour induire une augmentation significative de TSH dans la *PT* du mouton (Dardente et al., 2010). Pour chaque point expérimental j'ai quantifié l'ensemble des molécules impliquées dans le modèle de travail.

En ce qui concerne l'analyse dynamique d'une activation photoréfractaire endogène, j'ai réalisé 5 échantillonnages étalés entre 12 et 24 semaines en photopériode inhibitrice. Cette fenêtre temporelle a été choisie d'après Schlatt et al. (1995) et Urbanski et al. (1983), qui ont montré qu'après 12 semaines en photopériode inhibitrice, le poids testiculaire est minimal chez les hamsters djungariens et qu'entre 12 et 24 semaines, une réactivation de la reproduction est constatée. Tout comme dans la première analyse, l'ensemble des molécules impliquées dans le modèle de travail ont été quantifiées à chaque point expérimental.

Afin d'évaluer et de dissocier les évènements spécifiques aux espèces des évènements plus conservés, ces deux études ont été réalisées chez le hamster syrien (*Mesocricetus auratus*) et le hamster djungarien (*Phodopus sungorus*), deux espèces ne possédant pas d'horloge circannuelle. Ces études ont été faites chez le mâle afin d'écarter les interactions possibles avec les cycles oestriens présents chez la femelle.

Dans un deuxième temps, j'ai voulu voir quels rôles jouent les neuropeptides lors de la réactivation photopériodique. Pour cela, j'ai utilisé un antagoniste du récepteur au RFRP3 (NPFFR1). Cet antagoniste, le RF3286, a été injecté chroniquement intracérébroventriculairement (ICV) pendant 6 semaines lors d'un processus de réactivation photopériodique chez le hamster syrien mâle. J'ai choisi cette espèce car l'antagoniste y avait été précédemment testé. Il a été démontré qu'il était capable d'inhiber l'augmentation de LH induite par une injection ICV de RFRP3 (thèse Jo Henningsen 2016). J'ai également analysé la contribution du 26RFa dans la saisonnalité. Ce neuropeptide découvert récemment est en effet capable de moduler l'activité de l'axe reproducteur, mais son implication dans la saisonnalité reste inconnue.

Enfin, j'ai cherché des candidats potentiels pour la régulation de la Dio3. Pour cela, j'ai réalisé une recherche bibliographique dans le but de trouver des candidats intervenant dans la régulation de Dio3, dans la régulation de la reproduction ou alors qui sont régulés photopériodiquement. Mes recherches se sont portées premièrement sur Sonic Hedgehog (SHH), connu pour activer la Dio3 dans les kératinocytes malins (Dentice et al., 2007). Il y a également MKRN3 et EAP1, deux facteurs de transcription respectivement connus pour être importants dans l'inhibition prépubère et l'activation pubertaire de la reproduction (Abreu et al., 2013; Heger et al., 2007). Pour ces derniers, j'ai

préalablement vérifié la variation d'expression pré-pubertaire chez le hamster syrien, puis dans un deuxième temps analysé les variations d'expression photopériodique. Enfin, je me suis intéressé à deux facteurs photopériodiques : la Somatostatine (Klosen et al., 2013; Petri et al., 2016) et la Chromogranine A (Wood et al., 2015). L'ensemble des études transcriptionnelles par qPCR ont été réalisées chez le hamster syrien, du fait de la disponibilité du génome alors que des études par hybridation *in situ* ont été réalisées chez le hamster djungarien.

II) Animaux

L'expérimentation animale a été pratiquée en accord avec le décret français 2013-118 implémentant la directive européenne 2010/63/EU. L'ensemble des procédures réalisées ont été mises en place afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés et approuvées par le Comité de Bien-Etre Animal de la Plateforme d'Expérimentation Animale (Chronobiotron UMS 3415). Les hamsters syriens (*Mesocricetus auratus)* et djungariens *(Phodopus sungorus*) impliqués dans ces procédures sont issus de l'élevage interne du Chronobiotron étaient âgés de 3 à 6 mois en début d'expérience et ont été élevés dans les conditions suivantes :

- LP (LP) de respectivement 14h de lumière pour 10h d'obscurité pour les hamsters syriens et de 16h de lumière pour 8h d'obscurité pour les hamsters djungariens. Cette photopériode permet de maintenir leur axe reproducteur actif.
- Contrôle de la température : 20±2°C
- Contrôle de l'hygrométrie : 50±5%
- Mise à disposition de nourriture et d'eau à volonté

III) Expériences

a) Expérience 1 : Analyse du décours temporel de l'activation photopériodique et photoréfractaire

i) Experience 1a :

ii) Experience 1b :

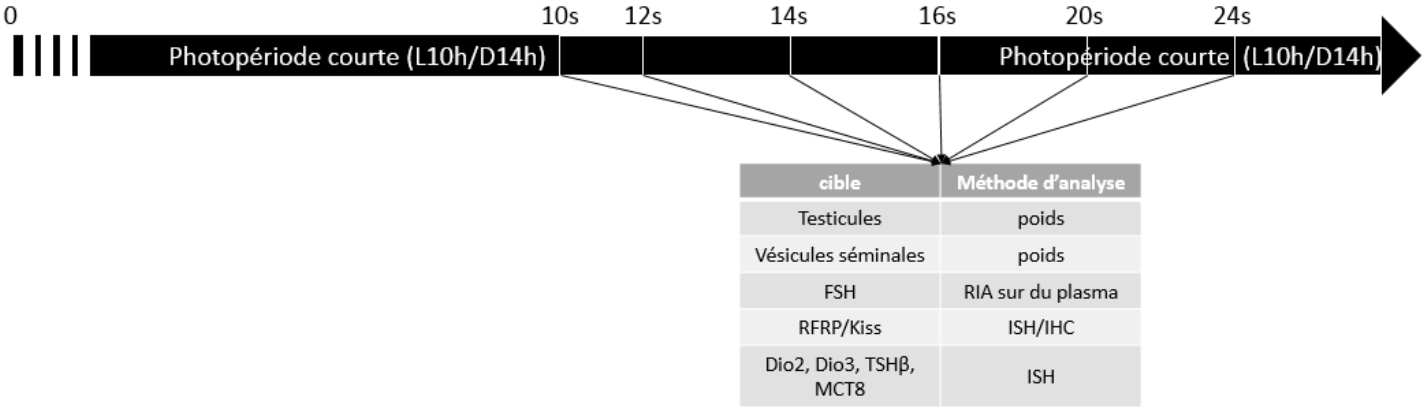


Figure 18 : Représentation schématique du design expérimental de l'analyse du décours temporel de l'activation photopériodique et photoréfractaire.

Les analyses du décours temporel de l'activation photopériodique ont impliqué 36 animaux par espèce. Durant une période de 10 semaines, ces animaux ont été placés en SP de respectivement 10h de lumière pour 14h de nuit pour les hamsters syriens et de 8h de lumière pour 16h de nuit pour les hamsters djungariens. Cette SP a permis d'inactiver leur axe gonadotrope. Ils ont ensuite été repassés en LP afin de réactiver l'axe gonadotrope. Un groupe de 6 animaux a été sacrifié à 0, 2, 7, 14, 28, et 42 jours.

Pour les analyses du décours temporel photoréfractaire 36 animaux par espèce ont également été utilisés. Ces animaux ont été placés en SP pendant 24 semaines afin d'inactiver dans un premier temps leur reproduction et d'induire dans un second temps le phénomène de réactivation endogène (photoréfraction) de l'axe gonadotrope. Un groupe de 6 animaux a été sacrifié à 12, 14, 16, 20, et 24 semaines de SP.

b) Expérience 2 : Analyse du rôle du RFRP3 dans le processus de réactivation de la reproduction

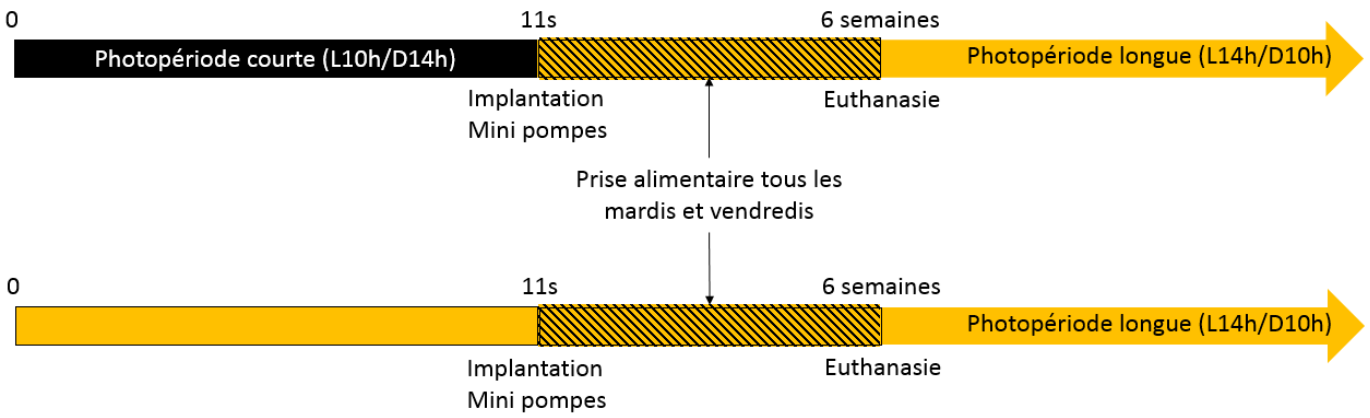


Figure 19 : Représentation schématique du design expérimental de l'analyse du rôle du RFRP3 dans le processus de réactivation de la reproduction

Les analyses du rôle du RFRP3 dans le processus de réactivation de la reproduction ont impliqué 32 hamsters syriens mâles adultes. La moitié d'entre eux a été placée pendant 11 semaines en SP afin d'inhiber leur axe gonadotrope. Parallèlement, l'autre moitié a été maintenue en LP. Ils ont été élevés dans des cages collectives enrichies (barreau + nids) de 3 animaux maximum. Tous les animaux ont ensuite été équipés d'une mini pompe osmotique à délivrance chronique intracérébroventriculaire **(*cf. :* partie IV b.)** avant d'être replacés en LP pendant 6 semaines supplémentaires en cage individuelle enrichie (barreau + nids) avec contacts visuels et olfactifs de leurs congénères.

Durant ces 6 semaines, le poids de chaque animal ainsi que sa prise alimentaire ont été déterminés deux fois par semaine. A la fin de cette période, tous les animaux ont été euthanasiés.

c) Expérience 3 : Comparaison du profil d'expression de molécules d'intérêt pendant la puberté et dans différents états photopériodiques

Dans cette expérience, des analyses par qPCR ont été réalisées sur 38 hamsters syriens. L'analyse du profil d'expression pubertaire a été effectuée sur 26 animaux élevés en LP et euthanasiés à 10, 20, 29, et 62 jours d'âge. L'analyse de l'expression génique aux différents stades saisonniers a été effectuée sur 18 animaux mâles adultes âgés de 6 à 10 mois. Six d'entre eux ont été maintenus en SP pendant 11 semaines afin d'analyser l'état sexuellement inactif. Six autres ont été maintenus en SP pendant 24 semaines afin d'analyser l'état photoréfractaire suite à une réactivation endogène de l'axe gonadotrope. Enfin, les six derniers ont été maintenus en LP toute leur vie afin d'analyser l'état sexuellement actif.

d) Expérience 4 : Analyse de l'effet saisonnier photopériodique et endogène photoréfractaire sur l'expression de la Chromogranine A dans la *PT* de l'adénohypophyse

Les études ont été réalisées sur les mêmes groupes expérimentaux que pour l'expérience 1B.

IV) Procédures chirurgicales et d'échantillonnage

a) Echantillonnage des tissus pour immunohistochimie et hybridation *in situ*

L'euthanasie des animaux a été pratiquée par overdose de dioxyde de carbone. Une fois l'arrêt respiratoire constaté, un prélèvement sanguin a été réalisé par ponction intracardiaque, puis les animaux ont été fixés par perfusion transcardiaque de fixateur periodate-lysine-paraformaldéhyde (PLP) (100mM lysine-phosphate pH7.4, 4% formaldéhyde, 10mM periodate de sodium). Les testicules ont ensuite été disséqués et pesés, ainsi que les vésicules séminales, en prenant soin de ne pas perdre de fluide séminal. Les cerveaux ont été prélevés pour une analyse par immunohistochimie et hybridation *in situ (Cf. paragraphe dédié N°VI et VII).*

b) Placement de mini pompes osmotiques à délivrance intracérébroventriculaire

Avant l'acte chirurgical, les mini-pompes osmotiques n°2006 (Alzet, USA) ont été préalablement remplies avec :

- Soit la solution d'intérêt : l'antagoniste du récepteur NPFFR1 (RF3286) fourni gracieusement par F. SIMONNIN, dilué dans du liquide céphalo rachidien artificiel (aCSF) à raison de 8.33µmol/µL pour le groupe traité.
- Soit seulement du aCSF pour le groupe contrôle.

La pompe osmotique délivrera 0.15µL/h pendant 42 jours après avoir été amorcée pendant 24h dans une solution de NaCl à 0.9%. Elles ont ensuite été préparées en les reliant grâce à un cathéter de 3.5cm, à une canule d'infusion « Brain infusion Kit 1 » (Alzet, USA n° 0004760).

Une analgésie préopératoire a été faite par injection sous cutanée de metacam 2mg/kg et de xylovet 5 mg/kg au site de la trépanation. L'implantation des mini-pompes Alzet a été effectuée sous anesthésie par injection intrapéritonéale de Zoletil (Zolazepam/Tiletamine) à raison de 40 mg/kg et de Rompun (Xylazine) à raison de 5 mg/kg. L'hypothermie induite par l'anesthésie a été contrôlée via un tapis chauffant thermostatisé. Après vérification de la profondeur de l'anesthésie, la tête de l'animal est placée dans un cadre stéréotaxique et une incision de la peau du crâne est réalisée, suivie du dégagement de la suture fronto-pariétale. Deux vis de soutien sont insérées dans le crâne afin d'assurer l'ancrage de la canule d'infusion (Alzet, USA n° 0004760). Au-dessus des coordonnées stéréotaxiques établies à 0.8mm postérieur et 2mm latéral par rapport au bregma, une trépanation a été effectuée et les méninges ont été incisées. La canule (Alzet, USA n° 0004760) a été descendue de 3 mm sous la dure mère et fixée avec du ciment dentaire alors que la mini pompe a été placée sous

la peau du dos de l'animal. L'incision cutanée est alors resserrée autour de la canule grâce à 3 points de suture. L'animal a ensuite été réveillé sous surveillance et replacé dans sa cage en LP. Le lendemain, un traitement post-opératoire de 3 jours par metacam à raison de 1mg/kg a été entamé dans l'eau de boisson. Pendant la première semaine post-opératoire, l'état général de l'animal et la cicatrisation de la zone cutanée autour de la canule ou de la mini pompe ont été vérifiés quotidiennement et la souffrance post-opératoire a été évaluée selon les critères suivants : diminution du comportement exploratoire, prostration, aspect du pelage, perte de poids.

c) Echantillonnage des tissus pour PCR quantitative

Les animaux ont été euthanasiés par overdose de dioxyde de carbone. Après dissection des cerveaux, les hypothalami ont été isolés et congelés dans de l'azote liquide. Lors de la dissection des hypothalami, la plus grande attention a été portée à la reproductibilité, en utilisant des repères visuels comme illustrés ci-dessous **(Fig. 20)** :

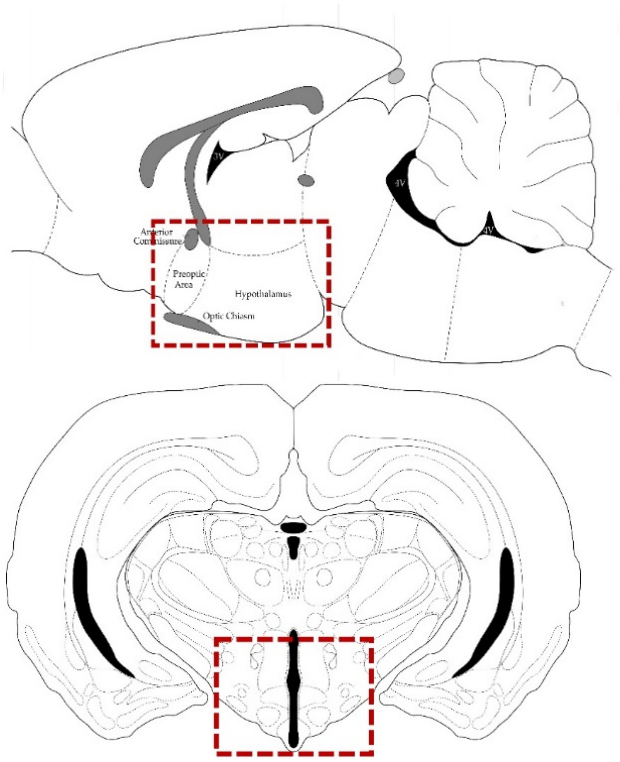


Figure 20 : Représentation schématique de la délimitation de la zone hypothalamique prélevée

V) Enrobage des cerveaux pour l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*

Une fois les animaux perfusés, les cerveaux ont été disséqués puis post-fixés par immersion pendant 12 heures dans du fixateur PLP. Ils ont été ensuite déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 50% et 70%, d'éthoxyéthanol et de butanol, pour enfin être enrobés à chaud (50°C) progressivement dans du polyéthylène glycol (PEG) 1000 100% puis dans du PEG 1000/1500 50%/50% et enfin du PEG 1000/1500 5%/95%. Les blocs ont ensuite été refroidis à température ambiante et les cerveaux ont été coupés au microtome, de la fin du chiasma optique à la fin des récessus mamillaires. L'épaisseur de coupe étant respectivement de 10 et 12µm pour le hamster

djungarien et syrien. Les coupes ont ensuite été montées de manière sériée sur des lames SuperFrost® Ultra Plus, séchées pendant 15 minutes à 60°C et stockées à sec à -80°C en vue d'un marquage par hybridation *in situ* ou à 4°C dans du PBS1x pour la réalisation d'immunohistochimie.

VI) Hybridation *in situ*

a) Design des Ribosondes

Les séquences codantes (CDS) des gènes cibles (Sonic Hedgehog, MCT8, Dio3) de différentes espèces ont été alignées et des jeux d'amorces ciblant les régions conservées ont été déterminés grâce au logiciel en ligne PriFi (https://services.birc.au.dk/prifi/). Ces amorces ont été utilisées pour amplifier par PCR une portion de la séquence codante allant de 700 à 1000 paires de bases, si possible. L'amplicon a ensuite été séparé sur gel d'agarose 1.2% et extrait de celui-ci grâce au kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, USA). Cet amplicon a été inséré dans le vecteur pSTBlue1 (Millipore, USA) et le plasmide alors formé est incorporé dans des bactéries compétentes qui ont été ensemencées et cultivées pendant 24h à 37°C sur milieu Luria-Bertani (LB) solide + Kanamycine (20µg/ml). Une colonie de bactéries a été ensuite récupérée et cultivée une nuit à 37°C dans un milieu LB liquide + Kanamycine (20µg/ml). Le plasmide a été alors extrait grâce à un kit d'extraction de plasmide (Qiagen, Allemagne) et séquencé à partir du promoteur T7, afin de vérifier la validité de la séquence amplifiée. Si celle-ci correspond bien au gène cible, le plasmide a été linéarisé en fonction du sens d'insertion de l'amplicon et du sens de transcription voulu (sens ou antisens). Une T7 ou SP6 polymérase (Roche, Meylan, France) a été ensuite utilisée pour transcrire des sondes ARN en incorporant des uridines triphosphates marquées à la digoxigénine (Roche, Meylan, France).

Gene	longueur (nucléotides)	espèce ciblée	Genbank
TSHβ	365	Rattus norvegicus	2610-2975, XM_008761373
Deiodinase 2	760	Mesocricetus auratus	442-1402, XM_005083985
Deiodinase 2	725	Phodopus sungorus	KC741502
Deiodinase 3	1147	Phodopus sungorus	MF662622
Kisspeptin	266	Rattus norvegicus	90-359, NM_181692
RFRP	440	Phodopus sungorus	87-529, JF727837
MCT8	1092	Phodopus sungorus	MF662621
SHH	743	Phodopus sungorus	MG970687
OATPC1	710	Phodopus sungorus	MG970688
26Rfa	306	Phodopus sungorus	MG970689

Table 2 : Ribosondes utilisées pour l'hybridation *in situ*

b) Hybridation *in situ* non radioactive

- Sortie des lames du stockage à -80°C.
- Post fixation, de 5minutes avec du formaldéhyde 4% dans du tampon phosphate 0.1M (PB).
- Rinçage 3 x 5 minutes avec du tampon phosphate salin (PBS1x).
- Incubation avec la Protéinase K à 0.5µg/mL dans du PBS1x pendant 30 minutes à 37°C afin de faciliter l'accessibilité aux ARN cibles.
- Lavage rapide avec du PBS1x à 4°C afin de laver la Protéinase K tout en l'inhibant par le froid.
- Fixation au formaldéhyde 2% dans du PB 0.1M, à 4°C afin d'inhiber la Protéinase K résiduelle par fixation.
- Lavages au PBS1x à 4°C 3 x 5 minutes.
- Acétylation de 10 minutes avec un bain contenant 100mM de triéthanolamine et 0.25% d'anhydride acétique à température ambiante. Après ces 10 minutes initiales, l'acétylation est poursuivie pendant 10 min additionnelles en rajoutant 0.25% d'anhydride acétique dans la solution. Le but est d'inhiber les RNAses résiduelles via une acétylation du site actif de l'enzyme.
- Incubation des sondes à 100ng/µL à 60°C pendant environ 40h dans du tampon d'hybridation contenant 50% de formamide, du Denhardt's 5X (Invitrogen, USA), du tampon salin citrate de sodium (SSC) 5X et de l'ADN de sperme de saumon à 1mg/mL (Roche, Meylan, France).
- Lavage de l'excès de sondes 3 x 10 minutes avec du SSC5x.
- Lavage 6 x 10 minutes avec du SSC0.1x à 72°C. Ces étapes de stringence permettent l'élimination des sondes accrochées de manière aspécifique.
- Saturation des coupes pendant une heure avec du réactif de blocage (Roche, Meylan, France).
- Détection des digoxygénines présentes dans les sondes avec un antisérum mouton anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche, Meylan, France) à 1/5000 dans de la solution de blocage, pendant une nuit à température ambiante.
- Lavage de l'excès d'anticorps 3 x 10 minutes avec du tampon Tris salin pH 7.5.
- Equilibrage des lames dans le tampon de révélation de phosphatase alcaline (Tris salin pH 9.5).
- Détection de l'activité phosphatase alcaline dans du tampon Tris salin pH 9.5 contenant du bromochloroindolyl phosphate à 165µg/mL et du nitroblue tétrazolium à 330µg/mL.
- Rinçages prolongés des lames afin de stopper la phosphatase alcaline et de rincer l'excès de substrat.
- Recouvrement des coupes avec du CC/Mount™ (Sigma Aldrich, USA) et séchage à température ambiante.
- Couverture des lames avec une lamelle couvre objet collée à l'Eukit ® (Sigma Aldrich, USA).

VII) Immunohistochimie

a) Simple immunohistochimie

Marquage RFRP ou Kp chez le hamster djungarien :

- Rinçage au TBS + 0.05% Tween 20 (TBS-T).
- Réactivation antigénique dans un tampon Tris 12.5 mM Citrate 1.25 mM pH 8 pendant une heure à 95°C.
- Refroidissement lent pendant au moins 30 minutes à température ambiante.
- Saturation pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de lait écrémé en poudre à 3% dans du TBS-T.
- Incubation pendant une nuit à température ambiante les antiséra lapin anti-Kp-52 de rat (JLV1, (Mikkelsen and Simonneaux, 2009) ou lapin anti-RFRP3 de rat (fourni par G. Anderson, (Rizwan et al., 2012) dilués au 1/1500 dans une solution de TBS-T+ 1% de sérum d'âne.
- Lavages 3 x 10 minutes au TBS-T pour rincer les anticorps non fixés.

i) Pour Kp

- Incubation pendant 2 heures à température ambiante avec un antisérum âne anti lapin couplé à la biotine à 0.5µg/mL (Jackson ImmunoResearch, USA), dilué dans du TBS-T + 1% de sérum d'âne.
- Lavage de l'excès d'anticorps 3 x 10 minutes au TBS-T.
- Incubation pendant une heure à température ambiante avec de la Neutravidine-HRP (NAV-HRP) (Thermofisher Scientific, USA) diluée à 0.5µg/mL dans du TBS-T + 0.02% de gélatine de poisson d'eau froide (Sigma Aldrich, USA).
- Lavage de l'excès de NAV-HRP 1 x10 minutes avec du TBS-T et 2 x10 minutes avec du TBI (50mM TRIS, 10mM Imidazole pH 7.6).
- L'activité peroxydase est détectée avec 500µg/mL de tétrahydrochlorure de diaminobenzidine dans du TBI additionné de $1.4x10^{-5}$ % d'H_2O_2.
- Lavages 3 x 10 minutes à l'eau de ville pour rincer l'excès de solution de révélation.
- Déshydratation des coupes avec des bains successifs d'éthanol 70%-95%-95%-100%-100% de 5 minutes suivis par 2 bains de toluène de 10 minutes.
- Scellage des lames avec une lamelle couvre objet collée à l'Eukit ® (Sigma Aldrich, USA).

ii) Pour RFRP-3

- Incubation pendant 2 heures à température ambiante avec un antisérum secondaire âne anti anticorps de lapin couplés à l'Alexa 594 à 1µg/mL (Thermofisher Scientific, USA).
- Lavage de l'excès d'anticorps 3 x 10 minutes avec du TBS-T.
- Scellage des lames avec une lamelle couvre objet et une solution de glycérol 90% + 0.02% d'azide de sodium.
- Stockage à 4°C.

b) Double Immunohistochimie

i) Double marquage TSHβ-Chromogranine A chez le hamster djungarien :

- Rinçage de 5 minutes au TBS + 0.05% Tween 20 (TBS-T) à température ambiante.
- Réactivation antigénique dans un tampon Tris 12.5 mM Citrate 1.25 mM pH 8 pendant une heure à 95°C.
- Refroidissement lent pendant au moins 30 minutes à température ambiante.
- Saturation pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de lait écrémé en poudre à 3% dans du TBS-T.
- Incubation pendant une nuit à température ambiante des anticorps primaires souris anti-TSHβ de rat monoclonal clone #442506 (R&D system, USA), lapin anti- Chromogranine A bovine SP1 polyclonal (ImmunoStar, USA) dans une solution de TBS-T+ 1% de sérum d'âne.
- Lavages 3 x 10 minutes au TBS-T pour rincer les anticorps non fixés.
- Incubation pendant 2 heures à température ambiante avec des antiséra secondaires âne anti anticorps de lapin couplés à l'Alexa 488 à 1µg/mL (Thermofisher Scientific, USA) et âne anti souris couplés à la biotine à 0.5µg/mL (Jackson ImmunoResearch, USA) dilués dans du TBS-T + 1% de sérum d'âne.
- Lavage de l'excès d'anticorps 3 x 10 minutes au TBS-T.
- Incubation pendant une heure à température ambiante avec de la Neutravidine-HRP (Thermofisher Scientific, USA) diluée à 0.5µg/mL dans du TBS-T + 0.02% de gélatine de poisson d'eau froide (Sigma Aldrich, USA).
- Lavage de l'excès de NAV-HRP 1 x 10 minutes avec du TBS-T et 2 x 10 minutes avec du PBS1x.
- L'activité peroxydase est détectée via une révélation de 30 minutes avec 1µg/mL de Tyramide-Rhodamine dans du PBS1x additionné de 100 mM d'imidazole pH 7.6 et 4.67×10^{-6} % H_2O_2.
- Lavages de l'excès de solution de révélation 3 x 10 minutes avec du PBS1x
- Scellage des lames avec une lamelle couvre objet et une solution de glycérol 90% + 0.02% d'azide de sodium.
- Stockage à 4°C.

ii) Double marquage αGSU-Chromogranine A

- Rinçage de 5 minutes au TBS + 0.05% Tween 20 (TBS-T) à température ambiante.
- Saturation pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de lait écrémé en poudre à 3% dans du TBS-T.
- Incubation pendant une nuit à température ambiante avec l'antisérum primaire lapin anti- αGSU de rat polyclonal (NIDDK, USA) dans une solution de TBS-T+ 1% de sérum d'âne.
- Lavages 3 x 10 minutes au TBS-T pour rincer les anticorps non fixés.
- Incubation pendant 2 heures à température ambiante avec l'antisérum âne anti lapin couplé à la biotine à 0.5µg/mL (Jackson ImmunoResearch, USA) dilués dans du TBS-T + 1% de sérum d'âne.
- Lavage de l'excès d'anticorps 3 x 10 minutes au TBS-T.
- Incubation pendant une heure à température ambiante avec de la Neutravidine-HRP (Thermofisher Scientific, USA) diluée à 0.5µg/mL dans du TBS-T + 0.02% de gélatine de poisson d'eau froide (Sigma Aldrich, USA).
- Lavage de l'excès de NAV-HRP 10 minutes avec du TBS-T et 2 x 10 minutes avec du PBS1x.
- L'activité peroxydase est détectée via une révélation de 30 minutes à température ambiante avec 1µg/mL de Tyramide-Rhodamine dans du PBS1x additionné de 100 mM d'imidazole pH=7.6 et 4.67×10^{-6} % H_2O_2.
- Lavages 3 x 10 minutes au PBS1x.
- Lavage 4 x 5 minutes à l'eau distillée pour préparer l'élution des anticorps.
- Elution des anticorps avec 2 lavages de 15 minutes avec une solution Glycine 0.1M pH2.2 + Triton X-100 0.3%.
- Lavages de la solution d'élution 2 x 5 minutes au PBS1x.
- Fixation au formaldéhyde 4% dans du PB 0.1M pendant 5 minutes.
- Lavage 4 x 5 minutes : 2 au PBS1x, 2 au TBS-T.
- Réactivation antigénique dans un tampon Tris 12.5 mM Citrate 1.25 mM pH 8 pendant une heure à 95°C.
- Refroidissement lent à température ambiante pendant au moins 30 minutes.
- Saturation pendant 1 heure avec une solution de lait écrémé en poudre à raison de 3% dans du TBS-T à température ambiante.
- Incubation toute la nuit des anticorps primaires lapin anti- Chromogranine A bovine SP1 polyclonal (ImmunoStar, USA) dans une solution de TBS-T+ 1% de sérum de d'âne à température ambiante.
- Lavage 3 x 10 minutes au TBS-T pour rincer les anticorps non fixés.
- Incubation pendant 2 heures à température ambiante de l'antisérum âne anti lapin couplés à l'Alexa 488 à 1µg/mL (Jackson ImmunoResearch, USA) dilués dans du TBS-T + 1% de sérum d'âne.
- Lavage 3 x 10 minutes avec du TBS-T pour rincer les anticorps non fixés.

- Scellage des lames avec une lamelle couvre objet et une solution de glycérol 90% + 0.02% d'azide de sodium.
- Stockage à 4°C.

VIII) Analyse d'image et statistiques

a) Analyse des images

L'ensemble des animaux et des lames ont été traités dans les mêmes conditions afin d'assurer un traitement identique, nécessaire aux analyses semi-quantitatives. L'ensemble des photos en lumière transmise ont été prises avec un microscope Leica DMRB équipé d'une caméra numérique Olympus DP50. Les temps d'exposition, la sensibilité et le contraste de la caméra ont été standardisés. Toutes les photos analysées étaient enregistrées en 8bit auxquelles une image du bruit de fond issu d'une zone sans tissus a été soustraite. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour traiter l'ensemble des images à fond clair. Les photos des doubles marquages immunofluorescents ont été réalisées quant à elles au Hamamatsu NanoZoomer S60, en prenant soin de standardiser également l'ensemble des paramètres d'acquisition. Elles ont été analysées à l'aide du logiciel propriétaire NDP.view2.

Les analyses de Dio3, de OATP1C1 chez le hamster djungarien et de MCT8 chez les deux espèces ont été réalisées sur les corps cellulaires des tanycytes α. L'analyse de Dio2 a été réalisée sur les pieds tanycytaires au niveau du sulcus tubéro-infundibulaire. Le niveau d'expression a été quantifié en mesurant l'intensité du niveau de gris moyen délestée du bruit de fond moyen, à l'aide de l'objet ligne du logiciel ImageJ (d'une largeur nécessaire pour couvrir la zone à analyser).

L'expression de Kp a été quantifiée dans le noyau arqué. Pour l'hybridation *in situ*, la moyenne de l'intensité intégrée a été mesurée avec des cercles de taille fixe entourant les corps cellulaires. Les neurones ont été choisis aléatoirement et la moyenne d'intensité intégrée a été calculée à partir d'un nombre minimal de 50 mesures.

Les cellules RFRP positives dans le DMH et les tanycytes Dio3 positifs au niveau des corps cellulaires des tanycytes α chez le hamster syrien ont été comptées sur des coupes sériées. De même, les cellules Kp positives analysées par immunohistochimie ont, quant à elles, été comptées dans le noyau arqué. Lors de l'échantillonnage, j'ai pris soin d'inclure des coupes rostrales et caudales ne contenant plus de cellules marquées afin d'être sûr que toute la structure d'intérêt a été analysée. Pour le comptage des cellules 26RFa positives, les cellules ont été comptées dans l'hypothalamus latéral. Sur cette dernière étude, l'échantillonnage a été étalonné grâce à des repères anatomiques de 0.6 à 2.5 mm postérieur au bregma (The golden Hamster Brain L.P. Morin et R.I. Wood). Pour chaque gène/peptide analysé, les cellules positives ont été comptées sur 8 à 10 sections, respectivement espacées de 90µm chez le hamster djungarien et de 140µm chez le hamster syrien. Le nombre de neurones a été normalisé par le nombre de coupes analysées.

Les analyses de TSHβ, αGSU, et Chromogranine A ont été réalisées en comptant les cellules positives dans la *PT.* Ce nombre a été normalisé par la suite par la longueur de la *PT* analysée.

Figure 21 : Représentation de la localisation anatomique de l'analyse des différents acteurs moléculaires.

Les neurones jaunes représentent les neurones à RFRP, les rouges, les neurones a kisspeptine et les violet les neurones a 26RFa. Les cellules vertes représentent les tanycytes α où est quantifié Dio3, OATP1C1 et MCT8 alors que le trais vert représente le sulcus tubéro-infundibulaire où est quantifié Dio2, DMH : dorso médian hypothalamus, VMH : ventro médian hypothalamus, LH : latéral hypothalamus, PT : *pars tuberalis*, TO : tractus optique, 3V : 3ème ventricule

b) Analyses Statistiques

La valeur finale donnée est la moyenne ± SEM des valeurs moyennes individuelles obtenues pour 5 à 6 animaux. Le nombre initial d'animaux par groupe était de 6, cependant au cours de la préparation des échantillons biologiques, certains animaux ont dû être exclus du fait du manque d'exploitabilité de la zone d'intérêt. Les données ont été analysées par Analyse de Variance à un facteur (ANOVA1). Les différences sont considérées comme significatives lorsque la valeur P est inférieure ou égale à 0.05.

IX) Dosage RIA des concentrations plasmatiques de FSH et 26RFa

Les niveaux de FSH ont été déterminés à partir d'un volume de 50µl par l'équipe de Manuel Tena Sempere. en utilisant un protocole RIA décrit dans l'article de (Ancel et al., 2012).

Les niveaux de 26RFa plasmatique ont été déterminés par l'équipe de Nicolas Chartrel en utilisant un protocole RIA (Prévost et al., 2015).

L'ensemble de ces dosages a été réalisé à titre gratuit par ces deux équipes.

X) PCR quantitative en temps réel

a) Extraction des ARN et rétrotranscription.

Les échantillons ont été sortis du lieu de stockage et conservés sur glace. Dans chaque tube a été immédiatement ajouté 1ml de solution TriReagent (MRC Inc., USA). Les échantillons ont été lysés par des allers-retours à l'aide d'une seringue avec une aiguille G18 dans un premier temps puis G21,

avant de transférer la solution dans des tubes Phase-Lock gel™ de 1.5mL (5prime, USA). Cinq cent microlitres de chloroforme ont été ajoutés, le tube a été vigoureusement agité à la main et centrifugé 10 minutes à 12000 *x g.* La phase aqueuse a été prélevée, transférée dans un autre tube Phase-Lock de 1.5mL avec 500µL de chloroforme et agitée vigoureusement à la main avant d'être recentrifugé 10 minutes à 12000 *x g.* La phase aqueuse a été prélevée et mélangée vigoureusement à 550µL d'isopropanol. Le tout a été laissé précipiter 2 heures à -80°C puis centrifugé 45 minutes à 22000 *x g* à 4°C. Le surnageant a été remplacé par 1ml d'éthanol 75% et le tube a été recentrifugé 10 minutes à 22000 *x g* à 4°C. Ce dernier lavage a été renouvelé une fois puis le culot a été séché et resuspendu dans 20µl d'eau exempte d'RNAses. La quantité d'acides nucléiques a été déterminée au spectrophotomètre Nanodrop (Thermofisher, USA) et la pureté des échantillons a été validée si le ratio A260/A280 est supérieur à 1.80 et A260/A230 proche de 2. Si c'est le cas, l'intégrité de l'ARNm a également été vérifiée par analyse de la dégradation des ARN ribosomaux 18 et 28S au Bioanalyseur (Agilent, USA) avec un kit RNA6000 nano (Agilent, USA). L'échantillon considéré comme utilisable si le score d'intégrité de l'ARN (RIN) était supérieur à 6 a été alors stocké à -80°C jusqu'à rétrotranscription en cDNA. Cette rétrotranscription a été effectuée par le kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, USA).

b) Mise au point

Les séquences codantes de chaque transcrit d'intérêt de hamster syrien ont été récupérées en ligne sur la banque de données Genbank. Via le logiciel Primer Express (Applied Biosystem, USA), chacune de ces séquences a été utilisée pour générer entre 3 et 5 jeux d'amorces spécifiques. Chacune de ces amorces a une longueur de 20 à 25 nucléotides et a été sélectionnée afin d'obtenir des produits d'amplifications compris entre 50 et 150 nucléotides de long. Leur synthèse a été confiée à la société Sigma Aldrich (USA). Afin de valider la spécificité de ces amorces, une PCR quantitative en temps réel a été faite avec une courbe dose/réponse utilisant un mélange équimolaire de cDNA à 100, 10, 1, 0.1 et 0.01ng/µL provenant de différents échantillons, ainsi qu'un échantillon non spécifique ne contenant que du tampon (NST). Pour cela 1µL de cDNA, 3µL de chaque primer à 2µM et 10µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) ont été mélangés dans un volume total de 20µL et la PCR a été réalisée avec une phase de dénaturation de 10 minutes à 95°C, et quarante cycles comportant une phase de dissociation de 15 secondes à 95°C et une phase d'élongation pendant 1 minute à 60°C. A la fin, une courbe de fusion a été effectuée. Cette courbe de fusion permet de savoir combien de types de produit de PCR comporte le mélange final. En effet, à chaque fois que la courbe de dissociation arrive à la température de demi-dissociation (Tm) d'un type d'amplicon, la pente de la courbe de fusion (-δ fluorescence/ δ température) augmente. S'il n'y a qu'un seul pic, cela veut dire qu'il n'y a qu'un seul produit d'amplification. La PCR non spécifique (NST) permet de savoir s'il y a formation de dimères d'amorces et si l'amplification est spécifique du cDNA apporté, ou liée à une contamination

extérieure. La courbe dose/réponse permet de calculer l'efficacité des amorces via la formule ci-dessous. Les jeux d'amorces utilisés ont tous une efficacité supérieure à 93%. Enfin, le produit de la PCR est également migré sur gel d'agarose afin de vérifier que la taille du produit d'amplification correspond bien à celle attendue.

$$Efficacité = \left(10^{-\frac{1}{-pente}}\right) x100$$

Une fois la spécificité et l'efficacité validées, la concentration des amorces a été optimisée. Pour cela 3 concentrations d'amorces ont été testées (50nM, 300nM et 900nM) avec les mêmes conditions que précédemment. Le but était de trouver un compromis afin d'éviter la formation de dimères d'amorces et d'avoir la meilleure sensibilité. Une fois la concentration d'amorces validée, la dilution adéquate des échantillons a été choisie grâce à la courbe dose/réponse, afin que l'ensemble des valeurs de demi amplification (Ct) soient comprises entre 15 et 30 cycles.

c) PCR quantitative en temps réel

Les quantifications ont été faites en plaque 96 puits MicroAmp (Applied Biosystems, USA). Chaque condition a été réalisée en duplicat et chaque analyse a été accompagnée d'un duplicata non spécifique sans cDNA (NST). Chaque quantification d'un gène d'intérêt était accompagnée de la quantification d'un contrôle interne de normalisation tel que la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou l'actineβ, qui sont des gènes dont le niveau d'expression n'est pas censé changer en fonction des conditions. Dans chaque puits est introduit 1µL de cDNA à la dilution nécessaire, 3µL de chaque amorce à 2µM et 10µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), dans un volume total de 20µL. Le remplissage de la plaque fini, l'absence de bulles d'air a été méticuleusement vérifiée dans la solution puis la plaque a été centrifugée 2 minutes à 1 000 tours/minutes. La PCR a comporté une phase de dénaturation de 10 minutes à 95°C puis 40 cycles divisés en une phase de dissociation de 15 secondes à 95°C et une phase d'élongation à 60°C de 1 minute pour enfin finir sur une courbe de fusion.

Gene	Set	Primer For	Primer Rev	Longueur Amplicon (Nucléotide)	efficacité	Concentration primers	Dilution échantillon
MKRN3	3	GCCACACAGTTTGAGAACAGGAT	ACCCAGAACTCACTAGGAATGACAA	86	100%	300nM	2ng/µl
EAP1	1	CCCCCTAGTCGGGTCTAATGTA	TTCACTTTAACATCCCCAGCTAAGA	81	100%	300nM	2ng/µl
SHH	1	AATGCCTTGGCCATCTCTGT	CCTCAGTCACCCGTAGCTTCA	61	99%	300nM	20ng/µl
Dio2	4	GTGCATGTGTCCAATCCTGAAG	AAGTCAAGGAGGTGGCATTCTG	83	100%	300nM	2ng/µl
26Rfa	1	CCTCTCTTTGCCTTACCTCCTTCT	CCGATGTCACCAACGTCTGT	90	99%	300nM	20ng/µl
ActB	1	TATGGAATCCTGTGGCATCCA	GCATAGAGGTCTTTGCGGATGT	81	93%	300nM	2ng/µl
GAPDH	1	GGTGGAGCCAAGAGGGTCAT	TCATGGTTCACACCCATCACA	74	94%	300nM	2ng/µl

Table 3 : Tableau listant les amorces utilisées pour la qPCR et leurs carastéristiques principales d'utilisation.

d) Méthode et analyses statistiques

Pour chaque duplicat la moyenne a été calculée. Le δCt qui correspond à la différence du Ct moyen du gène cible moins celui du contrôle interne, a été calculé pour chaque échantillon. Ensuite, le δδCt qui correspond à la différence du δCt de l'échantillon moins le δCt moyen du groupe de référence a été calculé. Enfin, la mesure relative égale à $2^{(-\delta\delta Ct)}$x100 a été calculée. Elle correspond au pourcentage d'expression de l'échantillon par rapport au groupe contrôle. Les différences significatives entre les groupes ont été analysées par comparaison 2 à 2, grâce à un test non paramétrique de Mann-Whitney.

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

PARTIE N°1

L'inhibition de la déiodinase 3 est l'élément le plus précoce de la réactivation photopériodique et photoréfractaire de l'axe gonadotrope chez les hamsters saisonniers

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

PARTIE N°1

L'inhibition de la Dio3 est l'élément le plus précoce de la réactivation photopériodique et photoréfractaire de l'axe gonadotrope chez les hamsters saisonniers

Version originale:

Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters

MILESI Sebastien[1], SIMONNEAUX Valerie[1] and KLOSEN Paul[1]

[1]Institute of Cellular and Integrative Neuroscience, CNRS, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg Cedex, France.

Publié dans Scientific Report le 18 Décembre 2017

Résumé :

Chez les rongeurs saisonniers, la reproduction est activée par les photopériodes longues. De plus le maintien d'une SP inhibitrice pendant plus de 20 semaines déclenche une réactivation spontanée de l'axe gonadotrope appelée réactivation photoréfractaire. La réactivation photopériodique est supposée impliquer la mélatonine, les hormones thyroïdiennes hypothalamiques (TH) et les (Ar) (Phe)-Amide peptides alors que le mécanisme d'induction photoréfractaire reste quant à lui encore inconnu. Nous avons analysé les changements dynamiques lors d'une réactivation photopériodique et photoréfractaire de la reproduction chez le hamster syrien et djungarien mâle pour valider le modèle actuel de l'activation photopériodique et pour révéler les mécanismes impliqués dans l'activation photoréfractaire. Nous avons découvert une inhibition précoce et conservée de l'enzyme du catabolisme des hormones thyroïdiennes, la Désiodinase 3 (Dio3), dans les tanycytes. Celle-ci est associée à une inhibition retardée du transporteur aux hormones thyroïdiennes MCT8. Ceci suggère l'existence d'un pic précoce d'hormones thyroïdiennes, qui pourrait induire la réactivation photopériodique et photoréfractaire de la reproduction. Lors de la photoréactivation, l'inhibition de la Dio3 est suivie d'une activation de la Dio2 (désiodination de T4 en T3 active), mais ce n'est pas le cas lors de l'activation photoréfractaire. De plus, l'augmentation des (Arg) (Phe)-amides apparait quelques semaines après l'inhibition initiale de Dio3. En conclusion, nous avons révélé une inhibition précoce de Dio3, qui est renforcée par une augmentation de l'expression de Dio2 lors de la photoactivation des hamsters. A l'inverse, lors de l'activation photoréfractaire, l'inhibition précoce de Dio3 pourrait suffire à réactiver l'axe gonadotrope.

Abstract:

In seasonal rodents, reproduction is activated by a long photoperiod. Furthermore, maintaining an inhibitory short photoperiod for over 20 weeks triggers a spontaneous reactivation of the gonadotropic axis called photorefractoriness. Photoactivation is proposed to involve melatonin, hypothalamic thyroid hormones (TH) and (Arg) (Phe)-amide peptides. The mechanisms involved in photorefractoriness are so far unknown. We analyzed the dynamic changes in long photoperiod- and photorefractory-induced activation of reproduction in both Syrian and Djungarian hamsters to validate the current model of photoactivation and to uncover the mechanisms involved in photorefractoriness. We detected a conserved early inhibition of expression of the TH catabolizing enzyme deiodinase 3 (Dio3) in tanycytes, associated with a late decrease of the TH transporter MCT8. This suggests that an early peak of hypothalamic TH may be involved in both photoinduced and photorefractory reactivation. In photoactivation, Dio3 downregulation is followed by an upregulation of Dio2, which is not observed in photorefraction. The upregulation of (Arg) (Phe)-amides occurs several weeks after the initial Dio3 inhibition. In conclusion, we uncovered a so far unreported early inhibition of Dio3. This early downregulation of Dio3 is reinforced by an upregulation of Dio2 in photoactivated hamsters. In photorefractoriness, the Dio3 downregulation might be sufficient to reactivate the gonadotropic axis.

I) Introduction:

The earth's rotation around the sun leads to annual changes in the duration of the daily light phase (called photoperiod), temperature and food resources. Organisms anticipate and adapt their physiology to these seasonal changes to optimize species survival. Rodents such as the Syrian (Mesocricetus auratus) or the Djungarian (Phodopus sungorus) hamster synchronize their metabolic and reproductive activities with the seasons. In mammals, the major seasonal synchronizer is the annual change in photoperiod length to which species respond differently according to their reproductive physiology. Hamsters are thus called long-day breeders because they are activated by a long photoperiod (LP), while a short photoperiod (SP) inhibits their reproduction. Interestingly, if hamsters are maintained for a prolonged period (over 20 weeks) in SP, their reproductive axis escapes the inhibitory action of the SP and endogenously reactivates. The mechanisms underlying this endogenous reactivation called photorefractoriness are so far unknown. Early experiments have demonstrated that photoperiod is translated into circulating melatonin by the pineal gland. This nocturnal production of melatonin depends on the length of the night (Hastings et al., 1985; Wurtman et al., 1963). During the last decade, a number of genes have been shown to display melatonin-dependent photoperiodic variations leading to the elaboration of a neuroendocrine pathway through which melatonin is supposed to control reproductive activity. In this pathway, the large SP melatonin peak inhibits thyroid stimulating hormone (TSH) production in the *PT* while the short LP melatonin peak relieves this inhibition (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002). This TSH is thought to bind to its receptor located on tanycytes, specialized glial cells lining the bottom of the 3rd ventricle to increase deiodinase 2 (Dio2) and inhibit deiodinase 3 (Dio3) expression (Hanon et al., 2008; Nakao et al., 2008). As Dio2 converts thyroxine (T4) to its active metabolite triiodothyronine (T3) and Dio3 catabolizes both T4 and T3 to inactive metabolites, TSH action on tanycytes leads to a local increase in T3 in the mediobasal hypothalamus (MBH)(Barrett et al., 2007; Klosen et al., 2013). Tanycytes also express the blood to brain thyroid hormone transporter MCT8 known to be down regulated by photoperiod (Herwig et al., 2013). T3 is further proposed to increase the synthesis of two hypothalamic neuropeptides, Kisspeptin (Kp) and RFamide related peptide-3 (RFRP-3), both well-established regulators of GnRH neuron activity (Ancel et al., 2012; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Klosen et al., 2013; Revel et al., 2006a). This putative TSH-Dio2/Dio3/MCT8-RFRP/Kp pathway involved in the melatonin-driven control of reproductive activity has been tested by central infusion of TSH or T3, both of which are able to reactivate the HPG axis of photoinhibited animals(Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007; Klosen et al., 2013; Murphy et al., 2012; Nakao et al., 2008). However, these studies cannot exclude that these treatments might simply override the photoperiodic inhibition of the gonadotropic axis, and that a reactivation by photoperiod involves additional mechanisms, particularly in the early phases. Thus, we decided to analyze the dynamic changes along the whole putative neuroendocrine pathway in the course of a photoperiodic

activation in order to uncover the sequential changes of this pathway. Furthermore, we analyzed the temporal changes of this neuroendocrine pathway during the endogenous photorefractory reactivation in order to compare the mechanisms involved in both the melatonin dependent and independent regulations of the reproductive axis. These experiments performed in both Syrian and Djungarian hamsters question the well-established TSH-T3-RFRP/Kp pathway for the seasonal control of reproductive activity and point to a very early TSH-independent change in Dio3 expression in this process.

II) Results:

For each experimental activation procedure, three different sets of parameters were analyzed in Syrian and Djungarian male hamsters: peripheral reproductive parameters (FSH, testes weight and seminal vesicle weight, the latter being a marker of testosterone exposure in the preceding days and weeks); central neuropeptides regulating GnRH neuron activity (RFRP in the dorsal hypothalamus and Kp in the arcuate nucleus) and markers of the melatonin signal integration and local thyroid hormone metabolism (TSHβ in the *PT*, Dio2 in the β1 tanycytes, Dio3 in the α tanycyte cell bodies and MCT8 in the α tanycyte cell bodies).

Photoperiodic activation of the reproductive axis in the male Syrian hamsters.

Transfer of SP-adapted hamsters to LP conditions led to a progressive reactivation of the HPG axis (Fig. 22A–C). FSH plasma concentration reached a maximal value (8.34 ± 1.97 ng/ml) 14 days after the LP transfer and remained elevated up to 42 days thereafter. Following this increase in FSH, both testes and seminal vesicle weights became significantly higher 28 and 42 days respectively after the LP transfer. Kiss1 expression measured as the mean integrated density of the hybridization signal per neuron increased after 28 and 42 days in LP. Notably, the number of RFRP positive neurons initially decreased to a minimum value 14 days after the LP transfer and then increased to a maximal and stable value after 28 and 42 days in LP. The number of TSHβ positive cells in the *PT* increased after 14 and 28 days in LP, and then dropped to lower levels at the 42nd day in LP (Fig. 22C,D). Dio2 expression in tanycyte end feet increased only at the 14th day in LP whereas Dio3 expression in α tanycyte cell bodies displayed a pronounced and rapid decrease with significantly lower values reached already after 2 days in LP (Fig. 22C,D).

Photorefractory reactivation of the reproductive axis in male Syrian hamsters.

An endogenous (photorefractory) reactivation of the HPG axis was observed when hamsters were exposed to a prolonged SP (Fig. 22E–G). After 12 weeks of SP exposure, the HPG axis was fully inhibited as confirmed by minimum FSH levels and testes weights. Then after 16 weeks in SP, plasma FSH increased followed by a significant increase in testes weight after 20 weeks and then in seminal vesicle weight after 24 weeks in SP. An increase in both Kiss1 and RFRP expression was observed only after 24 weeks of SP exposure. Regarding the hypothalamic thyroid axis, TSHβ and Dio2 expression remained low with no significant variation throughout the time course, while by contrast, Dio3 expression started to decrease 16 weeks after SD exposure (Fig. 22G,H).

Photoperiodic and photorefractory activation of the reproductive axis in male Djungarian hamsters.

A similar protocol of time-dependent investigation of both the photoperiodic and photorefractory activation of the reproductive axis was performed in Djungarian hamsters to investigate putative species-dependent differences in these processes (Fig. 23). During photoperiodic reactivation, circulating FSH and testes weight started to increase 28 days after the LP transfer, followed by a significant rise in seminal vesicle weight observed after 42 days in LP (Fig. 23A). The number of Kp

and RFRP neurons remained stable during the LP reactivation, except after 42 days in LP where Kp was decreased (Fig. 23B). RFRP expression should however increase after the end of the time course because a significant difference exists between the LP42d group and a control group constantly maintained in LP (Supplemental Fig. 24). Dio3 expression decreased already 7 days after the LP transfer while the increase in both TSHβ and Dio2 expression was significant only at the 42nd day. In this species, we also investigated the dynamic changes in the gene encoding the tanycytic thyroid hormone transporter MCT8, which displayed a major decrease of its expression 28 and 42 days after the LP transfer (Fig. 24). When Djungarian hamsters were maintained in SP for a prolonged period, an endogenous photorefractory increase in testes weight was observed after 20 weeks in SP. Although the mean seminal vesicle weight increased notably in parallel with testes weight, this increase failed to reach statistical significance due to high interindividual differences (Fig. 23E). After 24 weeks in SP, the number of Kp neurons decreased, while that of RFRP neurons increased when compared to the minimum number observed at 14 weeks in SP (Fig. 23F). Dio3 expression in the tanycytes was the earliest gene to show a significant decrease already after 14 weeks in SP (Fig. 23G,H) whereas Dio2 and TSHβ expression displayed a correlated increase after 24 weeks in SP (Fig. 23G,H). Notably, the photorefractory increase in TSHβ expression (reached after 24 weeks in SP), although significant, is very small (SP24w = 6.8 ± 3.0) and represents only 4.3 ± 1.9% of the level observed in the LP control animals (LP = 155.6 ± 10.5). MCT8 expression displayed a significant decrease at the 20th week (Fig. 24C and D).

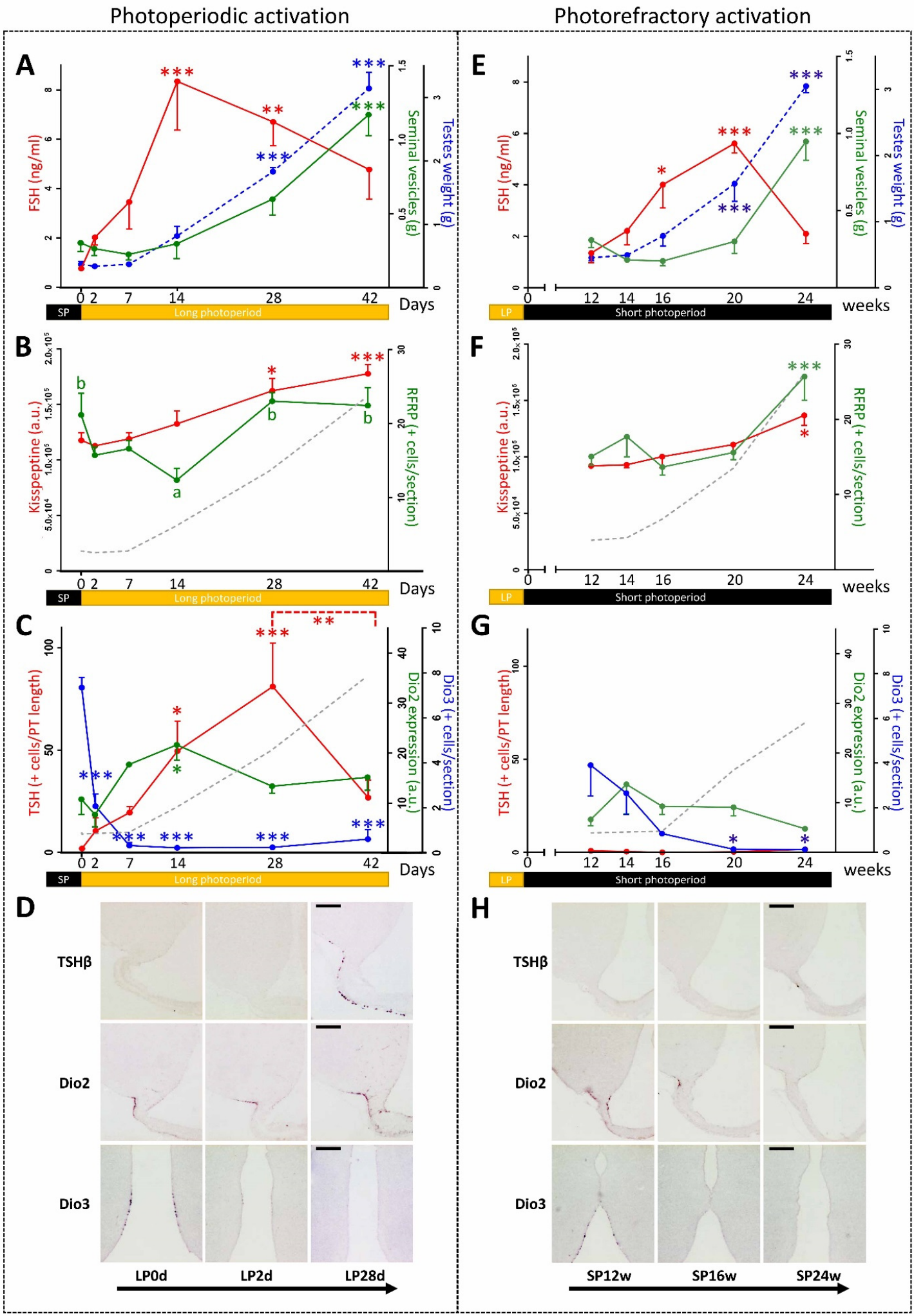

Photoperiodic activation
Photorefractory activation
A
FSH (ng/ml)
Seminal vesicles (g)
Testes weight (g)
Days
SP
Long photoperiod
E
weeks
LP
Short photoperiod
B
Kisspeptine (a.u.)
RFRP (+ cells/section)
F
C
TSH (+ cells/PT length)
Dio2 expression (a.u.)
Dio3 (+ cells/section)
G
D
TSHβ
Dio2
Dio3
LP0d
LP2d
LP28d
H
SP12w
SP16w
SP24w

Figure 22. Photoperiodic **(A–D)** and photorefractory **(E–H)** activation of the reproduction in male Syrian hamsters: **(A & E)** time course of physiological parameters: combined testes weight (g) (blue dotted line), plasma FSH concentration (ng/ml) (red line), combined seminal vesicle weight (g) (green line). **(B & F)** Time course of neuropeptide expression: Kiss1 integrated staining density of arcuate cell bodies (a.u.) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization (red line), number of RFRP positive cells per section analyzed by nonradioactive *in situ* hybridization where different letters indicate significant differences (green line), combined testes weight (g) (grey dotted line). **(C & G)** Time course of the hypothalamic TSH/T3 axis: Dio2 mean staining intensity (a.u.) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization (red line), Dio3 positive alpha tanycytes per section analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization (blue line), *PT* TSHβ positive cells (green line) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization, combined testes weight (g) (grey dotted line). **(D & H)** Representative micrographs of the non-radioactive *in situ* hybridization stain for TSHβ, Dio2 and Dio3: three time points are presented for each reactivation protocol: 0, 2d, 28d of long photoperiod (LP) for the photoperiodic activation; 12, 16, and 24w for the photorefractory reactivation. Scale bars = 200 µm.

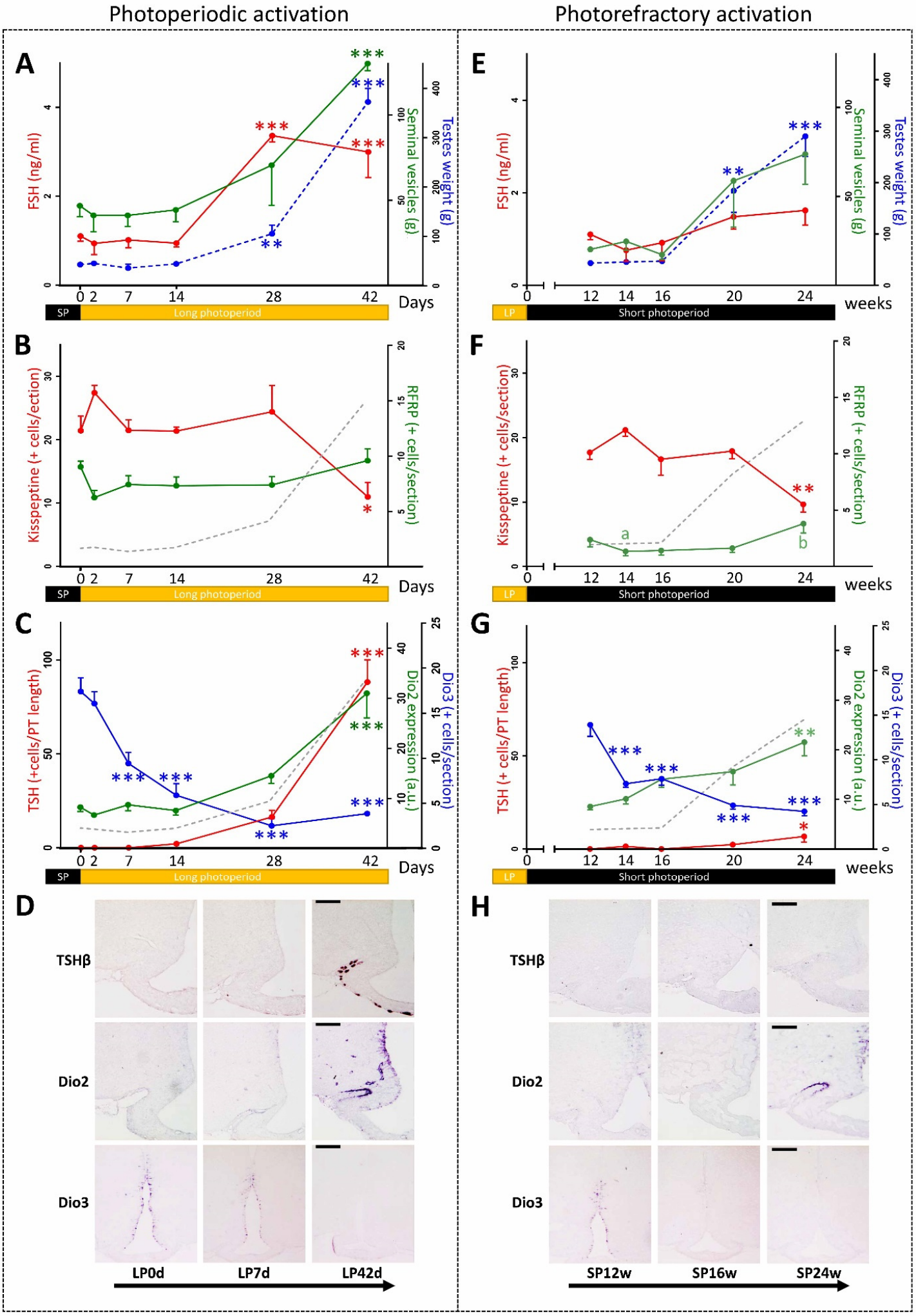

Photoperiodic activation
Photorefractory activation
A
FSH (ng/ml)
Seminal vesicles (g)
Testes weight (g)
Days
SP
Long photoperiod
E
weeks
LP
Short photoperiod
B
Kisspeptine (+ cells/ection)
RFRP (+ cells/section)
F
Kisspeptine (+ cells/section)
C
TSH (+cells/PT length)
Dio2 expression (a.u.)
Dio3 (+ cells/section)
G
D
TSHβ
Dio2
Dio3
LP0d
LP7d
LP42d
H
SP12w
SP16w
SP24w

Figure 23. Photoperiodic **(A–D)** and photorefractory **(D–H)** activation of the reproduction in male Djungarian hamsters: **(A & E)** time course of physiological parameters: combined testes weight (g) (blue dotted line), plasma FSH concentration (ng/ml) (red line), combined seminal vesicle weight (g) (green line). **(B & F)** Time course of neuropeptide expression: number of arcuate Kp immunopositive (JLV1 antiserum) neurons per section (red line), number of RFRP-3 immunopositive (GA197 antiserum) neurons per section where groups with different letters indicate significant differences (green line), combined testes weight (g) (grey dotted line). **(C & G)** Time course of the hypothalamic TSH/T3 axis: Dio2 mean staining intensity (a.u.) analyzed by nonradioactive *in situ* hybridization (red line), Dio3 mean staining intensity (a.u.) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization (blue line), *PT* TSHβ positive cells (green line) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization, combined testes weight (g) (grey dotted line). **(D & H)** Representative micrographs of the *in situ* hybridization stain for TSHβ, Dio2 and Dio3: three time points are presented for each reactivation protocol: 0, 2d, 28d of long photoperiod (LP) for the photoperiodic activation; 12, 16, and 24w for the photorefractory reactivation. Scale bars = 100 µm for TSHβ and Dio2 staining and 200 µm for Dio3 staining.

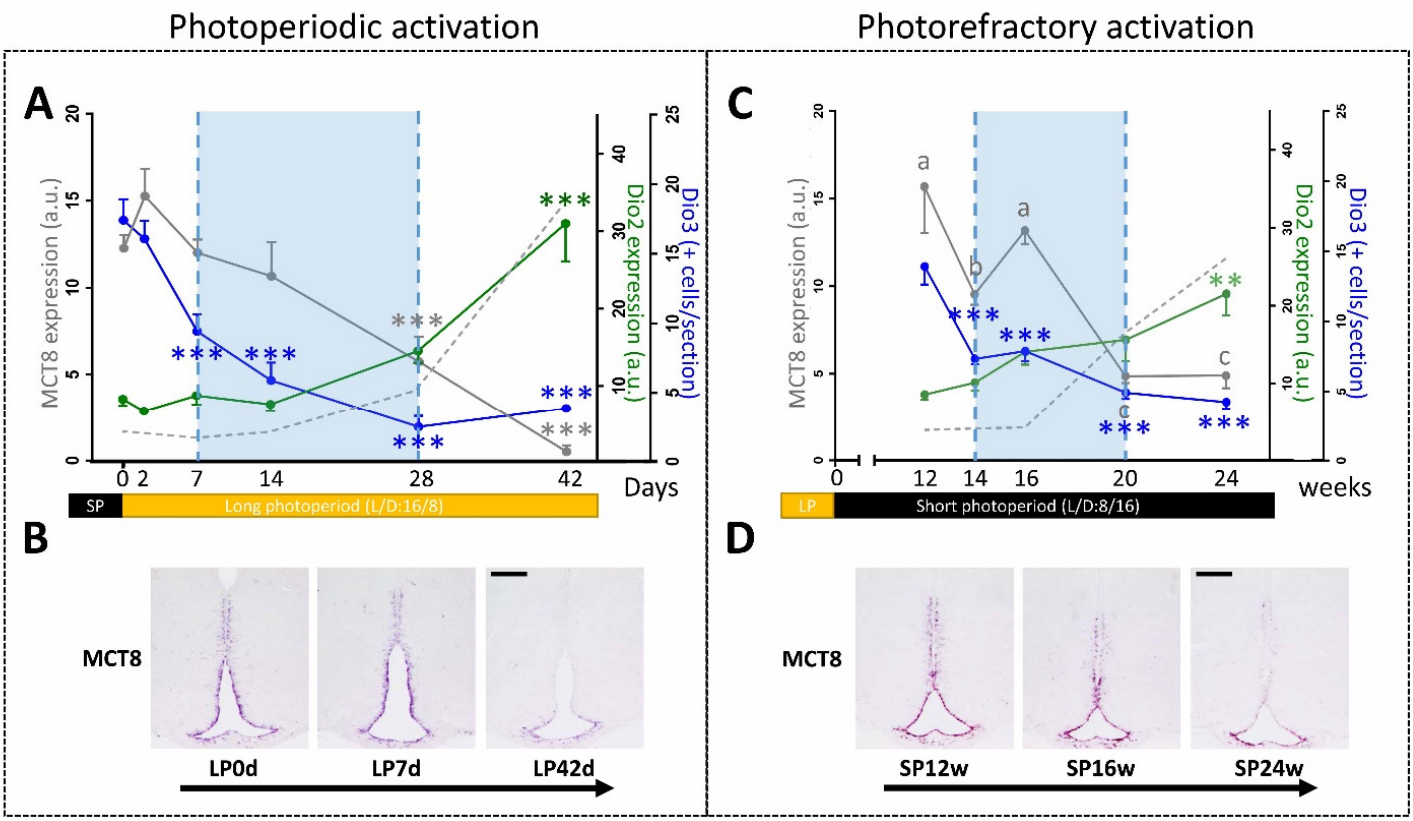


Figure 24. Analysis of the temporal expression of MCT8, Dio2 and Dio3 during photoperiodic **(A & B)** and photorefractory **(C & D)** activation of the reproduction in male Djungarian hamsters: **(A & C)** time course of hypothalamic Dio2, Dio3 and MCT8 expression: Dio2 mean staining intensity (a.u.) analyzed by nonradioactive *in situ* hybridization (green line), Dio3 mean staining intensity (a.u.) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization (blue line), MCT8 mean staining intensity (a.u.) analyzed by non-radioactive *in situ* hybridization where different letters indicate significant differences (grey line), combined testes weight (g) (grey dotted line). The blue shading represents a potential time window of high T3 resulting from reduced Dio3 expression combined with high MCT8 expression. **(B & D)** Representative micrographs of the *in situ* hybridization stain for MCT8 expression. Three time points are presented for each reactivation protocol: 0, 2d, 28d of long photoperiod (LP) for the photoperiodic activation; 12, 16, and 24w for the photorefractory reactivation. Scale bars 200 µm.

III) Discussion

The objective of this study was to integrate a dynamic temporal dimension in the study of the activation of reproductive activity in order to validate the current neuroendocrine model linking changes in photoperiod to changes in reproduction in seasonal species. Our results obtained in two seasonal rodents reveal a very early and conserved decrease in tanycytic Dio3 expression before any significant changes are observed for any of the other investigated parameters, whether the reproductive activation is induced by a long photoperiod or by endogenous photorefraction.

The current model of photoperiod integration and activation of the vertebrate HPG axis was mainly built by comparing the two reproductive states adapted to either LP or SP (Barrett et al., 2007; Dardente et al., 2003; Hanon et al., 2008; Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Revel et al., 2006a; Watanabe et al., 2004; Yoshimura et al., 2003). These investigations have highlighted the LP-induced increase in *PT* TSHβ and tanycyte Dio2, and the decrease in tanycyte Dio3, leading to an increase in hypothalamic T3. Experiments showing that exogenous central administration of TSH or T3 in SP-inhibited hamsters restored reproductive activity led to the hypothesis that this photoperiodic regulation of the intrahypothalamic thyroid hormone metabolism is pivotal for the control of seasonal reproduction(Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007; Klosen et al., 2013). Furthermore, our previous studies showed a marked melatonin-dependent photoperiodic regulation of the reproductive neuropeptides Kp(Revel et al., 2006a) and RFRP(Revel et al., 2008), together with their ability to restore a reproductive LP-like phenotype after central infusion in SP-adapted hamsters (Hazlerigg and Simonneaux, 2015; Revel et al., 2008). Altogether, this led to the hypothesis that TSH and thyroid hormones restore reproductive activity via a regulation of these hypothalamic neuropeptides(Henson et al., 2013; Klosen et al., 2013).

When SD-adapted Syrian and Djungarian hamsters were transferred to a stimulatory LP, a progressive correlated increase in TSHβ and Dio2 is observed, which is in agreement with the current view that TSH secreted from the *PT* acts on its receptors on tanycytes to increase Dio2 expression(Bolborea et al., 2015; Hanon et al., 2008; Ono et al., 2008). Melatonin has been reported to regulate TSHβ and Dio2 expression within a few days(Ono et al., 2008; Tsujino et al., 2013). In sheep, a significant 2.5 fold increase of TSHβ is observed 3 days after the transfer from SP to LP suggesting a fast integration of the new photoperiod (Dardente et al., 2010). Yet, it is unknown what minimum increase in TSH synthesis is required to induce a significant increase in Dio2 activity. A striking observation when both hamster species were transferred to the stimulatory LP, was the very early and sharp decrease in Dio3 gene expression occurring well before any significant changes in TSHβ or Dio2 expression. This finding raises the question of the photoperiodic regulator of tanycytic Dio3 expression. Although earlier work suggested a coordinated opposite TSH-driven regulation of Dio2 and Dio3(Helfer et al., 2013; Nakao et al., 2008; Ono et al., 2008; Watanabe et al., 2007), our data clearly indicate that an early LP-induced TSH-independent mechanism might inhibit Dio3 expression. Interestingly, a recent study analyzing the natural winter to summer activation in the

Djungarian hamster reported a similar decrease in Dio3 several weeks before the increase in Dio2(Petri et al., 2016). Therefore, TSH cannot be a direct upstream regulator of Dio3 in the reproductive reactivation pathway. In silico analysis of the Dio3 promoter reveals potential binding sites for retinoic acid receptors such as RAR or RXR. Retinoic acid might be a good candidate for a seasonal regulator of Dio3 because previous studies already showed that CRBP2, a protein involved in retinoic acid signaling, is an early seasonally regulated gene(Ross et al., 2005). In addition to TSH, other photoperiodically-regulated PT mediators can also be considered. Tanycytes express Neuromedin U receptors, but acute Neuromedin U injections into the cerebral ventricles do not modify Dio3 expression(Helfer et al., 2013). Chromogranin A displays a strong seasonal regulation in the sheep PT(Wood et al., 2015) but its effects on tanycytes are so far unknown.

During photoperiod-induced activation of reproductive activity in the Syrian hamster, a significant increase in FSH secretion was observed after 14 days in LP (like TSHβ/Dio2) followed by the testes weight after 28 days and finally the seminal vesicle weight after 42 days (in agreement with Turek et al., 1975). In the Djungarian hamster, FSH secretion and testis weight were significantly increased after 28 days (2 weeks before TSHβ/Dio2) followed by an increase in seminal vesicle weight 42 days after transfer to LP (in agreement with Schlatt et al., 1993). These findings are in agreement with a previous study in Djungarian hamsters kept in natural conditions showing that testis weight increases before (end of February) TSH and Dio2 expression (end of April)(Petri et al., 2016). Expression of the reproductive neuropeptides RFRP and Kp was also increased only 2 weeks after FSH in Syrian hamsters and either unchanged (RFRP) or decreased (Kp) 2 weeks after the FSH increase in Djungarian hamsters. In a previous study, we showed that a chronic intracerebroventricular TSH administration in SP-adapted Syrian and Djungarian was able to restore a long day pattern of Kp and RFRP expression and sexual activity(Klosen et al., 2013). In the present study, the comparative kinetics of TSHβ, Kp/RFRP, FSH and testis weight in both hamster species during transfer from inhibitory SP to stimulatory LP clearly suggest that other, faster, mechanisms must occur in addition to the TSH-driven increase in Kp/RFRP stimulation of the reproductive axis (Ancel et al., 2012; Clarke et al., 2008; Klosen et al., 2013; Revel et al., 2006a). Such mechanisms could involve a direct interaction between the tanycytes and the GnRH neuron terminals as already described during puberty onset and at the preovulatory LH surge(Garcia-Segura et al., 2008; Ojeda et al., 2010; Prevot et al., 1999a). Tanycyte processes cover GnRH nerve terminals at the level of the neurohemal junction and this glial coverage can modulate the reproductive status. This interaction could involve an effect of T3 via a rapid switch in the tanycytic Dio2/Dio3 balance associated with a high expression of the thyroid hormone transporter MCT8 (see Dezonne et al., 2015 for review) or an effect of prostaglandin E2, as observed during the preovulatory LH surge (Carlson et al., 1974). Prostaglandin E2 produced by the tanycytes directly stimulates GnRH neurons via EP1 and EP2 receptors located on the GnRH terminals and cell body respectively (Clasadonte et al., 2011a, 2011b). The EP2 receptor is a Gs coupled receptor which increases the firing rate of GnRH neurons by a PKA dependent

pathway{Cit(Clasadonte et al., 2011b)ation}. The EP1 receptor is a Gq coupled receptor, increasing GnRH release through an increase of the intracellular calcium concentration at the GnRH terminal (Clasadonte et al., 2011b). Further in vitro and in vivo pharmacological experiments will be required to disclose the mechanisms underlying this fast, neuropeptide-independent, seasonal activation of gonadotropin secretion.

Seasonal species kept in constant environmental conditions may display spontaneous changes in reproductive activity involving two different mechanisms. Circannual species, like sheep and the European hamster (Cricetus cricetus), show sustained cycles of reproductive activation and inactivation, whereas SP photorefractory species like Syrian and Djungarian hamsters show a spontaneous and stable reactivation of their gonadal activity after several weeks in constant SP (see Hazlerigg and Lincoln, 2011; Lincoln et al., 2005 for review). The cellular mechanisms driving these long-term spontaneous changes in reproductive activity are still unknown.

As for the photoperiodic activation of the gonadotropic axis, this endogenous photorefractory activation appears to be triggered by an early decrease of tanycyte Dio3 expression. As expected, the spontaneous increase in testes and seminal vesicle weight occurred between 20–24 weeks in both species(Schlatt et al., 1993; Turek et al., 1975). This gonadal activation was preceded by an increase in circulating FSH only in the Syrian hamster. Surprisingly and contrary to a previous study (Schlatt et al., 1995), we did not observe such an increase of FSH in the Djungarian hamster. Even more surprisingly, as for the photoperiodic activation, RFRP and Kp both responded only about 4 weeks after the increase in testes weight in both species. Furthermore, TSHβ and Dio2 remained at constant low levels in the Syrian hamster, and displayed only a slight and late increase in the Djungarian hamster.

Altogether these observations support the hypothesis that the spontaneous photorefractory reactivation of the reproductive axis is independent of TSH production by the *PT* and Dio2 activity in the tanycytes. Again, the reduction in Dio3 expression appears to be the trigger for this photorefractory activation. This observation is in clear contrast with the mechanisms involved in circannual rhythms, where significant changes in TSHβ and Dio2 were observed in correlation with the reproductive status of the European hamster kept in constant conditions (Sáenz de Miera et al., 2014) or the sheep placed in photorefractory LP or SP conditions(Sáenz de Miera et al., 2013).

Interestingly, the LP-induced or photorefractory-driven decrease in Dio3 is initially associated with a stable high level of MCT8. Therefore, the inhibition of the thyroid hormone catabolizing enzyme Dio3 associated with high MCT8-driven thyroid hormone intake may be sufficient to create a functionally significant peak of T3 during a time window occurring just before the activation of gonadotropin secretion and gonadal activation (blue shading in Fig. 26). T3 administration to SP-inhibited hamsters was shown to be sufficient to restore an active gonadotropic axis (Barrett et al., 2007; Henson et al., 2013) but so far the cellular targets of T3 for the seasonal control of reproduction have remained unidentified. The reproductive neuropeptide RFRP and Kp have been

proposed to be regulated by hypothalamic T3 (Helfer et al., 2013; Klosen et al., 2013). However, our temporal analysis of LP-induced and photorefractory reactivation of the HPG axis shows that FSH secretion is increased several weeks before detectable changes in RFRP and Kiss1 expression. Thus, we have to look for new potential targets of thyroid hormones for the early stages of the reactivation of the gonadotropic axis, maybe the tanycytes themselves. Indeed, a recent study showed that T3 appears to regulate genes such as Tmem252, Cndp1, Myl2 and Elovl3 in tanycytes in an autocrine/paracrine manner(Lomet et al., 2017).

The comparative analysis of the dynamic LP-induced and spontaneous SP refractory reactivation of the reproductive axis may help to better understand the underlying neuroendocrine mechanisms involved in both phenomena, especially because these mechanisms appear conserved in both hamster species. One striking observation is the early decrease in tanycytic Dio3, independent of measurable changes in *PT* TSHβ expression in both LP-induced and photorefractory activation of the HPG axis. This finding indicates that Dio3 expression can be regulated by TSH-independent mechanisms. In LP stimulated hamsters, this decrease could be driven by a melatonin independent effect of light, but in photorefractory hamsters other mechanisms either intrinsic to the tanycytes or in upstream structures must trigger this decrease. As previously suggested, retinoic acid signaling appears as a candidate for this regulation. Alternatively, epigenetic methylation of DNA is also known to regulate Dio3 during the seasonal cycle(Stevenson and Prendergast, 2013). Finally, miRNAs such as miR-155 and miR-200 which regulate GnRH directly as well as its transcriptional regulators during puberty might also be involved in this seasonal activation of the gonadotropic axis(Messina et al., 2016).

IV) Conclusion

Our dynamic approach including temporal information challenges the current hypothetic pathway responsible for the photoperiod dependent and the photorefractory reactivation of the reproduction. We suggest the existence of 2 pathways for the reactivation of reproduction. A first pathway is Dio3 dependent and might trigger HPG reactivation via a thyroid hormone spike. The second pathway is TSH, Dio2 and neuropeptide dependent. This pathway is triggered after the first one to sustain and stabilize the reactivation. Future studies will have to identify the photoperiodic trigger for changes in Dio3, as our study shows that the previously identified trigger for Dio2 changes, the *PT* produced TSH, clearly cannot be the trigger for changes in Dio3 expression.

V) Material and Methods

Animals.

Animal experimentation was conducted in accordance with the French National Law implementing

the European Communities Council Directive 2010/63/EU and the French Directive 2013-118. All animal procedures were reviewed and validated by the Animal Welfare Committee of the Animal Resource and Experimentation platform (Chronobiotron UMS 3415) of the Strasbourg Institute of Neuroscience. All efforts were made to minimize the number of animals used. Male Syrian hamsters (Mesocricetus auratus) and Djungarian hamsters (Phodopus sungorus) were bred and raised in our animal facilities. They were housed in a controlled photoperiod with constant temperature (20 °C +/− 2 °C), hygrometry (50% +/− 5%) and food and water ad libitum. After birth, Syrian hamsters were maintained in a long photoperiod (LP) of 14 hours of light and 10 hours of dark and Djungarian hamsters in 16 hours of light and 8 hours of dark to maintain a sexually active status. Animals started the experimental protocol after puberty and were between 3 and 12 months old at the day of the sacrifice.

For the photoperiodic investigation, 36 adult LP adapted Syrian and Djungarian hamsters were transferred to a short photoperiod (SP) (respectively 10 hours of light and 14 hours of dark or 8 hours of light and 16 hours of dark) for 10 weeks to induce a full inhibition of their reproductive axis. Then, they were switched back to LP and were sacrificed (6 animals per group) after 0, 2, 7, 14, 28 or 42 days of LP exposure.

For the photorefractory investigation, 30 adult LP adapted Syrian and Djungarian hamsters were transferred to SP and were sampled (6 animals per group) after 12 (SP12w), 14 (SP14w), 16 (SP16w), 20 (SP20w) or 24 (SP24w) weeks.

Tissue sampling.

Animals were euthanized during the early light phase (ZT6 to ZT8) by CO2 inhalation. Blood was sampled by intracardiac puncture. The hamsters were fixed by transcardiac perfusion with periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. After fixation, the seminal vesicles were cut at their very basis and weighed immediately while taking care to avoid loosing seminal fluid. Both testes were dissected out and weighed. Brains were post fixed by immersion in fixative solution during 12 h, dehydrated and then embedded in polyethylene glycol(Klosen et al., 1993). Serial 10 µm thick sections were cut from the beginning of the *PT* to the end of the mammillary recess with a microtome, mounted on SuperFrost® Ultra Plus slides (Thermo Scientific, MA, USA), dried for 15 min at 60 °C and stored at −80 °C until analysis.

Non-radioactive *in situ* hybridization.

Riboprobes for genes encoding TSHβ, Dio2, Dio3, RFRP, Kiss1 and MCT8 (SLC16A2) (Supplemental Table 1) were transcribed from linearized plasmids in the presence of digoxigenin-labeled nucleotides according to standard procedures (DIG RNA labeling mix, Roche ref 11 277 073 910; DIG RNA Labeling Kit SP6/T7, Roche ref 11 175 025 910; Meylan, France). The *in situ* hybridization was performed as previously reported (Henningsen et al., 2016). Briefly, polyethylene glycol sections were postfixed, digested for 30 min at 37 °C with 0.5 µg/ml Proteinase K (Roche Ref 03 115 828 001, Meylan, France) and acetylated twice for 10 min in 100 mM triethanolamine and 0.25% acetic anhydride. Hybridization was performed for 40 h at 60 °C with 200 ng/ml labeled probes in 50% formamide, 5x SSC, 5x Denhardt's solution and 1 mg/ml salmon sperm DNA. Stringency rinses were performed for 6 × 10 min in 0.1x SSC at 72 °C. Digoxigenin labeled probes were detected with alkaline phosphatase labeled anti-digoxigenin antibodies (Roche ref 11 093 274 910, Meylan, France). Alkaline phosphatase activity was detected with bromochloroindolyl phosphate and nitroblue tetrazolium. Section were covered with CC/Mount™ (Sigma Aldrich ref C9368, MO, USA) and then coverslipped with Eukitt® (Sigma-Aldrich ref 03989, MO, USA).

Immunohistochemistry.

In intact Djungarian hamsters, Kiss1 mRNA levels in the arcuate nucleus are particularly low, especially in long photoperiod due to a strong negative sex steroid feedback(Rasri-Klosen et al., 2017). This makes quantitative analysis of Kiss1 mRNA is difficult and unreliable. Therefore, we measured Kp expression by immunohistochemistry which provides a stronger signal easier to quantify. For consistency in peptide analysis, RFRP expression was also analyzed by immunohistochemistry in this species.

Kp immunoreactive neurons were visualized as previously described by an avidin-biotin detection system using a primary antiserum raised against full-length rat kisspeptin-52 (JLV-1)(Mikkelsen and Simonneaux, 2009) diluted 1/1,500. JLV1 shows no cross-reactivity with other members of the RFamide family of peptides (Desroziers et al., 2010). Djungarian hamster kisspeptin peptide sequence is identical to that of the mouse, and the specificity of JLV1 in the Djungarian hamster has previously been described (Rasri-Klosen et al., 2017). Bound Kp antibodies were detected by a 60 min incubation with biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (1/2,000; Jackson ImmunoResearch ref 711-065-152, PA, USA), followed by a 60 min incubation with Neutravidin HRP (Thermo Scientific ref 31030, MA, USA). Sections were developed for 30 min in 0,5 mg/ml Diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich ref D7304, MO, USA) and 0.003% H2O2 in Tris-Imidazole buffer (pH 7.5), resulting in a brown precipitate. Sections were dehydrated and then coverslipped with Eukitt® (Sigma-Aldrich ref 03989, MO, USA). RFRP-3 neurons were visualized with a rabbit anti RFRP-3 antiserum (antiserum GA197, kindly provided by G. Anderson (Rizwan et al., 2009)) diluted at 1/1,500. Djungarian hamster RFRP sequence shows only one Arginine to Serine substitution on the carboxyterminal amino acid of the immunogen sequence used by Rizwan et al., 2009 and the

specificity of this antiserum for the Djungarian hamster has been previously described49. Primary antibodies were visualized with a donkey anti-rabbit secondary antibody coupled to AlexaFluor 594 (Invitrogen ref A-21207, CA, USA) diluted at 1/1,000. The sections were then coverslipped with 60% glycerol in phosphate buffered saline containing 0.02% Sodium Azide and 2.5% Diazabicyclooctane. (Sigma-Aldrich ref D2522, MO, USA).

Image analysis and Statistics.

For counts of the kisspeptin cells in the Arc, as well as RFRP cells, care was taken that the sampling included sections rostrally and caudally of these structures that did not contain labelled kisspeptin or RFRP cells in order to be certain that our sampling included the full extent of the structure of interest. For each gene/peptide analyzed, a series of 8 to 10 sections per animal, taken every 90 µm for the Djungarian hamster and every 130 µm for the Syrian hamster, was collected.

All slides of each experiment were processed at the same time to ensure identical treatment and development conditions for semi-quantitative image analysis. Maximum care was taken to avoid signal saturation during the development step. After *in situ* hybridization, micrographs were taken on a Leica DMRB microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) with an Olympus DP50 digital camera (Olympus France, Rungis, France). For semi-quantitative evaluation of the *in situ* hybridization, all lighting parameters on the microscope and the camera software (Viewfinder Lite; Olympus) were standardized to ensure consistent stable lighting throughout the image capture procedure. All images for semi-quantitative staining intensity analysis were recorded as 256-level grayscale tagged image file format images. A background image of the slide without a section was taken for each slide. The images were then analyzed using the ImageJ software (W. S. Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The background image was subtracted from the corresponding sample image to compensate for inhomogeneities in the illumination of the image field.

Kisspeptin and RFRP analysis was done respectively in the arcuate nucleus and in the dorsal mediobasal hypothalamus. For Kiss1 *in situ* hybridization, the mean integrated density was measured with a fixed-size circle surrounding the labeled cells. Neurons were randomly selected in the arcuate nucleus provided the nucleus of the neuron was clearly visible. The mean integrated density was determined by measuring a minimum of 50 cells. Preliminary experiments showed that 50 cells are enough to provide a stable mean labeling intensity. For RFRP *in situ* hybridization, and for Kp and RFRP immunohistochemical analysis, positive cells were counted only if the nucleus was clearly visible. The number of cells counted was then normalized by the number of sections analyzed located in the region of interest for the neuropeptides.

Dio2 analysis was done on the tanycyte end feet in the tuberoinfundibular sulcus, while Dio3 and MCT8 were analyzed in the alpha tanycyte cell bodies. For Dio2 and MCT8 *in situ* hybridization we measured the background corrected mean pixel gray value in an area selected using the line tool of

ImageJ software with the line width adapted to cover the cell body layer. In the Djungarian hamster, Dio3 *in situ* hybridization was quantified by the same method described above for Dio2 and MCT8. In Syrian hamsters however, the number of positive cells was low and positive tanycytes were well separated, thus we simply counted the stained cells along the mediobasal hypothalamus and normalized the counts by the number of sections analyzed.

TSHβ was analyzed in the *PT*. We counted the number of TSHβ positive cells, which was then normalized by the length of *PT* that was sampled.

For each analyzed gene or peptide, the final value shown in the figures is the mean of the individual values obtained for 5 to 6 animals. Although the initial number of animals was 6 per group, for some analyses one animal had to be excluded because the region of interest was not properly exploitable.

FSH Assay.

Plasma FSH levels were determined in a volume of 50 µl using an RIA kit, as described previously(Ancel et al., 2012).

Statistical analyses.

Results are shown as mean ± SEM (n = 5–6 per group). The data were analyzed by multiple group comparisons using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey's Honestly Significant Difference post-hoc test, as appropriate. Statistical significance was set at Pvalue < 0.05.

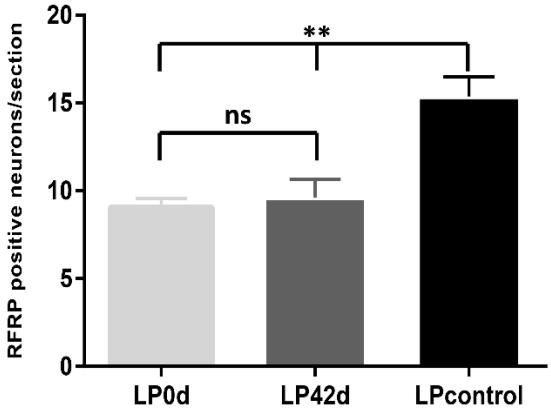
VI) Acknowledgements

This study was conducted at the Animal Resource and Experimentation platform/Chronobiotron of the Strasbourg Institute of Neuroscience (UMS 3415). We thank Prof. Manuel Tena-Sempere for help with hormonal analysis. Furthermore, we thank Dr Dominique Ciocca, Dr. Matthew Beymer, Fernando Cazerez Marquez, Marion Ciancia and Marie-Pierre Laran-Chich, and the staff at the Chronobiotron for their help and assistance with animal care.

VII) Supplemental Informations

Gene	Probe Length (bp)	Species of origin	location in the CDS	Genbank
TSHβ	365	Rattus norvegicus	2610-2975	XM_008761373
Deiodinase 2	760	Mesocricetus auratus	442-1402	XM_005083985
Deiodinase 2	725	Phodopus sungorus	1-725	KC741502
Deiodinase 3	1147	Phodopus sungorus	1-1147	MF662622
Kisspeptin	266	Rattus norvegicus	90-359	NM_181692
RFRP	440	Phodopus sungorus	87-529	JF727837
MCT8	1092	Phodopus sungorus	1-1092	MF662621

Supplemental Table 1 : *In situ* hybridization riboprobes



Supplemental Figure 1: RFRP immunopositive cells (GA197 antiserum) per section in the Djungarian hamster:

LP0d and LP42 values were obtained from short photoperiod adapted animals (LP0d) and short photoperiod adapted animals switched back to long photoperiod for 42 days (LP0d). LP control group animals were raised in long photoperiod (16h light / 8h dark) since birth. Non-parametric t-test.

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

PARTIE N°2

Quel est le rôle des neuropeptides dans l'initiation de la réactivation photopériodique de la reproduction ?

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

I) Introduction

Les neuropeptides sont des peptides sécrétés par des neurones et dont la longueur peut aller de quelques acides aminés (3 pour la thyréolibérine TRH) jusqu'à plusieurs dizaines (199 pour la prolactine). Dans cette famille, il existe plusieurs sous familles dont celle des RFamides. Ces derniers ont la particularité de se terminer par le motif Arginine (R) - Phénylalanine (F) et dont la fonction carboxy terminale est amidée, d'où le nom de RFamide. Ils sont représentés notamment par le RFRP3, la Kp ou le Pyroglutamylated RFamide peptide (26RFa). Leur expression dans le système nerveux central est majoritairement hypothalamique (Findeisen et al., 2011). Ils agissent via des récepteurs couplés aux protéines G sur des fonctions biologiques telles que la reproduction, la prise alimentaire ou la prise de boisson (Ancel et al., 2012; Ansel et al., 2011; Chartrel et al., 2016; Findeisen et al., 2011; Kriegsfeld et al., 2006; Patel et al., 2008; de Roux et al., 2003).

La Kp est exprimée dans le noyau arqué et l'aire antéro ventrale péri ventriculaire (AVPV, Colledge, 2008; Revel et al., 2006) et son récepteur, le Kiss1R (anciennement GPR54), est exprimé dans plusieurs structures hypothalamiques, notamment sur les neurones à GnRH (Herbison et al., 2010). Sa stimulation par la Kp entraîne une augmentation du calcium intracellulaire via une protéine Gq (Kotani et al., 2001), ce qui entraîne une plus grande excitabilité au niveau du corps cellulaire et un relargage plus important des vésicules synaptiques à la terminaison axonale du neurone à GnRH. Chez le hamster syrien, l'administration chronique de Kp soit centrale (Revel et al., 2006), soit périphérique (Ansel et al., 2011) est capable de renverser la régression des gonades causée par une SP.

Le RFRP est exprimé dans le DMH (Revel et al., 2008) et son récepteur NPFFR1 (anciennement GPR147) est exprimé dans plusieurs structures hypothalamiques, notamment sur les neurones à GnRH et les neurones à Kp (Henningsen et al., 2016; Rizwan et al., 2012). L'effet du NPFFR1 passe par différentes protéines G en fonction de la concentration du ligand. Pour une dose entre 10^{-9} et 10^{-5}M, l'effet sera médié par une protéine Gs et aura donc un effet stimulateur alors qu'entre 10^{-9} et 10^{-13} M, l'effet sera médié par une protéine Gi et sera donc inhibiteur (Akazome Y., 2015). RFRP est régulé par la photopériode, avec une inhibition en SP causée par une production plus importante de mélatonine (Revel et al., 2008). Tout comme son récepteur, son effet physiologique sur l'axe reproducteur chez le hamster est également bimodal. Il peut être stimulateur et son injection chronique peut renverser la régression des gonades due à une exposition en SP (Ancel et al., 2012). Le RFRP peut être inhibiteur chez les femelles pour réguler le pic de LH préovulatoire et chez des animaux en LP (Henningsen et al., 2016; Ubuka et al., 2012). Le RFRP a également un effet stimulateur sur la prise alimentaire chez la gerboise (Talbi et al., 2016) et la prise de poids chez le hamster djungarien mâle adapté en SP. (Cazarez Márquez et al., Soumis).

Le 26RFa est exprimé dans l'hypothalamus latéral et ventromédian (Chartrel et al., 2016). Via la stimulation de son récepteur GPR103 couplé aux protéines Gq et Gi (Findeisen et al., 2011), il est capable d'augmenter la prise alimentaire et le métabolisme énergétique chez la souris (Takayasu et

al., 2006) ainsi que de stimuler l'axe reproducteur chez le rat (Navarro et al., 2006b; Patel et al., 2008). En effet, il stimule la sécrétion de gonadotropines avec un effet dose dépendant au niveau de l'hypophyse. Au niveau central, il est également capable de stimuler l'axe gonadotrope chez les femelles, mais pas chez les mâles (Navarro et al., 2006b). Pourtant le 43Rfa, agoniste du même récepteur GPR103, est capable de stimuler centralement la sécrétion de gonadotropines chez le mâle, ce qui confirme la présence de récepteurs capables de réguler les neurones à GnRH chez ce dernier (Patel et al., 2008). Le 26Rfa est également sécrété par l'intestin et le pancréas dans le sang suite à l'ingestion de glucose. Il agit dans ce cas comme une incrétine en potentialisant l'effet de l'insuline et en diminuant l'hyperglycémie induite par le glucose (Chartrel et al., 2016).

Jusque récemment, la littérature proposait que les neuropeptides Kp et RFRP3 étaient des chaînons indispensables de la réactivation photopériodique de la reproduction, puisqu'ils sont régulés photopériodiquement et que leur injection réactive l'axe reproducteur chez des animaux photoinhibés (Ancel et al., 2012; Ansel et al., 2011; Revel et al., 2006a). Cependant, des études récentes ont montré que la différence photopériodique de l'expression de la Kp était majoritairement due au rétrocontrôle des stéroïdes sexuels et non à un effet saisonnier direct (Rasri-Klosen et al., 2017; Sáenz de Miera et al., 2014). De plus mon travail sur la cinétique de la réactivation tant photopériodique que photoréfractaire remet en cause le rôle des neuropeptides dans la réactivation de la reproduction, puisque le niveau d'expression de ces deux neuropeptides ne change qu'après l'activation de l'axe HPG. Aucune étude photopériodique saisonnière n'a été menée pour déterminer si le 26RFa jouait un rôle saisonnier. Dans un premier temps, j'ai donc évalué le rôle du RFRP3 dans le processus de réactivation de la reproduction en analysant l'effet d'une infusion chronique d'un nouvel antagoniste du récepteur NPFFR1, le RF3286, généré par l'équipe du Dr Frédéric Simonin (ESBS de Strasbourg). En effet, des études préliminaires de l'équipe ont montré que le RF3286 est capable d'abolir l'effet stimulateur du RFRP3 sur la sécrétion de LH chez le hamster syrien (Henningsen et al., thèse 2016). Dans un deuxième temps, j'ai commencé à évaluer le rôle possible du 26RFa dans les fonctions saisonnières en étudiant son expression photopériodique dans l'hypothalamus des hamsters syrien et djungarien par qPCR et hybridation *in situ*.

II) Résultats

a) L'infusion chronique de RF3286 n'altère pas l'activité de reproduction induite par la LP

Le but de cette expérience était d'évaluer chez des hamsters syriens mâles si le traitement chronique avec un antagoniste du NPFF1R (le RF3286) est capable d'inhiber ou non, l'activité de reproduction d'animaux adaptés en LP (14h lumière/10h obscurité). Dans un deuxième temps, j'ai aussi analysé l'effet du même traitement sur des animaux en cours de réactivation lors d'un transfert d'une SP inhibitrice (10h lumière/14h obscurité) à une LP activatrice. Pour cette expérience, j'ai utilisé deux groupes de hamsters : un groupe en LP constante et un groupe qui avait été placé en SP pendant 11 semaines afin d'inhiber leur axe gonadotrope. Les hamsters ont été implantés dans un

des ventricules latéraux avec une canule d'injection connectée à une minipompe osmotique, elle-même placée sous la peau du dos (selon le protocole décrit dans Henningsen et al., 2016). Elle contenait soit du liquide céphalorachidien artificiel (aCSF), soit le RF3286 dilué dans du aCSF infusé à 1.24µmoL/h pendant 6 semaines. Juste après la chirurgie, tous les animaux ont été placés en LP. Pour chaque animal des 4 groupes expérimentaux (LP constant aCSF ; LP constant RF3286 ; SP vers LP aCSF, SP vers LP RF3286 ; n= 8/groupe) la masse corporelle et la prise alimentaire ont été mesurées deux fois par semaine pendant les 6 semaines de traitement. A la fin de l'expérience, les animaux ont été euthanasiés et trois groupes de données ont été collectés : les paramètres métaboliques (variations de masse corporelle et de prise alimentaire moyenne quotidienne), les paramètres reproductifs (masse des testicules et des vésicules séminales) et l'expression des neuropeptides régulateurs des neurones à GnRH (Kiss1 mRNA dans le noyau arqué et RFRP mRNA dans le DMH, selon le protocole décrit dans Milesi et al., 2017).

i) Effet du RF3286 sur la prise alimentaire et la masse corporelle du hamster syrien mâle

Chez les animaux en LP constante, la perte de masse suite à la chirurgie pour la pose des minipompes est comprise entre 5 et 10% avec environ 90% de cette perte lors de la première semaine post-opératoire **(Fig. 25)**. Cette perte s'est stabilisée sur les 5 semaines d'infusions restantes, mais n'a jamais été complètement compensée **(Fig. 25)**. Chez les animaux ayant subi un transfert SP à LP, la perte de masse dans la première semaine post-opératoire est similaire aux animaux en LP constante, avec une perte comprise entre 5 et 10%, partiellement compensée dans les 5 semaines suivantes avec une réaugmentation de la masse corporelle de 4 à 6%, induisant une perte nette sur l'ensemble de l'expérience de seulement 1 à 6% chez ces animaux **(Fig. 25)**. Dans ces deux groupes, les variations de masses corporelles sont similaires entre les hamsters ayant reçus le aCSF ou le RF3286.

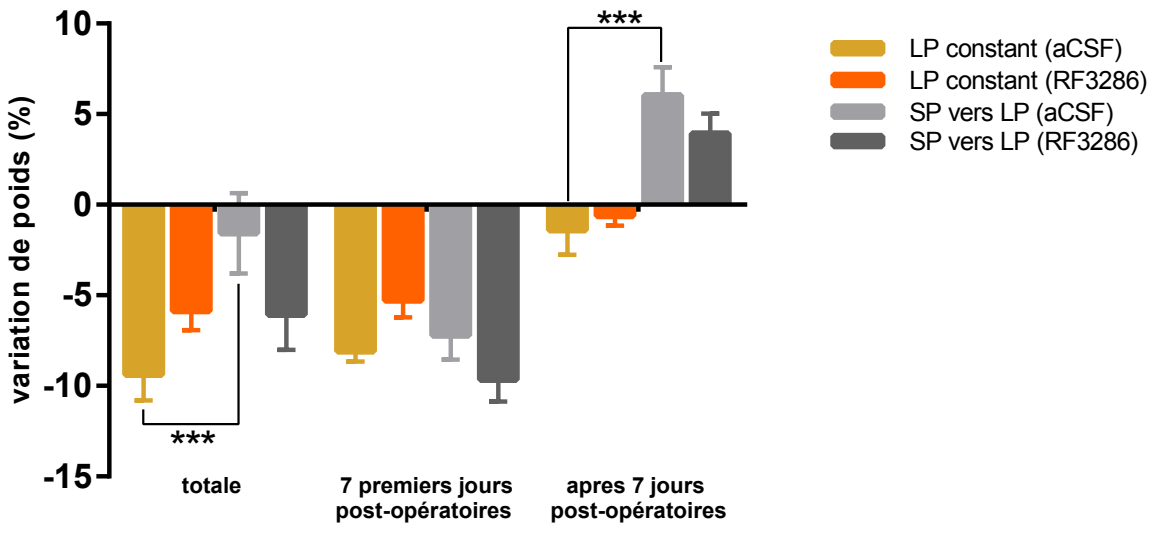


Figure 25 : Effet d'une infusion centrale chronique (6 semaines) d'un antagoniste NPFF1r (RF3286) sur la masse corporelle chez des animaux élevés en LP constante suite à une réactivation photopériodique.

Le poids de référence était soit le poids avant chirurgie pour la variation « totale » et la variation des « 7 premiers jours post opératoires », soit le poids à 7 jours post-opératoires pour « la variation de poids après 7 jours post-opératoires » représentation du pourcentage de variation moyenne ± SEM, pour n=8 par groupe, analyse statistique par analyse de variance à un facteur, * si 0.05<p< 0.01, ** si 0.01<p<0.001, *** si 0.001<p<0.0001.

Sur l'ensemble de l'expérience, les animaux transférés de SP en LP ont eu une prise alimentaire plus faible que les animaux élevés en LP constante **(Fig. 26)**. Chez l'ensemble des animaux, une diminution significative de la prise alimentaire moyenne a été observée pendant la première semaine suivant la chirurgie, puis elle s'est stabilisée par la suite. Un effet significatif du RF3286 n'est observé que chez les animaux maintenus en LP. Pendant les 7 premiers jours postopératoires, la prise alimentaire était significativement plus faible chez les animaux non traités (4.2g/jour) que chez les animaux traités avec du RF3286 (5.8g/jour) **(Fig. 26)**. Sur l'ensemble de l'expérience, la prise alimentaire moyenne est identique dans les deux groupes avec une prise alimentaire moyenne de 6.7g/ jour **(Fig. 26)**.

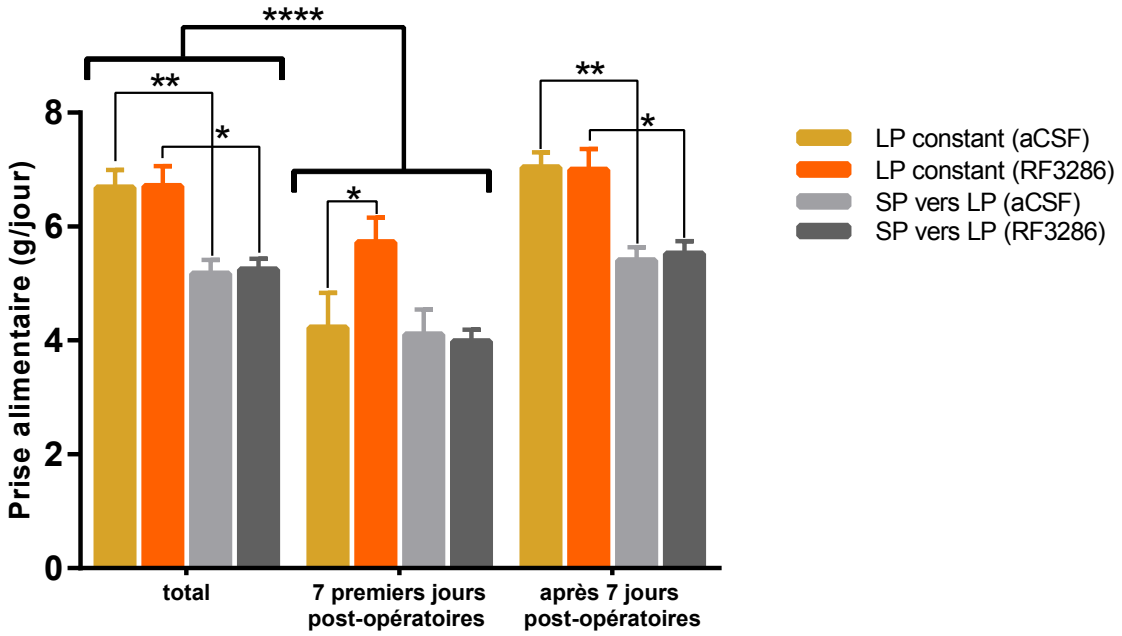


Figure 26 : Effet d'une infusion centrale chronique (6 semaines) d'un antagoniste NPFF1r (RF3286) sur la prise alimentaire quotidienne suite à une réactivation photopériodique ou chez des animaux élevés en photopériode constante.

Prise alimentaire quotidienne moyenne exprimée en gramme par jour ± SEM, représentation de la prise alimentaire quotidienne moyenne sur l'ensemble de l'expérience : « totale », sur les 7 premier jours post opératoires: « 7 premiers jours post opératoires » et sur les jours postérieurs au 7 jours post-opératoires: « aprés 7 jours post opératoires ». n=8 par groupe, analyse statistique par analyse de variance à 2 facteurs, * si 0.05<p< 0.01, ** si 0.01<p<0.001, *** si 0.001<p<0.0001, **** si p<0.0001.

ii) Effet du RF3286 sur les paramètres reproducteurs du hamster syrien mâle.

Au bout de 6 semaines de transfert en LP, la masse des testicules est similaire à celle des animaux maintenus en LP. Cependant, la masse des vésicules séminales est quant à elle plus faible chez les animaux ayant préalablement subi l'inhibition photopériodique par rapport aux animaux conservés en LP. Dans tous les cas, le traitement chronique avec l'antagoniste n'a eu aucun effet significatif sur ces paramètres reproducteurs **(Fig.29)**.

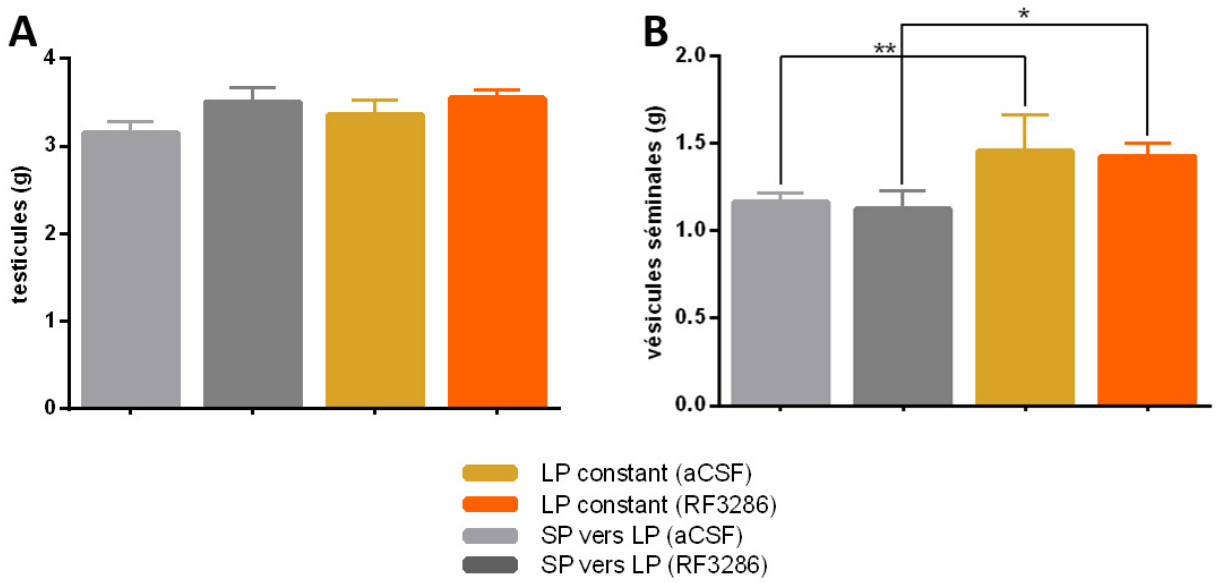


Figure 27 : Effet d'une infusion centrale chronique (6 semaines) d'un antagoniste NPFF1r (RF3286) sur les paramètres reproducteurs suite à une réactivation photopériodique ou chez des animaux élevés en photopériode constante.

La masse testiculaire représente la masse des deux testicules en g et la masse des vésicules séminales représente la masse des deux vésicules pleines de liquide séminal en g. n=8 par groupe, analyse statistique par analyse de variance à 1 facteur, * si 0.05<p< 0.01, ** si 0.01<p<0.001, *** si 0.001<p<0.0001, **** si p<0.0001.

iii) Effet du RF3286 sur l'expression des gènes codants pour Kp dans le noyau arqué de l'hypothalamus

L'infusion d'antagoniste RF3286 au cours des 6 semaines de transfert de SP a entrainé une augmentation significative de plus de 40% de l'intensité intégrée du marquage des ARNm Kiss1 dans les corps cellulaires des neurones du noyau arqué **(Fig. 28)**.

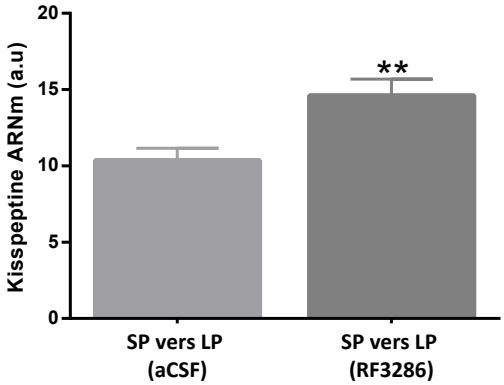


Figure 28 : Effet d'une infusion centrale chronique (6 semaines) d'un antagoniste NPFF1R (RF3286) sur l'expression du gène codant pour les neuropeptides Kp dans le noyau arqué lors d'un transfert de SP (SP) à longue (LP) .

L'analyse a été faite à la fin du traitement. Le niveau d'expression de Kp est indiquée en intensité intégrée moyenne sur le corps cellulaire des neurones du noyau arqué. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n= 8); statistique éffectuée par un test t de Welch, ** si 0.01<p<0.001

b) Le 26 RFa n'est pas régulé par la photopériode

Le but de cette expérience était d'évaluer chez deux rongeurs saisonniers, les hamsters syriens et djungariens, si le peptide 26RFa présente des variations photopériodiques ou non. Des hamsters syriens et djungariens mâles ont été adaptés à une LP activatrice (respectivement 14h lumière/ 10h obscurité pour le hamster syrien et 16h lumière/ 8h obscurité pour le hamster djungarien) ou une SP inhibitrice (respectivement 10h lumière/ 14h obscurité pour le hamster syrien et 8h lumière/ 16h obscurité pour le hamster djungarien). L'expression du gène codant pour le 26RFa a été mesurée dans l'hypothalamus par qPCR chez le hamster syrien (n = 4) sur des explants hypothalamiques ou par hybridation *in situ* chez le hamster djungarien (n = 6) en comptant les neurones positifs dans l'hypothalamus latéral. Cette expérience a permis d'ajouter une localisation neuroanatomique absente de l'étude par qPCR faite chez le hamster syrien. Le 26RFa étant aussi sécrété au niveau de l'intestin dans le sang, le peptide circulant a été mesuré par RIA dans les deux espèces (n=9 chez le hamster syrien et n=3 chez le hamster djungarien).

i) Chez le hamster syrien

Chez le hamster syrien, ni l'expression du gène codant pour le 26RFa analysée par qPCR dans les explants hypothalamiques, ni la quantité de peptide circulant dans le plasma par RIA ne montrent de différence photopériodique **(Fig. 29)**.

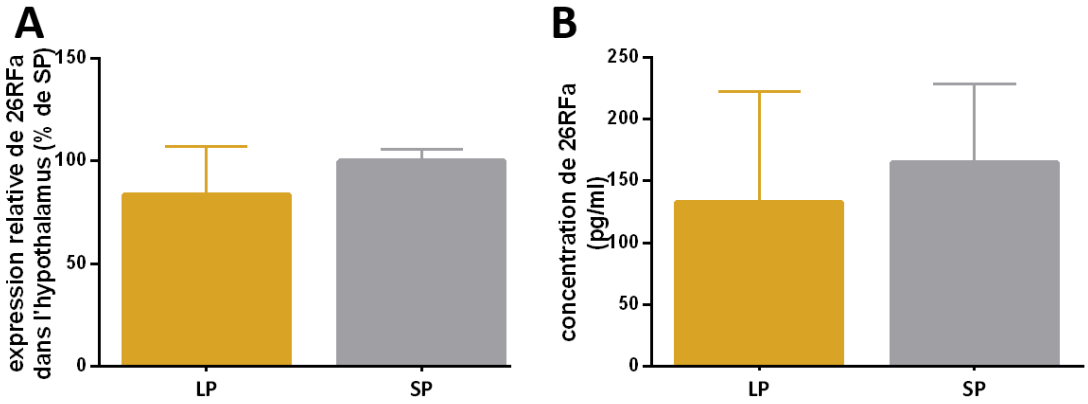


Figure 29 : Effet de la photopériode sur l'expression du gène codant pour le 26RFa dans l'hypothalamus et sur la concentration plasmatique circulante du 26RFa chez le hamster syrien.

(A) Analyse par qPCR du niveau d'expression de 26RFa dans l'hypothalamus (N=4 par groupe) **(B)** Concentration de 26RFa dans le plasma obtenue par RIA (N=9 par groupe) ; LP : photopériode longue ; SP: photopériode courte

ii) Chez le hamster djungarien

Chez le hamster djungarien, l'expression du gène codant pour 26RFa mesurée par hybridation *in situ* dans l'hypothalamus latéral ne montre pas de différence photopériodique **(Fig. 30A)**. Une mesure par RIA de la quantité de 26RFa a également été faite dans le plasma d'animaux en SP et en LP et ne montre pas de différence significative, malgré une tendance montrant une concentration plus faible chez des animaux en LP. Etant donné la grande variabilité des valeurs pour un nombre

restreint d'animaux (n=3 par groupe), il serait pertinent de refaire ces mesures sur un nombre plus grand d'animaux. **(Fig. 30B)**.

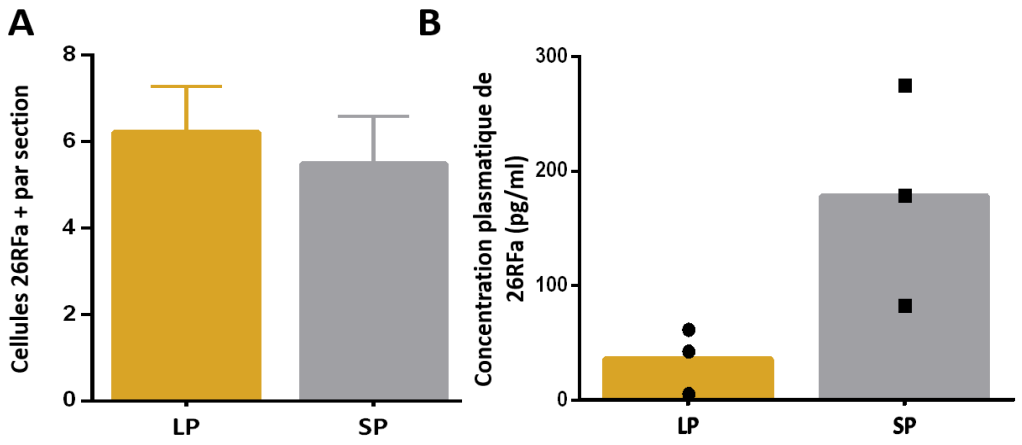


Figure 30 : Effet de la photopériode sur l'expression du gène codant pour le 26RFa dans l'hypothalamus et sur la concentration plasmatique circulante du 26RFA chez le hamster syrien.

(A) Analyse par hybridation *in situ* du nombre de cellules 26RFa positives dans l'hypothalamus (N=6 par groupe) **(B)** Concentration de 26RFa dans le plasma obtenue par RIA (N=3 par groupe) ; LP : photopériode longue ; SP: photopériode courte

III) Discussion

a) L'inhibition des récepteurs à RFRP3 par le RF3286 n'a pas d'effet significatif sur la physiologie reproductive

Les résultats issus de la première partie de ma thèse nous ont amené à questionner la place des neuropeptides RFRP3 et Kisspetine dans le processus de réactivation photopériodique et photoréfractaire de la reproduction des rongeurs saisonniers. En effet, mes résultats ont montré que l'expression de ces deux neuropeptides n'était augmentée qu'après la réactivation de l'axe HPG, suggérant qu'ils ne peuvent pas être les inducteurs de cette réactivation. De plus, des études récentes chez les hamsters ont montré une forte influence du rétrocontrôle des stéroïdes sur le niveau d'expression photopériodique de Kp (Rasri-Klosen et al., 2017; Revel et al., 2006a; Sáenz de Miera et al., 2014). Chez le hamster djungarien, les variations photopériodiques de Kp sont même majoritairement dues au rétrocontrole des stéroïdes sexuels et minoritairement, au contrôle saisonnier (Rasri-Klosen et al., 2017). J'ai donc étudié le rôle du RFRP3 dans la réactivation photopériodique de la reproduction en bloquant son action sur le récepteur NPFFR1 via l'utilisation chronique de l'antagoniste RF3286. Des études préalables ont montré que le RF3286 est capable d'inhiber l'augmentation de LH induite par une injection aiguë de RFRP3 chez le hamster syrien (Henningsen et al., thèse 2016). J'ai donc réalisé une infusion centrale de RF3286 pendant 6 semaines chez des animaux soit maintenus en LP constante, soit soumis à une réactivation photopériodique par un transfert de SP à LP.

Tous les animaux ont montré une perte de 5 à 10% de leur masse corporelle dans la première semaine postopératoire, corrélée à une prise alimentaire plus faible dans tous les groupes (4g/jour en moyenne), à l'exception des animaux en LP traités avec le RF3286 (6g/jour en moyenne) **(Fig. 26)**. En effet chez le hamster syrien, une prise alimentaire quotidienne normale à 22°C est comprise entre 7 et 10g/jour (Roth et al., 1990). Cette hypophagie est attendue car elle est la conséquence directe de la période de récupération des animaux suite à la chirurgie implantatoire des mini-pompes. Chez les animaux en LP, la prise alimentaire est plus élevée chez ceux traités au RF3286 par rapport aux contrôles aCSF, induisant une perte de poids plus faible bien que non significative. Etant donné que plusieurs études ont rapporté un effet orexigénique du RFRP3 (Johnson et al., 2007; Schneider et al., 2017; Talbi et al., 2016), il est peu probable que l'antagoniste RF3286 puisse également augmenter la prise alimentaire. Par contre, il a été montré que le RFRP3 a des propriétés hyperalgésiques abaissant le seuil de sensibilité à la douleur (Elhabazi et al., 2013a). Le RF3286 pourrait donc avoir un effet analgésique qui induirait une meilleure récupération postopératoire conduisant à une inhibition plus faible de la prise alimentaire. Il est possible que cet effet analgésique postopératoire ne soit visible que chez des animaux en LP où le niveau de RFRP3 dans l'hypothalamus est plus élevé que chez les animaux ayant subi l'opération quand ils étaient en SP (avec un niveau faible d'expression des RFRP). Afin de valider cette hypothèse, il serait interéssant d'évaluer l'effet du RF3286 sur le seuil de sensibilité à la douleur et d'évaluer également si ce seuil est différent selon l'adaptation des animaux en LP ou SP.

De façon inattendue la perte de masse observée lors de la première semaine postopératoire n'est pas compensée chez les animaux gardés en LP constante, à l'inverse des animaux transférés de SP en LP. Ces derniers accusent une perte nette de seulement 1.5 à 6% contre 5 à 10% chez les animaux en LP constante **(Fig. 25)**. Cette reprise de masse corporelle chez les animaux réactivés peut en partie s'expliquer par le fait que ces hamsters voient leur masse testiculaire multipliée par 10 (Milesi et al., 2017). Elle peut aussi être expliquée par le fait que pendant les 6 semaines de réactivation, le transfert SP à LP s'accompagne d'une réactivation des axes gonadiques, thyroïdiens et de l'hormone de croissance, ce qui se traduit par une augmentation des concentrations circulantes de testostérone, d'hormones thyroïdiennes ainsi que d'IGF-1 (Milesi et al., 2017; Vaughan et al., 1994; Vriend, 1983). Toutes ces hormones sont connues pour être des hormones anabolisantes qui pourraient faciliter la reprise de poids chez ces animaux, à la difference des animaux en LP constante, où le système est stabilisé. En ce qui concerne les paramètres reproducteurs, seule la masse des vésicules séminales est plus élevée chez les animaux élevés constament en LP en comparaison des animaux ayant subi une réactivation photopériodique. Ceci s'explique par le fait qu'à 6 semaines d'une réactivation induite par la LP, les vésicules séminales n'ont pas encore atteint leur taille maximale **(Fig. 27B)** (Milesi et al., 2017)**.**

Des études de notre équipe chez des hamsters syriens ont montré que l'infusion chronique de RFRP3 est capable de réactiver la reproduction photoinhibée par la SP (Ancel et al., 2012;

Henningsen et al., 2016) et que l'injection aiguë de RF3286 bloque l'effet stimulateur aigu du RFRP3 sur la production de LH (Henninsen et al., thèse 2016). Je n'ai observé ici aucun effet du RF3286 sur la masse des testicules et des vésicules séminales. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. La dose d'antagoniste utilisée pourrait ne pas être pertinente pour induire l'inhibition de l'axe HPG sachant que l'effet reproducteur du RFRP3 est dépendant de la dose administrée. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait recommencer cette expérience avec d'autres doses de RF3286. Une autre hypothèse est que l'inhibition de l'effet du RFRP3 endogène par le RF3286 pourrait être compensée, car j'ai montré que , six semaines après le transfert SP à LP, l'expression de Kp, un puissant stimulateur de l'axe gonadotrope, est augmentée dans le noyau arqué des animaux traités au RF3286. Néanmoins, l'augmentation de l'expression de Kp chez les animaux traités au RF3286 atteste que l'antagoniste a pu atteindre le noyaux arqué car les neurones à kisspeptine de ce noyaux expriment le récepteur au RFRP **(Fig.30)** (Poling et al., 2013). Finalement, l'absence d'effet de l'inhibition du RFRP3 endogène par l'antagoniste RF3286 suggère que le RFRP3 pourrait ne pas être essentiel ni à la réactivation photopériodique de la reproduction, ni à la régulation de l'activité reproductrice. Les effets reproducteurs observés auparavant avec l'administration exogène de RFRP3 pourraient ne pas être physiologiques (doses ou cibles inappropriées). Ceci est en accord avec mes observations de cinétiques de réactivations (Milesi et al., 2017). C'est également en accord avec ce qui est observé chez la souris avec une invalidation du gène RFRP (León et al., 2014).

b) <u>L'expression du26RFa dans l'hypothalamus de rongeurs saisonniers n'est pas régulée par la photopériode</u>

Il a été montré que le 26RFa, un autre neuropeptide de la famille des RFamides, est capable de stimuler la prise alimentaire (Chartrel et al., 2005) et l'axe reproducteur (Navarro et al., 2006b; Patel et al., 2008) chez le rat. Ces deux fonctions étant régulées par les saisons, j'ai déterminé si le 26RFa pouvait avoir une expression régulée par la photopériode dans l'hypothalamus de deux modèles de rongeurs saisonniers, les hamsters syriens et djungariens. Je n'ai obervé aucune différence d'expression que ce soit par qPCR chez le hamster syrien ou par hybridation *in situ* chez le hamster djungarien **(Fig. 29A et 32A)**. Ainsi, mes premières obervations indiqueraient que le 26RFa n'est pas un acteur hypothalamique impliqué dans le contrôle des fonctions saisonnières.

Le dosage du 26RFa dans le sang n'a pas montré non plus de différences photopériodiques significatives chez les deux espèces **(Fig. 29B et 32B)**. Cependant une nouvelle analyse avec un nombre supérieur d'hamsters djungariens devrait être réalisée, car même avec un nombre d'échantillons par groupe de 3 l'étude statistique était pourtant déjà proche de la significativité (p=0,07). Chez la souris, le 26RFa est sécrété par l'intestin suite à l'ingestion de glucose où il agit comme une incrétine en augmentant la concentration plasmatique d'insuline et en potentialisant son effet (Chartrel et al., 2016; Prévost et al., 2015). La concentration en leptine étant plus faible en SP chez les hamster djungariens (Korhonen et al., 2008), le niveau élevé de 26RFa périphérique en SP

pourrait agir comme un rétrocontrôle, afin d'augmenter l'effet de l'insuline pour induire une limitation de la lipolyse et une économie des stocks adipeux. Chez le hamster syrien, nous n'avons pas trouvé de variation photopériodique de la concentration de 26RFa plasmatique. Si le 26RFa est aussi orexigénique et s'il agit aussi comme une incrétine en périphérie chez cette espèce, ce résultat serait en accord avec le fait que les changements photopériodiques ne sont pas accompagnés de changements de la prise alimentaire ni du poids chez le hamster syrien. Cependant et de manière générale, une grande variabilité est observée dans l'analyse du 26RFa. Celle-ci pourrait s'expliquer par le fait que nous ne contrôlions pas la prise alimentaire chez ces animaux au moment de l'échantillonage. La prise alimentaire a donc pu induire, via l'ingestion de glucose, l'augmentation de la concentration plasmatique de 26RFa chez certains animaux (Prévost et al., 2015).

IV) Conclusion

Les résultats de l'étude pharmacologique ne permettent pas de conclure sur le rôle du RFRP3 dans la réactivation de la reproduction saisonnière. Par contre, l'analyse de la prise alimentaire lors de la semaine postopératoire suggère que l'antagoniste RF3286 pourrait avoir un rôle analgésique chez les animaux en LP. Ce qui est cohérent avec l'effet hyperalgésique du RFRP3 découvert par Elhabazi et al. (2013a). Enfin l'étude de l'expression du second neuropeptide, le 26RFa, montre que son expression hypothalamique n'est pas photopériodique. Le dosage du 26RFa dans le sang n'a pas montré non plus de différences photopériodiques significatives chez les deux espèces. Cependant une nouvelle analyse avec un nombre supérieur d'hamsters djungariens devrait être réalisée, car malgré un nombre d'échantillons par groupe faible (n = 3), l'analyse statistique était proche de la significativité.

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

PARTIE N°3

Recherche de régulateurs potentiels des changements saisonniers précoces de la Dio3

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

I) Introduction

Des études récentes ont remis en cause l'implication du modèle de travail historique TSH-Dio2-neuropeptides dans l'induction de l'activation photopériodique et endogène photoréfractaire de la reproduction, mais elles ont confirmé le rôle des hormones thyroïdiennes.

En effet, mes travaux suggèrent que l'activation de la reproduction par la LP utiliserait un système à deux voies (Milesi et al., 2017). La première voie rapide serait dépendante d'un pic local d'hormones thyroïdiennes au niveau de l'hypothalamus médiobasal induit par une inhibition précoce dans les tanycytes de l'expression de la Dio3 responsable du catabolisme des hormones thyroïdiennes et une diminution retardée de l'expression du transporteur aux hormones thyroïdiennes MCT8. Ces hormones thyroïdiennes pourraient agir de manière directe, ou indirecte via les tanycytes, sur les neurones à GnRH (Bolborea et al., 2011; Clasadonte et al., 2011a; Garcia-Segura et al., 2008; Jansen et al., 1997; Prevot et al., 2003). La deuxième voie TSH-Dio2-Kp/RFRP3 s'activerait de façon plus tardive afin de supporter et de stabiliser l'activation par la première voie (Ancel et al., 2012; Klosen et al., 2013; Revel et al., 2006a, 2006b, 2008).

Mes travaux ont également montré que, dans le cas de l'activation endogène photoréfractaire de la reproduction, seule la première voie dépendante de Dio3 serait impliquée puisque la voie TSH/Dio2 est peu ou pas (selon l'espèce de hamster) activée (Milesi et al., 2017).

Aujourd'hui, mes résultats posent de nouvelles questions sur les mécanismes photopériodiques ou endogènes responsables de l'inhibition précoce de l'expression de la Dio3, et notamment s'ils impliquent des processus similaires ou différents. Afin de trouver de nouveaux régulateurs potentiels de la Dio3, je suis parti du postulat qu'il existe deux groupes de régulateurs intéressants dans ce contexte : les régulateurs de la reproduction et les régulateurs saisonniers (photopériodique ou endogène). J'ai donc étudié dans un premier temps si des régulateurs de la reproduction pouvaient être régulés photopériodiquement. Dans un deuxième temps, j'ai analysé si des régulateurs saisonniers pouvaient intervenir dans la régulation de l'activité reproductrice via la Dio3.

La première partie de l'étude s'appuie sur l'observation que l'activation saisonnière de la reproduction partage certains gènes régulateurs de la puberté. Par exemple, le gène *kiss1* est activé à la fois lors du développement pubertaire et lors de l'activation saisonnière. J'ai donc choisi des gènes connus pour être impliqués dans la puberté et analysé leur régulation saisonnière, notamment les gènes codant pour MKRN3 et EAP1. MKRN3 est un inhibiteur pubertaire dont l'expression dans le noyau arqué est inhibée concomitamment à l'augmentation de l'expression de Kp (Abreu et al., 2013). Une mutation perte de fonction de son gène entraîne une puberté précoce (Abreu et al., 2013). Inversement, EAP1 est un facteur de transcription stimulateur de l'activité reproductrice dont l'expression dans le noyau arqué est augmentée lors de la puberté (Heger et al., 2007).

La deuxième approche vise à analyser le décours temporel de l'expression d'autres gènes connus pour présenter une régulation saisonnière afin d'analyser leur implication potentielle dans la régulation de l'activité reproductrice via Dio3. Pour cela j'ai déterminé si leur régulation devance ou

est concommitante avec celle de la Dio3. Ainsi, j'ai analysé l'expression des gènes codant pour le morphogène Sonic HedgeHog (SHH) dans les tanycytes (Lomet et al., 2017), la somatostatine au niveau du récessus mammilaire et la chromogranine A (CGA) dans la *PT* (Wood et al., 2015). SHH est connu pour être régulé photopériodiquement chez le mouton (Lomet et al., 2017) et pour contrôler l'expression de Dio3 dans certaines cellules cancereuses (Dentice et al., 2007; Luongo et al., 2014). La somatostatine peut agir sur les tanycytes en se liant sur des récepteurs SST2(a) localisés sur ces cellules (Hashemi et al., 2001). La CGA est exprimée dans les cellules thyréotropes de la *PT* du mouton et son expression est saisonnière avec un rythme strictement inversée avec celui de la TSHβ (Wood et al., 2015). Cette régulation alternée serait la base de l'horloge circannuelle endogène du mouton (Wood and Loudon, 2017; Wood et al., 2015). Aucune information n'est disponible sur la régulation photoperiodique de la CGA chez les rongeurs saisonniers. Aussi, chez le hamster djungarien, j'ai déterminé si la CGA présente une expression photopériodique, et si elle est exprimée exlusivement par les cellules thyréotropes de la PT avec une une alternance stricte entre l'expression de TSHβ et de la CGA comme chez le mouton. Finalement, j'ai comparéeles cinétiques de la CGA et de la TSHβ pendant la réactivation photoréfractaire endogène.

II) Les régulateurs pubertaires MKRN3 et EAP1 ne sont pas régulés photopériodiquement

a) Résultats

Cette étude visait à examiner les variations d'expression de gènes candidats cibles dans l'hypothalamus de hamsters en transition pubertaire, puis de tester si des variations sont aussi observées entre des animaux élevés en SP et LP. Pour cela, le niveau d'expression des gènes a été mesuré par PCR quantitative en temps réel sur des hypothalami d'animaux agés de 10, 20, 29 et 62 jours (n=3 par point), ainsi que sur des animaux adaptés à la SP ou LP (n=4 par point). Les variations d'expression sont exprimés en pourcentage du jour post natal (PN) 62 et de la SP respectivement pour l'analyse pubertaire et photopériodique. Ces analyses ont été faites chez le hamster syrien car son génome étant séquencé, le design des primers était plus efficace.

Que ce soit pour EAP1 ou MKRN3, une diminution importante d'expression de respectivement 2.3 et 8.3 fois est observée entre les jours PN 10 et 20 **(Fig.33A-C)** puis les valeurs se stabilisent par la suite entre PN20 et PN62 **(Fig. 31 A-C)**. Aucune variation n'a été observée entre les animaux en SP et LP ni pour MKRN3 ni pour EAP1, tandis que comme attendu, l'expression du gène codant pour la Dio2 augmente significativement de 3.8 fois entre la SP et la LP **(Fig. 31 B-D-E)**.

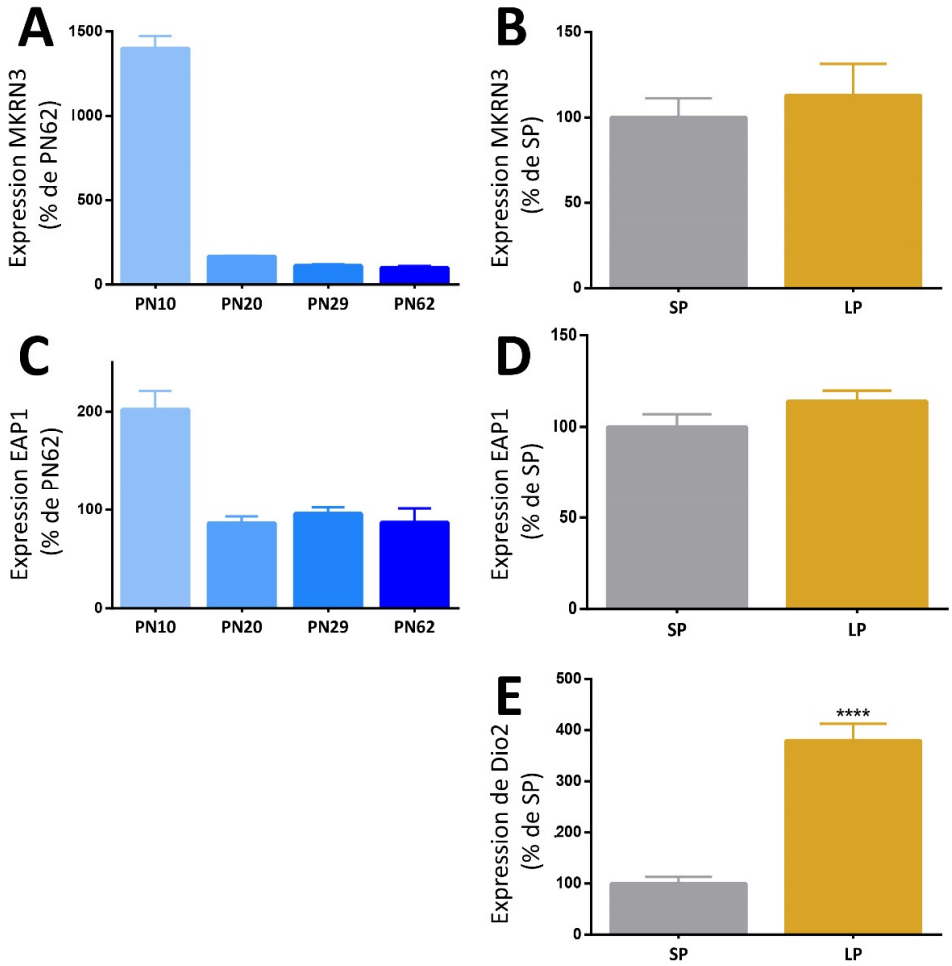


Figure 31 : Analyse par qPCR de l'expression de MKRN3 et EAP1 au cours de la puberté et en fonction de la photopériode dans l'hypothalamus de hamster syrien mâle.

(A-C) PN : jour postnatal, valeurs normalisées en fonction de PN62 **(B-D-E)** LP : photopériode longue , SP : photopériode courte, Dio2 constitue un contrôle positif de changement photopériodique, valeurs normalisées en fonction de SP. Valeur = moyenne +/- SEM, n=3 pour l'analyse pubertaire et n=4 pour l'analyse photopériodique, **** si $p<0.0001$

b) Discussion

MKRN3 est un inhibiteur pubertaire dont l'expression dans le noyau arqué de la souris diminue à partir de PN15 pour se stabiliser à un niveau basal d'expression entre PN18 et PN22. Cette diminution est corrélée avec l'augmentation Kp dans le noyau arqué au moment de la puberté et sera maintenue chez l'animal pubère (Abreu et al., 2013). Mes résultats montrent des variations similaires chez le hamster syrien chez lequel l'expression de MKRN3 mesurée par qPCR diminue entre PN10 et PN20 pour se stabiliser ensuite jusqu'à PN62. La diminution de l'expression de MKRN3 semble donc associée à l'activation pubertaire de la reproduction, puisqu'une mutation perte de fonction entraîne une activation précoce de l'activité reproductrice (Abreu et al., 2013). Mon hypothèse était que l'expression de MKRN3 augmente en SP afin de participer à l'inhibition de l'activité reproductrice. Cependant, la quantification par qPCR ne montre aucune différence d'expression du gène codant pour MKRN3 (contrairement à celui de Dio2) entre des animaux SP et LP **(Fig. 31B-E)**. Ces résultats sont en accord avec les études transcriptomiques faites chez le mouton, qui ne montraient pas non plus de différence photopériodique dans l'expression de ce gène (Lomet

et al., 2017). Mes résultats indiquent donc que MKRN3 ne participe pas à la régulation photopériodique de la reproduction.

A l'opposé, le facteur de transcription EAP1 est impliqué dans l'activation de la puberté et pour le maintien de l'activité reproductrice au cours du temps. En effet, chez la rate, son expression dans l'hypothalamus médio basal est diminuée de 2 fois entre PN6 et PN12 pour augmenter de nouveau lors du premier proestrus entre PN32 à PN37 (Heger et al., 2007; Matagne et al., 2009). Chez le hamster syrien mâle, j'observe une diminution d'expression similaire d'EAP1 entre PN10 et PN20 dans l'hypothalamus, mais pas de ré-augmentation significative de son expression après PN20 **(Fig. 31C)**. Il se peut qu'il y ait eu une augmentation transitoire entre PN20 et PN29 ou PN29 et PN62 que je n'aurais pas vue. De plus, chez la rate, l'augmentation significative d'EAP1 est observée seulement lors du proestrus tardif et pas aux autres moments du cycle (Matagne et al., 2009), ce qui pourrait indiquer que cette augmentation d'EAP1 est en fait due à l'avènement du premier pic pré ovulatoire et non à la puberté en elle-même. Il pourrait donc ne pas être présent chez le mâle. Cependant, EAP1 reste important pour la reproduction puisque son inhibition par interférence ARN dans l'aire antéroventrale périventriculaire (AVPV) entraîne une puberté retardée, ainsi que des problèmes de cyclicité chez la rate (Heger et al., 2007). J'ai donc analysé son expression dans l'hypothalamus de hamster syrien mâle élevé en SP et LP, mais je n'ai observé aucune différence significative **(Fig. 31D)**, suggérant qu'il n'est pas un régulateur important de la reproduction saisonnière chez le mâle.

Ainsi, en conclusion, même si je ne peux pas exclure que l'analyse par qPCR sur des échantillons d'hypothalamus entiers ait pu amortir des variations très locales d'expression des gènes codant pour MKRN3 et EAP1, mes résultats suggèrent qu'EAP1 et MKRN3 ne sont pas impliqués dans la régulation saisonnière de l'activité reproductrice et donc probablement pas dans la régulation précoce de la Dio3.

III) Les variations enodgènes de somatostatine et CGA sont trop tardives pour être impliquées dans l'inhibition précoce de Dio3 lors de la réactivation photoréfractaire endogène

a) Résultats

Le but de cette étude consistait à examiner les variations photopériodiques des facteurs SHH, somatostatine et CGA dans nos espèces d'intérêt et le cas échéant de suivre le profil temporel de leur régulation saisonnières afin d'évaluer leur rôle potentiel dans la régulation de la Dio3.

i) SHH n'est pas régulé photopériodiquement chez le hamster syrien

L'expression de SHH a d'abord été analysée par hybridation *in situ* à PN10 et chez des animaux adultes adaptés en SP ou en LP. La **figure 32B** montre que les transcripts sont présents dans les tanycytes des animaux agés de 10 jours, mais que les niveaux d'expression sont très faibles chez des animaux adultes, ce qui ne permet pas de détecter de différence photopériodique **(Fig. 32B)**. Aussi, j'ai ensuite mesuré les niveaux des transcripts par la technique de qPCR plus sensible. Même avec

cette technique plus sensible, aucune variation photopériodique de l'expression n'a pu être détectée entre les animaux adaptés à la LP ou la SP **(Fig. 32B)**.

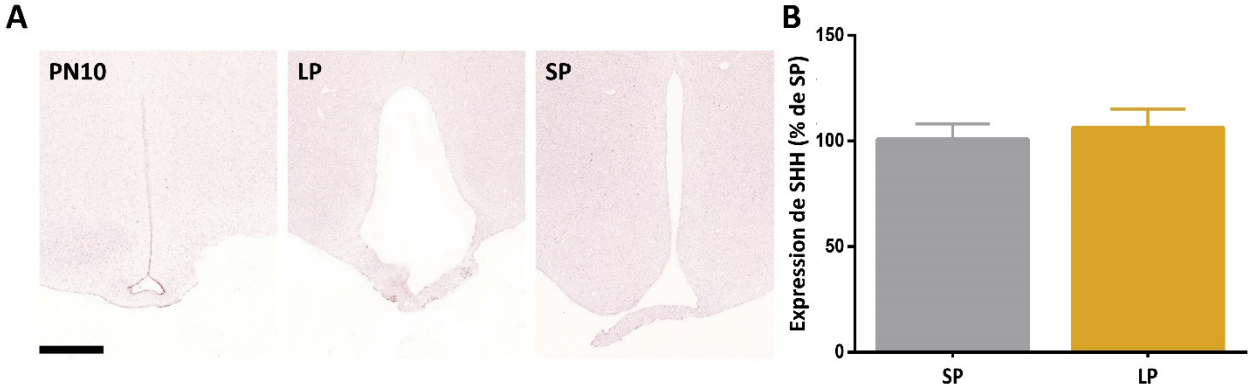


Figure 32 : Analyse de l'expression du gène codant pour Sonic HedgeHog (SHH) dans l'hypothalamus de hamsters syrien adaptés en LP ou SP

(A) Marquage des transcrits de SHH par hybridation *in situ* dans l'hypothalamus de hamsters syrien, échelle : 500µm **(B)** Mesure par qPCR de l'expression du gène codant pour SHH, avec des valeurs normalisées par rapport à la SP et données en pourcentage moyens± SEM (n=4), LP : photopériode longue, SP : photopériode courte, PN10 : jour post natal 10, constitue un contrôle positif

ii) L'inhibition de l'expression de la somatostatine lors de la réactivation endogène photoréfractaire a lieu après l'inhibition de la Dio3

La cinétique d'expression du gène codant pour la somatostatine au cours d'une réactivation endogène photoréfractaire a été analysée par hybridation *in situ* dans les recessus mammillaires du hamster djungarien maintenu en SP constante. Le niveau des transcrits codant pour la somatostatine a été analysé en mesurant l'intensité intégrée du signal sur les corps cellulaires positifs plutôt que par comptage simple du nombre de neurones à somatostatine, car une étude précédente avait montré que la photopériode affecte l'intensité du marquage, mais pas le nombre de neurones marqués (Klosen et al., 2013). Mes résultats confirment la diminution d'environ 50% du marquage des neurones à somatostatine en LP par rapport à la SP **(Fig. 33A)**. Lors de la réactivation endogène photoréfractaire, le niveau d'expression du gène de la somatostatine diminue à partir de la 20ème semaine en SP pour atteindre un niveau équivalent au LP après 24 semaines en SP **(Fig. 33B)**. La comparaison avec la variation endogène du gène codant pour Dio3 (Milesi et al., 2017) montre que la diminution de l'expression de la somatostatine est postérieure à celle de la Dio3 **(Fig. 33B)**.

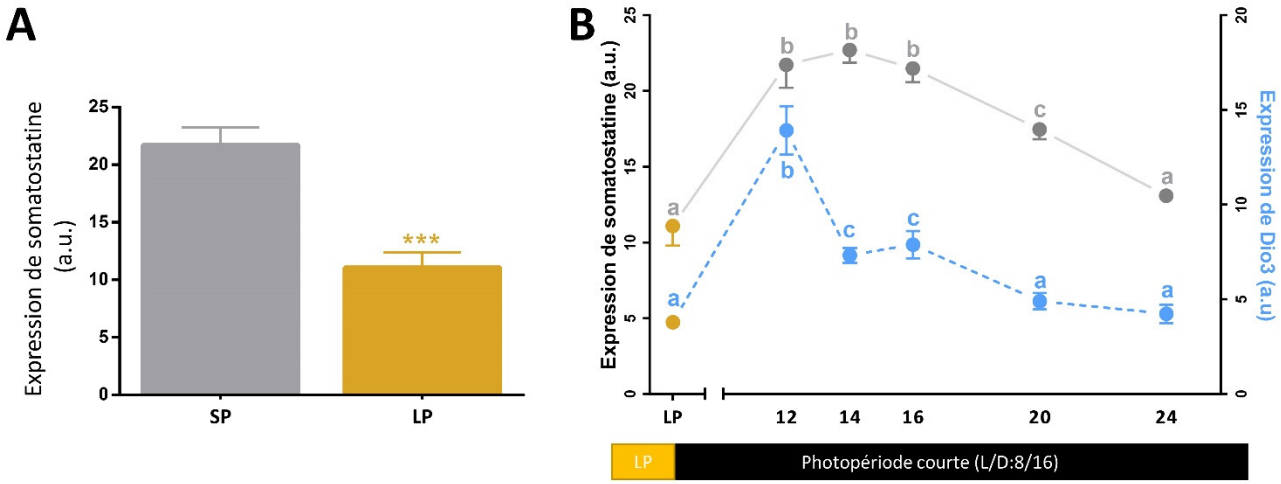


Figure 33 : Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du gène codant pour la somatostatine dans le recessus mammillaire de l'hypothalamus du hamster djungarien en fonction de la photopériode et lors d'une réactivation endogène photoréfractaire.

(A) Valeur moyenne (± SEM, n=6) de l'intensité intégrée du signal dans les corps cellulaires des neurones en photoperiode courte (SP) ou longue (LP), *** indique p<0.001. **(B)** Valeur moyenne (± SEM, n=) de l'intensité intégrée du signal dans les corps cellulaires des neurones au cours d'une réactivation endogène photoréfractaire, la courbe bleue représente la variation d'expression de la Dio3 au cours de la même réactivation endogène photoréfractaire (Milesi et al., 2017), LP : photopériode longue, p<0.05 si lettre différente.

iii) L'inhibition de l'expression de CGA lors de la réactivation endogène photorefractaire est postérieure à celle de Dio3

L'expression de la CGA dans la *PT* du hamster djungarien a été analysée par immunohistochimie en utilisant le même antisérum que dans les études réalisées chez le mouton (Wood et al., 2015). A des fins de comparaison, j'ai également analysé l'expression de la TSHβ et de l'αGSU (marqueur des cellules endocrines de la PT) par immunohistochimie. Le niveau d'expression de ces protéines a été calculé en comptant le nombre de cellules immunopositives dans la *PT* normalisé par la longueur de PT analysée chez un animal. Dans un premier temps, j'ai vérifié que l'expression de la TSHβ est fortement exprimée en LP et négligeable en SP **(Fig36A)** et observé que le nombre de cellules marquée à la αGSU est similaire en SP et en LP **(Fig36B)**. J'ai ensuite regardé s'il existe des changements d'expression photopériodique de CGA chez le hamster djungarien, comme rapporté chez le mouton (Wood et al., 2015)**.** Mes résultats montrent que l'expression de CGA est fortement réduite en LP par rapport à SP **(Fig. 34C).** Cependant, à la différence du mouton où il y a un nombre négligeable de cellules CGA en LP, chez le hamster djungarien il reste encore 47% de cellules marquées en LP **(Fig. 34C)**.

Chez le mouton, la CGA est présente exclusivement dans les cellules thyréotropes . Afin de vérifier si c'est le cas également chez le hamster djungarien, j'ai réalisé un comarquage CGA-αGSU par immunohistochimie. A l'inverse du mouton, il y a encore environ 15% des cellules exprimant la CGA qui n'expriment pas la αGSU, que ce soit en LP ou en SP **(Fig. 34D)**. Chez le mouton, il existe une

stricte opposition de l'expression de TSHβ et de CGA entre SP et LP de façon à ce que les cellules de *la PT* expriment soit la CGA en SP, soit la TSHβ en LP (Wood et al., 2015). Chez le hamster djungarien, mes résultats montrent qu'en SP, les cellules n'expriment que la CGA (car le niveau d'expression de la TSHb est négligeable) alors qu'en LP, 32% des cellules à CGA expriment aussi la TSHβ **(Fig. 34E),** ce qui représente environ 13% des cellules analysées **(Fig. 34F)**.

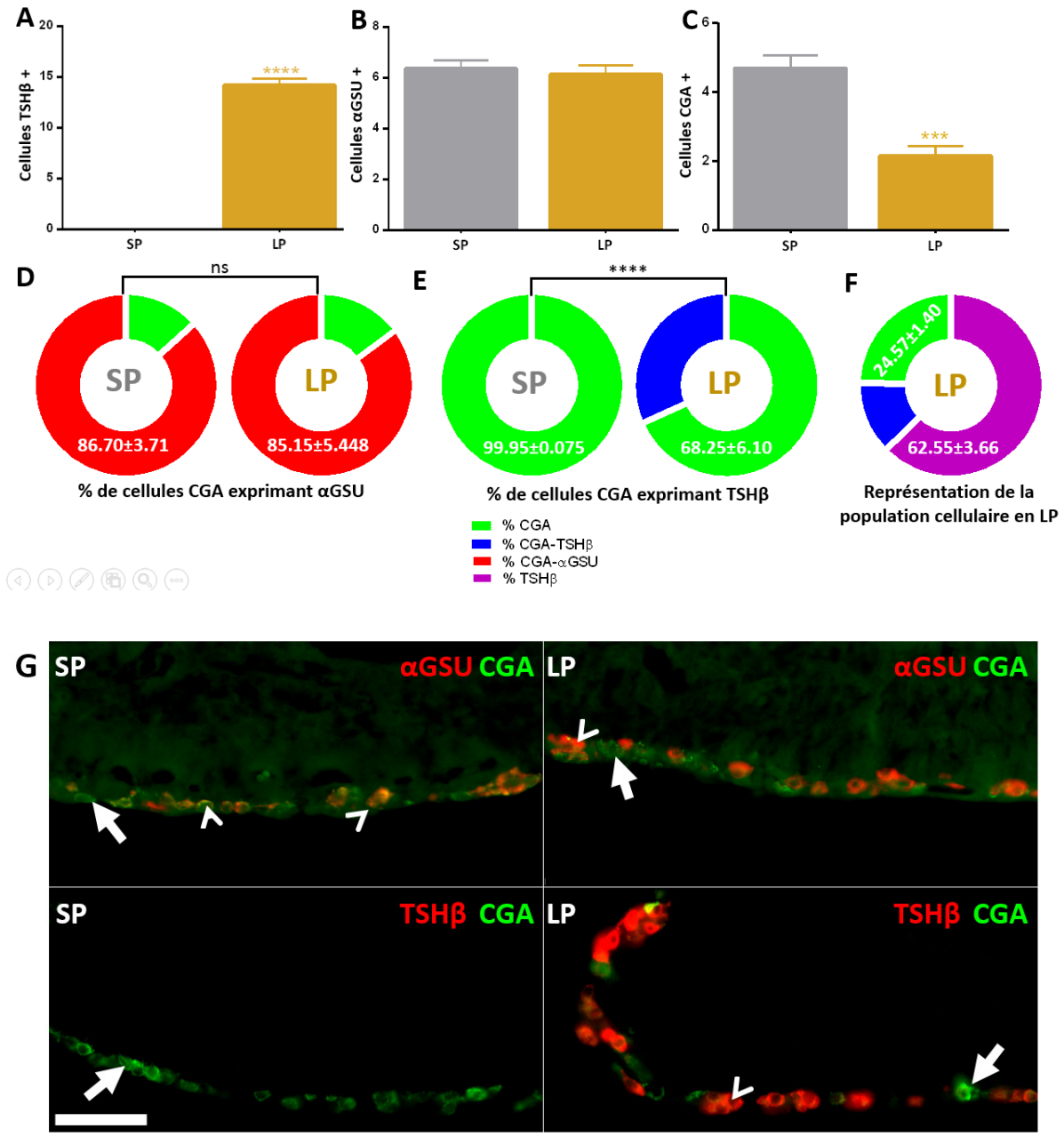


Figure 34 : Variation photopériodique de la TSHβ, la GSU et la chromogranine A (CGA) dans la *PT* de hamster djungarien.

La CGA, TSHβ et αGSU ont été visualisées par immunohistochimie, **(A, B, C)** nombre moyen de cellules exprimant αGSU, TSHβ ou CGA, par animal SP ou LP, valeurs normalisées par la longueur de *PT* analysée **(D)** pourcentage moyen de cellules exprimant CGA ou αGSU et CGA par animal SP ou LP, **(E)** pourcentage moyen de cellules exprimant CGA ou TSHβ-CGA par animal SP ou LP, Les valeurs sont des moyennes ± SEM (n= 6 par groupes), *** si 0.001<p<0.0001, **** si p<0.0001, **(G)** immunomarquage de αGSU, TSHβ (rouge) et CGA (vert), tête de flèche : cellule doublement marquées, flèches : cellules CGA positives, échelle = 50µm LP : photopériode longue, SP : photopériode courte.

Finalement, afin d'évaluer si l'inhibition de la CGA pouvait être associée à l'inhibition précoce de la Dio3 lors de la réactivation endogène photoréfractaire, j'ai analysé la cinétique d'expression de CGA, en parallèle de celle de l'αGSU et la TSHβ chez des hamsters djungariens maintenus en SP constante. Le nombre de cellules exprimant la CGA dans la *PT* diminue significativement à partir de la 20ème semaine de SP mais reste encore 1.6 fois plus élevé qu'en LP à la 24éme semaine. **(Fig. 35A-B)**. Ces cellules CGA n'expriment pas la TSHβ car son expression est quasiment indetectable tout au long de la SP **(Fig. 35A)**. Cette analyse cinétique montre que le nombre de cellules à CGA diminue bien après la diminution de l'expression de la Dio3 **(Fig. 35A)**. Le nombre de cellules exprimant la αGSU, ainsi que la proportion de cellules CGA exprimant aussi α GSU (81%) reste constant pendant toute la période photoréfractaire même si le nombre de cellules doublement marquées CGA-αGSU diminue à partir de la 14ème semaine de SP **(Fig. 35B)**.

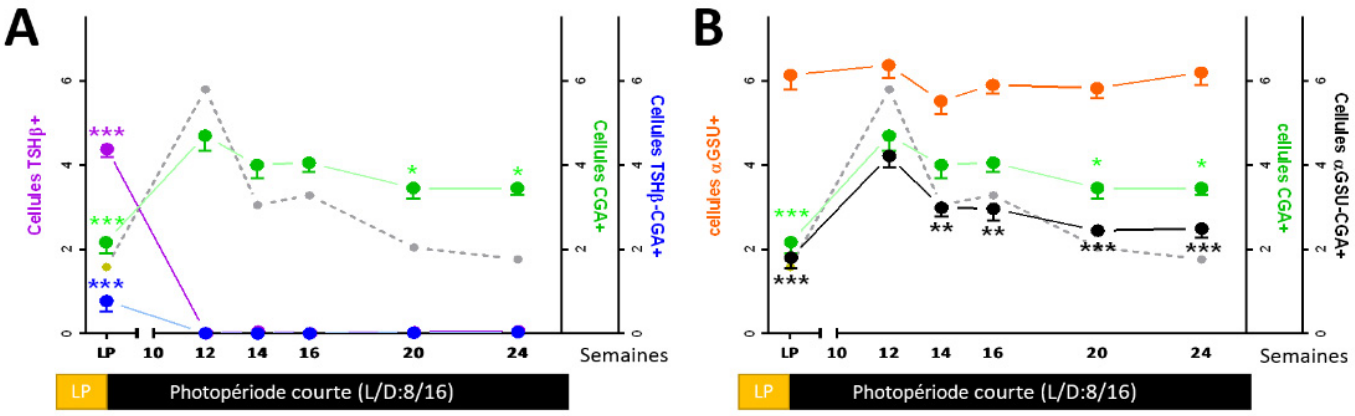


Figure 35 : Variation de l'expression des chromogranine A (CGA), TSHβ et αGSU dans la *PT* de hamster djungarien au cours de la réactivation endogène photoréfractaire.

Analyse par immunohistochimie de l'expression des trois facteurs CGA, αGSU et TSHβ dans la PT **(A)** Nombre moyen de cellules CGA+ (vert), TSHβ+ (violet) et CGA-TSHβ+ (bleu) normalisé par la longueur de *PT* analysée chez l'animal (B) Nombre moyen de cellules CGA+ (vert), αGSU+ (orange) et CGA-αGSU+ (noir) normalisé par la longueur de *PT* analysée chez l'animal. Sur tous les graphiques, la ligne en pointillé grisé représente la variation d'expression de Dio3 dans les α tanycytes lors de la réactivation endogène photoréfractaire de la reproduction (Milesi et al., 2017). LP : LP, la significativité est donnée par rapport au point à 12 semaines de SP, * si 0.05<p<0.01, ** si 0.01<p<0.001, *** si 0.001<p<0.0001,

b) Discussion

Ma deuxième stratégie pour identifier des candidats potentiels pouvant excercer une régulation précoce de la Dio3 était de chercher dans la littérature des gènes/protéines connus pour être régulés saisonnièrement, de valider ces variations chez les hamsters et d'analyser la cinétique de variation de leur expression puis enfin de la comparer à celle de la Dio3. L'expression de Dio3 est inhibée précocément, que la réactivation soit induite par la LP ou par la photoréfraction endogène. J'ai choisi de faire l'analyse cinétique lors d'une réactivation endogène photoréfractaire afin d'éviter un biais qui aurait été induit par le changement de longueur du pic de mélatonine lors du passage de SP à LP.

Le premier gène candidat était celui codant pour le morphogène Sonic Hedgehog (SHH), car des études récentes ont montré qu'il était surexprimé en LP par rapport à SP dans les tanycytes du mouton (Lomet et al., 2017). De plus, SHH semble impliqué dans la régulation de Dio3 notamment dans certains cancers (Dentice et al., 2007; Luongo et al., 2014). Cependant, même avec un système de détection des transcrits par hybridation *in situ* suffisamment sensible pour détecter un marquage dans les tanycytes d'animaux juvéniles, aucun marquage n'était visible chez l'animal adulte**.** SHH est un facteur important dans la prolifération, la spécialisation cellulaire ou la guidance axonale (Belgacem et al., 2016), ce qui explique probablement une expression plus faible dans le cerveau adulte que dans le cerveau en développement. J'ai alors quantifié son expression par qPCR, plus sensible, sur des ARNm extraits d'hypothalami de hamsters syriens mâles adaptés en SP ou en LP. Aucune différence photopériodique n'a finalement été observée. Ce résultat doit toutefois prendre en compte que la quantification de l'expression de SHH a été faite dans un hypothalamus entier, alors qu'il n'est exprimé que dans les tancytes (Lomet et al., 2017).Une différence potentielle a donc pu être masquée. On pourrait penser que cette différence de régulation photopériodique de l'expression de SHH entre le mouton (Lomet et al., 2017) et le hamster syrien (mes données) pourrait être corrélée au fait qu'il existe chez le mouton des variations photopériodiques de la proliferation cellulaire dans l'hypothalamus (Migaud et al., 2011). Cependant, il en existe aussi chez le hamster syrien (Huang et al., 2011). Les variations photopériodiques de SHH ne seraient donc pas indispensable à la régulation neurogénique saisonnière.

Le deuxième candidat était le gène codant pour la somatostatine, car des études chez le hamster djungarien ont montré une augmentation de son expression en SP dans le récessus mammillaire (Klosen et al., 2013). De plus, l'administration centrale de somatostatine mime certains effets d'une exposition à une SP telles qu'une perte de poids et une inhibition de l'activité des neurones à GnRH (Dumbell et al., 2015; Van Vugt et al., 2004). Enfin, des récepteurs SST2 (A) à la somatostatine (couplés à une protéine G inhibitrice) sont présents sur les tanycytes α qui expriment aussi la Dio3 (Cervia et al., 2003; Hashemi et al., 2001). La cinétique de variation de l'expression du gène de la somatostatine lors de l'activation endogène photoréfractaire de la reproduction montre que l'expression de la somatostatine ne diminue qu'à partir de la 20ème semaine de SP, alors que celle de la Dio3 est inhibée dès la 14ème semaine. Ainsi, mes résultats suggèrent que la somatostatine ne constitue pas un régulateur précoce de la Dio3 lors de la réactivation endogène. A l'inverse, il est probable que l'augmentation locale des hormones thyroïdiennes suite à la réduction de leur catabolisme par Dio3 pourrait être à l'origine de la diminution de l'expression de la somatostatine. En effet, il a été montré que l'administration centrale de TSH, connue pour augmenter les niveaux hypothalamiques de T3, est aussi capable d'inhiber l'expression de la somatostatine (Klosen et al., 2013). Par ailleurs, comme l'expression de la somatostatine est aussi régulée par les stéroïdes sexuels (Klosen et al, non publié), il est possible que les variations de l'expression de la somatostatine soient,

au moins en partie, liées au rétrocontrôle de la testostérone lors de la réactivation endogène de la reproduction.

Le dernier candidat que j'ai analysé est la CGA, car des études récentes chez le mouton montrent qu'elle est exprimée dans les cellules thyréotropes spécifiques de la *PT* et que son expression saisonnière est opposée à celle de la TSHβ. Les cellules thyréotropes expriment uniquement la TSHβ en LP et uniquement la CGA en SP (Wood et al., 2015). Il a été proposé que cette alternance stricte d'expression TSHβ/CGA soit sous contrôle de l'horloge circannuelle, voire même une base moléculaire endogène de celle-ci. En effet, lorsque les moutons deviennent photoréfractaires à la LP, la réactivation endogène de la reproduction s'accompagne d'une disparition de l'expression de TSHβ et d'une augmentation de l'expression de CGA (Wood et al., 2015). Dans un premier temps, j'ai examiné l'existence et la régulation saisonnière de la CGA dans la *PT* du hamster djungarien, puisqu'aucune information n'est publiée à ce sujet chez les rongeurs saisonniers. J'ai montré que, comme chez le mouton, le nombre de cellules exprimant la CGA est réduit en LP mais, à la différence du mouton, chez le hamster djungarien le nombre de cellules exprimant la CGA reste non négligeable en LP (environ 47% du niveau d'expression présent en SP). Ceci indique que la régulation photopériodique de la CGA n'est pas aussi stricte chez le hamster djungarien que chez le mouton et/ou que certaines cellules ne répondent pas à la SP par une diminution de CGA. Ce rythme « amorti » s'oppose à celui de l'expression de la TSHβ qui est totalement inhibée en SP par la mélatonine chez le hamster djungarien (Böckers et al., 1997a; Bockmann et al., 1996; Milesi et al., 2017). Chez le mouton, la régulation stricte et opposée de TSHβ et CGA par la photopériode ou l'horloge circannuelle fait qu'un nombre négligeable de cellules expriment à la fois la CGA et la TSHβ (Wood et al., 2015). Chez le hamster djungarien par contre, 32% des cellules à CGA expriment aussi la TSHβ en LP (ce qui n'est pas le cas en SP car aucune cellule n'exprime la TSHβ). Ainsi, la balance TSHβ/CGA n'est donc pas aussi exclusive chez le hamster djungarien que chez le mouton.

Une autre différence entre le mouton et le hamster djungarien est que chez le premier, la CGA est seulement exprimée par des cellules thyréotropes (Wood et al., 2015) alors que chez le second, un certain nombre de cellules à CGA n'expriment pas l'αGSU, un marqueur entre autres des cellules thyréotropes. En effet, le comarquage CGA-αGSU montre que, peu importe la photopériode, environ 15% des cellules exprimant la CGA ne seraient pas des cellules thyréotropes. Elles pourraient être des cellules folliculostellaires (Majdoubi et al., 1996) ou des macrophages connus pour contenir de la CGA (Eissa et al., 2018; Giometto et al., 1997). De facon intéréssante, en LP, le nombre de cellule exprimant l'αGSU est plus grand que celui exprimant la TSHβ. Ces cellules pourraient potentiellement être des cellules thyréotropes qui n'expriment pas la TSHβ ou en trop faible quantité pour etre détectée. Elles pourraient aussi être des cellules gonadotropes de la PT. En effet, les gonadotropines sont aussi constituées d'une sous unité β spécifique et de l'αGSU commune. Et il existe des cellules gonadotropes dans la PT du hamster (Dardente et al., 2003). Il est important de remarquer que la quantification de l'expression de αGSU ne montre aucune variation photopériodique, ce qui n'est pas

en accord avec la littérature puisque chez cette espèce Bockmann et al. (1996) montrent une expression diminuée en SP autant par hybridation *in situ* ainsi que par immunohistochimie. Cependant, j'ai compté les cellules positives alors qu'ils ont quantifié l'intensité moyenne du marquage αGSU. Il faudra donc réitérer cette quantification avec leur méthode d'analyse afin de valider les changements d'expression photopériodique d'αGSU

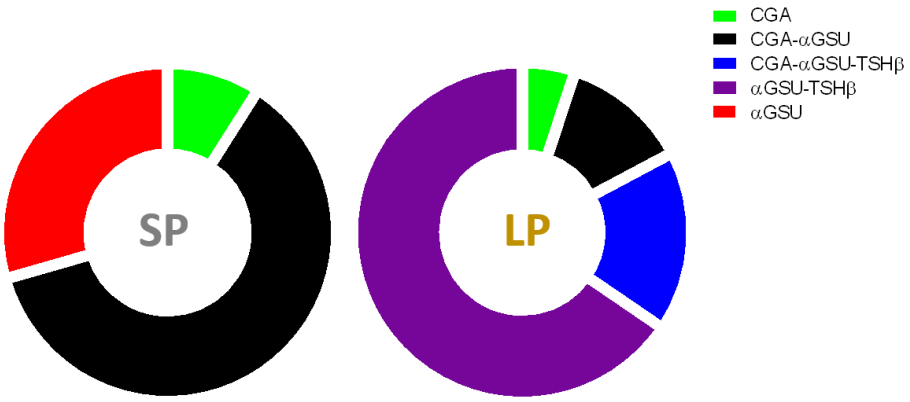


Figure 36 : Représentation indicative des différentes populations cellulaires de la PT en fonction des marquages αGSU, TSHβ, et CGA et en fonction de la photopériode.

LP : Photopériode longue, SP : Photopériode courte.

L'expression de la CGA étant régulée par la photopériode chez le hamster djungarien, j'ai ensuite analysé la cinétique de son expression, ainsi que celle de la TSHβ et de l'αGSU lors de la réactivation endogène photoréfractaire afin de les comparer. Lorsque les hamsters sont maintenus en SP inhibitrice prolongée, l'expression de CGA diminue, mais après 24 semaines de SP la diminution n'atteint pas le niveau minimum observé en LP (1.6 fois le niveau de LP). Ainsi, autant lors du changement photopériodique que photoréfractaire, le phénotype exclusif d'expression de la CGA n'est pas aussi strict chez le hamster djungarien que chez le mouton. De plus, tout au long de la réactivation photoréfractaire, le nombre de cellules TSHβ positives restera négligeable en accord avec (Böckers et al., 1997a), mais pas avec mon étude précédente où j'ai vu une lègère augmentation de TSHb après 24 semaines en photopériode inhibititrice (Milesi et al., 2017). Ceci peut être causé par une lègère baisse de la sensibilité causée par le fait que TSHβ a été détecté ici par des immunomarquage fluorescents indirects, alors que j'ai utilisé un marquage enzymatique plus sensible dans l'étude précédente (Milesi et al., 2017).

Ainsi, lors de la réactivation endogène photoréfractaire du hamster djungarien, il n'existe pas d'alternance exclusive de l'expression de la CGA et de la TSHβ dans les cellules de la PT, comme cela a été décrit chez le mouton (Wood et al., 2015). Etant donné que Wood et al. (2015) propose que l'alternance CGA/TSHβ soit la base moléculaire de l'horloge circannuelle, il est possible que cette alternance CGA/TSHβ soit moins marquée chez le hamster djungarien qui n'a pas d'horloge circannuelle. Néanmoins, mes résulats démontrent une variation endogène d'expression de la CGA chez le hamster djungarien. A l'exception de la variation très tardive d'αGSU montré par Böckers et

al. (1997a), ceci représente la première évidence montrant que la *PT* reçoit le signal endogène photoréfractaire chez une espèce sans horloge circannuelle.

La comparaison des cinétiques de la CGA et de la Dio3 au cours de la réactivation endogène photoréfractaire montre que l'expression de la CGA change bien après celle de la Dio3 et que par conséquent la CGA ne contrôlerait pasla régulation précoce de Dio3. A l'heure actuelle, il est difficile de connaître les mécanismes responsables de la diminution endogène de la CGA. Ils pourraient dépendre d'un phénomène endogène à la *PT*, d'un rétrocontrôle des stéroides sexuels étant donné que certaines cellules thyréotropes expriment le récepteur aux androgènes (Klosen et al, non publié) ou d'un effet inhibiteur sdu pic d'hormones thyroïdiennes créé par l'inhibition de la Dio3.

Tout au long de la cinétique, en moyenne 81% des cellules CGA sont aussi αGSU positive. Ceci indique donc que lors de la réactivation photoréfractaire, il y a une diminution proportionnelle du nombre de cellules CGA+ et CGA-GSU+. Ainsi, les cellules thyréotropes autant que les autres cellules CGA positives sont sensibles à la réactivation endogène photoréfractaire. De plus, alors que le nombre de cellules CGA+ diminue significativement seulement après 20 semaines de SP, celui des cellules doublement marquées αGSU-CGA chute déjà après 14 semaines. Cette chute est concomitante à celle de la Dio3, il est donc impossible d'évaluer qui pourrait être responsable responsable de la chute du deuxième. De même, il est difficile d'évaluer le rôle physiologique de cette inhibition.

Mes observations montrant des régulations de la quantité de CGA dans la PT en fonction de la photopériode et de la réactivation endogène, posent la question de son rôle physiologique. La CGA est connue pour jouer un rôle dans des mécanismes intracellulaires en participant à la formation et la stabilisation des grains de sécrétion, ainsi qu'en favorisant le tri et la libération des hormones peptidiques (Montero-Hadjadje et al., 2009). Elle est aussi exprimée par des cellules immunitaires et notamment les macrophages ou les polynucléaires neutrophiles, où elle a un rôle antibactérien et antifongique (Lugardon et al., 2000). La CGA est également un précurseur de différents peptides actifs tels que la vasostatine, ayant un rôle inotrope négatif sur le cœur (Corti et al., 2004), et la catéstatine, ayant un rôle inhibiteur du relargage des catécholamines (Mahapatra, 2008; Mahapatra et al., 2006). Finalement, la CGA et ses peptides associés sont libérés en cas de stress et leur concentration plasmatique constitue un marqueur de gravité clinique chez des patients (Lavaux et al., 2010).

Afin d'approfondir l'analyse saisonnière, il faudra analyser la balance CGA/TSHb au cours de la réactivation photopériodique afin de pouvoir comparer cette cinétique à celle de l'activation photorefractaire endogène. Il faudra également comparer ces cinétiques à celles du hamster européen qui possède une horloge circannuelle comme le mouton. Ensuite, ces analyses étant faites avec un antisérum reconnaissant la CGA entière et la CGA étant un propeptide capable d'être clivé, il faudra analyser par Western blot si son clivage est régulé photopériodiquement (Ottesen et al., 2017a). Enfin, des cellules non thyréotropes contiendraient de la CGA dans la PT, il faudra donc

analyser si elle est exprimée ou recapturée par ces cellules. Pour cela, une étude par hybridation *in situ* permettra de savoir si les cellules en question possèdent le transcrit ou pas.

IV) Conclusion

Cette dernière partie de mes travaux visait à 1) identifier de nouveaux candidats dont l'expression est saisonnière chez des rongeurs saisonners et 2) le cas échéant d'évaluer leur rôle potentiel dans la régulation précoce de la Dio3 autant lors de l'activation photopériodique que photoréfractaire de la reproduction. Les gènes codant pour MKRN3, EAP1 et SHH, bien que régulés au cours du développement pubertaire, n'ont montré aucune variation photopériodique. L'expression de la somatostatine dans le recessus mammillaire et de la CGA dans la *PT* ont une régulation photopériodique, mais aussi endogène lors de la réactivation de la reproduction. Cependant, leur expression varie bien après celle de la Dio3 et est plutôt concomitante à la reprise de l'activité gonadique à partir de la 20ème semaine. Finalement, iI serait intérréssant d'évaluer la balance TSHβ/CGA chez le hamster européen, qui lui possède une horloge circannuelle, et de la comparer au résultats trouvés chez le hamster Djunagrien et le mouton.

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

DISCUSSION GENERALE

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

I) Introduction

Le but de nos recherches était de mieux comprendre comment les changements saisonniers de l'environnement sont intégrés dans le système nerveux central et contrôlent l'activité reproductrice. L'apport de ces nouvelles connaissances dans le milieu est crucial pour des enjeux socioéconomiques. En effet, de nombreuses espèces agricoles sont saisonnières et le contrôle de leur reproduction permet une optimisation de la production agroalimentaire (lait + viande). Nos études sont également importantes au niveau écologique, car de nombreuses espèces sont en voie de disparition à cause de difficultés de reproduction liées entre autres à une désynchronisation entre les informations environnementales lumineuses et nutritionnelles. La reproduction saisonnière est également un modèle unique où l'on peut inhiber ou activer physiologiquement la reproduction chez un individu adulte, ce qui permet une analyse fine des voies de régulation de l'axe HPG sans manipulation génétique, chirurgicale ou pharmacologique. Enfin l'étude de la reproduction saisonnière permet une amélioration des connaissances fondamentales de la physiologie animale.

II) Modèle historique du contrôle photopériodique de la reproduction

Le modèle d'étude de la reproduction saisonnière des rongeurs est souvent basé sur la comparaison d'un état inhibé en SP et activé en LP, ainsi que sur des manipulations pharmacologiques. Les études histologiques ont montré qu'en LP la TSHβ est surexprimée dans la PT (Bockmann et al., 1996; Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002) et que le ratio Dio2/Dio3 est augmenté dans les tanycytes (Petri et al., 2016; Revel et al., 2006b) conduisant à une augmentation des concentration de T3 dans l'hypothalamus médiobasal. L'expression du transporteur de la T3, MCT8, est également inhibée dans les tanycytes en LP par rapport à SP (Petri et al., 2016). Les neuropeptides régulateurs de l'activité des neurones à GnRH, Kp et RFRP3 sont également régulés par les changements saisonniers. Le nombre de neurones à RFRP dans le DMH est plus élevé en LP qu'en SP chez toutes les espèces saisonnières étudiées (Lomet et al., 2017; Rasri-Klosen et al., 2017; Revel et al., 2008; Sáenz de Miera et al., 2014; Talbi et al., 2016). Le nombre de neurones à Kp dans le noyau arqué, par contre, peut-être plus élevé en LP (Revel et al., 2006b, Talbi et al., 2016) ou en SP (Rasri-Klosen et al., 2017 ; Saenz et al., 2014 ; Lomet et al., 2017). Afin d'analyser l'implication possible des neuropeptides TSH, Kp et RFRP3 dans la reproduction saisonnière, des études pharmacologiques ont été entreprises. Des infusions chroniques de TSH chez des hamsters djungariens et rats adaptés à la SP, ont été capable de rétablir un phénotype de type LP pour le ratio Dio2/Dio3, et donc la concentration de T3 hypothalamique, les neuropeptides Kp et RFRP3, et l'activité gonadique (Helfer et al., 2013; Klosen et al., 2013). Des implants de T3, ou des administrations chroniques de Kp ou de RFRP3 dans le système nerveux central sont aussi capables de réactiver la reproduction d'animaux photoinhibés (Ancel et al., 2012; Ansel et al., 2011; Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007; Henningsen et al., 2016; Klosen et al., 2013; Revel et al., 2006a).

De ces observations, un modèle de travail a été réalisé reliant le système reproducteur au système saisonnier : lorsque l'animal passe en LP, le raccourcissement du pic de mélatonine lève l'inhibition de l'expression de TSHβ qui va donc augmenter dans la PT **(Fig. 37)**. La TSH se lie sur ses récepteurs présents sur les tanycytes où elle induit une augmentation du ratio Dio2/Dio3 **(Fig. 37)** conduisant à une augmentation locale de l'activation de la T4 en hormone thyroïdienne active T3. Cette augmentation du niveau de la T3 provoquerait ensuite par rétrocontrôle négatif une diminution homéostatique de l'expression du MCT8 par les tanycytes (Herwig et al. 2009).

A l'heure actuelle, il est bien établi que les hormones thyroïdiennes sont essentielles dans l'activation de la reproduction saisonnière (Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007).Cependant leurs cibles exactes dans l'hypothalamus restent hypothétiques bien que nos études suggèrent que les neurones à Kp et RFRP3 puissent être des cibles importantes pour coordonner les informations saisonnières à l'activité des neurones à GnRH et ainsi synchroniser l'activité reproductrice **(Fig. 37)**.

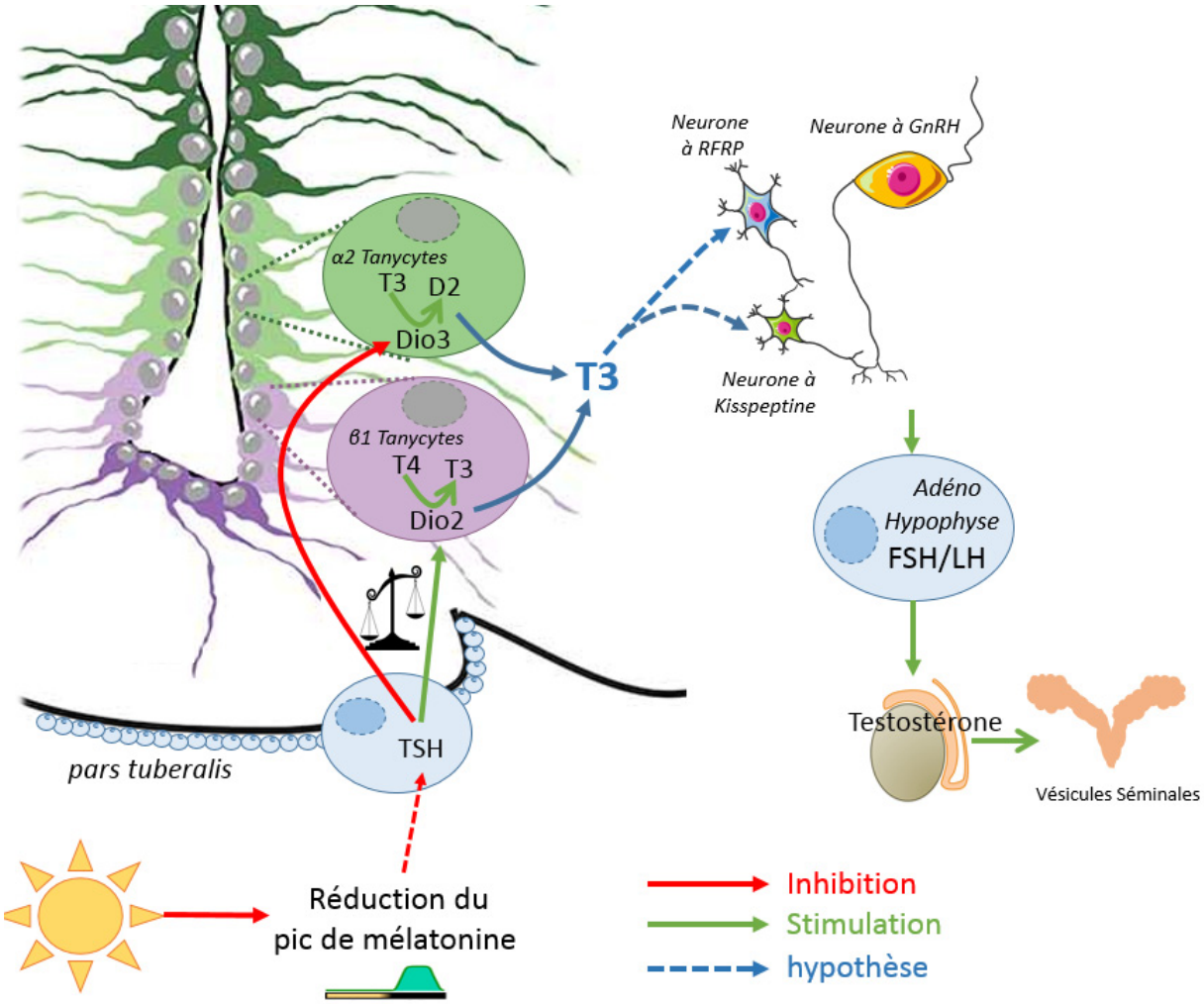


Figure 37 : Voie de signalisation hypothétique reliant les changements de photopériode aux changements d'activité reproductrice.

TSH : thyréostimuline, Dio2 : Désiodinase 2, Dio3 Désiodinase 3, T3 : triiodothyronine, T4 : Tétraïodothyronine

III) Limitation et ambigüité du modèle de travail

Ce modèle pose pourtant plusieurs limites. Ainsi, la transition d'une photopériode à l'autre peut entraîner des phénomènes transitoires non observables lorsque les animaux sont déjà pleinement adaptés à la LP ou SP. Il existe certainement des changements photopériodiques au-delà de ceux liés à la régulation de l'axe gonadotrope pouvant entraîner l'inclusion à tort de facteurs photopériodiques indépendants de la reproduction. Enfin, le modèle a été proposé en fonction de l'effet observé suite à des stimulations supraphysiologiques induites par l'approche pharmacologique pouvant entraîner de faux positifs.

IV) Nouvelle approche : l'analyse temporelle

Afin de mettre à l'épreuve ce modèle et de valider ou non l'implication des candidats et l'ordre des évènements moléculaires, j'ai fait une analyse temporelle de la réactivation de la reproduction. Le but était de décrire la chronologie d'activation des facteurs de la voie de signalisation responsable de l'activation photopériodique de la reproduction. J'ai également utilisé cette étude dynamique de photoréactivation pour la comparer au phénomène de réactivation endogène photoréfractaire dont les mécanismes sont à l'heure actuelle encore totalement inconnus. Le but était de déterminer quels sont les évènements moléculaires et cellulaires conservés et différents entre les deux mécanismes d'activation de la reproduction.

Les deux études ont été réalisées chez deux espèces de hamsters saisonniers, les hamsters syriens et djungarien, afin de pouvoir déterminer les mécanismes conservés de ceux spécifiques de l'une ou l'autre de ces deux espèces.

Trois évènements majeurs sont conservés lors de l'activation photopériodique et photoréfractaire ; 1) le couple TSH/Dio2 est activé tardivement, voire pas activé du tout dans le cas de l'activation endogène chez le hamster syrien **;** 2) similairement, l'expression des neuropeptides est régulée postérieurement à l'activation de l'axe reproducteur ; 3) enfin, la Dio3 est inhibée très précocement et c'est le seul facteur modifié avant l'activation de la reproduction.

a) <u>TSH/Dio2 est activé tardivement voire pas activé du tout lors de l'activation photopériodique et photoréfractaire</u>

L'une de nos premières observations est le fait que l'expression de TSH et Dio2 est extrêmement bien synchronisée. Peu importe le modèle de réactivation ou l'espèce, ces deux facteurs varient toujours au même moment et dans la même direction. Ceci est en accord avec la littérature montrant que Dio2 est activée par la TSH (Bolborea et al., 2015; Klosen et al., 2013; Sáenz de Miera et al., 2014).

i) TSH/Dio2 lors de l'activation photopériodique

Lors de l'activation photopériodique, TSH/Dio2 varient tardivement, respectivement après 14 et 42 jours de SP selon l'espèce, et donc de façon inattendue après l'augmentation de la FSH ou du poids testiculaire (Milesi et al., 2017). Ceci n'est pas en accord avec les études chez le mouton montrant une augmentation dès le deuxième jour (Dardente et al., 2010). Il est possible que cette augmentation tardive soit due à notre méthode d'analyse par hybridation *in situ* non radioactive qui est moins sensible que celle utilisant des radioisotopes. Néanmoins la comparaison est difficile car Dardente et al (2010) montrent une augmentation de 2,5 fois des transcrits après 2 jours, mais ne présentent pas le niveau final d'augmentation obtenu chez un animal pleinement actif. Il est donc difficile de juger de la relevance physiologique d'une telle augmentation ou de la comparer directement à nos résultats d'hybridation *in situ* non-radioactive. On peut également imaginer qu'une augmentation faible de TSH imperceptible à la quantification soit suffisante pour activer un système hyper sensible. Cependant j'écarterais cette hypothèse par le fait que les variations de TSH et de Dio2, juste en aval de TSH, sont corrélées. S'il y avait une hypersensibilité du récepteur à la TSH sur les tanycytes, l'augmentation minimale de TSH aurait dû créer une augmentation décuplée de Dio2 observable précocement.

ii) TSH/Dio2 lors de l'activation photoréfractaire

L'expression de TSH/Dio2 ne varie pas du tout lors de la réactivation photoréfractaire du hamster syrien et augmente très tardivement et avec une faible amplitude, après la réactivation de l'axe HPG, chez le hamster djungarien (Milesi et al., 2017). Cette légère augmentation n'est pas en accord avec les études précédentes (Böckers et al., 1997b) et les études de la partie 3 qui elles ne montrent aucune augmentation**.** L'augmentation de TSH/Dio2 ne semble donc pas nécessaire à l'initiation de l'activation photopériodique et photoréfractaire de la reproduction. La différence avec les études faites chez le mouton pourrait s'expliquer par le fait que cette espèce possède une horloge circannuelle qui pourrait contrôler l'expression de la TSH en complément des mécanismes photopériodiques.

iii) Rôle de la PT dans l'activation photopériodique/photoréfractaire endogène de la reproduction

Le rôle de la PT dans la physiologie saisonnière est discuté depuis une première étude qui montrait des changements saisonniers structuraux photopériodiques (Wittkowski et al., 1984). Plus tard, en 1987 et 1988, deux études montraient pour la première fois la présence de récepteurs à la mélatonine dans cette structure (Vaněcek et al., 1987; Williams and Morgan, 1988). En 1996, il a été montré que l'expression de TSHβ dans la PT était contrôlé par la photopériode et que cette régulation dépendait de la mélatonine (Bockmann et al., 1996; Klosen et al., 2002). Finalement, en 2010, Dardente et al. (2010) ont découvert les mécanismes par lesquels les changements photopériodiques de la mélatonine régulent l'expression saisonnière de TSHβ « tubéralienne ». Il

apparaît donc difficile de remettre en cause le rôle de la PT dans la physiologie saisonnière et plus particulièrement dans le contrôle de l'activation photopériodique de la reproduction chez les hamsters syriens et djungariens.

Cependant, nos résultats montrent une augmentation de TSHβ/Dio2 postérieure à la réactivation de l'HPG et une modification photopériodique de Dio3 antérieure aux premiers signes d'activation de la reproduction. Ceci nous amène à proposer un modèle alternatif, au moins chez les hamsters. En effet, la Dio3 est diminuée respectivement après 2 jours et 7 jours de LP chez les hamsters syriens et djungariens. Les tanycytes n'ayant pas de récepteur MT1, ils ne peuvent pas recevoir directement le signal mélatoninergique. L'information photique photopériodique pourrait donc arriver via une structure intermédiaire décodant la photopériode, autre que la PT. Il n'est pas exclu que la PT émette aussi un messager autre que la TSH qui serait plus précoce.

Dans le cadre de la réactivation photoréfractaire, aucune modification (chez le hamster syrien) ou une très faible augmentation tardive (chez le hamster djungarien) de TSHβ n'est observée dans la *PT*. Ceci suggère que la TSH n'interviendrait pas non plus dans l'initiation endogène photoréfractaire de l'activité de reproduction. Nous avons examiné si un autre élément de la PT pouvait avoir un rôle dans cette réactivation, notamment la CGA qui présente aussi une variation saisonnière (Wood et al., 2015). Nous avons confirmé que l'expression de la CGA de la PT des hamsters est également régulée par la photopériode, mais qu'elle n'est inhibée qu'à partir de la 20ème semaine, soit postérieure de 6 semaines à l'inhibition de Dio3. L'ensemble de ces informations suggère donc que la *PT* ne participe pas non plus à l'initiation endogène photoréfractaire de l'activation de la reproduction.

Ainsi, mes résultats indiquent que le mécanisme de photoréactivation endogène est différent de celui de l'horloge circannuelle endogène observée chez le mouton et le hamster européen. En effet, lorsque ces espèces sont gardées en conditions photopériodiques constantes, l'expression de TSHβ dans la PT varie de façon indépendante de la mélatonine et de la lumière, probablement sous le contrôle d'une horloge circannuelle qui reste à identifier (Sáenz de Miera et al., 2013, 2014). Il faut noter cependant que la PT des hamsters syriens et djungariens reçoit aussi un signal de réactivation endogène photoréfractaire car la CGA est diminuée à partir de la 20ème semaine. Cette information n'est pas nouvelle car Böckers et al. (1997) ont montré une augmentation tardive de l'expression d'αGSU dans la PT suite à la réactivation photoréfractaire. Il est néanmoins probable que ces variations tardives d'αGSU et CGA dépendent d'un effet secondaire des changements des stéroïdes sexuels, car certaines cellules thyréotropes de la PT expriment le récepteur aux androgènes (Klosen et al., non publié) ou encore des hormones thyroïdiennes.

Mes observations sont les premières indiquant que le mécanisme photoréfractaire initiant la réactivation endogène pourrait être initié au sein des tanycytes via une inhibition de la Dio3. Il pourrait aussi dépendre d'un signal dont l'origine est encore inconnue aujourd'hui.

b) La régulation de l'expression des neuropeptides Kp et RFRP n'est pas synchronisée avec l'activation de l'axe reproducteur

Que ce soit lors de l'activation photopériodique ou photoréfractaire, et que ce soit chez le hamster syrien ou djungarien, la modification de l'expression neuropeptides Kp et RFRP est postérieure à l'activation de l'axe HPG (Milesi et al., 2017) ce qui suggère que ces neuropeptides ne participent pas à l'initiation de la réactivation de la reproduction.

i) Quel est le rôle de Kp dans l'activation de l'axe reproducteur

Pour Kp, ce résultat remet en cause son rôle critique dans le contrôle saisonnier de la reproduction. En effet les études de Revel et al. (2006b) ont montré chez le hamster syrien une expression plus élevée de Kp dans le noyau arqué en LP par rapport à SP. Cependant, chez d'autres rongeurs saisonniers comme le hamster djungarien (Klosen et al., 2013) ou la hamster d'Europe (Sáenz de Miera et al., 2014), l'expression de Kp est inhibée en LP par rapport à SP, ce qui paraît contradictoire avec le fait qu'il soit un stimulateur de l'activité gonadique en LP. En fait, l'expression de Kp dans le noyau arqué est fortement inhibée par le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels chez toutes les espèces. Aussi, chez les hamsters djungarien (Rasri-Klosen et al. (2017) et d'Europe (Sáenz de Miera et al., 2014), les variations photopériodiques des concentrations circulantes de stéroïdes sexuels ont un effet inhibiteur, plus important que la photopériode en elle-même. Néanmoins, l'injection de Kp en intracérébroventriculaire chez le hamster syrien (Revel et al., 2006a) ou djungarien (Rasri-Klosen et al., 2017) ou en périphérie chez le hamster syrien (Ansel et al. 2011) en photopériode courte est capable de réactiver l'axe HPG photoinhibé de ces animaux. L'effet de réactivation pharmacologique est également discutable. En effet, la régulation de l'activité des neurones à GnRH est un équilibre entre des afférences stimulatrices et inhibitrices. La réactivation créée par les injections chroniques de Kp est donc due à un déséquilibre de cette balance du côté stimulateur. Ceci confirme donc le rôle régulateur de Kp sur les neurones à GnRH mais pas son rôle saisonnier.

Il reste néanmoins que nos résultats pourraient être influencés par la méthode d'analyse. En effet, l'hybridation *in situ* n'est pas la méthode la plus sensible pour détecter de faibles changements d'expression. De plus, comme Kp est un stimulateur très puissant de la sécrétion de GnRH, une faible augmentation de la sécrétion du peptide, non détectable par hybridation *in situ* ou immunohistochimie, pourrait suffire à initier la réactivation du système hypersensibilisé par une longue période en SP.

ii) Quel est le rôle de RFRP dans l'activation de l'axe reproducteur

Le rôle du RFRP3 dans la régulation de la reproduction est très discuté, car des effets activateurs ou inhibiteurs, voir nuls ont été décrits selon l'espèce (Ancel et al., 2012; Decourt et al., 2016; Pineda et al., 2010), le sexe au sein d'une espèce (Ancel et al., 2012, 2017; Henningsen et al., 2016) ou la

saison au sein d'un même sexe d'une même espèce (Ubuka et al., 2012). De plus, même s'il joue un rôle régulateur de l'activité reproductrice, son rôle ne semble pas crucial et peut manifestement être compensé. En effet, des souris déficientes pour le gène du NPFFR1, le récepteur du RFRP3, montrent une plus grande concentration de LH lors de la puberté chez le mâle mais pas chez la femelle malgré une taille supérieure des utéri (León et al., 2014). Chez l'adulte, l'effet KO du NPFFR1 s'amenuise puisqu'il n'y a plus d'effet sur la taille des gonades ni sur la LH bien qu'une légère augmentation de FSH reste détectable (León et al., 2014). Cependant, cette étude a été menée chez la souris en condition environnementale constante, ce qui ne permet pas de connaître l'implication possible de RFRP/NPFFR1 dans la reproduction saisonnière de hamsters adultes. Afin de tester l'effet d'une inhibition du système RFRP/NPFFR1, nous avons utilisé une approche pharmacologique avec le RF3286, un antagoniste sélectif du NPFFR1 mis au point par le docteur Frédéric SIMONIN (ESBS, Strasbourg). Des études préliminaires ont en effet montré que le RF3286 est capable d'inhiber totalement l'augmentation de LH causée par une injection aiguë de RFRP3 chez le hamster syrien, ce qui prouve son efficacité chez notre espèce d'intérêt (Henningsen, 2016) **(Fig. 38).**

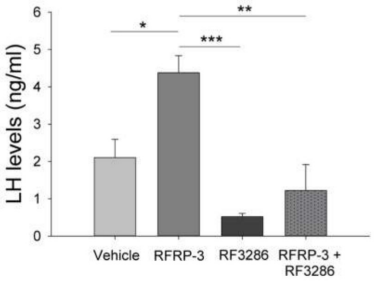


Figure 38 : Effet du RFRP3 et de son antagoniste RF3286 sur la sécrétion de LH chez le hamster syrien mâle.

L'injection intracérébroventriculaire de RFRP-3 (0.75 nM) induit une augmentation significative de la sécrétion de LH en comparaison au véhicule chez le hamster syrien mâle. Le RF3286 (10 nM), injecté seul, ne produit aucun effet significatif sur la sécrétion de LH, alors que lorsqu'il est injecté avec du RFRP-3 (0.75 nM), il bloque complètement l'effet stimulateur du RFRP-3. (Non publié). (Henningsen, 2016)

Nous avons administré cet antagoniste de façon chronique dans l'espace intracérébroventriculaire afin d'inhiber l'effet du RFRP sur son récepteur chez des hamsters syriens tout au long du processus de réactivation photopériodique lors d'un transfert de SP vers LP. Au bout de 6 semaines de LP, aucun effet n'a été observé sur la recrudescence de l'activité testiculaire et seule une surexpression de Kp était détectable dans le noyau arqué. Cet effet suggère que le RFRP endogène n'a pas de rôle essentiel dans la réactivation photopériodique de la reproduction. Cependant la dose ou le timing de délivrance n'ont peut-être pas été optimaux. Afin de confirmer ces résultats, ils doivent être reproduits en faisant varier ces paramètres.

De façon intéressante, le blocage du RFRP3 produit une inhibition de l'hypophagie lors de la première semaine post opératoire chez les animaux LP. Ceci n'est probablement pas dû à un effet purement métabolique, puisque le RFRP3 est décrit au contraire comme orexigène (Cazarez Márquez

et al., soumis; Talbi et al., 2016). Cet effet pourrait être dû à une meilleure récupération post opératoire des animaux sous RF3286. Le RFRP3 étant connu pour être proalgésique en abaissant le seuil de sensibilité à la douleur (Elhabazi et al., 2013b), cette observation mettrait à jour un effet analgésique du RF3286. Cet effet serait accru en LP, car la régulation saisonnière fait qu'en LP l'expression de RFRP est plus élevée qu'en SP. Pour confirmer cette hypothèse, des études de l'effet du RF3286 sur le seuil de sensibilité à la douleur pourraient être faites sur des animaux adaptés à la LP ou la SP. Pour cela, le test de la plaque chaude pourrait être utilisé (Tjølsen et al., 1991). En plus d'analyser l'effet analgésique du RF3286, une telle étude permettrait également d'analyser si le changement saisonnier d'expression du RFRP3 entraîne aussi des changements du seuil nociceptif menant à une diminution de la sensibilité à la douleur en hiver. Enfin, si le RFRP3 s'avère avoir un effet proalgésique chez le hamster, il sera nécessaire de réévaluer sur le plan éthique les injections aiguës et chroniques de RFRP3 à des doses supraphysiologiques tel qu'elles ont été faites de par le passé (Ancel et al., 2012; Henningsen et al., 2016).

iii) Existe-il un autre neuropeptide saisonnier de la famille des RFamides ?

Dans la famille des peptides RFamides, il existe d'autres membres et plus particulièrement le 26RFa (ou QRFP). Il provoque via son récepteur GPR103 une stimulation de l'axe reproducteur (Navarro et al., 2006a; Patel et al., 2008) ainsi qu'une augmentation de la prise alimentaire (Chartrel et al., 2005), deux paramètres régulés saisonnièrement chez le hamster djungarien. Cependant aucune étude sur la saisonnalité du 26RFa n'avait été menée jusqu'à aujourd'hui. J'ai donc analysé les variations saisonnières de l'expression du 26RFa chez le hamster syrien et djungarien. Dans l'hypothalamus du hamster syrien, je n'ai pas observé de différences entre SP et LP par qPCR. Chez le hamster djungarien, j'ai quantifié l'expression saisonnière du 26RFa en utilisant l'hybridation *in situ*. Mais aucune différence d'expression n'a été observée non plus entre SP et LP et ni chez des animaux photoréfractaires. J'ai voulu confirmer ces résultats en analysant la quantité de peptide par immunohistochimie, mais aucun des anticorps testés n'ont produit de marquage dans mes espèces d'intérêt. En plus de l'expression hypothalamique, le 26RFa est également synthétisé par l'intestin sous l'effet du glucose (Chartrel et al., 2016; Prévost et al., 2015). A l'inverse de l'étude hypothalamique, une étude préliminaire sur un faible nombre d'animaux a montré que les concentrations circulantes de 26RFa ont une tendance à être plus élevées ($p=0.07$) en SP qu'en LP dans le plasma du hamster djungarien, mais pas chez le hamster syrien. Cette observation devra être confirmée avec un nombre plus important d'animaux, mais ces résultats semblent en accord avec les effets connus du 26RFa et la physiologie du hamster. En effet, le 26RFa joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose en augmentant la sensibilité du récepteur à l'insuline et les concentration de l'hormone (Prévost et al., 2015). Or le hamster djungarien montre des variations saisonnières de la concentration et de la sensibilité à la leptine avec une concentration plus faible mais une sensibilité accrue en SP (Klingenspor et al., 2000). L'augmentation de la concentration circulante de

26RFa pourrait donc entraîner une augmentation de la sensibilité à l'insuline. La potentialisation de l'effet de l'insuline pourrait également expliquer la baisse de prise alimentaire en SP via une augmentation de l'effet satiétogène.

Ainsi, mes résultats remettent en cause le rôle des neuropeptides saisonniers RFRP3 et Kp dans l'initiation de l'activation saisonnière de la reproduction, mais ils pourraient cependant moduler l'activité des neurones à GnRH à plus long terme. J'ai également montré que l'expression du 26RFa dans l'hypothalamus n'est pas plus régulée saisonnièrement, même si un rôle périphérique pourrait exister.

c) La Dio3 est un facteur modifié avant l'activation de la reproduction

Inhibition précoce de la Dio3

Parmi les gènes candidats étudiés, ceux codant pour la TSH, la Dio2 ou les neuropeptides, ne sont augmentés que tardivement et après à l'activation de l'axe HPG. Seul le gène codant pour la Dio3 varie très précocement quel que soit l'espèce et le type d'activation. En effet lors de l'activation photopériodique, l'expression de la Dio3 dans les tanycytes α diminue respectivement dès le 2ème (hamster syrien) ou le 7ème jour (hamster djungarien), c'est-à-dire 12 ou 21 jours avant le premier signe d'activation de l'axe HPG. Similairement, lors de l'activation photoréfractaire chez le hamster djungarien, l'expression de Dio3 diminue 6 semaines avant l'activation de l'axe HPG. A l'inverse chez le hamster syrien, l'expression de Dio3 est inhibée seulement 4 semaines après l'activation de l'axe HPG mais dans ce cas il y avait une grande variabilité interindividuelle dans l'initiation endogène de la reproduction. En effet, dès la 14ème semaine, l'expression de la Dio3 tend à diminuer même si cela n'atteint pas un niveau significatif.

La diminution précoce de l'expression de la Dio3 pourrait jouer un rôle déterminant dans l'initiation de la réactivation, photopériodique ou endogène, de la reproduction. De par sa précocité, on pourrait cependant aussi penser que l'inhibition d'expression de Dio3 est un résidu de l'inactivation photopériodique due au passage de LP vers SP. Cependant, le délai entre le passage en SP et la diminution d'expression de Dio3 est différent entre l'activation photopériodique et photoréfractaire, ce qui indique l'implication d'un deuxième facteur régulateur. Cela pourrait être l'activation photopériodique ou l'initiation endogène photoréfractaire.

Désynchronisation entre Dio2/Dio3

Il est communément admis qu'il y a une régulation réciproque et inverse de la Dio2 et de la Dio3 tanycytaires par la TSH (Helfer et al., 2013; Nakao et al., 2008; Ono et al., 2008; Sáenz de Miera et al., 2013; Watanabe et al., 2007). Or, l'apport de la dimension temporelle dans notre étude montre une dissociation de la régulation de la Dio3, précoce, et de la Dio2, tardive, suggérant une régulation différentielle de ces deux enzymes. Il est en effet probable que contrairement à la Dio2, la Dio3 n'est

pas uniquement régulée photopériodiquement par la TSH. Les tanycytes n'ayant pas de récepteurs à la mélatonine de type MT1 et n'étant pas sensibles à la lumière, il doit donc exister un ou plusieurs intermédiaires régulés par la photopériode et capables d'inhiber précocement la Dio3 indépendamment de la Dio2.

Création d'un pic de T3 antérieur à l'activation de l'axe HPG

La diminution de Dio3, qui catabolise T3 et T4 en formes inactives D2 et rT3, devrait induire une accumulation des deux formes actives T3 et T4, d'autant que le transporteur MCT8 reste stable jusqu'après la réactivation de l'axe HPG. Ainsi, cette régulation pourrait induire une fenêtre temporelle pendant laquelle les concentrations hypothalamiques de T3 et T4 seraient augmentées. La proportion de T3 et de T4 dans cette accumulation est inconnue, cependant même si l'affinité du récepteur aux hormones thyroïdiennes à la forme de stockage T4 est 20 à 30 fois plus faible que celle à la forme active T3, les deux formes sont capables de l'activer (Sandler et al., 2004). Les hormones thyroïdiennes étant capable de réactiver la reproduction d'hamsters photoinhibés (Barrett et al., 2007; Freeman et al., 2007), un pic d'hormones thyroïdiennes créé par l'inhibition de la Dio3 pourrait être suffisant pour initier la réactivation de la reproduction

Qui peut réguler la Dio3 ?

La PT étant considérée comme le principal décodeur photopériodique (Dardente et al., 2010), le messager régulant la Dio3 pourrait en être issu, mais il pourrait aussi provenir d'une autre structure qui reste à identifier. Ce décodeur pourrait dépendre du signal mélatoninergique comme dépendre directement du signal lumineux. En effet, chez le hamster européen, des animaux pinéalectomisés sont toujours capable d'être entrainés par la photopériode (Monecke et al., 2013).

Pour tenter d'identifier ce signal inhibant l'expression de la Dio3, j'ai fait une recherche bibliographique de candidats potentiels selon 3 axes : des régulateurs connus de Dio3, des régulateurs de l'activité reproductrice et des candidats photopériodiques connus mais non évalués dans ce contexte. J'ai ensuite validé leurs variations photopériodiques via une quantification SP/LP. Et pour ceux qui présentaient une variation photopériodique j'ai réalisé une analyse de la cinétique de ces variations lors d'une réactivation photoréfractaire, et non pas photopériodique afin de m'affranchir des changements physiologiques induits par la mélatonine.

- Régulateur connus de la Dio3

Sonic Hedgehog (SHH) était un candidat potentiel d'intérêt, car il active Dio3 dans certaines tumeurs (Dentice et al., 2007; Luongo et al., 2014). De plus il présente une expression saisonnière dans les tanycytes de mouton (Lomet et al., (2017), même si le niveau plus élevé en LP est contradictoire avec la régulation attendue chez nos modèles de rongeurs saisonniers. Chez les hamsters syriens et djungariens, le niveau d'expression dans l'hypothalamus est très faible chez

l'adulte et une étude des variations photopériodiques par qPCR n'a révélé aucun changement photopériodique. Ainsi, mes résultats suggèrent que SHH n'est pas impliqué dans la régulation précoce de Dio3.

- Les régulateurs de l'activité reproductrice

MKRN3 et EAP1 sont deux régulateurs de la signalisation cellulaire qui sont de bons candidats, car leurs mutations entraînent une puberté retardée ou précoce (Abreu et al., 2013; Heger et al., 2007) et ils sont exprimés dans l'hypothalamus médiobasal. Mais, aucune variation d'expression photopériodique n'a été observée par PCR quantitative sur des échantillons d'hypothalamus chez le hamster syrien. Afin d'approfondir cette étude, j'ai essayé d'analyser leur expression au niveau cellulaire par hybridation *in situ* non radioactive. Malheureusement, les sondes que j'ai mises au point ont donné un marquage diffus difficilement exploitable. Cependant des comarquages avec des marqueurs cellulaires spécifiques comme Kp ou DARPP32 (pour marquer les tanycytes), pourraient permettre une analyse de ces marquages spécifiquement dans des cellules impliquées dans le contrôle photopériodique. Pour le moment, mes résultats suggèrent que ces deux facteurs n'interviennent pas dans la régulation photopériodique.

- Les facteurs photopériodiques

J'ai également examiné des facteurs dont une expression photopériodique a été rapportée chez d'autres espèces. Par exemple, chez le mouton, l'expression de la CGA dans la PT varie inversement à celle de la TSHβ et cette variation est maintenue lorsque les animaux sont maintenus en conditions constantes, suggérant que ce système soit à la base de l'horloge circannuelle (Wood et al., 2015). De plus, la somatostatine pourrait aussi être un candidat potentiel à la régulation de la Dio3, car son expression est augmentée en SP chez le hamster djungarien (Klosen et al., 2013) et les α tanycytes, qui expriment la Dio3, possèdent le récepteur SST2A (Hashemi et al., 2001). L'analyse des cinétiques de variation de la somatostatine et de la CGA lors de l'activation photoréfractaire de la reproduction chez le hamster djungarien montre que ces deux candidats ne varient que 6 semaines après l'inhibition initiale de Dio3**.** Ce sont donc des candidats saisonniers, mais la cinétique de leur variation ne suggère pas qu'ils soient associés à la diminution précoce de Dio3. Par contre, leurs changements d'expression pourraient être régulés par le pic d'hormones thyroïdiennes (consécutif à l'inhibition de Dio3) ou de l'augmentation du taux de testostérone circulante (consécutif à la réactivation de la reproduction).

En conclusion, mon étude a mis à jour une régulation inédite de la Dio3 lors de l'activation photopériodique ou photoréfractaire, mais mes analyses actuelles n'ont pas encore permis de révéler de candidat potentiel pour cette régulation précoce de la Dio3. Parallèlement, mon étude remet aussi en question le rôle du système TSH/Dio2 et des neuropeptides reproducteurs dans l'initiation de la réactivation de la reproduction. Ces résultats me permettent de proposer un

nouveau modèle de travail pour la voie de signalisation entraînant les changements d'activité reproductrice sous le contrôle des changements photopériodiques et du phénomène de photoréfraction.

V) Nouveau modèle du contrôle photopériodique de la reproduction

Le nouveau modèle que je propose comprend deux voies : une voie rapide d'initiation de l'activité reproductrice et une voie longue de stabilisation **(Fig. 39).**

La première voie impliquerait une inhibition précoce de la Dio3 qui, associée à une forte expression de MCT8, entrainerait une augmentation locale de la concentration de T3 et T4. Ces hormones thyroïdiennes pourraient avoir une action stimulatrice directe sur les neurones à GnRH qui expriment les récepteurs TRα (Jansen et al., 1997) ou indirecte via les tanycytes. L'action indirecte pourrait impliquer la libération par les tanycytes de prostaglandines E2, dont les récepteurs EP1 sont localisés sur les terminaisons axonales des neurones à GnRH (Prévot et al., 2003). L'activation de ces récepteurs entraine une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et le recrutement de vésicules de neurohormones. Les hormones thyroïdiennes pourraient également entrainer le remaniement plastique de la couverture tanycytaire sur les terminaisons axonales des neurones à GnRH, régulant ainsi leur l'accès au réseau capillaire du système porte hypophysaire (Clasadonte et al., 2011a; Garcia-Segura et al., 2008; Prevot et al., 2003; Yamamura et al., 2004a). On pourrait également imaginer que la modification de Dio3, les modifications plastiques et stimulations paracrines soient simultanées. L'inhibition précoce de Dio3 servirait alors dans ce cas-là de marqueur afin de visualiser quand les tanycytes reçoivent l'information photopériodique. Le but de cette voie pourrait être d'initier rapidement la réactivation de la reproduction via une stimulation directe de la libération de GnRH au niveau de la terminaison axonale.

La seconde voie serait mise en jeu plus tardivement lors de la réactivation photopériodique. Elle ferait intervenir une augmentation de T3 via une stimulation de l'expression de Dio2 sous le contrôle de la TSH de la PT. Cette seconde voie, plus puissante, pourrait stimuler l'expression des neuropeptides saisonniers régulateurs des neurones à GnRH comme le RFRP3 et la Kp (Revel et al., 2006a, 2008).

Si les mécanismes impliqués dans la régulation de la TSHβ par la mélatonine sont maintenant bien connus (Dardente et al., 2010), ceux qui régulent l'inhibition précoce de Dio3 ne sont pas connus. L'un de nos prochains défis sera d'établir quel signal photopériodique régule l'expression de la Dio3. Ce signal pourrait provenir aussi de la *PT,* mais la CGA que nous avons analysée ne varie pas de façon précoce. Les tanycytes n'exprimant pas le récepteur MT1 pour la mélatonine, le signal pourrait aussi provenir d'une autre structure. Il pourrait être aussi indépendant du signal mélatoninergique car le hamster européen pinéalectomisé est toujours capable d'être entrainé par la photopériode (Monecke et al., 2013).

Les SCN, qui reçoivent des informations photiques, sont riches en récepteur MT1 et possèdent un système de mesure du temps. De plus, chez des hamsters djungariens pinéalectomisés, si ces noyaux sont lésés, cela entraine un blocage de la réponse de l'axe reproducteur à des infusions de mélatonines simulant des jours courts (Bartness et al., 1991). A l'inverse, chez cette même espèce l'injection par microdialyse de mélatonine directement dans les SCN induit une régression testiculaire (Badura and Goldman, 1992). Cette structure pourrait donc être une structure de choix dans la régulation photopériodique dépendante de la reproduction. Via des sorties glutamatergiques (Kalsbeek et al., 2006), les SCN pourraient stimuler les astrocytes afin qu'ils produisent des neurégulines et du TGF α (Clasadonte et al., 2011a; Dziedzic et al., 2003). En effet, la neuréguline est capable d'inhiber la Dio3 (Simmons et al., 2016) et le TGFα est capable de stimuler la voie ErbB1 tanycytaire et astrocytaire, qui en aval pourrait stimuler les neurones à GnRH (Clasadonte et al., 2011a; Prevot et al., 2003).

Une deuxième structure de choix serait le DMH. tout comme pour les SCN chez le hamster djungarien, ces noyaux sont riches en récepteurs à la mélatonine (Maywood and Hastings, 1995). Sa lésion chez le hamster syrien entraine un blocage de la réponse de l'axe reproducteur à des infusions de mélatonines simulant des jours courts, alors que ça ne bloque pas la réponse de la prolactine (Maywood et al., 1996). A l'inverse la mise en place de micro-implant de mélatonine dans le DMH a significativement avancé la mise en place du phénotype reproductif hivernal chez le mouton sans affecté la PT (Lincoln and Maeda, 1992; Malpaux et al., 1993, 1995). Cette structure serait d'autant plus intéressant que les tanycytes α dans lesquelles la dio3 est inhibée précocement, projettent dans cette structure (Rodríguez et al., 2005). Nous pourrions également penser que les neurones à RFRP soient un acteur de ces effets photopériodiques DMH dépendant, puisqu'ils possèdent leur corps cellulaire dans ces noyaux et régule les neurones à GnRH. Cependant leur activation tardive lors du processus de réactivation questionne sur cette hypothèse.

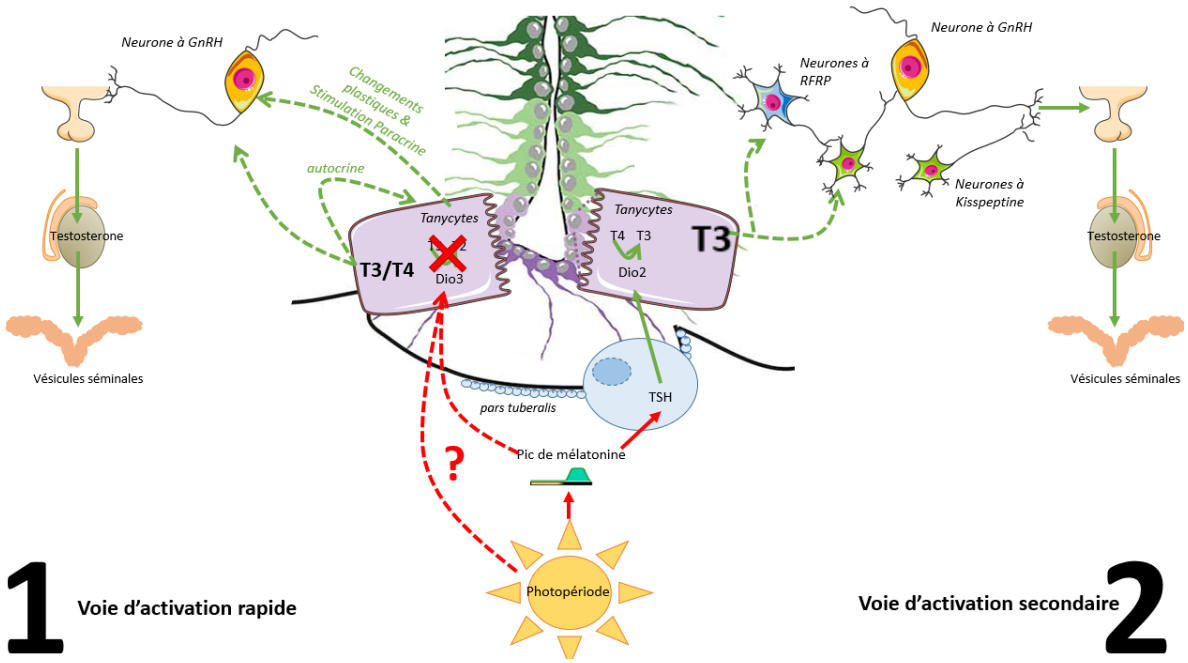


Figure 39 : Nouveau modèle de travail de la voie de signalisation reliant les changements photopériodiques aux changements d'activité reproductrice.

Flèche verte : stimulatrice, Flèche rouge : inhibitrice, Flèche en pointillé : hypothèse, croix rouge : enzyme inhibée.

VI) Modèle du contrôle endogène photoréfractaire de la reproduction

Pour l'activation endogène photoréfractaire, j'ai obtenu des résultats similaires à l'activation photopériodique. Ceci suggère qu'outre les mécanismes initiateurs, les voies cellulaires photopériodiques et photoréfractaires sont proches. Lors de l'activation photoréfractaire, la voie précoce inhibe la Dio3, mais le duo TSH/Dio2 et la PT n'interviendraient pas. Les neuropeptides s'activeraient plus tardivement afin de réguler l'activité des neurones à GnRH. Leur activation est peut-être causée par le pic primaire d'hormones thyroïdiennes créé par l'inhibition de la Dio3 ou ils peuvent être aussi activés secondairement par les stéroïdes sexuels.

Aujourd'hui nous ne savons toujours pas où se situe le mécanisme endogène responsable du timing et de l'initiation de l'activation de la reproduction chez les espèces photoréfractaires. Cependant, le signal inhibant la Dio3, il pourrait être intrinsèque aux tanycytes, ou la structure devra être capable de projeter sur ces cellules. Ce mécanisme pourrait être basé sur des modifications épigénétiques. En effet, il a été montré que le promoteur de Dio3 est méthylé lors de la réactivation endogène, ce qui entrainerait la diminution de son expression (Stevenson and Prendergast, 2013).

VII) Un rôle de la CGA dans la PT des hamsters djungariens

Chez le mouton, il a été récemment montré que la CGA et la TSHβ sont exprimées de façon strictement inverse par les cellules thyréotropes de la PT, et que cette alternance maintenue en conditions photopériodiques constantes pourrait être à la base de l'horloge circannuelle chez le mouton (Wood et al., 2015). Dans ce contexte, nous avons voulu examiner 1) si une telle régulation existe aussi chez le hamster djungarien et 2) s'il pouvait expliquer le phénomène de photoréfraction.

a) Quelles cellules de la PT expriment la CGA

Afin de savoir si la CGA est aussi exprimé chez le hamster djungarien par des cellules thyréotropes, un comarquage a été fait avec l'αGSU. Dans la PT du hamster djungarien, quelle que soit la photopériode, environ 85% des cellules CGA expriment l'αGSU, indiquant que ce sont soit des cellules thyréotropes, soit des cellules gonadotropes (Dardente et al., 2003). Les 15% de cellules CGA positives qui n'expriment pas l'αGSU pourraient être soit des cellules endocrines dont l'expression de l'αGSU est très faible, soit des cellules folliculostellaires ou des macrophages connus aussi pour exprimer la CGA chez le rat (Eissa et al., 2018; Majdoubi et al., 1996; Stilling et al., 2005). Afin d'analyser si la CGA est synthétisée par des cellules non endocrines ou si elle est recaptée après avoir été sécrété par les cellules endocrines, il faudrait examiner la localisation cytologique de ses transcrits par hybridation *in situ*.

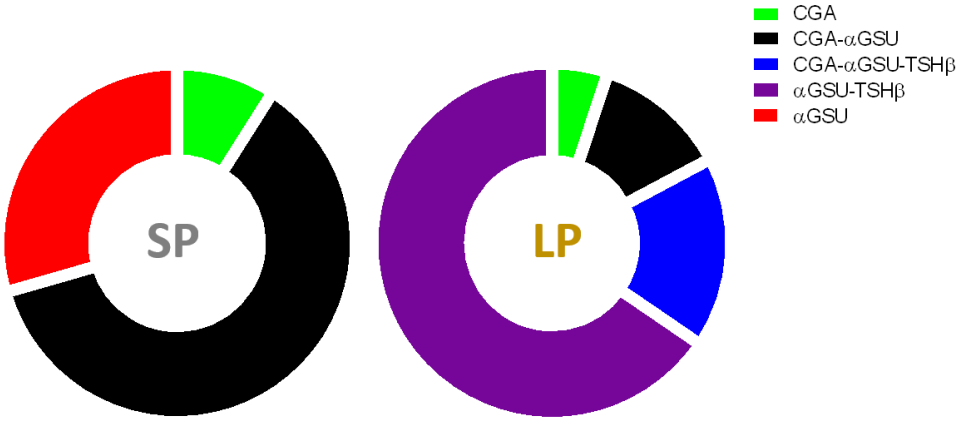


Figure 40 : Représentation indicative des différentes populations cellulaires identifiées par des marquages αGSU, TSHβ, et CGA, en fonction de la photopériode courte (SP) et longue (LP).

b) L'expression de la CGA est saisonnière

Chez le hamster djungarien, comme chez le mouton, l'expression de la CGA dépend de la photopériode avec des niveaux de protéine plus élevés en SP qu'en LP, c'est-à-dire opposée à celle de la TSHβ. Cependant, cette régulation n'est pas aussi stricte que chez le mouton, puisque l'expression de la CGA n'est pas totalement inhibiée en LP (il reste environ 47% du niveau d'expression en SP). De plus, l'alternance CGA-TSHβ n'est pas aussi exclusive puisqu'en LP environ 32% des cellules CGA expriment aussi la TSHβ.

Lors de la réactivation photoréfractaire, chez le mouton maintenu en photopériode inhibitrice, il y a aussi une stricte inversion du ratio CGA/TSHβ (Wood et al., 2015). Lors de la réactivation photoréfractaire du hamster djungarien, l'expression de la CGA diminue à partir de la 20ème semaine mais n'est pas totalement inhibée, car le niveau reste encore 1.6 fois plus élevé qu'en LP. A l'inverse, l'expression de la TSHβ reste inhibée pendant toute la SP.

Dans l'ensemble, mes observations chez le hamster djungarien indiquent que, contrairement au mouton, il n'existe pas de switch binaire strict TSHβ/CGA. Cette différence de corégulation TSHβ/CGA pourrait s'expliquer par le fait que chez le mouton, il a été proposé par Wood et al. (2015) que ce switch serait à la base de l'horloge circannuelle, alors que les hamsters djungariens n'ont pas d'horloge circannuelle. L'inhibition tardive de la CGA, qui n'est pas observée pour la TSHβ, pourrait être due au pic de T3, dépendant de l'inhibition de la Dio3, ou au rétrocontrôle des stéroïdes sexuels par les organes reproducteurs réactivés.

Dans le futur, il faudra analyser les variations de la CGA lors de la réactivation photopériodique du hamster djungarien, afin de voir si elles sont également tardives. Dans, ce cas, il serait intéressant d'évaluer l'influence des stéroïdes sexuels sur les variations d'expression saisonnière de la CGA chez des hamsters djungariens castrés. Enfin, pour déterminer si l'alternance stricte CGA/TSHβ dans les cellules thyréotropes est la marque d'une horloge circannuelle, il faudrait comparer leur expression

en été subjectif et en hiver subjectif chez des hamsters d'Europe, qui possèdent une horloge circannuelle qui régule la TSHβ de la PT (Sáenz de Miera et al., 2014).

c) Quel est le rôle de la CGA dans la PT.

Dans les cellules endocrines, la CGA joue un rôle dans la formation et la stabilisation des granules de sécrétion ainsi que dans le tri et la sécrétion des vésicules (Montero-Hadjadje et al., 2009). Elle est généralement utilisée comme marqueur des cellules endocrines (Gazdar et al., 1988; Rindi et al., 1986; Wilson and Lloyd, 1984). Cependant, elle peut être exprimée dans des cellules non endocrines telles que des cellules de soutien ou des macrophages dans lesquels elle aurait un rôle antibiotique et antifongique (Eissa et al., 2018; Lugardon et al., 2000; Majdoubi et al., 1996; Stilling et al., 2005).

La CGA est aussi considérée comme une molécule précurseur clivable en différents peptides dont la nature dépend des tissus. Par exemple, la CGA peut être cliver entre autres en vasostatine, qui régule l'angiogenèse et la contractibilité cardiaque, ou en pancréastatine, capable de d'inhiber la sécrétion d'insuline (Helle et al., 2018). Pour quantifier l'expression de la CGA, j'ai utilisé un antisérum détectant la forme complète de la protéine et potentiellement tous ses produits de clivage. Afin de poursuivre cette analyse, il serait intéressant de savoir quelles sont les formes réellement présentes dans la PT et si le clivage varie de façon saisonnière. Ceci pourrait être réalisé par Western blot (Ottesen et al., 2017b) ou par spectrométrie de masse sur des PT isolées. Finalement la CGA pouvant être glycosylée, il serait intéressant d'analyser s'il existe des modifications de cette glycosylation en fonction des saisons.

Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

PERSPECTIVES

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

L'ensemble de mes travaux a permis de poser de nouvelles questions auxquelles il faudra répondre dans le futur. Il s'agira de mieux définir les rôles de TSH/Dio2 et des neuropeptides RFamides dans l'activation photopériodique de la reproduction et d'identifier les régulateurs précoces de Dio3, ce qui pourra éventuellement aider à mieux comprendre les mécanismes responsables du phénomène de photoréfraction.

I) Quel est le rôle de TSH/Dio2 dans l'activation de la reproduction chez les espèces saisonnières

Dans toutes les analyses cinétiques chez les hamsters syriens et djungariens, nous avons trouvé une variation tardive de TSH/Dio2, qui n'est pas en accord avec les études chez le mouton montrant que l'expression de la TSH est augmentée déjà deux jours après le transfert en LP (Dardente et al., 2010). Afin de confirmer cette régulation tardive chez les hamsters, qui questionne le rôle primordial de la TSH dans l'activation photopériodique de la reproduction, je propose de refaire cette analyse en utilisant la PCR quantitative en temps réel, qui est une technique plus sensible et qui permettra d'éventuellement analyser le niveau résiduel d'expression de TSHβ en SP. Les résultats seront comparés avec l'étude chez le mouton. Il faudra cependant inclure dans notre étude des groupes de référence tels que des groupes stabilisés en SP et en LP et prendre un soin particulier au niveau de la reproductibilité de l'échantillonnage des hypothalami médiobasaux. En effet, la PT ne représentant qu'une faible partie de l'échantillon, il est très facile d'induire une « dilution » variable des transcrits de la PT dans l'ensemble du tissu prélevé et donc une variabilité interindividuelle. De plus, la *PT* peut facilement être endommagée et contaminée avec de l'adénohypophyse qui exprime aussi de la TSHβ.

Que ces résultats par qPCR confirment une activation tardive ou montrent une activation plus précoce, il faudra comparer cette cinétique à celle de l'activation centrale de l'axe HPG, c'est-à-dire l'activation des neurones à GnRH, et non pas la FSH ou la masse testiculaire qui sont des indices distaux de l'activation. Afin de savoir quand s'activent les neurones à GnRH, je propose de faire un marquage du marqueur d'activation neuronale cFOS dans les neurones à GnRH et de doser la LH plasmatique autour du moment où la Dio3 est modifiée. Il y pourrait aussi exister une augmentation transitoire de l'expression de GnRH au moment de l'activation (Porkka-Heiskanen et al., 1997), qui pourrait être analysée par hybridation *in situ.*

Finalement, afin de valider définitivement l'implication de TSH/Dio2, il faudrait inhiber spécifiquement ces facteurs et en évaluer les effets sur la réactivation de la reproduction photopériodique ou photoréfractaire. Plusieurs approches sont possibles dans nos modèles d'étude :

1) L'approche pharmacologique :

Les T3 et T4 ayant un rôle ubiquitaire, il faut appliquer les produits pharmacologiques inhibiteurs localement et éviter que la molécule ne passe la barrière hématoencéphalique. Il faut également des antagonistes très efficaces. En effet, il est déjà connu que le système reproducteur possède de nombreuses redondances et que de forts taux d'inhibition sont nécessaires afin d'observer un effet physiologique. Par exemple, seulement 12% des neurones à GnRH sont nécessaires pour que la puberté soit maintenue, et seulement entre 12 et 34% des neurones à GnRH sont nécessaires au maintien de la cyclicité oestrienne (Herbison et al., 2008). Des essais avec une infusion à long terme d'acide iopanoïque (un inhibiteur des Désiodinases) ont été réalisées au laboratoire mais sa faible solubilité et son manque de spécificité (inhibe Dio2 et Dio3) n'ont pas permis d'avoir de résultats concluants. Puisque peu d'antagonistes des récepteurs à la TSH sont disponibles, j'ai essayé d'utiliser un anticorps monoclonal de souris anti-récepteur TSH (clone 4C1), connu pour bloquer 80% de la liaison de la TSH à son récepteur à une concentration de 5µg/ml (Shepherd et al., 1999). J'ai injecté 5 µg de cet anticorps dans le ventricule latéral de hamsters djungariens et quatre heures plus tard, j'ai stimulé le récepteur TSH des tanycytes par une injection aigüe intracérébroventriculaire de TSH. Aucun effet de l'anticorps n'a été observé puisque, dans les deux cas, la TSH a activé l'expression de Dio2 mesurée par hybridation *in situ* 4 heures plus tard. On ne peut pas exclure que la dose ou l'intervalle d'attente n'étaient pas adaptés, ou que l'anticorps ne soit pas suffisamment sélectif. En effet, il n'a pas donné de marquage sur les tanycytes malgré une conservation à 100% de l'épitope reconnu sur le récepteur TSH entre l'homme et le hamster djungarien (humain LQAFDSHYDY 378-387) (Shepherd et al., 1999).

2) Approche par interférence ARN :

L'interférence ARN utilise une propriété physiologique des cellules eucaryotes qui est de dégrader tout ARN double brin présent dans la cellule. Ainsi, pour inhiber l'expression d'un gène, on fait exprimer de courtes séquences d'ARN complémentaires à un ARNm cible (shRNA) dans une cellule et la création du double brin entraînera la dégradation de l'ARNm cible par le complexe RISC (Karagiannis and El-Osta, 2004). L'apport des shRNA peut se faire par des virus, mais dans le cas de la reproduction saisonnière, il faut que l'infection soit stable sur plusieurs semaines. Les lentivirus sont donc le virus de choix, grâce à ses propriétés de rétrotranscription qui permettent l'insertion du matériel génétique dans l'ADN de la cellule hôte et donc une expression très stable (à la différence des AAV qui ne sont pas intégratifs). Finalement, il faut avoir accès au génome de l'espèce étudiée, ce qui est le cas du hamster syrien mais pas encore du hamster djungarien. Dans notre modèle expérimental, l'extinction de la TSHβ nécessite de cibler la PT qui est difficile d'accès pour l'injection des virus et il faut éviter de contaminer l'adénohypophyse qui exprime aussi la TSHβ. L'inhibition de la Dio2 serait plus facile car les tanycytes sont plus accessibles, mais il faudra veiller à ce qu'une proportion suffisante de tanycytes soit infectée par le virus.

J'ai commencé le développement de cette stratégie afin d'inhiber l'expression de Dio2 dans les tanycytes chez le hamster syrien. Pour cela, j'ai développé une culture primaire d'adipocytes bruns pour tester l'efficacité des shRNA, car ces cellules expriment le récepteur TSH, ainsi que Dio2 et Dio3. Cependant, je n'ai pas pu mener ce projet à terme dans le temps imparti pour ma thèse de doctorat.

3) Approche transgénique :

Les approches transgéniques classiques ne sont pas accessibles sur les modèles de hamster. Cependant l'arrivée de la technique CRISPR-CAS9 va maintenant pouvoir permettre d'en générer. Cette technique consiste à extraire une partie d'ADN double brins spécifique du génome via l'enzyme Cas9 et de la remplacer pour introduire une mutation gain ou perte de fonction (Tremblay, 2015). Des études sont actuellement en cours pour développer cette technique chez le hamster syrien.

Cette technique peut être utilisée chez l'adulte. Cependant l'apport des composants nécessaires se faisant par l'utilisation de virus, les mêmes limitations que pour l'inhibition par ARN interférant s'appliquent. A la différence de l'interférence ARN, on peut cependant aussi l'utiliser au stade embryonnaire afin de générer des animaux transgéniques (Fan et al., 2014). Le but serait d'utiliser cette dernière option afin d'inhiber l'expression de TSHβ seulement dans la PT en injectant le virus permettant l'expression de CAS9 sous contrôle du promoteur d'un gène spécifique des cellules thyréotropes de la *PT* tel que le gène MT1.

II) Quel est le rôle des neuropeptides RFamides dans la reproduction saisonnière ?

Des études montrant une inhibition de l'expression de Kp dans le noyau arqué en LP (à cause du fort rétrocontrôle des stéroïdes sexuels) chez des rongeurs saisonniers (Rasri-Klosen et al., 2017; Sáenz de Miera et al., 2014), remettent en cause leur rôle sur le contrôle saisonnier de la reproduction. Par ailleurs, mes résultats montrent que l'inhibition de la signalisation du RFRP3 par l'antagoniste RF3286 n'a produit aucun effet sur l'activité reproductrice du hamster syrien. Finalement, que ce soit lors de la réactivation photopériodique ou photoréfractaire chez le hamster syrien ou djungarien, l'expression des gènes codant pour Kp et RFRP3 est activée tardivement. Le rôle de ces neuropeptides RFamides dans les processus d'activation saisonnier de la reproduction reste donc discutable.

a) Rôle de Kp

La meilleure approche pour déterminer l'importance de Kp serait d'inhiber son expression ou son action sur son récepteur lors des processus de réactivation de la reproduction.

Des souris où le gène *Kiss-1* ou *Kiss-1R* est invalidé présentent un hypogonadisme hypogonadotropique (Kauffman et al., 2007a; Lapatto et al., 2007). Cependant le phénotype des souris *Kiss-1* $^{-/-}$ semble moins sévère que celui des souris *Kiss-1R* $^{-/-}$. En effet, malgré une concentration circulante de gonadotropines plus faible, la moitié des femelles *Kiss-1* $^{-/-}$montre un

poids gonadique similaire aux souris contrôles et une cornification du vagin (Lapatto et al., 2007). Ceci pourrait être causé par la présence d'un deuxième ligand du Kiss1R et/ou une activité intrinsèque du récepteur. Malgré cela, l'hypogonadisme général observé chez ces souris KO montre bien l'importance de Kp dans le développement reproductif et l'apparition de la puberté. Cependant, avoir un rôle déterminant dans le développement reproducteur n'induit pas nécessairement un rôle obligatoire dans la régulation saisonnière. Afin d'analyser l'implication des neurones à Kp du noyau arqué, qui coexpriment la Neurokinine B et la Dynorphine (neurones KNDys) et qui seraient un générateur de pulses de GnRH (Uenoyama et al., 2014), il serait intéressant d'analyser les variations d'activité du pulse générateur afin de savoir si son activité électrique est modulée en fonction des saisons. Une inhibition de Kp au cours du processus de réactivation photopériodique de la reproduction serait aussi nécessaire pour mieux comprendre son rôle saisonnier. Il faudra cependant être capable de discerner un effet dû à une modification de la physiologie saisonnière, d'un effet dû à la modification de la physiologie reproductrice.

A l'heure actuelle, il existe un antagoniste pharmacologique de Kiss1R, le 2-acylamino-4,6-diphenylpyridine, capable *in vivo* de diminuer le taux circulant de LH (Kobayashi et al., 2010). Il faudra cependant faire des courbes doses-réponses afin de savoir quel est le pourcentage d'inhibition maximal qui peut être atteint. La famille des RFamides ayant des récepteurs structurellement proches, il faudra également vérifier qu'il n'y a pas d'effets croisés comme nous l'avons observé avec le RF9, d'abord présenté comme antagoniste du GPR147, puis qui s'est avéré aussi stimulateur du Kiss-1R (Min et al., 2015; Simonin et al., 2006). L'inhibition via interférence ARN est possible mais surement compliquée, car la population des neurones à Kp étant étendue, il sera difficile d'infecter l'intégralité de la population. Finalement, si la technique de CRISPR/CAS9 est mise au point chez les rongeurs saisonniers, elle pourra être utilisée pour évaluer l'effet saisonnier du Kp.

b) <u>Rôle de RFRP3</u>

Le rôle du RFRP3 dans la régulation de la reproduction est très discuté, car son effet activateur ou inhibiteur dépend de l'espèce, du sexe, de la photopériode et de l'interaction entre ces trois facteurs (Ancel et al., 2017; Henningsen et al., 2016; Ubuka et al., 2012). De plus, son rôle ne semble pas crucial et peut manifestement être compensé. En effet, des souris déficientes pour le gène du NPFFR1, le récepteur du RFRP3, montrent chez l'adulte que l'effet KO du NPFFR1 est minime puisqu'il n'y a pas d'effet sur la taille des gonades ni sur la LH bien qu'une légère augmentation de FSH reste détectable (León et al., 2014). Lors de nos études, l'inhibition pharmacologique de RFRP3 via le RF3286 n'a pas eu d'effet sur la reproduction saisonnière. Il est toujours difficile de conclure à partir de l'absence d'effet observé, car il peut aussi être induit par des problèmes dans la conception expérimentale. Afin de valider ou non le rôle du RFRP3 dans la réactivation photopériodique de la reproduction des rongeurs saisonniers, tout comme pour Kp, l'effet du RFRP3 pourrait être inhibé par interférence ARN ou CRISPR/CAS9 avec les mêmes limites.

III) La régulation précoce de Dio3 est-elle à l'origine d'un pic local d'hormones thyroïdiennes ?

Nous suggérons que l'inhibition précoce de Dio3, associée à une inhibition tardive du transporteur MCT8 pourrait entrainer une augmentation locale de T3/T4 dans l'hypothalamus médiobasal. De façon intéressante, j'ai récemment observé qu'un deuxième transporteur des hormones thyroïdiennes , le Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1C1 (SLCO1C1 ou OATP1C1) est augmentée en LP par rapport à SP dans les tanycytes du hamster djungarien **(Fig. 41),** en accord avec la littérature (Lomet et al., 2017; Ross et al., 2011). Il serait intéressant d'analyser sa cinétique d'expression lors de la réactivation photopériodique et endogène photoréfractaire afin de s'avoir s'il favorise, ou non, la création du pic d'hormones thyroïdiennes hypothalamiques.

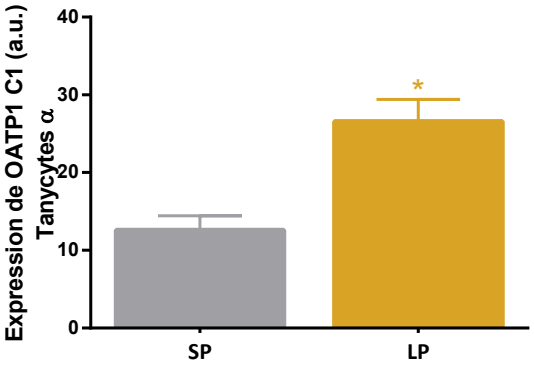


Figure 41: Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du gène OATP1C1 dans les tanycytes du hamster djungarien en fonction de la photopériode.

Valeur moyenne d'intensité (± SEM, n=3) du signal dans les corps cellulaires des tanycytes en photoperiode courte (SP) ou longue (LP). Valeur d'intensité calculée en utilisant une ligne suffisamment large pour couvrir les corps cellulaires des tanycytes bordant le troisième ventricule. * indique $p<0.05$.

Afin de définitivement vérifier s'il existe une augmentation précoce de T3/T4 hypothalamique au moment de la réactivation de la reproduction, j'ai effectué des prélèvements d'hypothalamus chez des hamsters djungariens avant l'inhibition de Dio3 (après 2 jours en LP) et après l'inhibition de celle-ci (après 14 jours de LP) ainsi que chez des contrôles maintenus en LP constant. T3 et T4 seront dosées par spectrométrie de masse. S'il s'avère qu'un pic précoce de T3 ou T4 est observé suite à l'inhibition précoce de Dio3, il faudra rechercher les régulateurs potentiels de Dio3 afin de déterminer quels signaux induisent son inhibition précoce. Il faudra analyser si ces signaux dépendent de la lumière ou de la mélatonine et donc si la PT est nécessaire dans ce phénomène ou s'il existe une nouvelle structure impliquée et le cas échéant laquelle. Surtout, nous évaluerons si les signaux régulant Dio3 sont les mêmes dans le cas de la réactivation photopériodique et endogène photoréfractaire. A ce jour, notre recherche basée sur une approche à partir de candidats potentiels issus de la littérature n'a pas fourni de résultats encourageants. Aussi faudrait-il maintenant utiliser une approche sans a priori, par analyse transcriptomique d'hypothalamus prélevés entre le point

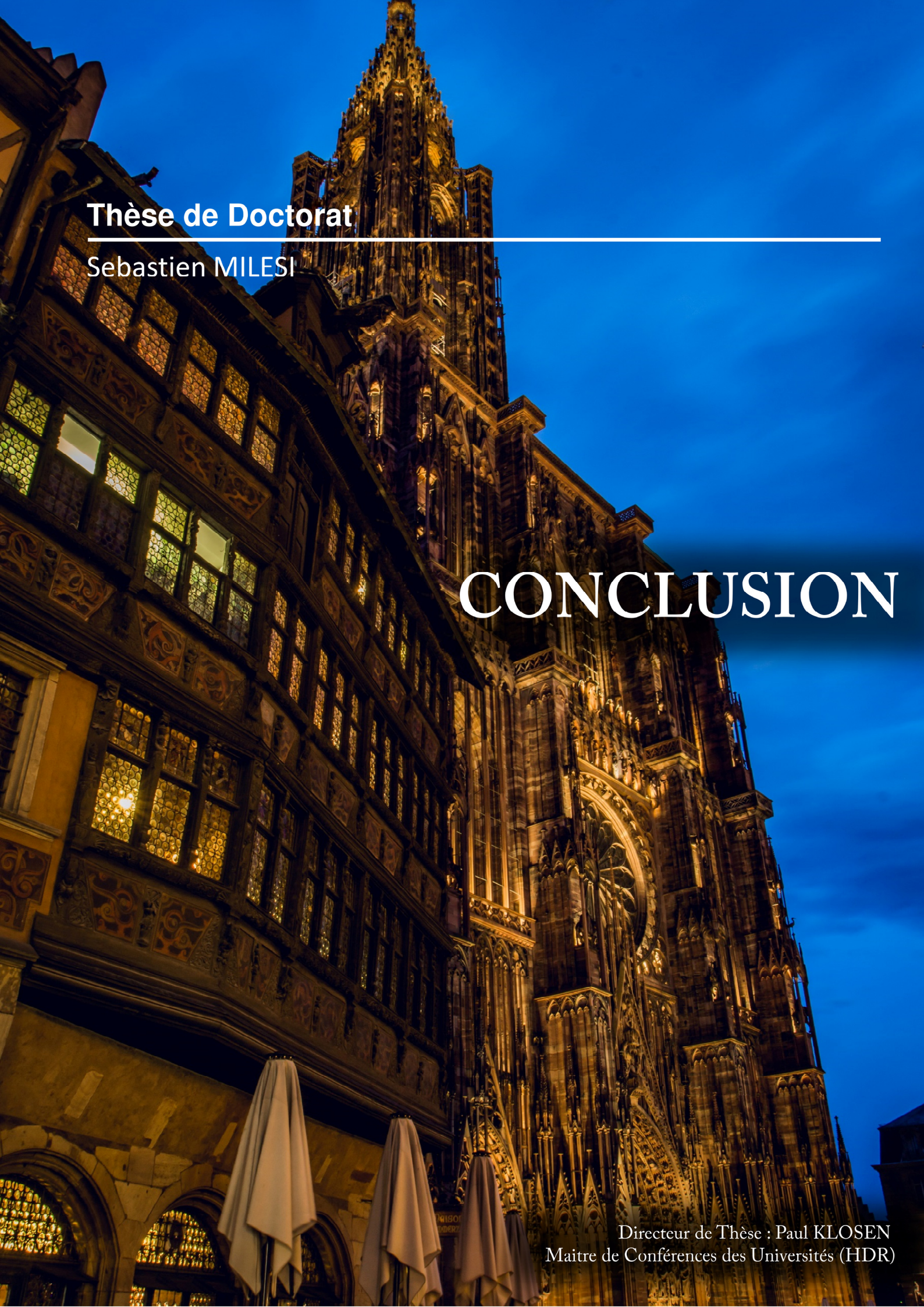
avant (LP 2 jours) et après (LP 14 jours) l'inhibition de la Dio3 chez le hamster djungarien. Dans la liste des gènes différentiellement transcrits, il faudra porter une attention particulière :

⇨ aux gènes connus pour réguler la puberté, notamment ceux liés au métabolisme des hormones thyroïdiennes comme TTF-1 (Mastronardi et al., 2006).

⇨ Aux miARN. En effet, une mutation de DICER, l'enzyme responsable de la formation de micro ARN, entraine une infertilité (Messina et al., 2016). De plus, miR200 et miR155 sont connus pour respectivement inhiber les répresseurs de GnRH, Zeb1 et CEBPB. Leur augmentation lors de la minipuberté permet l'augmentation de l'expression de GnRH dans les neurones à GnRH (Messina et al., 2016). Il serait possible que ces miARN interviennent aussi dans régulation saisonnière de la reproduction.

⇨ Aux gènes codant pour des enzymes de modification épigénétique. En effet, Stevenson and Prendergast, (2013) ont montré que l'exposition à une SP entraîne une diminution mélatonine-dépendante de l'expression des ADN méthyltransférases dnmt1 et dnmt3a et par conséquent une diminution de la méthylation de l'ADN. Cette régulation de méthylation touche notamment le promoteur de Dio3, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de Dio3. La LP ainsi que la réactivation photoréfractaire renverse ce phénotype, entraînant une diminution de l'expression de la Dio3. Une modification de l'empreinte épigénétique au niveau du promoteur de la Dio3 pourrait donc être responsable de la diminution de son d'expression lors de l'activation photopériodique et photoréfractaire de la reproduction.

⇨ Aux gènes codant pour des régulateurs potentiels de l'expression de Dio3, notamment les gènes des facteurs de transcription capables de se lier aux courtes séquences d'ADN nécessaires aux facteurs de transcription pour se fixer au promoteur de Dio3. Il existe 96 éléments régulateurs potentiels dans les 5000pb précédant le codon initiateur de la transcription du gène *Dio3*. Une étude ontologique par www.pantherdb.org permet de les trier en fonction de leur implication dans certaines fonctions biologiques. Dans le promoteur du gène de Dio3, il existe des sites de liaison pour: les récepteurs hormonaux (ER, GR, TR α, TR β); les récepteurs de l'acide rétinoïque et ses régulateurs (RARa, RARb, RXRa, RXRb, AP2); les éléments de réponse de l'AMPc (ATF, CREB1, jun, TCF12, CRE-BP1); la voie p38 MAPK (Creb1, SRF, ELK1); les molécules de signalisation de la voie GnRH (Nr5a1, Id2, cFOS, Sp1, Creb1, Srf, Nr3c1, Ap-1, Elk-1, Atf-3); les molécules participant à la signalisation inflammatoire (C/EBP family, ICSBP, IRF-1, ISGF-3, NF-E2, famille NFkB, Olf-1); et des constituants de l'horloge circadienne (ID-1, ID-2, Nr1d1, Reverb-alpha). Parmi les familles d'intérêt, la famille de l'acide rétinoïque pourrait être étudiée en priorité, car les différents composants de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque sont régulés photopériodiquement chez le hamster djungarien (Ross et al., 2004, 2005) et certaines de ces molécules comme CRABP2 sont modifiés précocement lors d'un changement de photopériode (Ross et al., 2005).



Thèse de Doctorat

Sebastien MILESI

CONCLUSION

Directeur de Thèse : Paul KLOSEN
Maitre de Conférences des Universités (HDR)

La mise à l'épreuve de la voie hypothétique de réactivation photopériodique de la reproduction a permis d'apporter des informations temporelles sur la voie de réactivation, a montré que la réactivation photopériodique et photoréfractaire partage des mécanismes similaires chez les hamsters saisonniers et a surtout levé des questions sur le modèle hypothétique proposé jusqu'à présent.

En effet, de façon inattendue, nous avons observé que le signal TSH/Dio2 et les neuropeptides reproducteurs Kp et RFRP3 sont activés postérieurement à l'activation de la reproduction par la photopériode longue et le phénomène endogène photoréfractaire. Afin d'éclaircir l'implication de ces quatre acteurs dans la gestion saisonnière de la reproduction chez les rongeurs, il faudra maintenant développer des systèmes d'activation et d'inactivation sélectives de gènes et créer des modèles transgéniques de hamsters.

Nous avons également découvert un rôle potentiel de l'inhibition précoce et conservée de la Dio3, l'enzyme catabolisant les hormones thyroïdiennes, dans les tanycytes. Il faut maintenant établir si cette régulation est associée à des changements sensibles de T3 et T4 dans l'hypothalamus. Le cas échéant, il faudra établir si ce phénomène est suffisant pour initier l'activation de la reproduction et quels sont les facteurs (photopériodiques et endogènes) impliqués dans cette régulation précoce de Dio3. Nous avons porté un intérêt particulier à différents candidats à l'initiation (photopériodique ou endogène) de l'activité reproductrice saisonnière notamment les activateurs de la puberté et la Chromogranine A dans la *pars tuberalis*, mais sans succès jusqu'ici. Notamment, la cinétique de régulation saisonnière de la Chromograine A est similaire, bien qu'opposée, à celle de la TSHβ, suggérant qu'elle ne participe pas aux phénomènes d'activation précoce photopériodique ou endogène. Chez les hamsters, nous n'observons pas une expression strictement inversée de TSHβ et de la Chromogranine A comme chez le mouton. Comme ce système exclusif a été poposé être à la base de l'horloge circannuelle dans la PT du mouton, il faudra examiner si cette régulation opposée TSHβ/CGA existe aussi chez un rongeur possédant une horloge circannuelle, tel le hamster européen.

Finalement, nos études cinétiques proposent que la réactivation de la reproduction, mais probablement aussi des autres fonctions saisonnières, implique un système à deux voies. La première voie, dépendante de l'inhibition de la Dio3, induirait l'initiation de l'activation de l'HPG via une augmentation des hormones thyroïdiennes. La deuxième voie, dépendante de la voie TSH/Dio2/neuropeptides reproducteurs aurait un rôle stabilisateur de l'activation de l'axe gonadotrope. De façon remarquable, la deuxième voie ne serait activée que lors de l'activation photopériodique (dépendante de la mélatonine) mais pas lors de l'activation photoréfractaire endogène. Des études complémentaires sont maintenant nécessaires, en particulier via des analyses transcriptomiques, afin d'identifier de nouveaux candidats potentiels à la régulation photopériodique et photoréfractaire de la reproduction saisonnière.

Bibliographie

Abdelgadir, S.E., Resko, J.A., Ojeda, S.R., Lephart, E.D., McPhaul, M.J., et Roselli, C.E. (1994). Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology* **135**, 395–401.

Abreu, A.P., Dauber, A., Macedo, D.B., Noel, S.D., Brito, V.N., Gill, J.C., Cukier, P., Thompson, I.R., Navarro, V.M., Gagliardi, P.C., Rodrigues, T., Kochi, C., Longui, C.A., Beckers, D., De Zegher, F., Montenegro, L.R., Mendonca, B.B., Carroll, R.S., Hirschhorn, J.N., Latronico, A.C. et Kaiser, U.B. (2013). Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2467–2475.

Aguilera, G., et Liu, Y. (2012). The molecular physiology of crh neurons. *Front. Neuroendocrinol*. **33**, 67–84.

Akazome, Y. (2015). Ligand Dose-Dependent Switch in G-Protein Coupling (Gi and Gs) of Medaka (Oryzias latipes) Neuropeptide FF Receptors, NPFFR1 (GPR147) and NPFFR2 (GPR74): Signaling *Endocrine society's annual meeting*.

Allgeier, A., Offermanns, S., Van Sande, J., Spicher, K., Schultz, G., et Dumont, J.E. (1994). The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J. Biol. Chem.* **269**, 13733–13735.

Amann, R.P. (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J. Androl.* **29**, 469–487.

Ancel, C., Bentsen, A.H., Sébert, M.-E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J.D., et Simonneaux, V. (2012). Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* **153**, 1352–1363.

Ancel, C., Inglis, M.A., et Anderson, G.M. (2017). Central RFRP-3 Stimulates LH Secretion in Male Mice and Has Cycle Stage–Dependent Inhibitory Effects in Females. *Endocrinology* **158**, 2873–2883.

Ansel, L., Bentsen, A.H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., et Simonneaux, V. (2011). Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GNRH release. *Reprod. Camb. Engl*. **142**, 417–425.

Aoki, T., Tsunekawa, K., Araki, O., Ogiwara, T., Nara, M., Sumino, H., Kimura, T., et Murakami, M. (2015). Type 2 Iodothyronine Deiodinase Activity Is Required for Rapid Stimulation of PI3K by Thyroxine in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Endocrinology* **156**, 4312–4324.

Arendt, J., Symons, A.M., Laud, C.A., et Pryde, S.J. (1983). Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *J. Endocrinol.* **97**, 395–400.

Atrens, D.M., et Menéndez, J.A. (1993). Somatostatin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res*. **630**, 238–244.

Badura, L.L., et Goldman, B.D. (1992). Prolactin-dependent seasonal changes in pelage: role of the pineal gland and dopamine. *J. Exp. Zool*. **261**, 27–33.

Bagatell, C.J., Dahl, K.D., et Bremner, W.J. (1994). The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J. Androl*. **15**, 15–21.

Balasubramanian, R., Dwyer, A., Seminara, S.B., Pitteloud, N., Kaiser, U.B., et Crowley, W.F. (2010). Human GnRH Deficiency: A Unique Disease Model to Unravel the Ontogeny of GnRH Neurons. *NeuroEndocrinology* **92**, 81–99.

Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R. et Prevot, V. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab*. **19**, 293–301.

Barrett, P., Ebling, F.J.P., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A.W., Warner, A., Jethwa, P., Boelen, A., Visser, T.J., Ozanne, D.M., Archer, Z.A., Mercer, J.G. et Morgan, P.J. (2007). Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* **148**, 3608–3617.

Bartness, T.J., et Wade, G.N. (1985). Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **9**, 599–612.

Bartness, T.J., Goldman, B.D., et Bittman, E.L. (1991). SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in Siberian hamsters*. Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol*. **260**, R102–R112.

Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., et Goldman, B.D. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J. Pineal Res.* **15**, 161–190.

Bartolomucci, A., Possenti, R., Levi, A., Pavone, F., et Moles, A. (2007). The role of the vgf gene and VGF-derived peptides in nutrition and metabolism. *Genes Nutr.* **2**, 169–180.

Batailler, M., Derouet, L., Butruille, L., et Migaud, M. (2016). Sensitivity to the photoperiod and potential migratory features of neuroblasts in the adult sheep hypothalamus. *Brain Struct. Funct*. **221**, 3301–3314.

van der Beek, E.M., van Oudheusden, H.J., Buijs, R.M., van der Donk, H.A., van den Hurk, R., et Wiegant, V.M. (1994). Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology* **134**, 2636–2644.

Belgacem, Y.H., Hamilton, A.M., Shim, S., Spencer, K.A., et Borodinsky, L.N. (2016). The Many Hats of Sonic Hedgehog Signaling in Nervous System Development and Disease. *J. Dev. Biol.* **4***, 35.*

Beltramo, M., et Dufourny, L. (2015). Le système kisspeptine : Au coeur du contrôle de la reproduction. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **168** (1). Présenté à la Séance de l'Académie Vétérinaire de France, Paris, FRA (2015-02-12). FRA : Académie Vétérinaire de France

Bianco, A.C., et Kim, B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **116**, 2571–2579.

Böckers, T.M., Niklowitz, P., Bockmann, J., Fauteck, J.-D., Wittkowski, W., et Kreutz, M.R. (1995). Daily Melatonin Injections Induce Cytological Changes in Pars Tuberalis-Specific Cells Similar to Short Photoperiod. *Endocrinology* **7**, 607–613.

Böckers, T.M., Bockmann, J., Salem, A., Niklowitz, P., Lerchl, A., Huppertz, M., Wittkowski, W., et Kreutz, M.R. (1997a). Initial expression of the common alpha-chain in hypophyseal pars tuberalis-specific cells in spontaneous recrudescent hamsters. *Endocrinology* **138**, 4101–4108.

Böckers, T.M., Bockmann, J., Salem, A., Niklowitz, P., Lerchl, A., Huppertz, M., Wittkowski, W., et Kreutz, M.R. (1997b). Initial expression of the common alpha-chain in hypophyseal pars tuberalis-specific cells in spontaneous recrudescent hamsters. *Endocrinology* **138**, 4101–4108.

Bockmann, J., Böckers, T.M., Vennemann, B., Niklowitz, P., Müller, J., Wittkowski, W., Sabel, B., et Kreutz, M.R. (1996). Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* **137**, 1804–1813.

Bockmann, J., Winter, C., Wittkowski, W., Kreutz, M.R., et Böckers, T.M. (1997). Cloning and expression of a brain-derived TSH receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **238**, 173–178.

Bolborea, M., et Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* **36**, 91–100.

Bolborea, M., Laran-Chich, M.-P., Rasri, K., Hildebrandt, H., Govitrapong, P., Simonneaux, V., Pévet, P., Steinlechner, S., et Klosen, P. (2011). Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology* **152**, 3871–3883.

Bolborea, M., Helfer, G., Ebling, F.J.P., et Barrett, P. (2015). Dual signal transduction pathways activated by TSH receptors in rat primary tanycyte cultures. *J. Mol. Endocrinol*. **54**, 241–250.

Buhr, E.D., et Takahashi, J.S. (2013). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol*. 3–27.

Callery, E.M., et Elinson, R.P. (2000). Thyroid hormone-dependent metamorphosis in a direct developing frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2615–2620.

Campbell, R.E., ffrench-Mullen, J.M., Cowley, M.A., Smith, M.S., et Grove, K.L. (2001). Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype. *NeuroEndocrinology* **74**, 106–119.

Caraty, A. (2008). Le système kisspeptine/GPR54 : la clé majeure du contrôle de la reproduction. Médecine Thérapeutique. *Médecine de la Reproduction*, **10** (2), 114-122.

Carlson, J.C., Barcikowski, B., Cargill, V., et McCracken, J.A. (1974). The blockade of LH release by indomethacin. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **39**, 399–402.

Carrillo-Vico, A., Lardone, P.J., Álvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., et Guerrero, J.M. (2013). Melatonin: Buffering the Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 8638–8683.

Cates, P.S., Li, X.F., et O'Byrne, K.T. (2004). The influence of 17beta-oestradiol on corticotrophin-releasing hormone induced suppression of luteinising hormone pulses and the role of CRH in hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile LH secretion in the female rat. *Stress Amst. Neth*. **7**, 113–118.

Cazarez Márquez, F., Milesi, S., Laran-Chich, M.-P., Klosen, P., Kalsbeek, A., et Simonneaux, V. (Soumis). Kisspeptin and RFRP3 modulate body mass in the Phodopus Sungorus via two different hypothalamic pathways. *J. Neurosci.*

Cervia, D., Fehlmann, D., et Hoyer, D. (2003). Native somatostatin sst2 and sst5 receptors functionally coupled to Gi/o-protein, but not to the serum response element in AtT-20 mouse tumour corticotrophs. Naunyn. *Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. **367**, 578–587.

Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Régo, J.-C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., et Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15247–15252.

Chartrel, N., Bruzzone, F., Dujardin, C., Leprince, J., Tollemer, H., Anouar, Y., Vallarino, M., Costentin, J., et Vaudry, H. (2005). Identification of 26RFa from frog brain: a novel hypothalamic neuropeptide with orexigenic activity in mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1040**, 80–83.

Chartrel, N., Picot, M., El Medhi, M., Arabo, A., Berrahmoune, H., Alexandre, D., Maucotel, J., Anouar, Y., et Prévost, G. (2016). The Neuropeptide 26RFa (QRFP) and Its Role in the Regulation of Energy Homeostasis: A Mini-Review. *Front. Neurosci.* **10**, 1-6.

Ciechanowska, M., Łapot, M., Malewski, T., Mateusiak, K., Misztal, T., et Przekop, F. (2011). Effects of corticotropin-releasing hormone and its antagonist on the gene expression of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in the hypothalamus and anterior pituitary gland of follicular phase ewes. *Reprod. Fertil. Dev*. **23**, 780–787.

Cifuentes, M., Pérez-Martín, M., Grondona, J.M., López-Ávalos, M.D., Inagaki, N., Granados-Durán, P., Rivera, P., et Fernández-Llebrez, P. (2011). A comparative analysis of intraperitoneal versus intracerebroventricular administration of bromodeoxyuridine for the study of cell proliferation in the adult rat brain. *J. Neurosci. Methods* **201**, 307–314.

Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., Pawson, A.J., Tsutsui, K., Millar, R.P. et Bentley, G.E. (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* **149**, 5811–5821.

Clasadonte, J., Poulain, P., Beauvillain, J.-C., et Prevot, V. (2008). Activation of neuronal nitric oxide release inhibits spontaneous firing in adult gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible local synchronizing signal. *Endocrinology* **149**, 587–596.

Clasadonte, J., Sharif, A., Baroncini, M., et Prevot, V. (2011a). Gliotransmission by prostaglandin e(2): a prerequisite for GnRH neuronal function? *Front. Endocrinol.* **2**, 1-12.

Clasadonte, J., Poulain, P., Hanchate, N.K., Corfas, G., Ojeda, S.R., et Prevot, V. (2011b). Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16104–16109.

Clermont, Y., et Harvey, S.C. (1965). Duration of the Cycle of the Seminiferous Epithelium of Normal, Hypophysectomized and Hypophysectomized-Hormone Treated Albino Rats. *Endocrinology* **76**, 80–89.

Colledge, W.H. (2008). GPR54 and kisspeptins. *Results Probl. Cell Differ*. **46**, 117–143.

Constantin, S. (2011). Physiology of the GnRH neuron: Studies from embryonic GnRH neurons. *Endocrinology* **23**, 542–553.

Constantin, S., Caraty, A., Wray, S., et Duittoz, A.H. (2009). Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinology* **150**, 3221–3227.

Corti, A., Mannarino, C., Mazza, R., Angelone, T., Longhi, R., et Tota, B. (2004). Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart. *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**, 217–224.

Dardente, H., Klosen, P., Pévet, P., et Masson-Pévet, M. (2003). MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *Endocrinology* **15**, 778–786.

Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupré, S.M., Loudon, A.S.I., Lincoln, G.A., et Hazlerigg, D.G. (2010). A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr. Biol.* **20**, 2193–2198.

Dardente, H., Hazlerigg, D.G., et Ebling, F.J.P. (2014a). Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front. Endocrinol.* **5**, 1-11.

Dawson, A. (1993). Thyroidectomy progressively renders the reproductive system of starlings (Sturnus vulgaris) unresponsive to changes in daylength. *J. Endocrinol.* **139**, 51–55.

Dawson, A., Goldsmith, A.R., et Nicholls, T.J. (1986). Seasonal changes in testicular size and in plasma follicle-stimulating hormone and prolactin concentrations in thyroidectomized male and thyroidectomized castrated starlings (Sturnus vulgaris). *Gen. Comp. Endocrinol*. **63**, 38–44.

Dawson, A., King, V.M., Bentley, G.E., et Ball, G.F. (2001). Photoperiodic control of seasonality in birds. *J. Biol. Rhythms* **16**, 365–380.

Decourt, C., Robert, V., Anger, K., Galibert, M., Madinier, J.-B., Liu, X., Dardente, H., Lomet, D., Delmas, A.F., et Caraty, A., (2016). A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Sci. Rep.* **6**, 26908.

Dentice, M., Luongo, C., Huang, S., Ambrosio, R., Elefante, A., Mirebeau-Prunier, D., Zavacki, A.M., Fenzi, G., Grachtchouk, M., Hutchin, M., Dlungoz, A.A., Bianco, A.C., Missero, C., Larsen, P.R., et Salvatore, D. (2007). Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14466–14471.

Desroziers, E., Mikkelsen, J., Simonneaux, V., Keller, M., Tillet, Y., Caraty, A., et Franceschini, I. (2010). Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *Endocrinology* **22**, 1101–1112.

Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Delagrange, P., Spadoni, G., Cohen, W., Malpaux, B., Boutin, J.A., et Nosjean, O. (2012). Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT(1) and hMT(2) and discovery of inverse agonists. *J. Pineal Res.* **53**, 29–37.

Dezonne, R.S., Lima, F.R.S., Trentin, A.G., et Gomes, F.C. (2015). Thyroid hormone and astroglia: endocrine control of the neural environment. *Endocrinology* **27**, 435–445.

Dickmeis, T. (2009). Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.* **200**, 3–22.

Dopico, X.C., Evangelou, M., Ferreira, R.C., Guo, H., Pekalski, M.L., Smyth, D.J., Cooper, N., Burren, O.S., Fulford, A.J., Hennig, B.J., Prentice, A.M., Ziegler, A.G., Bonifacio, E., Wallace, C., et Todd, J.A. (2015). Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat. Commun.* **6**, 1-13

Drijfhout, W.J., van der Linde, A.G., Kooi, S.E., Grol, C.J., et Westerink, B.H. (1996). Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* **66**, 748–755.

Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J., et Masana, M.I. (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **8**, d1093–d1108.

Ducker, M.J., Bowman, J.C., et Temple, A. (1973). The effect of constant photoperiod on the expression of oestrus in the ewe. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **19**, 143–150.

Ducret, E., Anderson, G.M., et Herbison, A.E. (2009). RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* **150**, 2799–2804.

Dufau, M.L. (1998). The luteinizing hormone receptor. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 461–496.

Dufau, M.L., Winters, C.A., Hattori, M., Aquilano, D., Barañao, J.L., Nozu, K., Baukal, A., et Catt, K.J. (1984). Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. *J. Steroid Biochem.* **20**, 161–173.

Dufourny, L., et Lomet, D. (2017). Crosstalks between kisspeptin neurons and somatostatin neurons are not photoperiod dependent in the ewe hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* **254**, 68–74.

Dufourny, L., Gennetay, D., Martinet, S., Lomet, D., et Caraty, A. (2016). The Content of Thyroid Hormone Receptor α in Ewe Kisspeptin Neurones is not Season-Dependent. *Endocrinology* **28**, 12344.

Duittoz, A.H., et Batailler, M. (2000). Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *J. Reprod. Fertil.* **120**, 391–396.

Dumbell, R.A., Scherbarth, F., Diedrich, V., Schmid, H.A., Steinlechner, S., et Barrett, P. (2015). Somatostatin Agonist Pasireotide Promotes a Physiological State Resembling Short-Day Acclimation in the Photoperiodic Male Siberian Hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology* **27**, 588–599.

Duncan, M.J., Goldman, B.D., Di Pinto, M.N., et Stetson, M.H. (1985). Testicular function and pelage color have different critical daylengths in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus sungorus. *Endocrinology* **116**, 424–430.

Dziedzic, B., Prevot, V., Lomniczi, A., Jung, H., Cornea, A., et Ojeda, S.R. (2003). Neuron-to-glia signaling mediated by excitatory amino acid receptors regulates ErbB receptor function in astroglial cells of the neuroendocrine brain. *J. Neurosci.* **23**, 915–926.

Ebling, F.J.P. (2014). On the value of seasonal mammals for identifying mechanisms underlying the control of food intake and body weight. *Horm. Behav.* **66**, 56–65.

Eissa, N., Hussein, H., Kermarrec, L., Ali, A.Y., Marshall, A., Metz-Boutigue, M.-H., Hendy, G.N., Bernstein, C.N., et Ghia, J.-E. (2018). Chromogranin-A Regulates Macrophage Function and the Apoptotic Pathway in Murine DSS colitis. *J. Mol. Med.* **96**, 183–198.

Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.* **60**, 97–108.

Elhabazi, K., Humbert, J.-P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.-J., Bucher, B., Becker, J.A.J., Sorg, T., Meziane, H., Petit-Demoulière, B., Ilien, B., et Simonin, F. (2013a). Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* **75**, 164–171.

Elhabazi, K., Humbert, J.-P., Bertin, I., Quillet, R., Utard, V., Schneider, S., Schmitt, M., Bourguignon, J.-J., Laboureyras, E., Ben Boujema, M., Simonnet, G., Laboureyas, E., Ben Boujema, M., Simonnet, G., Ancel, C., Simonneaux, V., Beltramo, M., Bucher, B., Sorg, T., Meziane, H., Schneider,E., Petit-Démoulière, B., Ilien, B., Bihel, F. et Simonin, F. (2017). RF313, an orally bioavailable neuropeptide FF receptor antagonist, opposes effects of RF-amide-related peptide-3 and opioid-induced hyperalgesia in rodents. *Neuropharmacology* **118**, 188–198.

Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M.J., Oyarce, K.A., Carril, C.A., et García-Robles, M.A. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 1471–1482.

Escobar, G.M. de, Obregon, M.J., et Rey, F.E. del (2004). Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur. J. Endocrinol.* **151**, U25–U37.

Fan, Z., Li, W., Lee, S.R., Meng, Q., Shi, B., Bunch, T.D., White, K.L., Kong, I.-K., et Wang, Z. (2014). Efficient Gene Targeting in Golden Syrian Hamsters by the CRISPR/Cas9 System. *PLOS ONE* **9**, e109755.

de Farias, T. da S.M., de Oliveira, A.C., Andreotti, S., do Amaral, F.G., Chimin, P., de Proença, A.R.A., Leal, F.L.T., Sertié, R.A.L., Campana, A.B., Lopes, A.B., De Souza, A.H., Cipolla-Neto, J. et Lima, F.B. (2015). Pinealectomy interferes with the circadian clock genes expression in white adipose tissue. *J. Pineal Res.* **58**, 251–261.

Figala, J., Hoffmann, K., et Goldau, G. (1973). Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster Phodopus sungorus Pallas. *Oecologia* **12**, 89–118.

Findeisen, M., Rathmann, D., et Beck-Sickinger, A.G. (2011). RFamide Peptides: Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical Potential. *Pharmaceuticals* **4**, 1248–1280.

Fine, J.B., et Bartness, T.J. (1996). Daylength and body mass affect diet self-selection by Siberian hamsters. *Physiol. Behav.* **59**, 1039–1050.

Follett, B.K., et Nicholls, T.J. (1985). Influences of thyroidectomy and thyroxine replacement on photoperiodically controlled reproduction in quail. *J. Endocrinol*. **107**, 211–221.

Forni, P.E., et Wray, S. (2015). GnRH, anosmia and hypogonadotropic hypogonadism--where are we? *Front. Neuroendocrinol.* **36**, 165–177.

Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., Schantz, M. von, Muñoz, M., David-Gray, Z., et Foster, R. (1999). Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science* **284**, 502–504.

Freeman, D.A., Teubner, B.J.W., Smith, C.D., et Prendergast, B.J. (2007). Exogenous T3 mimics long day lengths in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **292**, R2368–R2372.

Funabashi, T., Daikoku, S., Shinohara, K., et Kimura, F. (2000). Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats. *NeuroEndocrinology* **71**, 138–144.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., et Gustafson, E.L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1357–1363.

Galton, V.A. (1992). The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 96–100.

García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., et Nualart, F. (2003). Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* **86**, 709–724.

Garcia-Segura, L.M., Lorenz, B., et DonCarlos, L.L. (2008). The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reprod. Camb. Engl.* **135**, 419–429.

Gazdar, A.F., Helman, L.J., Israel, M.A., Russell, E.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Schuller, H.M., et Park, J.-G. (1988). Expression of Neuroendocrine Cell Markers l-Dopa Decarboxylase, Chromogranin A, and Dense Core Granules in Human Tumors of Endocrine and Nonendocrine Origin. *Cancer Res.* **48**, 4078–4082.

Giometto, B., Miotto, D., Botteri, M., Alessio, L., Scanarini, M., An, S.F., et Tavolato, B. (1997). Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas: immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *NeuroEndocrinology* **65**, 47–52.

Goldman, B., et Brown, S. (1979). Sex differences in serum LH and FSH patterns in hamsters exposed to short photoperiod. *J. Steroid Biochem.* **11**, 531–535.

Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Campo, A. del, Malpaux, B., Chemineau, P., Tortonese, D.J., Gonzalez-Bulnes, A., et López-Sebastián, A. (2008). Endogenous Circannual Cycles of Ovarian Activity and Changes in Prolactin and Melatonin Secretion in Wild and Domestic Female Sheep Maintained under a Long-Day Photoperiod. *Biol. Reprod.* **78**, 552–562.

Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V.R., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., et Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* **148**, 5752–5760.

Gorman, M.R., Yellon, S.M., et Lee, T.M. (2001). Temporal reorganization of the suprachiasmatic nuclei in hamsters with split circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* **16**, 552–563.

Greives, T.J., Humber, S.A., Goldstein, A.N., Scotti, M. -a. L., Demas, G.E., et Kriegsfeld, L.J. (2008). Photoperiod and Testosterone Interact to Drive Seasonal Changes in Kisspeptin Expression in Siberian Hamsters (Phodopus sungorus). *Endocrinology* **20**, 1339–1347.

Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 411–416.

Gross, D.S. (1983). Hormone production in the hypophysial pars tuberalis of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* **112**, 733–744.

Gutiérrez, C.I., Urbina, M., Obregion, F., Glykys, J., et Lima, L. (2003). Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. *Amino Acids* **25**, 95–105.

Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* **309**, 73–88.

Hanon, E.A., Lincoln, G.A., Fustin, J.-M., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P.J., et Hazlerigg, D.G. (2008). Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr. Biol.* **18**, 1147–1152.

Hashemi, S.H., Li, J.Y., Schindler, M., et Dahlström, A. (2001). Presence of sst2(a) receptor immunoreactivity in rat ependyma and tanycytes. *Neuroreport* **12**, 1793–1797.

Hastings, M.H., et Herbert, J. (1986). Neurotoxic lesions of the paraventriculo-spinal projection block the nocturnal rise in pineal melatonin synthesis in the Syrian hamster. *Neurosci. Lett*. **69**, 1–6.

Hastings, M.H., Herbert, J., Martensz, N.D., et Roberts, A.C. (1985). Melatonin and the brain in photoperiodic mammals. *Ciba Found. Symp.* **117**, 57–77.

Hatori, M., Le, H., Vollmers, C., Keding, S.R., Tanaka, N., Buch, T., Waisman, A., Schmedt, C., Jegla, T., et Panda, S. (2008). Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLOS ONE* **3**, e2451.

Hazlerigg, D. (2012). The evolutionary physiology of photoperiodism in vertebrates. *Prog. Brain Res.* **199**, 413–422.

Hazlerigg, D.G., et Lincoln, G.A. (2011). Hypothesis: cyclical histogenesis is the basis of circannual timing. *J. Biol. Rhythms* **26**, 471–485.

Hazlerigg, D.G., et Simonneaux, V. (2015). Seasonal regulation of reproduction in mammals. *Physiol. Reprod. Eds Plant TM Zeleznik AJ* 1575–1604.

Hazlerigg, D.G., Wyse, C.A., Dardente, H., Hanon, E.A., et Lincoln, G.A. (2013). Photoperiodic variation in CD45-positive cells and cell proliferation in the mediobasal hypothalamus of the Soay sheep. *Chronobiol. Int*. **30**, 548–558.

Heger, S., Mastronardi, C., Dissen, G.A., Lomniczi, A., Cabrera, R., Roth, C.L., Jung, H., Galimi, F., Sippell, W., et Ojeda, S.R. (2007). Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis. *J. Clin. Invest.* **117**, 2145–2154.

Helfer, G., Ross, A.W., Russell, L., Thomson, L.M., Shearer, K.D., Goodman, T.H., McCaffery, P.J., et Morgan, P.J. (2012). Photoperiod regulates vitamin A and Wnt/β-catenin signaling in F344 rats. *Endocrinology* **153**, 815–824.

Helfer, G., Ross, A.W., et Morgan, P.J. (2013). Neuromedin U partly mimics thyroid-stimulating hormone and triggers Wnt/β-catenin signalling in the photoperiodic response of F344 rats. *Endocrinology* **25**, 1264–1272.

Helle, K.B., Metz-Boutigue, M.-H., Cerra, M.C., et Angelone, T. (2018). Chromogranins: from discovery to current times. *Pflugers Arch.* **470**, 143–154.

Henningsen, J.B. (2016). The roles of RFRP in the central control of reproduction: Photoperiodic and sex-specific differences. *Doctoral Thesis*, University of Strasbourg.

Henningsen, J.B., Ancel, C., Mikkelsen, J.D., Gauer, F., et Simonneaux, V. (2016). Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female Syrian hamsters. *Endocrinology* **158**, 652-663

Henson, J.R., Carter, S.N., et Freeman, D.A. (2013). Exogenous T_3 elicits long day-like alterations in testis size and the RFamides Kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone in short-day Siberian hamsters. *J. Biol. Rhythms* **28**, 193–200.

Herbison, A.E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res. Rev*. **57**, 277–287.

Herbison, A.E., Porteous, R., Pape, J.-R., Mora, J.M., et Hurst, P.R. (2008). Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Requirements for Puberty, Ovulation, and Fertility. *Endocrinology* **149**, 597–604.

Herbison, A.E., de Tassigny, X. d'Anglemont, Doran, J., et Colledge, W.H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **151**, 312–321.

Herde, M.K., Iremonger, K.J., Constantin, S., et Herbison, A.E. (2013). GnRH Neurons Elaborate a Long-Range Projection with Shared Axonal and Dendritic Functions. *J. Neurosci.* **33**, 12689–12697.

Herwig, A., Wilson, D., Logie, T.J., Boelen, A., Morgan, P.J., Mercer, J.G., et Barrett, P. (2009). Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **296**, R1307–R1315.

Herwig, A., de Vries, E.M., Bolborea, M., Wilson, D., Mercer, J.G., Ebling, F.J.P., Morgan, P.J., et Barrett, P. (2013). Hypothalamic ventricular ependymal thyroid hormone deiodinases are an important element of circannual timing in the Siberian hamster (Phodopus sungorus). *PLOS ONE* **8**, e62003.

Hikim, A.P., Amador, A.G., Klemcke, H.G., Bartke, A., et Russell, L.D. (1989). Correlative morphology and *Endocrinology* of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology* **125**, 1829–1843.

Hoffman, R.A., et Reiter, R.J. (1965). Pineal Gland: Influence on Gonads of Male Hamsters. *Science* **148**, 1609–1611.

Hoffmann, K. (1982). The Critical Photoperiod in the Djungarian Hamster Phodopus sungorus. *In Vertebrate Circadian Systems, P.D.J. Aschoff, D.S. Daan, and D.G.A. Groos, eds.* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 297–304.

Hrabovszky, E., Steinhauser, A., Barabás, K., Shughrue, P.J., Petersen, S.L., Merchenthaler, I., et Liposits, Z. (2001). Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* **142**, 3261–3264.

Hrabovszky, E., Molnár, C.S., Nagy, R., Vida, B., Borsay, B.Á., Rácz, K., Herczeg, L., Watanabe, M., Kalló, I., et Liposits, Z. (2012). Glutamatergic and GABAergic innervation of human gonadotropin-releasing hormone-I neurons. *Endocrinology* **153**, 2766–2776.

Huang, L., DeVries, G.J., et Bittman, E.L. (1998). Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J. Neurobiol*. **36**, 410–420.

Huang, M.P., Rodgers, K.A., O'Mara, R., Mehta, M., Abuzahra, H.S., Tannenbaum, A.D., Persons, K., Holick, M.F., et Safer, J.D. (2011). The thyroid hormone degrading type 3 deiodinase is the primary deiodinase active in murine epidermis. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **21**, 1263–1268.

Iason, G.R., Sim, D.A., Foreman, E., Fenn, P., et Elston, D.A. (1994). Seasonal variation of voluntary food intake and metabolic rate in three contrasting breeds of sheep. *Anim. Sci.* **58**, 381–387.

Ikegami, K., Liao, X.-H., Hoshino, Y., Ono, H., Ota, W., Ito, Y., Nishiwaki-Ohkawa, T., Sato, C., Kitajima, K., Iigo, M., et al. (2014). Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin. *Cell Rep.* **9**, 801–810.

Iremonger, K.J., et Herbison, A.E. (2014). Elucidating the Structure and Function of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuron Dendrites. *In Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons, W.E. Armstrong, and J.G. Tasker, eds.* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 271–299.

Jansen, H.T., Lubbers, L.S., Macchia, E., DeGroot, L.J., et Lehman, M.N. (1997). Thyroid hormone receptor (alpha) distribution in hamster and sheep brain: colocalization in gonadotropin-releasing hormone and other identified neurons. *Endocrinology* **138**, 5039–5047.

Jasnow, A.M., Huhman, K.L., Bartness, T.J., et Demas, G.E. (2000). Short-Day Increases in Aggression Are Inversely Related to Circulating Testosterone Concentrations in Male Siberian Hamsters (Phodopus sungorus). *Horm. Behav.* **38**, 102–110.

Jasoni, C.L., Todman, M.G., Han, S.-K., et Herbison, A.E. (2005). Expression of mRNAs encoding receptors that mediate stress signals in gonadotropin-releasing hormone neurons of the mouse. *Neuroendocrinology* **82**, 320–328.

Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J.A., et Delagrange, P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br. J. Pharmacol.* **154**, 1182–1195.

Johnson, L., Matt, K.S., Bartke, A., Nguyen, H.B., et Le, H.T. (1987). Effect of photoperiod on the size of the Leydig cell population and the rate of recruitment of Leydig cells in adult Syrian hamsters. *Biol. Reprod.* **37**, 727–738.

Johnson, M.A., Tsutsui, K., et Fraley, G.S. (2007). Rat RFamide Related Peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav.* **51**, 171–180.

Kadokawa, H., Shibata, M., Tanaka, Y., Kojima, T., Matsumoto, K., Oshima, K., et Yamamoto, N. (2009). Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines. *Domest. Anim. Endocrinol.* **36**, 219–224.

Kalsbeek, A., Drijfhout, W.J., Westerink, B.H., van Heerikhuize, J.J., van der Woude, T.P., van der Vliet, J., et Buijs, R.M. (1996). GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release. *NeuroEndocrinology* **63**, 69–78.

Kalsbeek, A., Palm, I.F., Fleur, S.E.L., Scheer, F.A.J.L., Perreau-Lenz, S., Ruiter, M., Kreier, F., Cailotto, C., et Buijs, R.M. (2006). SCN Outputs and the Hypothalamic Balance of Life. *J. Biol. Rhythms* **21**, 458–469.

Karagiannis, T.C., and El-Osta, A. (2004). siRNAs: mechanism of RNA interference, in vivo and potential clinical applications. *Cancer Biol. Ther*. **3**, 1069–1074.

Karp, J.D., Hastings, M.H., et Powers, J.B. (1991). Melatonin and the coding of day length in male Syrian hamsters. *J. Pineal Res.* **10**, 210–217.

Karsch, F.J., Malpaux, B., Wayne, N.L., et Robinson, J.E. (1988). Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* **28**, 459–472.

Kauffman, A.S., Freeman, D.A., et Zucker, I. (2003). Termination of neuroendocrine refractoriness to melatonin in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Endocrinology* **15**, 191–196.

Kauffman, A.S., Park, J.H., McPhie-Lalmansingh, A.A., Gottsch, M.L., Bodo, C., Hohmann, J.G., Pavlova, M.N., Rohde, A.D., Clifton, D.K., Steiner, R.A., et Rissman E.F. (2007a). The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 8826–8835.

Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., et Tena-Sempere, M. (2007b). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* **148**, 1774–1783.

Kaynard, A.H., Pau, K.Y., Hess, D.L., et Spies, H.G. (1990). Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology* **127**, 2437–2444.

Kerr, J.B., et Sharpe, R.M. (1985). Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology* **116**, 2592–2604.

Klingenspor, M., Niggemann, H., et Heldmaier, G. (2000). Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *J. Comp. Physiol*. **170**, 37–43.

Klosen, P., Maessen, X., et van den Bosch de Aguilar, P. (1993). PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 455–463.

Klosen, P., Bienvenu, C., Demarteau, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pévet, P., et Masson-Pévet, M. (2002). The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1647–1657.

Klosen, P., Sébert, M.-E., Rasri, K., Laran-Chich, M.-P., et Simonneaux, V. (2013). TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* **27**, 2677–2686.

Kobayashi, T., Sasaki, S., Tomita, N., Fukui, S., Nakayama, M., Kiba, A., Kusaka, M., Matsumoto, S., Yamaguchi, M., Itoh, F., et Baba, A. (2010). 2-Acylamino-4,6-diphenylpyridine derivatives as novel GPR54 antagonists with good brain exposure and in vivo efficacy for plasma LH level in male rats. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 5157–5171.

Korhonen, T., Mustonen, A.-M., Nieminen, P., et Saarela, S. (2008). Effects of cold exposure, exogenous melatonin and short-day treatment on the weight-regulation and body temperature of the Siberian hamster (Phodopus sungorus). *Regul. Pept.* **149**, 60–66.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.-M., Poul, E.L., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., et Parmentier, M. (2001). The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* **276**, 34631–34636.

Koyama, M., Yin, C., Ishii, H., Sakuma, Y., et Kato, M. (2012). Somatostatin inhibition of GnRH neuronal activity and the morphological relationship between GnRH and somatostatin neurons in rats. *Endocrinology* **153**, 806–814.

Krieger, D.T., Liotta, A.S., Suda, T., Goodgold, A., et Condon, E. (1979). Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **48**, 566–571.

Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., et Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2410–2415.

Kriegsfeld, L.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., et Tsutsui, K. (2015). Seasonal Control of Gonadotropin-Inhibitory Hormone (GnIH) in Birds and Mammals. *Front. Neuroendocrinol.* **37**, 65–75.

Kuhlmann, M.T., Clemen, G., et Schlatt, S. (2003). Molting in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus Pallas): seasonal or continuous process? *J. Exp. Zoolog. A Comp. Exp. Biol.* **295**, 160–171.

Lacoste, B., Angeloni, D., Dominguez-Lopez, S., Calderoni, S., Mauro, A., Fraschini, F., Descarries, L., et Gobbi, G. (2015). Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *J. Pineal Res.* **58**, 397–417.

Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.-M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., et Seminara, S.B. (2007). Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/- mice. *Endocrinology* **148**, 4927–4936.

Larsen, P.J., Enquist, L.W., et Card, J.P. (1998). Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. Eur. *J. Neurosci.* **10**, 128–145.

Lavaux, T., Schneider, F., Bach, C., Herbrecht, J.-E., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M.-H. (2010). Chromogranin A expression in plasma of critically ill patients. *Crit. Care* **14**, S1-S23.

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

Legros, C., Devavry, S., Caignard, S., Tessier, C., Delagrange, P., Ouvry, C., Boutin, J.A., et Nosjean, O. (2014). Melatonin MT1 and MT2 receptors display different molecular pharmacologies only in the G-protein coupled state. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 186–201.

León, S., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Roa, J., Vázquez, M.J., Gaytan, F., Blomenrohr, M., Van Duin, M., Pinilla, L. et Tena Sempere, M. (2014). Physiological Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Signaling in the Control of Mammalian Reproductive Axis: Studies in the NPFF1 Receptor Null Mouse. *Endocrinology* **155**, 2953–2965.

Leonhardt, H., Krisch, B., et Erhardt, H. (1987). Organization of the Neuroglia in the Midsagittal Plane of the Central Nervous System: A Speculative Report. In: *Scharrer B., Korf HW., Hartwig HG. (eds) Functional Morphology of Neuroendocrine Systems*. Springer, Berlin, Heidelberg

Li, C., Chen, P., et Smith, M.S. (1999). Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* **140**, 5382–5390.

Li, X.F., Knox, A.M.I., et O'Byrne, K.T. (2010). Corticotrophin-releasing factor and stress-induced inhibition of the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in the female. *Brain Res.* **1364**, 153–163.

Lincoln, G.A. (1990). Correlation with changes in horns and pelage, but not reproduction, of seasonal cycles in the secretion of prolactin in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.* **90**, 285–296.

Lincoln, G.A., et Maeda, K.-I. (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J. Endocrinol.* **132**, 201–215.

Lincoln, G.A., et Richardson, M. (1998). Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **119**, 283–294.

Lincoln, G.A., Libre, E.A., et Merriam, G.R. (1989). Long-term reproductive cycles in rams after pinealectomy or superior cervical ganglionectomy. *J. Reprod. Fertil.* **85**, 687–704.

Lincoln, G.A., Andersson, H., et Hazlerigg, D. (2003). Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *Endocrinology* **15**, 390–397.

Lincoln, G.A., Johnston, J.D., Andersson, H., Wagner, G., et Hazlerigg, D.G. (2005). Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology* **146**, 3782–3790.

Lindner, H.R., et Mann, T. (1960). Relationship Between the Content of Androgenic Steroids in the Testes and the Secretory Activity of the Seminal Vesicles in the Bull. *J. Endocrinol.* **21**, 341–359

Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., et Reppert, S.M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **19**, 91–102.

Logan, A., et Weatherhead, B. (1978). Pelage Color Cycles and Hair Follicle Tyrosinase Activity in the Siberian Hamster. *J. Invest. Dermatol.* **71**, 295–298.

Lomet, D., Cognié, J., Chesneau, D., Dubois, E., Hazlerigg, D., et Dardente, H. (2017). The impact of thyroid hormone in seasonal breeding has a restricted transcriptional sig*Nature*. *Cell. Mol. Life Sci.* ***75****,* 905-919

Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M.-H. (2000). Antibacterial and Antifungal Activities of Vasostatin-1, the N-terminal Fragment of Chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **275**, 10745–10753.

Luongo, C., Ambrosio, R., Salzano, S., Dlugosz, A.A., Missero, C., et Dentice, M. (2014). The sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase facilitates tumorigenesis of basal cell carcinoma by reducing Gli2 inactivation. *Endocrinology* **155**, 2077–2088.

Lyon, M.F., Glenister, P.H., et Lamoreux, M.L. (1975). Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature* **258**, 620–622.

Mahapatra, N.R. (2008). Catestatin is a novel endogenous peptide that regulates cardiac function and blood pressure. *Cardiovasc. Res*. **80**, 330–338.

Mahapatra, N.R., Mahata, M., Mahata, S.K., et O'Connor, D.T. (2006). The chromogranin A fragment catestatin: specificity, potency and mechanism to inhibit exocytotic secretion of multiple catecholamine storage vesicle co-transmitters. *J. Hypertens.* **24**, 895–904.

Majdoubi, M.E., Metz-Boutigue, M.H., Garcia-Sablone, P., Theodosis, D.T., et Aunis, D. (1996). Immunocytochemical localization of chromogranin A in the normal and stimulated hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *J. Neurocytol.* **25**, 405–416.

Malpaux, B., Moenter, S.M., Wayne, N.L., Woodfill, C.J., et Karsch, F.J. (1988). Reproductive refractoriness of the ewe to inhibitory photoperiod is not caused by alteration of the circadian secretion of melatonin. *NeuroEndocrinology* **48**, 264–270.

Malpaux, B., Daveau, A., Maurice, F., Gayrard, V., et Thiery, J.-C. (1993). Short-Day Effects of Melatonin on Luteinizing Hormone Secretion in the Ewe: Evidence for Central Sites of Action in the Mediobasal Hypothalamus. *Biol. Reprod*. **48**, 752–760.

Malpaux, B., Skinner, D.C., et Maurice, F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J. Neuroendocrinol*. **7**, 199–206.

Masson-Pévet, M., George, D., Gauer, F., et Pévet, P. (1993). Demonstration of melatonin-binding sites in cyclohexylamine-formaldehyde-fixed brain tissues. *Cell Tissue Res.* **274**, 207–209.

Masson-Pévet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D., et Pévet, P. (1994a). Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (Cricetus cricetus) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J. Pineal Res.* **17**, 151–163.

Masson-Pévet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N., et Pévet, P. (1994b). An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res.* **278**, 97–106.

Masson-Pévet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D., et Pevet, P. (1994c). Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (Cricetus cricetus) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J. Pineal Res.* **17**, 151–163.

Mastronardi, C., Smiley, G.G., Raber, J., Kusakabe, T., Kawaguchi, A., Matagne, V., Dietzel, A., Heger, S., Mungenast, A.E., Cabrera, R., Kimura, S., et Ojeda, S.R. (2006). Deletion of the Ttf1 gene in differentiated neurons disrupts female reproduction without impairing basal ganglia function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 13167–13179.

Matagne, V., Mastronardi, C., Shapiro, R.A., Dorsa, D.M., et Ojeda, S.R. (2009). Hypothalamic Expression of Eap1 Is Not Directly Controlled by Ovarian Steroids. *Endocrinology* **150**, 1870–1878.

Maywood, E.S., Buttery, R.C., Vance, G.H., Herbert, J., et Hastings, M.H. (1990). Gonadal responses of the male Syrian hamster to programmed infusions of melatonin are sensitive to signal duration and frequency but not to signal phase nor to lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Biol. Reprod.* **43**, 174–182.

Maywood, E.S., et Hastings, M.H. (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* **136**, 144–153.

Maywood, E.S., Bittman, E.L., et Hastings, M.H. (1996). Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol. Reprod*. **54**, 470–477.

Meachem, S., von Schönfeldt, V., et Schlatt, S. (2001). Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reprod. Camb. Engl.* **121**, 825–834.

Meesters, Y., et Gordijn, M.C. (2016). Seasonal affective disorder, winter type: current insights and treatment options. *Psychol. Res. Behav. Manag.* **9**, 317–327.

Menon, K.M.J., et Menon, B. (2012). Structure, Function and Regulation of Gonadotropin Receptors-A Perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* **356**, 88–97.

Meredith, J.M., Turek, F.W., et Levine, J.E. (1998). Effects of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency modulation on the reproductive axis of photoinhibited male Siberian hamsters. *Biol. Reprod.* **59**, 813–819.

Messina, A., Langlet, F., Chachlaki, K., Roa, J., Rasika, S., Jouy, N., Gallet, S., Gaytan, F., Parkash, J., Tena-Sempere, M., Giacobini, P. et Prevot, V. (2016). A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat. Neurosci.* **19**, 835–844.

Migaud, M., Batailler, M., Pillon, D., Franceschini, I., et Malpaux, B. (2011). Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J. Biol. Rhythms* **26**, 486–496.

Mikkelsen, J.D., et Simonneaux, V. (2009). The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* **30**, 26–33.

Milesi, S., Simonneaux, V., et Klosen, P. (2017). Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters. *Sci. Rep.* **7**, 17739.

MILESI, S., Simonneaux, V., et Klosen, P. (2018). Seasonal Control of the GnRH Neuronal Network as a Means of Uncovering Novel Central Mechanisms Governing Mammalian Reproduction. Dans *The GnRH Neuron and Its Control, Masterclass book/e-book series edited by Herbison A. & Plant T*.

Millar, R.P. (2005). GnRHs and GnRH receptors*. Anim. Reprod. Sci.* **88**, 5–28.

Min, L., Leon, S., Li, H., Pinilla, L., Carroll, R.S., Tena-Sempere, M., et Kaiser, U.B. (2015). RF9 Acts as a KISS1R Agonist In Vivo and In Vitro. *Endocrinology* **156**, 4639–4648.

Miro, J.L., Canguilhem, B., et Schmitt, P. (1980). Effects of bulbectomy on hibernation, food intake and body weight in the european hamster, Cricetus cricetus. *Physiol. Behav.* **24**, 859–862.

Monecke, S., et Wollnik, F. (2005). Seasonal variations in circadian rhythms coincide with a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster. *J. Comp. Physiol*. **B 175**, 167–183.

Monecke, S., Sage-Ciocca, D., Wollnik, F., et Pévet, P. (2013). Photoperiod can entrain circannual rhythms in pinealectomized European hamsters. *J. Biol. Rhythms* **28**, 278–290.

Monecke, S., Wollnik, F., et Pévet, P. (2014). The Circannual Clock in the European Hamster: How Is It Synchronized by Photoperiodic Changes? In: Numata H., Helm B. (eds) *Annual, Lunar, and Tidal Clocks*. Springer, Tokyo

Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Benard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas, L., Yon, L., Malagon, M.M., Driouich, A., Gasman, S., Anouar, Y. (2009). Chromogranin A Promotes Peptide Hormone Sorting to Mobile Granules in Constitutively and Regulated Secreting Cells : Role of Conserved N- and C-Terminal Peptides. *J. Biol. Chem.* **284**, 12420–12431.

Mruk, D.D., et Cheng, C.Y. (2015). The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr. Rev.* **36**, 564–591.

Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., et Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **518**, 943–962.

Mullur, R., Liu, Y.-Y., et Brent, G.A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382.

Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., et Tsutsui, K. (2008). Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J. Endocrinol.* **199**, 105–112.

Murphy, M., Jethwa, P.H., Warner, A., Barrett, P., Nilaweera, K.N., Brameld, J.M., et Ebling, F.J.P. (2012). Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in Siberian hamsters. *Endocrinology* **153**, 101–112.

Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., et Al. (2008). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* **452**, 317–322.

Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Vigo, E., Tovar, S., Chartrel, N., Le Marec, O., Leprince, J., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Vaudry, H. et Tena-Sempere, M. (2006a). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J. Physiol*. **573,** 237–249.

Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., et Steiner, R.A. (2009). Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Kisspeptin/Dynorphin/Neurokinin B Neurons in the Arcuate Nucleus of the Mouse. *J. Neurosci.* **29**, 11859–11866.

Ng, K.Y., Leong, M.K., Liang, H., et Paxinos, G. (2017). Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct. Funct.* **222**, 2921–2939.

Nicholls, T.J., Follett, B.K., Goldsmith, A.R., et Pearson, H. (1988). Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reprod. Nutr. Dev*. **28**, 375–385.

Niklowitz, P., Khan, S., Bergmann, M., Hoffmann, K., et Nieschlag, E. (1989). Differential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on Leydig cell function and restoration of spermatogenesis in hypophysectomized and photoinhibited Djungarian hamsters (Phodopus sungorus). *Biol. Reprod.* **41**, 871–880.

Nishiwaki-Ohkawa, T., et Yoshimura, T. (2016). Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *J. Endocrinol.* **229**, R117–R127.

Noel, S.D., Abreu, A.P., Xu, S., Muyide, T., Gianetti, E., Tusset, C., Carroll, J., Latronico, A.C., Seminara, S.B., Carroll, R.S. et Kaiser, U.B. (2014). TACR3 mutations disrupt NK3R function through distinct mechanisms in GnRH-deficient patients. *FASEB J.* **28**, 1924–1937.

Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J.-M., Lefoulon, F., Fauchère, J.-L., Delagrange, P., Canet, E., et Boutin, J.A. (2000). Identification of the Melatonin-binding SiteMT 3 as the Quinone Reductase 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 31311–31317.

Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrange, P., Canet, E., et Boutin, J.A. (2001). Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol*. **61**, 1369–1379.

Oakley, A.E., Clifton, D.K., et Steiner, R.A. (2009). Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocr. Rev.* **30**, 713–743.

Ojeda, S.R., et Negro-Vilar, A. (1985). Prostaglandin E2-induced luteinizing hormone-releasing hormone release involves mobilization of intracellular Ca+2. *Endocrinology* **116**, 1763–1770.

Ojeda, S.R., Urbanski, H.F., Katz, K.H., et Costa, M.E. (1988). Prostaglandin E2 releases luteinizing hormone-releasing hormone from the female juvenile hypothalamus through a Ca2+-dependent, calmodulin-independent mechanism. *Brain Res.* **441**, 339–351.

Ojeda, S.R., Lomniczi, A., et Sandau, U. (2010). Contribution of glial-neuronal interactions to the neuroendocrine control of female puberty. Eur. *J. Neurosci.* **32**, 2003–2010.

Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., Ebihara, S., Korf, H.-W., et Yoshimura, T. (2008). Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18238–18242.

Orth, J.M., Gunsalus, G.L., et Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787–794.

Ortiga-Carvalho, T.M., Sidhaye, A.R., et Wondisford, F.E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. Nat. Rev. Endocrinol. **10**, 582–591.

Ottesen, A.H., Carlson, C.R., Louch, W.E., Dahl, M.B., Sandbu, R.A., Johansen, R.F., Jarstadmarken, H., Bjørås, M., Høiseth, A.D., Brynildsen, J., Sjaastad, I., Stridsberg, M., Omland, T., Christensen, G. et Rosjo, H. (2017a). Glycosylated Chromogranin A in Heart Failure: Implications for Processing and Cardiomyocyte Calcium Homeostasis. *Circ. Heart Fail.* **10**, e003675.

Ouimet, C.C., Miller, P.E., Hemmings, H.C., Walaas, S.I., et Greengard, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J. Neurosci.* **4**, 111–124.

Parkinson, T.J., et Follett, B.K. (1995). Thyroidectomy abolishes seasonal testicular cycles of Soay rams. *Proc. Biol. Sci.* **259**, 1–6.

Patel, S.R., Murphy, K.G., Thompson, E.L., Patterson, M., Curtis, A.E., Ghatei, M.A., et Bloom, S.R. (2008). Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* **149**, 4747–4754.

Paul, M.J., Galang, J., Schwartz, W.J., et Prendergast, B.J. (2009). Intermediate-duration day lengths unmask reproductive responses to nonphotic environmental cues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **296**, R1613–R1619.

Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Pévet, P., et Buijs, R.M. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. Eur. *J. Neurosci.* **19**, 318–324.

Petri, I., Diedrich, V., Wilson, D., Fernández-Calleja, J., Herwig, A., Steinlechner, S., et Barrett, P. (2016). Orchestration of gene expression across the seasons: Hypothalamic gene expression in natural photoperiod throughout the year in the Siberian hamster. *Sci. Rep.* **6**, 29689.

Pevet, P., et Challet, E. (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J. Physiol. Paris* **105**, 170–182.

Pévet, P., Vivien-Roels, B., et Masson-Pévet, M. (1989). Low temperature in the golden hamster accelerates the gonadal atrophy induced by short photoperiod but does not affect the daily pattern of melatonin secretion. *J. Neural Transm.* **76**, 119–128.

Piet, R., Dunckley, H., Lee, K., et Herbison, A.E. (2016). Vasoactive Intestinal Peptide Excites GnRH Neurons in Male and Female Mice. *Endocrinology* **157**, 3621–3630.

Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blomenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., et Tena Sempere, M. (2010). Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E39–E46.

Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C., et Barlow-Walden, L.R. (1994). Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **738**, 419–420.

Poling, M.C., Quennell, J.H., Anderson, G.M., et Kauffman, A.S. (2013). Kisspeptin neurones do not directly signal to RFRP-3 neurones but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. *J. Neuroendocrinol*. **25**, 876–886.

Porkka-Heiskanen, T., Khoshaba, N., Scarbrough, K., Urban, J.H., Vitaterna, M.H., Levine, J.E., Turek, F.W., et Horton, T.H. (1997). Rapid photoperiod-induced increase in detectable GnRH mRNA-containing cells in Siberian hamster. *Am. J. Physiol*. **273**, R2032–R2039.

Poulton, A.L., English, J., Symons, A.M., et Arendt, J. (1987). Changes in plasma concentrations of LH, FSH and prolactin in ewes receiving melatonin and short-photoperiod treatments to induce early onset of breeding activity. *J. Endocrinol.* **112**, 103–111.

Powers, J.B., Steel, E.A., Hutchison, J.B., Hastings, M.H., Herbert, J., et Walker, A.P. (1989). Photoperiodic Influences on Sexual Behavior in Male Syrian Hamsters. *J. Biol. Rhythms* **4**, 61–78.

Prendergast, B.J. (2010). MT1 melatonin receptors mediate somatic, behavioral, and reproductive neuroendocrine responses to photoperiod and melatonin in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Endocrinology* **151**, 714–721.

Prendergast, B.J., Mosinger, B., Kolattukudy, P.E., et Nelson, R.J. (2002). Hypothalamic gene expression in reproductively photoresponsive and photorefractory Siberian hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16291–16296.

Prendergast, B.J., Bilbo, S.D., Dhabhar, F.S., et Nelson, R.J. (2004). Effects of photoperiod history on immune responses to intermediate day lengths in Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *J. Neuroimmunol.* **149**, 31–39.

Prévost, G., Jeandel, L., Arabo, A., Coëffier, M., El Ouahli, M., Picot, M., Alexandre, D., Gobet, F., Leprince, J., Berrahmoune, H., Déchelotte, P., Malagnon, M., Bonner, C., Kerr-Conte, J., Chigr, F., Lefebvre, H., Anouar, Y. et Chartrel, N. (2015). Hypothalamic Neuropeptide 26RFa Acts as an Incretin to Regulate Glucose Homeostasis. *Diabetes* **64**, 2805–2816.

Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G.B., et Beauvillain, J.C. (1999). Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *NeuroScience* **94**, 809–819.

Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G., et Ojeda, S.R. (2003). Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J. Neurosci.* **23**, 10622–10632.

Prevot, V., Lomniczi, A., Corfas, G., et Ojeda, S.R. (2005). erbB-1 and erbB-4 receptors act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function. *Endocrinology* **146**, 1465–1472.

Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., et Rollag, M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* **20**, 600–605.

Qiu, J., Nestor, C.C., Zhang, C., Padilla, S.L., Palmiter, R.D., Kelly, M.J., et Rønnekleiv, O.K. (2016). High-frequency stimulation-induced peptide release synchronizes arcuate kisspeptin neurons and excites GnRH neurons. *eLife* **5**, e16246.

Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., et Simonin, F. (2016). RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol. Ther.* **160**, 84–132.

Radovick, S., Levine, J.E., et Wolfe, A. (2012). Estrogenic Regulation of the GnRH Neuron. *Front. Endocrinol.* **3,** 335-353

Rage, F., Lee, B.J., Ma, Y.J., et Ojeda, S.R. (1997). Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J. Neurosci.*, **23,** 9145–9156.

Ramaswamy, S., Seminara, S.B., Ali, B., Ciofi, P., Amin, N.A., et Plant, T.M. (2010). Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (Macaca mulatta) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **151**, 4494–4503.

Randall, V.A. (2008). The Endocrine Control of the Hair Follicle. In Hair Growth and Disorders, In: Blume-Peytavi U., Tosti A., Trüeb R. (eds) Hair Growth and Disorders. Springer, Berlin, Heidelberg

Rasri-Klosen, K., Simonneaux, V., et Klosen, P. (2017). Differential response patterns of kisspeptin and RFamide-related peptide to photoperiod and sex steroid feedback in the Djungarian hamster (Phodopus sungorus). *Endocrinology* **29**,1-13

Reese T. J., et Brightmann M. W. (1968). Similarity in structure and permeability to peroxidase of epithelia overlying fenestrated cerebral capillaries. *Anat. Rec.* **160**, 414.

Remaud, S., Gothié, J.-D., Morvan-Dubois, G., et Demeneix, B.A. (2014). Thyroid Hormone Signaling and Adult Neurogenesis in Mammals. *Front. Endocrinol.* **5.** 62

Reppert, S.M., Perlow, M.J., Ungerleider, L.G., Mishkin, M., Tamarkin, L., Orloff, D.G., Hoffman, H.J., et Klein, D.C. (1981). Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the rhesus monkey. *J. Neurosci*. **1**, 1414–1425.

Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., et Simonneaux, V. (2006a). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr. Biol.* **16**, 1730–1735.

Revel, F.G., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., et Simonneaux, V. (2006b). Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology* **147**, 4680–4687.

Revel, F.G., Herwig, A., Garidou, M.-L., Dardente, H., Menet, J.S., Masson-Pévet, M., Simonneaux, V., Saboureau, M., et Pévet, P. (2007). The circadian clock stops ticking during deep hibernation in the European hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 13816–13820.

Revel, F.G., Saboureau, M., Pévet, P., Simonneaux, V., et Mikkelsen, J.D. (2008). RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* **149**, 902–912.

de Reviers, M.-M., Ravault, J.-P., Tillet, Y., et Pelletier, J. (1989). Melatonin binding sites in the sheep pars tuberalis. *Neurosci. Lett*. **100**, 89–93.

Rindi, G., Buffa, R., Sessa, F., Tortora, O., et Solcia, E. (1986). Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. *Histochemistry* **85**, 19–28.

Ritchie, M., et Yeap, B.B. (2015). Thyroid hormone: Influences on mood and cognition in adults. *Maturitas* **81**, 266–275.

Rizwan, M.Z., Porteous, R., Herbison, A.E., et Anderson, G.M. (2009). Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* **150**, 1413–1420.

Rizwan, M.Z., Poling, M.C., Corr, M., Cornes, P.A., Augustine, R.A., Quennell, J.H., Kauffman, A.S., et Anderson, G.M. (2012). RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* **153**, 3770–3779.

Robins, S.C., Stewart, I., McNay, D.E., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., Kokoeva, M.V., et Placzek,M. (2013). α-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat. Commun.* **4**, 1-13.

Robinson, J.E., et Karsch, F.J. (1984). Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol. Reprod.* **31**, 656–663.

Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Pastor, F.E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., et Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int. Rev. Cytol.* **247**, 89–164.

Roseweir, A.K., Kauffman, A.S., Smith, J.T., Guerriero, K.A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., Pineda, R., Gottsch, M.L., Tena-Sempere, M., Moenter, S.M., Terasawa, E., Clarke, I., Steiner, R.A. et Millar, R. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J. Neurosci.* **29**, 3920–3929.

Ross, A.W., Webster, C.A., Mercer, J.G., Moar, K.M., Ebling, F.J., Schuhler, S., Barrett, P., et Morgan, P.J. (2004). Photoperiodic regulation of hypothalamic retinoid signaling: association of retinoid X receptor gamma with body weight. *Endocrinology* **145**, 13–20.

Ross, A.W., Bell, L.M., Littlewood, P.A., Mercer, J.G., Barrett, P., et Morgan, P.J. (2005). Temporal changes in gene expression in the arcuate nucleus precede seasonal responses in adiposity and reproduction. *Endocrinology* **146**, 1940–1947.

Ross, A.W., Helfer, G., Russell, L., Darras, V.M., et Morgan, P.J. (2011). Thyroid Hormone Signalling Genes Are Regulated by Photoperiod in the Hypothalamus of F344 Rats. *PLOS ONE* **6**, e21351.

Roth, J., Merker, G., Nürnberger, F., Pauly, B., et Zeisberger, E. (1990). Changes in physiological and neuroendocrine properties during thermal adaptation of golden hamsters (Mesocricetus auratus). *J. Comp. Physiol*. **B 160**, 153–159.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., et Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10972–10976.

Ruf, T., et Geiser, F. (2015). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **90**, 891–926.

Sáenz de Miera, C., Hanon, E.A., Dardente, H., Birnie, M., Simonneaux, V., Lincoln, G.A., et Hazlerigg, D.G. (2013). Circannual variation in thyroid hormone deiodinases in a short-day breeder. *Endocrinology* **25**, 412–421.

Sáenz de Miera, C., Monecke, S., Bartzen-Sprauer, J., Laran-Chich, M.-P., Pévet, P., Hazlerigg, D.G., et Simonneaux, V. (2014). A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr. Biol.* **24**, 1500–1506.

Sahu, A., Crowley, W.R., Tatemoto, K., Balasubramaniam, A., et Kalra, S.P. (1987). Effects of neuropeptide Y, NPY analog (norleucine4-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (ovx) and ovx estrogen, progesterone-treated rats. *Peptides* **8**, 921–926.

Sánchez, E., Singru, P.S., Wittmann, G., Nouriel, S.S., Barrett, P., Fekete, C., et Lechan, R.M. (2010). Contribution of TNF-alpha and nuclear factor-kappaB signaling to type 2 iodothyronine deiodinase activation in the mediobasal hypothalamus after lipopolysaccharide administration. *Endocrinology* **151**, 3827–3835.

Sandler, B., Webb, P., Apriletti, J.W., Huber, B.R., Togashi, M., Cunha Lima, S.T., Juric, S., Nilsson, S., Wagner, R., Fletterick, R.J. et Baxter, J.D. (2004). Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J. Biol. Chem.* **279**, 55801–55808.

Schlatt, S., Niklowitz, P., Hoffmann, K., et Nieschlag, E. (1993). Influence of short photoperiods on reproductive organs and estrous cycles of normal and pinealectomized female Djungarian hamsters, Phodopus sungorus. *Biol. Reprod.* **49**, 243–250.

Schlatt, S., De Geyter, M., Kliesch, S., Nieschlag, E., et Bergmann, M. (1995). Spontaneous recrudescence of spermatogenesis in the photoinhibited male Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Biol. Reprod.* **53**, 1169–1177.

Schneider, J.E., Benton, N.A., Russo, K.A., Klingerman, C.M., Williams, W.P., Simberlund, J., Abdulhay, A., Brozek, J.M., et Kriegsfeld, L.J. (2017). RFamide-related Peptide-3 and the Trade-off between Reproductive and Ingestive Behavior. *Integr. Comp. Biol.* **57**, 1225–1239.

Schomerus, C., et Korf, H.-W. (2005). Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1057**, 372–383.

Schwartz, C.E., May, M.M., Carpenter, N.J., Rogers, R.C., Martin, J., Bialer, M.G., Ward, J., Sanabria, J., Marsa, S., Lewis, J.A., et al. (2005). Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am. J. Hum. Genet*. **77**, 41–53.

Schwartz, H.L., Strait, K.A., Ling, N.C., et Oppenheimer, J.H. (1992). Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J. Biol. Chem.* **267**, 11794–11799.

Seegal, R.F., et Goldman, B.D. (1975). Effects of photoperiod on cyclicity and serum gonadotropins in the Syrian hamster. *Biol. Reprod.* **12**, 223–231.

Shepherd, P.S., Da Costa, C.R., Cridland, J.C., Gilmore, K.S., et Johnstone, A.P. (1999). Identification of an important thyrotrophin binding site on the human thyrotrophin receptor using monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **149**, 197–206.

Shibata, M., Friedman, R.L., Ramaswamy, S., et Plant, T.M. (2007). Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (Macaca mulatta). *Endocrinology* **19**, 432–438.

Simmons, L.J., Surles-Zeigler, M.C., Li, Y., Ford, G.D., Newman, G.D., et Ford, B.D. (2016). Regulation of inflammatory responses by neuregulin-1 in brain ischemia and microglial cells in vitro involves the NF-kappa B pathway. *J. Neuroinflammation* **13**.1-15

Simoni, M., Gromoll, J., et Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* **18**, 739–773.

Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J.-P., Laboureyras, E., Jhamandas, J.H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., Kieffer, B.L., Bourguignon, J.J., Simonnet, G. (2006). RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 466–471.

Simonneaux, V., et Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* **55**, 325–395.

Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V.J., et Gauer, F. (2013). Kisspeptins and RFRP-3 Act in Concert to Synchronize Rodent Reproduction with Seasons. *Front. Neurosci*. **7**, 1-11

Smale, L., Cassone, V.M., Moore, R.Y., et Morin, L.P. (1989). Paraventricular nucleus projections mediating pineal melatonin and gonadal responses to photoperiod in the hamster. *Brain Res.* Bull. **22**, 263–269.

Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K., et Steiner, R.A. (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* **146**, 2976–2984.

Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., et Clarke, I.J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* **148**, 1150–1157.

Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., et Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **109**, 323–330.

Stalvey, J.R., et Clavey, S.M. (1992). Evidence that testosterone regulates Leydig cell 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity by a trans-acting factor distal to the androgen receptor. *J. Androl.* **13**, 93–99.

Stanton, S.J., Mullette-Gillman, O.A., et Huettel, S.A. (2011). Seasonal variation of salivary testosterone in men, normally cycling women, and women using hormonal contraceptives. *Physiol. Behav.* **104**, 804–808.

Steinlechner, S., Heldmaier, G., et Becker, H. (1983). The seasonal cycle of body weight in the Djungarian hamster: photoperiodic control and the influence of starvation and melatonin. *Oecologia* **60**, 401–405.

Stetson, M.H., et Watson-Whitmyre, M. (1986). Effects of exogenous and endogenous melatonin on gonadal function in hamsters. *J. Neural Transm. Suppl.* **21**, 55–80.

Stetson, M.H., Matt, K.S., et Watson-Whitmyre, M. (1976). Photoperiodism and reproduction in golden hamsters: circadian organization and the termination of photorefractoriness. *Biol. Reprod.* **14**, 531–537.

Stetson, M.H., Watson-Whitmyre, M., et Matt, K.S. (1977). Termination of photorefractoriness in golden hamsters-photoperiodic requirements. *J. Exp. Zool.* **202**, 81–88.

Stevenson, T.J., et Prendergast, B.J. (2013). Reversible DNA methylation regulates seasonal photoperiodic time measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci* **110**, 16651–16656.

Stilling, G.A., Bayliss, J.M., Jin, L., Zhang, H., et Lloyd, R.V. (2005). Chromogranin A transcription and gene expression in folliculostellate (TtT/GF) cells inhibit cell growth. *Endocr. Pathol.* **16**, 173–186.

Sun, Y., Todd, B.J., Thornton, K., Etgen, A.M., et Neal-Perry, G. (2011). Differential Effects of Hypothalamic IGF-I on Gonadotropin Releasing Hormone Neuronal Activation During Steroid-Induced LH Surges in Young and Middle-Aged Female Rats. *Endocrinology* **152**, 4276–4287.

Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S.C., Iguchi, H., Kawasawa, Y.I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., et Al. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7438–7443.

Talbi, R., Laran-Chich, M.-P., Magoul, R., El Ouezzani, S., et Simonneaux, V. (2016). Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa. *Sci. Rep.* **6**, 36057.

Teclemariam-Mesbah, R., Kalsbeek, A., Buijs, R.M., et Pévet, P. (1997). Oxytocin innervation of spinal preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion in the rat. *Cell Tissue Res.* **287**, 481–486.

Terasawa, E., Keen, K.L., Mogi, K., et Claude, P. (1999a). Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinology* **140**, 1432–1441.

Terasawa, E., Schanhofer, W.K., Keen, K.L., et Luchansky, L. (1999b). Intracellular Ca(2+) oscillations in luteinizing hormone-releasing hormone neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *J. Neurosci.* **19**, 5898–5909.

Tjølsen, A., Rosland, J.H., Berge, O.G., et Hole, K. (1991). The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J. Pharmacol. Methods* **25**, 241–250.

Todman, M.G., Han, S.-K., et Herbison, A.E. (2005). Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *NeuroScience* **132**, 703–712.

Tremblay, J.P. (2015). CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Méd. Sci.* **31**, 1014–1022.

Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., et Malpaux, B. (2002). Melatonin Enters the Cerebrospinal Fluid through the Pineal Recess. *Endocrinology* **143**, 84–90.

Tsujino, K., Narumi, R., Masumoto, K., Susaki, E.A., Shinohara, Y., Abe, T., Iigo, M., Wada, A., Nagano, M., Shigeyoshi, Y., et Ueda, H.R. (2013). Establishment of TSH β real-time monitoring system in mammalian photoperiodism. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech*. **18**, 575–588.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., et Sharp, P.J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 661–667.

Turek, F.W., et Pappas, P. (1980). Daily melatonin injections inhibit short-day-induced testicular regression in hamsters. *Experientia* **36**, 1426–1427.

Turek, F.W., Elliott, J.A., Alvis, J.D., et Menaker, M. (1975). Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol. Reprod.* **13**, 475–481.

Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., et Tsutsui, K. (2012). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* **153**, 373–385.

Ueda, S., et Ibuka, N. (1995). An analysis of factors that induce hibernation in Syrian hamsters. *Physiol. Behav.* **58**, 653–657.

Uenoyama, Y., Tsukamura, H., et Maeda, K. (2014). KNDy neuron as a gatekeeper of puberty onset. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **40**, 1518–1526.

Ulloa-Aguirre, A., Uribe, A., Zariñán, T., Bustos-Jaimes, I., Pérez-Solis, M.A., et Dias, J.A. (2007). Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in GaS protein coupling and receptor expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **260-262**, 153–162.

Underwood, L.S., et Reynolds, P. (1980). Photoperiod and fur lengths in the arctic fox (Alopex lagopus L.). *Int. J. Biometeorol*. **24**, 39–48.

Urbanski, H.F., Simpson, S.M., Ellis, D.H., et Follett, B.K. (1983). Secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in castrated golden hamsters during exposure to various photoperiods and to natural daylengths. *J. Endocrinol.* **99**, 379–386.

Urbanski, H.F., Doan, A., et Pierce, M. (1991). Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol. Reprod.* **44**, 687–692.

Van Cauter, E.W., Virasoro, E., Leclercq, R., et Copinschi, G. (1981). Seasonal, circadian and episodic variations of human immunoreactive beta-MSH, ACTH and cortisol. *Int. J. Pept. Protein Res.* **17**, 3–13.

Van der Beek, E.M., Horvath, T.L., Wiegant, V.M., Van den Hurk, R., et Buijs, R.M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Comp. Neurol.* **384**, 569–579.

Vaněcek, J., Pavlík, A., et Illnerová, H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* **435**, 359–362.

Van Vugt, H.H., Swarts, H.J.M., Van de Heijning, B.J.M., et Van der Beek, E.M. (2004). Centrally applied somatostatin inhibits the estrogen-induced luteinizing hormone surge via hypothalamic gonadotropin-releasing hormone cell activation in female rats. *Biol. Reprod.* **71**, 813–819.

Vaughan, M.K., Buzzell, G.R., Hoffman, R.A., Menendez-Pelaez, A., et Reiter, R.J. (1994). Insulin-like growth factor-1 in Syrian hamsters: interactions of photoperiod, gonadal steroids, pinealectomy, and continuous melatonin treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **205**, 327–331.

Vriend, J. (1983). Evidence for pineal gland modulation of the neuroendocrine-thyroid axis. *NeuroEndocrinology* **36**, 68–78.

Vriend, J., et Wasserman, R.A. (1986). Effects of afternoon injections of melatonin in hypothyroid male Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* **42**, 498–503.

Wade, G.N., et Bartness, T.J. (1984). Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight, and body composition in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* **246**, R26–R30.

Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., Steiner, R.A. et Okamura, H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 3124–3132.

Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Ohkura, S., Tanaka, T., Kusaka, M., et Okamura, H. (2011). Effects of Chronic Administration of a Metastin Analog, TAK-683, on the GnRH Pulse Generator Activity in Ovariectomized Goats : basic/translational - Gonadotropin-Releasing Hormone (the endocrine society's annual meeting).

Wallis, K., Dudazy, S., van Hogerlinden, M., Nordström, K., Mittag, J., et Vennström, B. (2010). The thyroid hormone receptor alpha1 protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **24**, 1904–1916.

Walton, J.C., Weil, Z.M., et Nelson, R.J. (2011). Influence of Photoperiod on Hormones, Behavior, and Immune Function. *Front. Neuroendocrinol.* **32**, 303–319.

Warner, A., Jethwa, P.H., Wyse, C.A., I'anson, H., Brameld, J.M., et Ebling, F.J.P. (2010). Effects of photoperiod on daily locomotor activity, energy expenditure, and feeding behavior in a seasonal mammal. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **298**, R1409–R1416.

Wassmer, T., et Wollnik, F. (1997). Timing of torpor bouts during hibernation in European hamsters (Cricetus cricetus L.). *J. Comp. Physiol*. **B167**, 270–279.

Watanabe, M., Yasuo, S., Watanabe, T., Yamamura, T., Nakao, N., Ebihara, S., et Yoshimura, T. (2004). Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* **145**, 1546–1549.

Watanabe, M., Fukuda, A., et Nabekura, J. (2014). The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front. Neurosci.* **8.** 387

Watanabe, T., Yamamura, T., Watanabe, M., Yasuo, S., Nakao, N., Dawson, A., Ebihara, S., et Yoshimura, T. (2007). Hypothalamic expression of thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes in relation to photorefractoriness in birds and mammals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **292**, R568–R572.

Weaver, D.R., Liu, C., et Reppert, S.M. (1996). *Nature*'s knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **10**, 1478–1487.

Weems, P.W., Witty, C.F., Amstalden, M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., et Lehman, M.N. (2016). κ-Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology* **157**, 2367–2379.

Weinbauer, G.F., Luetjens, C.M., Simoni, M., et Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. (eds) Andrology. Springer, Berlin, Heidelberg

Wierman, M.E., Kiseljak-Vassiliades, K., et Tobet, S. (2011). Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Neuron Migration: Initiation, Maintenance and Cessation as Critical Steps to Ensure Normal Reproductive Function. *Front. Neuroendocrinol.* **32**, 43–52.

Wildt, L., Häusler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., et Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* **109**, 376–385.

Williams, L.M., et Morgan, P.J. (1988). Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* **119**, R1–R3.

Wilson, B.S., et Lloyd, R.V. (1984). Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am. J. Pathol*. **115**, 458–468.

Wirth, E.K., Schweizer, U., et Köhrle, J. (2014). Transport of thyroid hormone in brain. *Front. Endocrinol*. **5**, 98.

Wittkowski, W., Hewing, M., Hoffmann, K., Bergmann, M., et Fechner, J. (1984). Influence of photoperiod on the ultrastructure of the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Cell Tissue Res.* **238**, 213–216.

Wittkowski, W., Bergmann, M., Hoffmann, K., et Pera, F. (1988). Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Cell Tissue Res.* **251**, 183–187.

Wood, S., et Loudon, A. (2017). The pars tuberalis: The site of the circannual clock in mammals? *Gen. Comp. Endocrinol.* **258,** 222-235

Wood, S.H., Christian, H.C., Miedzinska, K., Saer, B.R.C., Johnson, M., Paton, B., Yu, L., McNeilly, J., Davis, J.R.E., McNeilly, A.S., Burt, D.W. et Loudon, A.S.I. (2015). Binary Switching of Calendar Cells in the Pituitary Defines the Phase of the Circannual Cycle in Mammals. *Curr. Biol*. **25**, 1-12

Woodfill, C.J., Wayne, N.L., Moenter, S.M., et Karsch, F.J. (1994). Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol. Reprod.* **50**, 965–976.

Wray, S. (2010). From Nose to Brain: Development of Gonadotropin-releasing hormone −1 Neurons. *Endocrinology* **22**, 743–753.

Wray, S., Nieburgs, A., et Elkabes, S. (1989). Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. Dev. *Brain Res.* **46**, 309–318.

Wurtman, R.J., Axelrod, J., et Phillips, L.S. (1963). Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Control by Light. *Science* **142**, 1071–1073.

Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., et Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol*. **192**, 251–264.

Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S., et Yoshimura, T. (2004a). Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology* **145**, 4264–4267.

Yamamura, T., Yasuo, S., Hirunagi, K., Ebihara, S., et Yoshimura, T. (2006). T(3) implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res.* **324**, 175–179.

Yan, L., et Silver, R. (2004). Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1105–1109.

Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., et Korf, H.-W. (2009). Melatonin Transmits Photoperiodic Signals through the MT1 Melatonin Receptor. *J. Neurosci.* **29**, 2885–2889.

Yasuo, S., Koch, M., Schmidt, H., Ziebell, S., Bojunga, J., Geisslinger, G., et Korf, H.-W. (2010). An endocannabinoid system is localized to the hypophysial pars tuberalis of Syrian hamsters and responds to photoperiodic changes. *Cell Tissue Res.* **340**, 127–136.

Yip, S.H., Boehm, U., Herbison, A.E., et Campbell, R.E. (2015). Conditional Viral Tract Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. *Endocrinology* **156**, 2582–2594.

Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., et Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* **426**, 178–181.

REVUE

Le Contrôle saisonnier des neurones a GnRH : un moyen de découvrir de nouveau mécanismes régulateurs de l'activité reproductrice chez les mammifères

Version originale:

Seasonal control of the GnRH neuronal network as a means of uncovering novel central mechanisms governing mammalian reproduction

MILESI Sebastien[1], SIMONNEAUX Valerie[1] and KLOSEN Paul[1]

[1]Institute of Cellular and Integrative Neuroscience, CNRS, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg Cedex, France.

Publié dans The GnRH Neuron and its Control (Ed. Prof Allan E Herbison and Prof Tony M Plant)

19 Février 2018

Abstract

In temperate climates, most species are submitted to pronounced annual changes in temperature, light exposure, and food availability. Because reproduction requires large energy expenditure, the timing of birth and weaning of offspring has evolved to coincide with a period of maximal food availability. To achieve this, breeding activity needs to be properly timed and synchronized with the seasons according to the species' gestational period. Rodents with a gestation time around 1 month breed in spring and summer (long-day breeders), while caprines, such as sheep and goats, with several months of gestation breed in fall in order to give birth in spring (short-day breeders). Most importantly, seasons not only control sexual behavior, but also profoundly affect the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis. Therefore, the study of seasonal breeding may be viewed as a tool for investigating the central mechanisms regulating this reproductive axis, particularly the activity of the hypothalamic neurons that secrete the gonadotrophin releasing hormone (GnRH) in the portal blood, which, after transport to the pituitary, stimulates the secretion of the pituitary gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and follicule stimulating hormone (FSH).

To unveil the neuroendocrine mechanisms controlling seasonal breeding, studies have focused on (i) the identification of the cell type(s) capable of decoding the astronomical photoperiodic message; (ii) the detection of the central structures forwarding this message to the GnRH neurons; and (iii) the investigation of the role of the foregoing cell types and central structures in determining the seasonal synchronization of reproduction. Melatonin secreted by the pineal gland transduces photoperiod into a hormonal signal, and data so far point to the *pars tuberalis* of the adenohypophysis as the decoder of the melatonin message. The photoperiodic cue is then forwarded to tanycytes: highly specialized glia with cell bodies located in the ependymal layer of the ventral aspect of the third ventricle, which have long processes projecting either to the mediobasal hypothalamus or the median eminence (ME) in order to regulate the local level of thyroid hormones. From there, this photoperiodic message is distributed to the hypothalamic circuits controlling the pituitary–gonadal axis, among which are the kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) neurons (Figure 16.1).

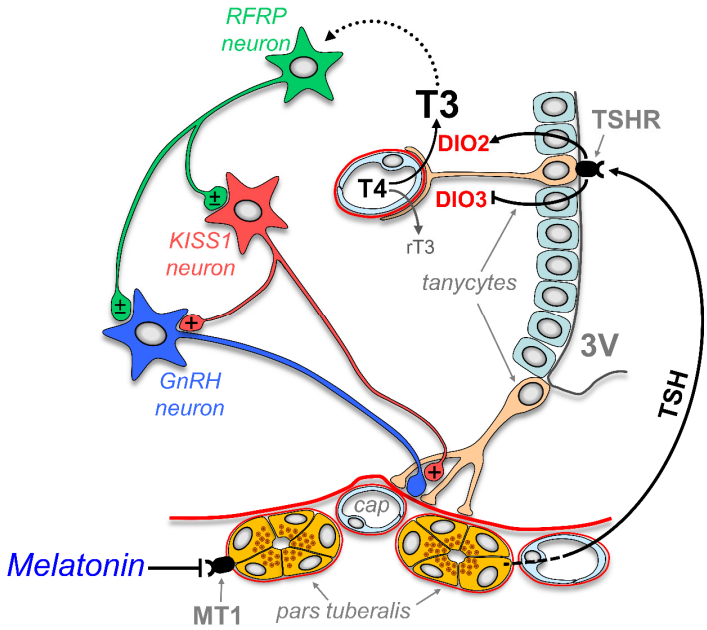


Figure 16.1 Current state of our understanding of the photoperiodic control of GnRH secretion. Nightly melatonin secretion inhibits thyroid stimulating hormone (TSH) production in the *pars tuberalis*. However, when nights are short (long days = long photoperiod), the melatonin inhibition of TSH production is relieved and *pars tuberalis* TSH expression and secretion increase. TSH acts on the hypothalamic tanycytes, stimulating deiodonase (DIO)2 and inhibiting DIO3 expression. Thus, the balance between the T3-producing DIO2 and the T3-metabolizing DIO3 shifts to favor the production of T3 from thyroxine (T4), increasing local T3 concentrations in the mediobasal hypothalamus. How this T3 acts on the kisspeptin and RFRP neurons is currently under investigation. Long photoperiods activate the expression of RFRP, a neuropeptide whose action on the GnRH and kisspeptin neurons is complex. This photoperiodic signaling also affects kisspeptin neurons, which are a known activator of GnRH secretion. Kisspeptin expression and secretion are modulated by photoperiod. Cap, capillary; MT1, melatonin receptor subtype 1; rT3, reverse T3; TSHR, TSH receptor; 3V, third ventricle.

I) Introduction

[T]Reproduction in vertebrates relies on the activity of a cluster of a few neurons synthesizing GnRH. These neurons are peculiar in that their cell bodies are diffusely scattered in a species-dependent manner throughout the hypothalamus, yet are synchronized with one another. Furthermore, many of these neurons project toward the ME, where they release GnRH in a pulsatile manner. GnRH then activates its receptor on the pituitary gonatrophs to increase the synthesis and release of LH and FSH, both hormones acting on the growth and activity of the gonads. A number of factors, such as metabolic and environmental signals, can modulate GnRH neurons, and as a consequence reproductive activity. The environmental cue allowing seasonal breeders to synchronize their reproductive activity with season is the photoperiod, the duration of the light phase during 1 day. Annual changes in the duration of the photoperiod are a predictable astronomic parameter, allowing reproducible tracking of the progress of the change in seasons. Since the 1960s, the pineal hormone melatonin has been recognized in rodents, as well as other species, as the key photoperiodic neuroendocrine messenger synchronizing HPG-axis activity with change in season (Hoffman and Reiter, 1965). Melatonin is secreted by the pineal gland only during the night, and the duration of secretion is proportional to the duration of the night. Thus, the duration of the nightly melatonin peak is an internal endocrine representation of the photoperiod. Melatonin controls not only reproduction, but also other seasonally regulated functions, such as pelage, energy balance, and hibernation. Species are usually classified as “seasonal” or “photoperiodic” based on whether they present a seasonal control of their reproductive activity or not. Nevertheless, species without an overt seasonal control of reproduction can exhibit seasonal variations in other physiological functions, such as seasonal affective disorder in humans, showing that the photoperiod integrating mechanism may also be of importance for these “non-seasonal” or “non-photoperiodic” species.

II) Photoperiodic changes in melatonin and the seasonal control of reproduction

a) Classical mammalian models for the study of seasonal reproduction

Standard laboratory rodents such as rats and mice do not display seasonal changes in reproductive activity, even when exposed to changes in day length, temperature, or food availability, except after experimental placement of certain central nervous system (CNS) lesions or administration of hormonal treatments.

The most common rodent used for the study of seasonal reproduction is the golden or Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). The Syrian hamster is a long-day breeder, whose HPG axis is inhibited by exposure to short days. Classically, this hamster is maintained under a long photoperiod of 14 hours of light and 10 hours of dark (LD 14/10), under which it remains reproductively active indefinitely. When exposed to a short photoperiod of 10 hours of light and 14 hours of dark (LD 10/14), the gonads of the Syrian hamster regress over a period of 10 weeks. If this short photoperiod is maintained longer than 20–25 weeks, the HPG axis spontaneously reactivates (Turek

et al., 1975). This spontaneous short-day reactivation is called the “photorefractory” state. These photorefractory animals are then “insensitive” to the short-day inhibition of the HPG axis, and need to be re-exposed to a long photoperiod before becoming sensitive to short days again. The Syrian hamster also undergoes hibernation in short days, particularly when exposed to low temperatures. Some studies have also shown photoperiodic variations in the body weight of this species, but this seems to be dependent on the laboratory or breeding colony.

The second classical rodent model for studying seasonal reproduction is the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), sometimes also called the Siberian hamster (Figala et al., 1973). This small hamster is also a long-day breeder, which is commonly maintained under a long photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of dark (LD 16/8): the maximal summer photoperiod of the natural habitat of this hamster in the border region between Kazakhstan and Mongolia. Like the Syrian hamster, the Djungarian hamster remains reproductively active indefinitely under long photoperiod. If exposed to short days (classically LD 8/16), sexual quiescence develops over a period of 10–12 weeks. Again, as with the Syrian hamster, if this short photoperiod is maintained longer than 20–25 weeks, a spontaneous photorefractory state is triggered. Djungarian hamsters do not hibernate, but display short episods (a few hours) of hypometabolism and hypothermia known as “diurnal torpor” during short photoperiod. Additionally, they display a pronounced photoperiodic body-weight rhythm and seasonal molting, resulting in a much paler (sometimes almost white) fur coat and about 30% weight loss, in short days.

The European hamster (*Cricetus cricetus*) requires a special mention. Like the previous two hamster species, this hamster is a long-day breeder, displays a pronounced seasonal body-weight rhythm, and hibernates. However, in contrast to the other species, even if it is maintained under a stable (long or short) photoperiod, with or without melatonin, it continues to display a circannual rhythm of activation and inhibition of its HPG axis and metabolic activity with a period of about 10–14 months. This endogenous rhythm is thought to be driven by a self-sustained “circannual clock,” the location of which is still a matter of debate, although a recent study pointed to the *pars tuberalis* (Sáenz de Miera et al., 2014). Photoperiod and melatonin, however, appear able to synchronize the circannual rhythm with the seasonal variations.

Results obtained in these species have mostly been confirmed in other photoperiodic rodents, such as voles (*Microtus* sp.) or the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). Such species cannot be obtained from commercial breeding centers, however, and there are only a few academic breeding colonies.

The main non-rodent species in which seasonal breeding is studied is the sheep (*Ovis aries*). As previously mentioned, sheep are short-day breeders, whose HPG axis is activated by short days in fall. They also display photorefractory mechanisms and have a circannual clock mechanism maintaining rhythmic activation and inhibition of the HPG axis even when maintained in a stable photoperiod.

b) Effect on seasonal physiology of the duration of the nightly pineal melatonin peak

In almost all mammals studied to date, the duration of the nightly melatonin peak is directly proportional to the duration of the night phase (Arendt et al., 1995), and pinealectomy results in the loss of all seasonal variations of physiology – with the notable exception of circannual species, which become out of phase with the seasonal changes. This has led to the hypothesis that *the duration of the nocturnal peak of melatonin is the endocrine driving factor for seasonal changes in physiology*.

This hypothesis has been confirmed using several approaches. The most informative have been peripheral (subcutaneous or intraperitoneal) melatonin injections and the "timed infusion paradigm" (extensively reviewed in Bartness et al., 1993). In these procedures, animals, both intact and pinealectomized, are exposed to either melatonin injections or infusions during certain periods of the circadian cycle. The key conclusions of this approach are as follows:

1. [LN]The duration of the melatonin peaks determines the photoperiodic response. Long melatonin peaks trigger short-day responses. Most interestingly for experimental studies of photoperiodic reproduction, subcutaneous melatonin injections in intact animals exposed to long photoperiods can trigger short-day responses if they are delivered close enough to the endogenous melatonin peak, either in the late afternoon or in the early morning. Indeed, subcutaneous bolus melatonin injections lead to a steep peak of melatonin followed by a steep drop, and then a slower decrease in melatonin concentration. Thus, late-afternoon injections of melatonin easily trigger short-day responses, because this trailing exogenous melatonin "fuses" with the endogenous melatonin peak to generate a long, night-like melatonin peak. Early-morning injections have to be delivered before the endogenous melatonin peak drops to basal levels, otherwise they are ineffective. Melatonin inhibition by light pulses as short as 1 second in the middle of a long night is sufficient to block short-day responses. Thus, the protocol of choice for simulating a short-day melatonin peak in animals exposed to a long photoperiod is a daily late-afternoon peripheral injection of melatonin.

2. It is clearly the duration of the melatonin peak and not the total dose of melatonin delivered that triggers short-day responses: an identical total dose of melatonin triggers short-day responses when delivered over a period of 8–10 hours and long-day responses when delivered over only 4–5 hours.

3. The circadian phase of delivery of a long melatonin peak is irrelevant. In pinealectomized animals, a long melatonin peak delivered during the light or the dark phase triggers the same short-day phenotype.

4. Pinealectomy can have different responses according to species. In the Syrian hamster, pinealectomy results in a long-day phenotype (sexual competence) whether the animals have been maintained in long or short photoperiod and whether they are maintained in long or short photoperiod following pinealoectomy. Thus, in this species, the long-day phenotype is the "default" phenotype. In the sibling species, the Turkish hamster (*Mesocricetus brandti*), the same procedure

results in sexual quiescence whatever the phenotype at pinealectomy and whatever the photoperiod following pinealectomy, indicating the "default" is a short-day phenotype. Finally, in the Djungarian hamster, pinealectomy prevents transition from the phenotype at the time of surgery. Animals with a long-day phenotype remain sexually competent, whether maintained in long days or transferred to short days. Short-day animals remain sexually quiescent, whether maintained in short days or transferred to long days. Thus, in this species, the pineal gland and the melatonin peak are probably only required during the transition from one photoperiod to another. Pinealectomy obviously eliminates the melatonin rhythm, but its outcome is species-specific.

c) Melatonin sites of action for the seasonal control of reproduction

i) Melatonin receptors

In mammals, two *bona fide* receptors for melatonin have been identified, both by their nucleotide sequence and by their pharmacological profiles in isolated cell lines (Jockers et al., 2016). They are named melatonin receptor subtype 1 and 2 (MT1 and MT2), and are encoded respectively by the *Mtnr1A* and *Mtnr1B* genes. Both are G protein-coupled receptors (GPRs) and signal mostly through inhibition of cyclic adenosine-3',5'monophosphate (cAMP) levels, as well as inhibition of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels for the MT2 receptor, and through the phospholipase C pathway. Although both genes are present in all mammals analyzed to date, *Mtnr1B* contains premature stop codons in the Djungarian hamster, the Campbell's desert hamster (*Phodopus campbelli*) and the Syrian hamster (Weaver et al., 1996). The fact that all these species display a full range of seasonal physiology driven by melatonin shows that *the MT1 receptor is necessary and sufficient to drive photoperiodic physiology*.

The gold standard for the study of melatonin receptor localization, especially in the brain and the pituitary gland, remains the detection of melatonin binding sites using ^{125}I-iodomelatonin as ligand (Figure 16.2A) (Vaněcek et al., 1987). This technique, however, does not allow for the phenotyping of cells expressing melatonin receptors. Iodomelatonin is a ligand for both MT1 and MT2 receptors, but on mouse brain tissue sections, ^{125}I-iodomelatonin disappears completely in *Mtnr1A* knockout (KO) mice, although *Mtnr1B* expression in the brain has been proven by polymerase chain reaction (PCR).

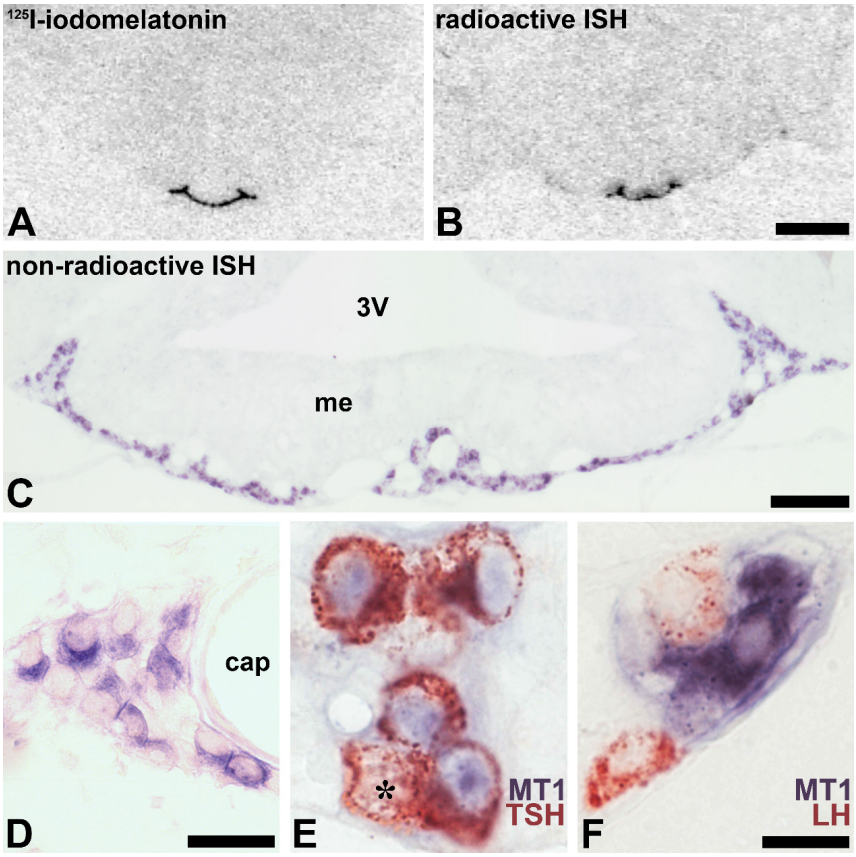


Figure 16.2 Melatonin receptor subtype 1 (MT1) in the *pars tuberalis.* A) ^{125}I-iodomelatonin binding in the rat hypothalamus. The thin layer of *pars tuberalis* cells located directly below the ME is the only region displaying ^{125}I-iodomelatonin. Note the selectivity and the strength of this signal. B) Radioactive *in situ* hybridization (ISH) for the mRNA encoding MT1. The radioactive signal is detected in the same area as the ^{125}I-iodomelatonin binding. C) Nonradioactive ISH for the mRNA encoding MT1. Nonradioactive ISH allows a more precise localization of the mRNA for MT1. D) At higher magnification, nonradioactive ISH for MT1 allows the visualization of individual cells expressing this mRNA. E) Nonradioactive ISH for MT1 can be combined with immunocytochemical detection of beta thyroid stimulating hormone (TSH) to demonstrate the colocalization of both signals in the same cells (European hamster, *Cricetus cricetus pars tuberalis*). * indicates a TSH-positive cell that does not appear to co-express the MT1 receptor. There are no MT1-positive cells that do not co-express TSH. F) Co-detection of MT1 (nonradioactive ISH) and beta LH (immunocytochemistry) shows that *pars tuberalis* gonadotropes do not express MT1 (European hamster, *Cricetus cricetus pars tuberalis*). 3V, third ventricle; me, median eminence; cap, capillary. Scale bars = 1 mm (A,B), 100 µm (C), 25 µm (D), 10 µm (E,F).

The identification of the melatonin target cells has been hampered for more than 20 years, because no reliable antibodies for immunocytochemical detection are available. Indeed, GPRs are the largest family of vertebrate membrane proteins, and are thus highly susceptible to cross-reactions. Some studies claim to have detected melatonin receptors using antibodies, but most fail to assess the specificity of these antibodies beyond reasonable doubt. The classical peptide-blocking

test does not prove specificity of the observed labeling, as this test fails to detect cross-reaction. Western blotting does not prove specificity of antisera in immunocytochemistry, because of the different pretreatments of the two techniques. Furthermore, even minor protein bands in Western blotting can produce significant labeling in immunocytochemistry. Finally, many small molecules that can be detected immunocytochemically are not separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and exit the gel before transfer. To date, no anti-melatonin receptor antibody complies with the stringent specificity controls suggested by Bordeaux et al. (2010).

In the absence of reliable melatonin receptor antibodies, melatonin receptor expression can be assessed by *in situ* hybridization (ISH). However, with the exception of the *pars tuberalis* of the adenohypophysis (Figure 16.2), this approach has not provided cellular localization or phenotyping of melatonin receptor-expressing cells. Nevertheless, radioactive ISH has been used extensively to study the changes in melatonin receptor expression in response to various stimuli, including photoperiodic changes.

Iodomelatonin binding studies have revealed a great diversity of melatonin binding sites in the brain of photoperiodic mammalian species (Masson-Pévet et al., 1994). Although melatonin binding sites have been detected in several species in the regions where GnRH neurons are located, no study has pointed to these melatonin receptors being located directly on GnRH neurons, indicating that melatonin does not act directly on GnRH neurons in the photoperiodic control of the HPG axis. Similarly, melatonin binding has not been detected in the adult *pars distalis* of the adenohypophysis, excluding a direct action of melatonin on pituitary gonadotropes (Johnston et al., 2007)

Melatonin binding sites in the brain have also been evaluated using lesions, in order to see whether these sites might be involved in the reception of the photoperiodic melatonin signal (Bartness et al., 1993; Maywood et al., 1996). Many of these lesions interfered with the perception of the photoperiodic melatonin signal, but they may simply have affected a structure that was involved in the transmission of photoperiodic information in the brain. Therefore, most studies using this method appear inconclusive concerning the identity of the master detection system for the photoperiodic melatonin signal. Similar caveats also affect studies trying to determine the site of action of melatonin using either melatonin microimplants (Malpaux et al., 1998) or local infusion of melatonin (Bartness et al., 1993), because they also result in local trauma of the brain tissue.

To date, one anatomical site, the *pars tuberalis* of the adenohypophysis, has been found to express a high density of melatonin receptors in all seasonal species (Figure 16.2). Moreover, the density of melatonin receptors in this structure varies with season, clearly pointing to the *pars tuberalis* as *the main candidate for the reception of the photoperiodic signal*. The high levels of melatonin receptor in the *pars tuberalis* have also allowed for the identification of these receptors as the MT1 subtype, and further examination of the localization of *Mtnr1A* transcripts by nonradioactive ISH revealed expression of the receptor in the small "specific cells of the *pars tuberalis*" (Figure 16.2C,D). Similar attempts to identify and localize *Mtnr1A* or *Mtnr1B* expression by

nonradioactive ISH in other locations of iodomelatonin binding have remained either unsuccessful or inconclusive. The anatomical location of the *pars tuberalis* does not allow for functional lesion studies, however, because any lesion to this tissue will likely interfere with the working of the hypothalamic–pituitary tract.

ii) The pars tuberalis of the adenohypophysis

The *pars tuberalis* of the adenohypophysis is a thin layer of cells of the rostral adenohypophysis surrounding the pituitary stalk, and contains the highest levels of iodomelatonin binding sites in the mammalian body. It is composed of two types of endocrine cell: the specific cells of the *pars tuberalis* and, in smaller number, the typical *pars distalis* endocrine cells. Folliculo-stellate cells are also present. Some of the specific cells of the *pars tuberalis* can be found along the rostro-ventral part of the *pars distalis*, in an area called the *zona tuberalis*. The specific cells of the *pars tuberalis* have long been known to produce thyroid stimulating hormone (TSH) (Figure 16.2E). MT1 receptors are only found in the specific cells of the *pars tuberalis* (Klosen et al., 2002), where they display melatonin-dependent changes according to the time of the day (i.e., low levels of receptor at night, when melatonin is elevated), and this relationship leads to seasonal changes in receptor, with low levels in short photoperiod (Masson-Pévet et al., 2000). The *pars tuberalis* cells also express clock genes with a diurnal rhythm specifically driven by the day/night variation in melatonin levels and directly dependent on the expression of the MT1 receptor (von Gall et al., 2002).

Photoperiodic variation in melatonin induces seasonal changes in the ultrastructure of the specific cells of the *pars tuberalis* (Wittkowski et al., 1984; Böckers et al., 1995), as well as in their expression of TSH (Dardente et al., 2003, 2010). Thus, the long nocturnal peak of melatonin in short photoperiod strongly inhibits TSH synthesis through a dampening of eyes absent 3 (EYA3), a coactivator that synergizes with the thyrotroph embryonic factor (TEF) to maximize *Tsh* gene expression (Dardente et al., 2010). Conversely, in long photoperiod, the short peak of melatonin does not inhibit *Eya3* expression, which allows for full co-activatation of *Tsh* expression.

Thus, the pars tuberalis *appears as a melatonin-dependent time giver, with photoperiodically driven expression of TSH: minimal TSH expression and synthesis in short days and high TSH expression and synthesis in long days.* The target of this *pars tuberalis*-secreted TSH remained a mystery until 2008, when TSH receptor expression was described in the tanycytes, very specialized glial cells bordering the third ventricle in the mediobasal hypothalamus (see Section 16.3) (Hanon et al., 2008). TSH receptor activation in tanycytes leads to an increase in deiodinase 2 (DIO2) expression, and a reduction in DIO3 expression. As DIO2 converts the prohormone T4 into its active form T3, and DIO3 metabolizes T4 and T3 into inactive compounds, this TSH-induced regulation of tanycytic DIO2/3 leads to higher T3 levels in the basal hypothalamus in long as compared to short photoperiod. The functional significance of this photoperiodic TSH secretion by the *pars tuberalis* was demonstrated by central TSH infusions in Djungarian and Syrian hamsters adapted to short photoperiod (with low

endogenous TSH). Even though these animals were photoinhibited, the intracerebroventricular infusions of exogenous TSH were able to fully reactivate the HPG axis, as assessed by testis size and testosterone production (Klosen et al., 2013).

MT1 receptor and TSH are the key elements of photoperiodic decoding at the pars tuberalis*.* Strikingly, this decoding system is conserved among all seasonal breeders, since TSH expression and the DIO2/DIO3 ratio are higher in long as compared to short photoperiod, whether animals are long- or short-day breeders. Thus, in long photoperiod, there is an increased hypothalamic T3 concentration, and this may activate the HPG axis of long-day breeders and inhibit this axis of short-day breeders. Therefore, the divergence in the pathway mediating seasonal effects on the HPG axis in long- and short-day breeders must be located downstream of the central T3 signaling (see Sections 16.3 and 16.4).

d) GnRH neurons and photoperiod

One of the main features of photoperiodic inhibition of the HPG axis is low GnRH pulsatility, as analyzed in large species such as sheep, with consequently very low levels of the gonadotropins LH and FSH (Turek et al., 1975; Viguie et al., 1995). Yet, the pituitary of photoinhibited animals is able to respond to exogenous GnRH stimulation with increased secretion of gonadotropins both *in vivo* and *in vitro* (Lincoln and Wu, 1991).

Although the pulsatility of GnRH secretion is reduced, immunostaining studies of GnRH neurons in photoperiodic species usually fail to demonstrate a photoperiodic difference in the number of GnRH neurons. Other studies show a slight increase in the number of GnRH neurons or in the size of immunostained GnRH neurons, but only in short days at reproductive quiescence. Quantitative immunoassay (radioimmunoassay, RIA; enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) studies usually show an increase in the hypothalamic GnRH content at reproductive quiescence (Bernard et al., 1999). GnRH mRNA does not seem to display an overt photoperiodic difference in Syrian hamsters. Thus, this increase in hypothalamic GnRH content has been interpreted as an accumulation of nonsecreted peptide rather than an increase in GnRH production. In time-course studies in which Djungarian hamsters are transferred from short to long days to trigger photoreactivation of the HPG axis, a transient increase in the number of immunoreactive and mRNA-positive GnRH neurons can be observed after around 2 days (Porkka-Heiskanen et al., 1997; Bernard et al., 1999). Thus, GnRH neurons might change their steady-state production of GnRH between the sexually active and the reproductively quiescent state. In the reproductively quiescent state, GnRH neurons remain able to respond to upstream stimuli by secreting physiologically relevant amounts of GnRH. For example, peripheral or central injections of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) in reproductively quiescent hamsters and sheep are able to elicit release of GnRH, demonstrating that photoperiod does not affect the GnRH neuron's ability to respond to upstream stimuli (Lincoln and Wu, 1991; Viguie et al., 1995).

Electron microscopy shows photoperiodic changes of the synaptic inputs on GnRH neurons of sheep. In the breeding season, GnRH neurons receive about twice as many inputs as during reproductive quiescence. Using confocal microscopy, Sergeeva and Jansen (2009) showed that during the breeding season, the glutamatergic input on to GnRH neurons is increased, while gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic input is reduced. This results in a major change in the excitatory–inhibitory balance of the GnRH neurons' input. This seasonal structural plasticity of the GnRH neurons' input might be controlled or modulated by the expression of the polysialated form of the neuronal cell adhesion molecule PSA-NCAM (Chalivoix et al., 2013). These structural changes in the GnRH neurons' input are also reminiscent of the plastic changes on and around GnRH neurons during puberty, as described by Cottrell et al. (2006) in the mouse.

Thus, GnRH neurons themselves appear to be modulated by photoperiod, but are clearly not the key direct target of photoperiodic regulation. They remain responsive to upstream stimuli and are able to stimulate the HPG axis even at reproductive quiescence. A similar situation can be observed downstream of the GnRH neurons, along the HPG axis. Thus, *the key regulatory sites for the photoperiodic control of the HPG axis must be located upstream of the GnRH neurons and downstream of the* pars tuberalis*.*

III) Methods for the analysis of seasonal changes in the hypothalamus

The hypothalamus and the pars tuberalis are key regulators of the reproductive axis. Thus, differences should appear in these structures between the seasonally induced sexually active and inactive states, as well as during the transitions between these states. In order to compare these different hypothalamic states, several molecular, cellular, and histological approaches have been used to visualize structural and transcriptional differences across seasons or photoperiodic conditions.

a) Microarrays: a technique to identify potential candidate genes

The mammalian genome contains between 20 000 and 30 000 genes, but only a fraction of these are actively expressed as mRNA to produce a specific phenotype (the transcriptome). The development of DNA microarray technology in the mid 1990s allowed for the first time the simultaneous comparison of the transcriptome under different conditions. The advantage of this approach was the ability to find differentially regulated candidate genes without prior bias and by scanning a wide spectrum of transcripts. After bio-informatic analysis, these candidate genes are organized into functional groups, allowing the highlighting of different signaling pathways, or a group of genes with a similar function; this will require further study in order to better elucidate the physiological mechanism. Microarray technology uses DNA chips segmented into squares, each of which contains multiple identical cDNA fragments, each representing a specific gene. A DNA chip can contain more than 15 000 elements, printed in duplicate so as to detect false positives. The sample of

interest can be RNA extracts of cell cultures or tissues that have been subjected to different physiological conditions. Messenger RNA, extracted from cells or tissues, is converted to cDNA by reverse transcription using polyT primers, together with different fluorescently labeled nucleotides (Cy3 or Cy5) incorporated for each condition. The same amount of cDNA is then hybridized simultaneously on the same DNA chip, and the Cy5 and Cy3 fluorescence intensity for each spot is determined by a laser scanner. Comparing the Cy3/Cy5 fluorescence ratio then reveals differences in mRNA expression for all the genes contained in the DNA chip (Figure 16.3).

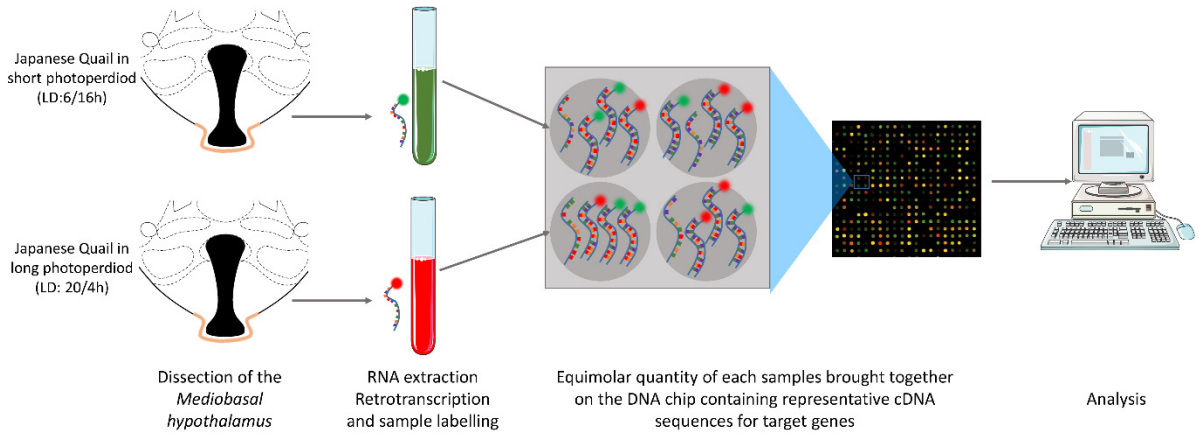


Figure 16.3 Microarray technology. First, the mediobasal hypothalamus is dissected from two groups of Japanese quail: a short photoperiod (LD 8/16)- and a long photoperiod (LD 20/4)-housed group. RNA is then extracted and reverse transcribed to cDNA. During the reverse transcription, a different fluorescent label is used for the deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) that are incorporated for each sample. Both samples are hybridized together on a microarray chip. Fluorescence intensities are measured by a laser and analyzed by computer.

This approach allowed the discovery of several significant factors involved in the seasonal regulation of GnRH neurons. Nakao et al. (2008) used chicken microarrays to analyze transcriptional changes in the hypothalamus and pars tuberalis of Japanese quail, a well-known avian model of seasonality, during the first day of transfer from a photoinhibitory short photoperiod to a photostimulating long photoperiod. After 4 weeks in short photoperiod (LD 8/16), male quails were switched to long photoperiod (LD 20/4); six animals were killed every 4 hours starting 24 hours before and continuing up to 2 days after the transition. Nakao et al. (2008) identified 77 genes as long day-induced genes (Figure 1b and Supplementary Table 1 in Nakao et al., 2008), segregated in two waves, at 14 and 18 hours after the last long night (Figure 1a in Nakao et al., 2008): the first wave comprised only the two genes Tshβ and Eya3, the second wave a cluster of genes, including an increase in Dio2 and a decrease in Dio3.

Microarray analysis and the now more widely used RNAseq are powerful technique for identifying candidate genes through differential expression. However, they do not provide information as to the precise anatomical location or the cell type where this change occurs. Thus, the functional role of

these candidate genes needs to be further evaluated using complementary techniques. Moreover, other changes related to post-transcriptional, post-translational (protein activation/inactivation), or structural/plasticity mechanisms are also not revealed by these techniques.

b) Methods for studying the cellular localization of gene expression

In order to better identify the cell types that display seasonnaly regulated genes, especially in the heterogenous hypothalamus, it is critical to use appropriate neuroanatomical tools.

Transcript location can be accomplished by ISH (Figure 16.4). This technique uses DNA or RNA probes, complementary to the sequence of the mRNA to be detected, labeled by incorporation of nucleotides tagged either by radioactive isotopes (radioactive ISH) or by haptens such as digoxigenin, fluorescein, or biotin (nonradioactive ISH). After hybridization, the radioactive tracer is detected by autoradiography and the nonradioactive haptens are detected by immunocytochemistry. Radioactive ISH mostly uses 35S or 33P as radioactive tracer. These tracers can be visualized by exposing the tissue sections to a radiographic film, which will reveal the regional localization of the transcripts. For cellular localization, a photographic emulsion is applied directly on to the sections and, after a given exposure time, developed like a photographic film. This results in the formation of black-silver grains in the proximity of the source of the radioactive isotopes. Radioactive ISH is very sensitive, and thus allows for precise quantization of the signal intensity, but it does not give a precise cellular localization of the signal. A coupling with immunohistochemistry (IHC) can compensate for this lack of spatial resolution, giving information about the phenotype of stained cells. Nonradioactive ISH allows a very precise localization of the target transcripts, potentially down to the ultrastructural level. Furthermore, nonradioactive ISH can help phenotyping of the target cells using either double nonradioactive ISH or a combination of nonradioactive ISH and immunocytochemistry. With fluorescent labels, nonradioactive ISH is also accessible to confocal microscopic analysis. Finally, although the dynamic range of nonradioactive ISH is relatively limited, enzymatic and fluorescent signals generated by the technique can be reliably evaluated semi-quantitatively by image analysis (Hill et al., 1993).

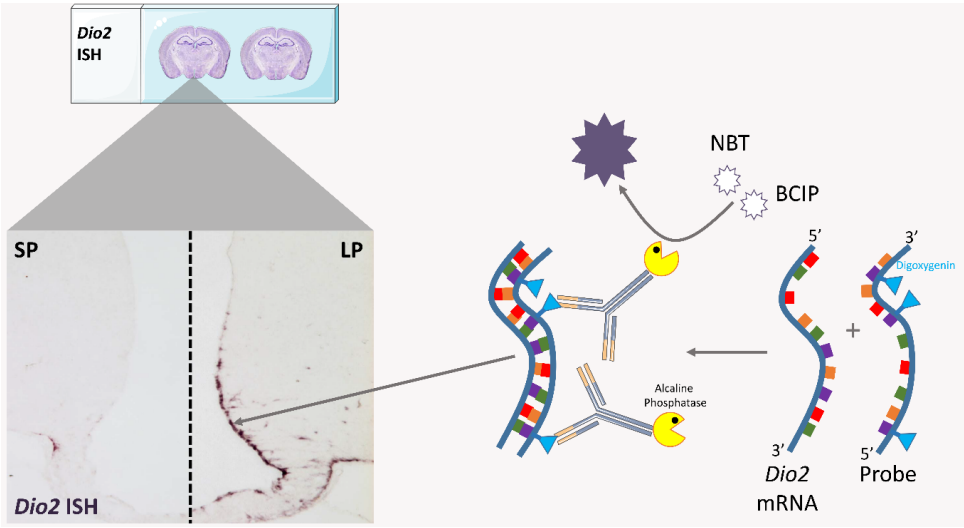


Figure 16.4 Nonradioactive in situ hybridization (ISH). DNA or RNA probes complementary to specific mRNA are hybridized to the target mRNA (Dio2 mRNA). The probe is labeled by a hapten, digoxygenin (fluorescein or biotin may also be used), which is detected by immunohistochemistry (IHC) using a one-step procedure with an anti-hapten antibody labeled with alkaline phosphatase. Nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) are the substrates for the chromogenic detection of alkaline phosphatase activity. LP, long photoperiod; SP, short photoperiod.

ISH and microarrays measure mRNA levels, but proteins are the active metabolic player. Protein level is regulated by translation/degradation, and protein activity can be further modulated by post-translational modifications such as phosphorylation. Therefore, ISH should be complemented by the detection of corresponding protein using immunocytochemistry.

ISH has been used to identify a number of hypothalamic and pituitary genes implicated in seasonal regulation. Starting in 2006, we used it to reveal the role of three genes in the photoperiodic regulation of reproduction in rodents. We first reported that expression of Dio2, previously identified in birds as a key photoperiodic responder (Yoshimura et al., 2003), is expressed specifically in hamster tanycytes (Figure 16.4). Dio2 is markedly downregulated in short photoperiod (Revel et al., 2006a) as a consequence of the inhibition of pars tuberalis Tshβ expression by the long nightly melatonin peak (see earlier).

We also discovered that the gene encoding for kisspeptin (Kiss1), a novel neuropeptide identified as major regulator of puberty in mice and humans (Seminara et al., 2003), is also regulated by photoperiod in the arcuate nucleus of the Syrian hamster. Indeed, we determined that arcuate kisspeptin mRNA expression is reduced in short photoperiod in a melatonin-dependant manner, and that this inhibition is further modulated by the seasonal variation in circulating sex steroids (Revel et al., 2006b). Using immunocytochemistry to verify whether the changes in kisspeptin mRNA translated into changes at the peptide level, we noticed cell-body immunostaining outside of the arcuate nucleus in areas devoid of kisspeptin mRNA. We concluded that this staining was most

probably due to a cross-reaction of this antiserum with a kisspeptin-related molecule. Since kisspeptin belongs to a large family of RFamide peptides with closely related amino acid sequences, we hypothesized that the antibody was recognizing another RFamide peptide. Strikingly, using ISH, we were able to show that this immunoreactive signal was caused by the presence of another RFamide peptide, previously reported to regulate reproductive activity in birds: gonadotropin inhibitory hormone (GnIH), also known as RFRP-3 (Revel et al., 2008). Furthermore, we found that the level of RFRP mRNA, like that of Kiss1, is strongly inhibited by short photoperiod in a melatonin-dependent manner in the Syrian hamster (Revel et al., 2008). In all these studies, the use of ISH allowed for the detection of photoperiodic changes in gene expression, as well as the cellular location of the transcripts: tanycytes in the ventral wall of the third ventricle in the hypothalamus for Dio2, neurons in the arcuate nucleus for Kiss1 and extended groups of neurons located between the dorsomedial and the ventromedial nucleus, and above the dorsomedial nucleus for RFRP.

Additionally, other mechanisms must be involved in the long-term photoperiodic modulation of neuronal and glial activities in the brain of seasonal species. Thus, photoperiodic plasticity in the neuroglial interaction with the GnRH neurons may be part of the seasonal regulation of the HPG axis.

c) Investigation of seasonal plasticity in tanycytes and cytogenesis by IHC and electron microscopy

In the last 2 decades, our view of the role of glial cells has shifted from seeing them as simple structural support cells to considering them integral elements of neuronal communication and the function of neuronal networks. A particular role of glial cells in the regulation of the gonadotropic axis was first demonstrated in puberty and during the preovulatory LH surge (Prevot et al., 2010), but earlier data indicate that they are also involved in the seasonal control of reproduction (Yamamura et al., 2004). Astrocytes cover the cell body and dendrites of GnRH neurons, while the axonal terminals in the ME are surrounded by the endfeet of tanycytes. Modifications of the glial coverage of GnRH neurons coincide with changes in neuronal communication and in neuronal interaction with the environement (Witkin et al., 1991). Cashion et al. (2003) showed that, in female rats, during the morning of proestrus and before the initiation of the LH surge, the cell surface area of astrocytes in close apposition to GnRH neurons decreases. This is probably due to rising estradiol concentrations. Indeed, Witkin et al. (1991) also showed, in rhesus monkeys, that ovariectomy (OVX) increased the density of glial processes apposed to GnRH perikarya, while estrogen supplementation reduced this glial covering. These findings led to the conclusion that astroglial plastic changes, together with synaptic remodeling, could change GnRH neuron exitability (Garcia-Segura et al., 2008). At the GnRH axon terminal at the neuro-hemal junction, estradiol also induces a shrinkage of the tanycyte endfeet surrounding the GnRH terminals, thereby facilitating and potentiating the release of GnRH by these structures into the portal blood vessels (Prevot et al., 1999, 2010).

A similar plasticity also exists in the seasonal control of GnRH neuron activity, but this has been much less studied to date. This seasonal plasticity has been analyzed in two aspects: changes in cell shape and the expression of plasticity-related molecules. Detailed analysis of the structural interaction between neurons and glial cells requires the use of transmission electron microscopy (TEM) to visualize fine details such as synaptic contacts. In order to identify certain cellular elements of interest, immunoelectron microscopy can be used, whereby an antibody against a protein selectively present in certain structures (e.g., GnRH in GnRH terminals) can identify these structures. If a suitable cellular marker protein that fully fills the cells of interest is available, immunocytochemistry with a fluorescent-labeled antibody can be used, analyzed by confocal microscopy. For observation in electron microscopy, the peroxidase substrate diaminobenzidine (DAB) becomes electron-dense upon postfixation, which allows for the visualization of the DAB precipitate at the ultrastructural level.

Yamamura et al. (2004) have examined the ultrastructure of the ME and the shapes of tanycytes and GnRH terminals in Japanese quails kept in either short photoperiod (LD 8/16) for 2–3 weeks or long photoperiod (LD 16/8). Using immunoelectron microscopy, they showed that the distance between GnRH axon terminals and the basal lamina of the ME was less in long (2.30 ± 0.16 µm) versus short (2.91 ± 0.16 µm) day-adapted birds (Figure 2A in Yamamura et al., 2004). They also showed that the proportion of GnRH nerve terminals localized within 1 µm of the basal lamina was larger in birds adapted in long photoperiod and that, conversely, the endfeet of the glial processes made more physical contacts with basal lamina in short (84.0 ± 2.98%) versus long (63.9 ± 3.82%) photoperiod. It has been hypothesized that in short photoperiod, tanycytes create a barrier between GnRH nerve terminals and the neuro-hemal junction, which could help reduce GnRH release into the portal blood.

Plastic changes in cell shape are dependent on the cytoskeleton and cell-adhesion molecules that “stick” cells either together or to the extracellular matrix (ECM). Thus, the expression and localization of such plasticity-related proteins can be used to visualize and analyze neuronal and neuroglial plasticity. One of the cell-to-cell adhesion molecules involved in neuronal and glial plasticity is neuronal cell adhesion molecule (NCAM), a member of the immunoglobulin family. The adhesion generated by NCAM stabilizes cell interactions and cell shape. In order to allow changes in cellular shape and mobility, the NCAM interaction can be post-translationally reduced by the addition of polysialic acid (PSA). This polysialated form of NCAM (PSA-NCAM) is known to be involved in almost all forms of neuronal and neuroglial plasticity studied to date (Hildebrandt et al., 2010). In order to study both the expression of NCAM and PSA-NCAM and the shape of NCAM- and PSA-NCAM-expressing cells, immunocytochemistry is, again, the tool of choice. Bolborea et al. (2011) investigated the foregoing parameters in tanycytes of Djungarian hamsters housed in either short (LD 8/16) or long (LD 16/8) photoperiod. They used the expression of the intermediate filament vimentin to visualize the shapes of tanycytes and the extent of their processes, and the expression of

NCAM and PSA-NCAM in these cells as a marker of plasticity. They reported that exposure to a short photoperiod induced a decrease in the staining of vimentin, NCAM, and PSA-NCAM quite selectively in tanycyte cell bodies and processes (Figures 3A and 4G–J in Bolborea et al., 2011). These findings may reflect a reduced ability of tanycytes in short photoperiod to participate in the neuroglial plastic changes posited to be required for hypophysiotropic hormone release. In conclusion, tanycytes appear to be major actors in the seasonal ultrastructural changes within the mediobasal hypothalamus.

Additionally, tanycytes, as well as parenchymal cells of the hypothalamus, can generate new neurons in an adult brain (Robins et al., 2013), raising the possibility that seasonal regulation of the gonadotropic axis might involve neurogenesis. Most neurons are generated during development, but there are several neurogenic niches that are able to generate new neurons even in the adult brain. These neurogenic precursors can also generate astrocytes and oligodendrocytes. The main neurogenic niches are located in the hippocampal dentate gyrus, the subventricular zone, and the hypothalamus. In the hypothalamus, the neurogenic progenitors are the alpha 2 tanycytes (Rodríguez et al., 2005).

During neurogenesis, the process of DNA replication can be used to detect the newly generated cells through incorporation of a labeled nucleotide into newly replicated DNA. The nucleotide can be labeled with either radioactive tritiated thymidine (3H-thymidine) or the nonradioactive thymidine analog, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Historically, 3H-thymidine was the first marker used to detect neurogenesis in the adult brain. However, because the detection of radioactivity from 3H using emulsion autoradiography requires long exposure times, in addition to the poor resolution of the signal, this technique was replaced by the immundetection of BrdU. BrdU-positive cells can also be further identified by double-label immunocytochemistry, using markers either for neurons, astrocytes, or other glial cells. As many newly generated cells die quite quickly, and not all newly generated neurons survive and integrate into the adult network, more recently researchers have shifted to other early markers of neuronal differentiation, such as the microtubule-associated protein doublecortin, to label newly generated neurons, which does not require injection of a labeled nucleotide (Brown et al., 2003). Furthermore, doublecortin is neuron-specific, so a second marker is not required to identify the newly generated cells.

Migaud et al. (2011) used BrdU to detect adult neurogenesis in the hypothalamus of sheep in a seasonal context. One group of sheep was injected with BrdU in July (long photoperiod, sexual quiescence) and another was injected in December (short photoperiod, sexually active). The animals were euthanized 24 hours after injection and processed for immunocytochemical detection of the BrdU. The number of BrdU-positive nuclei in the hypothalamus was higher in short than in long photoperiod, but no photoperiodic difference was seen in the ME. In the pars tuberalis, on the other hand, the proliferation of progenitors was higher in long than in short photoperiod (Figure 2 in Migaud et al., 2011). In the subventricular neurogenic niche, Migaud et al. (2011) did not detect any

seasonal changes in proliferative activity, indicating that the hypothalamic changes they observed were region-specific. They then identified the BrdU-positive cells using either NeuN as a neuronal marker or glial fibrillary acidic protein (GFAP) as an astrocytic marker. In the hypothalamus, 16.7% of the BrdU-positive cells were also NeuN-positive, indicating newly generated neurons, and about 70% were astrocytes.

In conclusion, these approaches show that the effects of photoperiodic changes on the hypothalamus and pars tuberalis are manifold. Transcriptomic analysis by microarrays has identified candidate genes, whose changes were then confirmed by ISH. ISH and IHC can also add information about the location and the identity of the cells displaying these seasonal changes. Altogether, these approaches have identified the pars tuberalis TSH cells as a primary target of melatonin regulation by the co-expression of the MT1 receptor, and have led to the identification of Eya3 as a key element in the photoperiodic regulation of the pars tuberalis. They have also helped in identifying tanycytes, which express DIO2 and DIO3, as the target of the photoperiodically regulated pars tuberalis TSH. Furthermore, a combination of ISH and immunocytochemistry has disclosed photoperiodic changes in the expression of two key neuropeptides for the regulation of the HPG axis: kisspeptin and RFRP. Finally, electron microscopic and immunocytochemical analyses of synaptic and neuroglial plasticity have shown how photoperiod affects the way the cells regulating the gonadotropic axis interact, and how these interactions are modulated by photoperiod. There is evidence that some of these neurochemical and plastic changes might be driven by the local variations in the active form of thyroid hormone (T3), whose role might extend beyond the control of the HPG axis to that of metabolism and food intake.

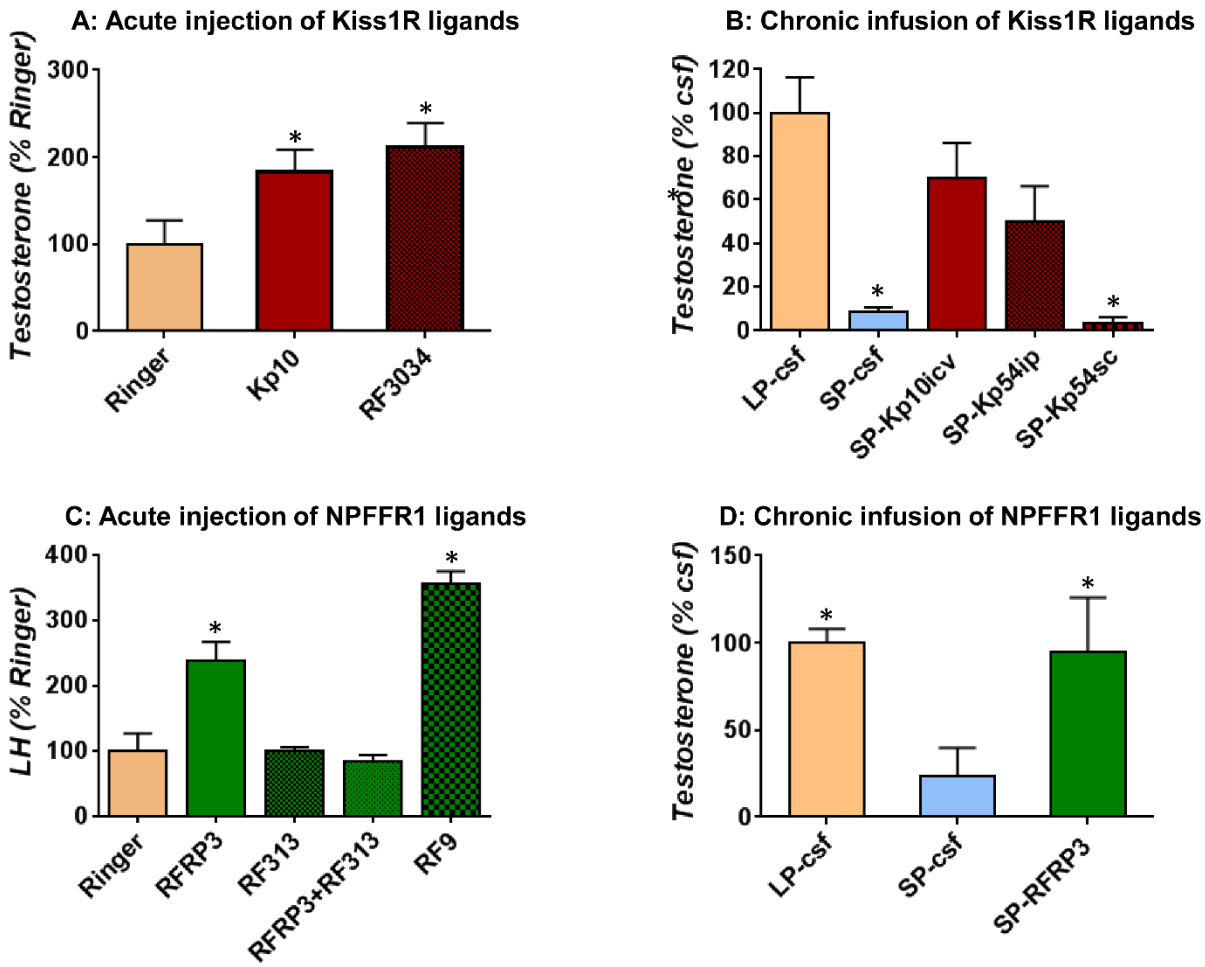
IV) Pharmacological approaches to the study of the regulation of seasonal reproduction

The discovery that a number of seasonal species display large photoperiodic, melatonin-driven variations in the hypothalamic content of the RFamide peptides kisspeptin and RFRP-3 led to the hypothesis that photoperiodic variations in either or both of these neuropeptides may drive seasonal reproduction. Confirmation of this hypothesis cannot arise from classical genetic approaches, where selective genes encoding peptides or receptors are mutated in seasonal species. Seasonal rodents are still poor genetic models, so we have to rely on in vivo pharmacological approaches. In vivo pharmacology has the advantage, over genetic analysis, of avoiding developmental compensatory phenomena, but it may suffer from poor selectivity, off-target effects, and metabolic degradation of pharmacological agents. Therefore, such investigations must be conducted rigorously and include the establishment of proper dose–response curves, the use of selective agonists or antagonists when available, the comparative analysis of the drug's effects with the anatomical distribution of its receptor, and, whenever possible, similar studies among different seasonal species.

a) Pharmacological investigation of long- and short-term effects of kisspeptins on reproductive activity

Kisspeptins are a family of structurally related peptides encoded by the Kiss1 gene that act through binding to the GPR kisspeptin receptor 1 (KISS1R) (formerly named GRP54). Different kisspeptins are derived from differential proteolytic processing of a 145-amino-acide precursor: kisspeptin-54/52, kisspeptin-14, kisspeptin-13, and kisspeptin-10, all with the same conserved 10-amino-acid terminus (YNWNSFGLRY/F). Kisspeptins were originally reported as metastasis suppressors (and, as such, kisspeptin-54 was previously called “metastatin”), until the discovery that rodents and humans with a loss-of-function mutation in Kiss1R fail to enter puberty and remain infertile throughout adulthood (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Since this seminal finding, research on kisspeptins has mostly focused on their role in reproduction.

Kisspeptins bind selectively and with a high affinity to the same KISS1R, with a half-maximal effective concentration (EC50) for kisspeptin-10 of around 2.5 nM on cell lines stably transfected with KISS1R and on GnRH neurons in situ. A number of studies have reported that a single central or peripheral injection of kisspeptin (either kisspeptin-54 or kisspeptin-10) activates most GnRH neurons and increases the release of gonadotropin and sex hormones. Intracerebroventricular infusion of kisspeptin-10 in the male rat induced a large increase in LH, FSH, and testosterone release, with an EC50 of 0.1–0.3 nmol/5 µL (Thompson et al., 2004). This potent stimulatory effect is in line with the presence of KISS1R in GnRH neurons and the inhibition of the kisspeptin-induced LH release by a GnRH receptor antagonist. Similar potent effects of single kisspeptin injections to stimulate gonadotropins and sex steroids have been reported in seasonal species such as Syrian and Siberian hamsters and sheep (Figure 16.5A).



<u>Figure 16.5</u> Comparative action of kisspeptin (A,B) and RFRP-3 ligands (C,D) on the production of reproductive hormones in male rodents. A) Acute intracerebroventricular (icv) injection of the KISS1R agonist RF3034 displays a similar stimulatory effect to that of kisspeptin-10 (Kp10) on testosterone secretion in the male rat (*, $P < 0.05$) when compared to vehicle (Ringer)-injected animals. Adapted from Doebelin et al. (2016). B) Chronic icv infusion of Kp10 or repeated daily intraperitoneal (ip) injections of Kp54, but not continuous subcutaneous (sc) infusion of Kp54, increases testosterone production in the short photoperiod (SP)-adapted male Syrian hamster after 5 weeks of treatment (*, $P < 0.05$) when compared to cerebrospinal fluid (csf)-injected SP animals. LP, long photoperiod. Adapted from Revel et al. (2006) and Ansel et al. (2011). C) Acute i.c.v. injection of the NPFFR1 antagonist, RF313, in the LP-adapted male Syrian hamster prevents the stimulatory effect of RFRP-3 on LH production; RF9 alone displays a strong stimulatory effect (*, $P < 0.05$) when compared to vehicle (Ringer)-injected animals. Unpublished data. D) Chronic icv infusion of RFRP-3 for 5 weeks in the SP-adapted male Syrian hamster increases testosterone production to a level comparable to that measured in the sexually active LP-adapted-hamster (*) when compared to vehicle (csf)-injected SP animals. Adapted from Ancel et al. (2012).

The discovery of the pivotal role of kisspeptin in activating GnRH neurons has led to new research on synthetic KISS1R ligands. One study produced a series of decapeptide analogs of kisspeptin-10 in which a single amino acid was exchanged with an enantiomer or with another amino acid (Curtis et

al., 2010). Using a combination of rational chemical modifications of the endogenous kisspeptin-10, two recent studies reported the design of several kisspeptin-10 analogs (Beltramo et al., 2015; Decourt et al., 2016). The kisspeptin agonists were designed to have an improved resistance to degradation and reduced renal clearance, through the introduction of a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole as a proteolysis-resistant amide mimic and a serum albumin-binding motif. The best triazololipopeptide selected (compound 6) was found to be a potent full agonist with an EC50 of 0.33 nM on KISS1R and a >100-fold selectivity for KISS1R over the closely related receptor for RFRP-3 (NPFF1R), with a long-lasting in vivo effect due to improved stability. Doebelin et al. (2016) designed kisspeptin analogs based on chemical modification of the 2 amino acid terminus and found a dipeptide Bz-Arg-Trp-NH2 (RF3034) with an EC50 of 69 nM on human KISS1R, with an improved in vivo stability as compared to the endogenous neuropeptide. Both compound 6 and RF3034 proved to be potent agonists in vivo by increasing LH secretion in sheep and testosterone in rats (Figure 16.5A).

The production of a selective and efficient KISS1R antagonist appears more difficult. So far, one study has reported the design of a selective antagonist, peptide234, using substitution of amino acids in kisspeptin-10 at Tyr1, Asn2, Trp3, Ser 5, and Leu8. The antagonist was able to inhibit kisspeptin-10-induced GnRH neuron firing and LH secretion in male rats and mice, and to decrease pulsatile GnRH in monkeys and LH pulses in OVX ewes (Roseweir et al., 2009). However, in our hands, peptide 234 was unable to antagonize kisspeptin-10-induced activation of LH and testosterone production in the male Syrian hamster (unpublished data), and no other studies have reported the use of this compound.

Investigation of the pharmacological effect of kisspeptins on seasonal reproduction requires a long-term intermittent or continuous infusion of the peptide, raising the issues of both receptor desensitization and metabolic degradation. Although these are not fully resolved, a continuous intracerebroventricular injection of a low dose of kisspeptin-10 (4-week infusion of 0.25 nmol kisspeptin-10/hour) in short day-adapted sexually inhibited male Syrian hamsters was able to fully reactivate gonadal activity, attested by testis size and testosterone production (Figure 16.5B) (Revel et al., 2006b). Similarly, long-term intravenous injection of kisspeptin-10 (12.6 nmol kisspeptin-10/hour for 48 hours) was able to induce ovulation in about 80% of anestrous ewes (Caraty and Franceschini, 2008). Both studies pointed to a pivotal role of kisspeptins in the seasonal control of reproduction. Repeated peripheral injections of kisspeptin-54 (5 weeks with two daily i.p. injections of 10 nmol kisspeptin-54/hamster) were able to significantly increase testicular activity in short day-adapted Syrian hamsters (Figure 16.5A) Peripherally administered kisspeptin is posited to act on the GnRH terminals at the ME, but other direct effects on peripheral organs expressing KISS1R, such as pituitary or gonads, cannot be excluded. In contrast to the protocol of repeated injections, a chronic subcutaneous infusion of 10 nmol kisspeptin-54 per day was ineffective in restoring reproductive activity in short day-adapted hamsters (Figure 16.5A), possibly due to KISS1R desensitization or metabolic degradation (Ansel et al., 2011).

The design of more selective and stable kisspeptin agonists further supports the role of kisspeptin in seasonal reproduction and might now help to better control and possibly counteract seasonal inhibition of the gonadotropic axis. Thus, a single intramuscular injection of 15 nmol of a KISS1R agonist generated by Decourt et al. (2016) produced a large increase in LH secretion up to 14 hours post-injection in anestrus ewes and induced synchronized ovulations in both breeding and nonbreeding seasons.

b) Pharmacological investigation of acute and long-term effects of RFRP-3 on reproductive activity

RFRP-3, like kisspeptins, belongs to the superfamily of RFamide peptides. Its putative role in mammalian reproductive biology comes from studies performed in quail. In 2000, Tsutsui and colleagues discovered a 12-amino-acid hypothalamic neuropeptide (SIKPSAYLPLRF-NH2) with the distinct capacity to inhibit gonadotropin release from cultured quail pituitaries, which was thereafter termed GnIH. Similar sequences have since been identified in mammals, which have allowed the identification of related peptides, notably RFRP-1, RFRP-2, and RFRP-3 encoded by the RFRP gene. RFRP-1 (also named NPFF, containing a C-terminal LPLRFa motif) displays high structural homology with GnIH, whereas RFRP-3 (also named NPVF, containing LPQRFa motif) displays a pharmacological profile similar to that of GnIH. The biological actions of RFRP-1 and RFRP-3 are exerted mainly through the GPR NPFF1R (also termed GPR147) and, to a lesser extent, the related receptor NPFF2R (also termed GPR74). In mammals, RFRP is exclusively expressed in bilateral clusters of neurons located in the dorsal and medial hypothalamus, and in all seasonal mammals investigated to date, its level of expression is higher in long as compared to short photoperiod.

Kriegsfeld et al. (2006) reported that central administration of 500 ng RFRP-3 (or GnIH) in the female ovarectomized Syrian hamster reduces LH secretion. Further studies, mostly performed in rats, confirmed that RFRP-3 reduces LH secretion, pointing to a conserved inhibitory role of this peptide on gonadotropin secretion. Electrophysiological experiments, however, reported that while RFRP-3 inhibits 41% of isolated mouse GnRH neurons, it also activates 12%, and that the relative number of activated/inactivated neurons is dependent on the dose of RFRP-3 (Ducret et al., 2009). In ewes, an initial report showed an inhibitory effect of RFRP-3 on LH secretion (Clarke et al., 2008), but a more recent study, using various protocols of administration, found no effect of RFRP-3 on LH secretion in the ewe (Decourt et al., 2016). The pharmacological profile of this peptide became even more complicated when it was found to display sex- and photoperiod-dependant effects in seasonal rodents. In male Syrian hamster, intracerebroventricular injection of 150–1500 ng RFRP-3 stimulates GnRH neuron activity, gonadotropin secretion (Figure 16.5C), and sex steroid production (Ancel et al., 2012), whereas it shows an opposite, inhibitory action in female Syrian hamster (Kriegsfeld et al., 2006; Henningsen et al 2017). In male Siberian hamster, another study reported that acute central injection of the peptide activated LH secretion in short days but inhibited it in long days (Ubuka et al.,

2012). All together, these studies ruled out the early assertion that RFRP-3 was solely an inhibitory reproductive peptide, and indicated instead that its effect may be sex- and season-dependant.

RFRP-3 binds with a higher affinity to NPFFR1 (EC50 = 0.2–2.0 nM, according to in vitro studies) than to NPFFR2 (EC50 = 5–300 nM, according to studies) (Elhabazi et al., 2013), and this cross-reactivity may explain some of its variable physiological effects. In this context, the design of highly selective NPFFR1 agonists and antagonists is essential. Simonin et al. (2006) reported, in an initial study, that the N-acylated dipeptide Arg-Phe-NH2 (RF9) could be a NPFFR1 antagonist, but further analysis showed that central injection of 1.5 µg RF9 increased the release of LH in the Syrian hamster (Figure 16.5C) but did not abolish the stimulatory effect of RFRP-3 (unpublished data). Recent pharmacological studies are now proposing more selective ligands. RF313, a novel active dipeptide NPFFR1 receptor antagonist, is a derivative of RF9 in which the C-terminal amide function is removed, the arginine residue is replaced with a non-natural ornithine derivative bearing a piperidine moiety on its side chain, and the adamantane ring is replaced with a biphenyl moiety (Doebelin et al., 2016). This NPFFR1 antagonist is active when administered centrally and peripherally. Central injection of 1.5 µg RFRP-313 has no effect when administered alone, but fully blocks the increase in LH secretion induced by 1.5 µg RFRP-3 in male hamster (Figure 16.5C). In contrast to RF9, it shows a negligible affinity toward KISS1R. Another NPFFR1 antagonist, GJ14 (with IC50 = 21 nM toward NPFFR1, as compared to 387 nM toward NPFFR2), was designed recently by Kim at al. (2015), but its effect on the RFRP-3 regulation of LH secretion has not yet been reported.

The very large photoperiodic variation of the RFRP-3 content in the hypothalamus of seasonal rodents has led us to study the role of this peptide in the seasonal synchronization of reproduction. The chronic intracerebroventricular infusion of a low dose of RFRP-3 (12 µg RFRP-3/day for 6 weeks) in short day-adapted sexually inactive Syrian hamster was able to increase testis size and testosterone production (Figure 16.5D) to levels observed in long day-adapted animals, a result in line with its acute stimulatory effect and its overexpression in long-day conditions. Notably, the RFRP-3-induced reactivation of reproduction was associated with an increased expression of kisspeptin in the arcuate nucleus. This in vivo pharmacological experiment supports the pivotal role of RFRP-3 in the control of reproduction in seasonal rodents (Henningsen et al., 2016).

In conclusion, studies to date are reporting varying effects of RFRP-3 on the reproductive axis. A few selective NPFFR1 antagonists have recently been proposed, but new, highly selective, peripherally acting NPFFR1 ligands are required for translational applications in livestock and human reproduction to be proposed.

V) Perspectives

In mammals, the duration of the nocturnal peak of melatonin is well known to be the endocrine driving factor for seasonal changes in physiology. Studies have now pointed to MT1-regulated TSH production by the pars tuberalis as a fundamental event for the synchronization of physiological

functions, like reproduction, with the seasons. The effect of TSH on the hypothalamic neuronal circuits driving seasonal reproduction requires a specific regulation of the enzymes controlling thyroid hormone metabolism located in the tanycytes. The seasonal change in the local concentration of thyroid hormone within the mediobasal hypothalamus is hypothesized to be responsible for the structural (neuron–glia interaction) and neurochemical (amount of kisspeptin and RFRP-3) changes required for the synchronization of reproduction with the appropriate season.

To date, the role of kisspeptin and RFRP-3 in the seasonal regulation of reproduction has been investigated in seasonal but genetically intractable animal models (hamster, sheep), thereby preventing the use of genetic approaches to elucidate mechanisms. In order to circumvent this issue, new approaches should now be considered. One approach would be to model seasonality in mice. Most mouse strains are deficient in melatonin production because either arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT; EC2.1.3.87) or hydroxyindole O-methyltransferase (HIOMT; EC 2.1.1.4), the two key enzymes in melatonin synthesis, is affected by loss-of-function mutations (Kasahara et al., 2010). There are, however, mouse strains that are melatonin-proficient and in which photoperiodic signaling has been shown to reach at least the regulation of tanycytic DIOs (Ono et al., 2008). Ono et al. (2008) were also able to show a photoperiodic regulation of DIO2 in the melatonin-deficient C57BL/6J mice by treating these mice with exogenous melatonin. Finally, in recent years, a new melatonin-proficient mouse strain, Mus musculus molossinus, has been described, which shows some photoperiodic responses in its gonadotropic axis. These mouse models could be used to study certain aspects of photoperiodic regulation by introducing mutations of the molecular actors of photoperiodic regulation into them. Another alternative would be to adapt CrispR/Cas9 technology in hamsters in order to selectively silence genes thought to be involved in melatonin-driven seasonal reproduction.

VI) References

Ancel, C., Bentsen, A.H., Sébert, M.-E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2012) Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* **153**: 1352–1363.

Ansel, L., Bentsen, A.H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2011) Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GNRH release. *Reprod Camb Engl* **142**: 417–425.

Arendt, A.J., Deacon, S., English, J., Hampton, S., and Morgan, L. (1995) Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res* **4**: 74–79.

Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., and Goldman, B.D. (1993) The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* **15**: 161–190. [Review of

experimental proofs for the role of the melatonin peak duration on the seasonal synchronization of biological functions.]

Beltramo, M., Robert, V., Galibert, M., Madinier, J.-B., Marceau, P., Dardente, H., Decourt, C., De Roux, N., Lomet, D., Delmas, A.F., Caraty, A., and Aucagne, V. (2015) Rational design of triazololipopeptides analogs of kisspeptin inducing a long-lasting increase of gonadotropins. *J Med Chem* **58**: 3459–3470.

Bernard, D.J., Abuav-Nussbaum, R., Horton, T.H., and Turek, F.W. (1999) Photoperiodic effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content and the GnRH-immunoreactive neuronal system of male Siberian hamsters. *Biol Reprod* **60**: 272–276.

Bolborea, M., Laran-Chich, M.-P., Rasri, K., Hildebrandt, H., Govitrapong, P., Simonneaux, V., Pévet, P., Steinlechner, S., and Klosen, P. (2011) Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* **152**: 3871–3883.

Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., Anagnostou, V., and Rimm, D. (2010) Antibody validation. *BioTechniques* **48**: 197–209.

Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., and Kuhn, H.G. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* **467**: 1–10.

Caraty, A. and Franceschini, I. (2008) Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. *Reprod Domest Anim Zuchthyg* **43**(Suppl. 2): 172–178.

Cashion, A.B., Smith, M.J., and Wise, P.M. (2003) The morphometry of astrocytes in the rostral preoptic area exhibits a diurnal rhythm on proestrus: relationship to the luteinizing hormone surge and effects of age. *Endocrinology* **144**: 274–280.

Chalivoix, S., Guillaume, D., Cognié, J., Thiéry, J.C., Malpaux, B., and Dufourny, L. (2013) Photoperiodic variations of the polysialylated form of neural cell adhesion molecule within the hypothalamus and related reproductive output in the ewe. *Cell Tissue Res* **352**: 387–399.

Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., Pawson, A.J., Tsutsui, K., Millar, R.P., and Bentley, G.E. (2008) Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* **149**: 5811–5821.

Cottrell, E.C., Campbell, R.E., Han, S.-K., and Herbison, A.E. (2006) Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **147**: 3652–3661.

Curtis, A.E., Cooke, J.H., Baxter, J.E., Parkinson, J.R.C., Bataveljic, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Murphy, K.G. (2010) A kisspeptin-10 analog with greater in vivo bioactivity than kisspeptin-10. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E296–E303.

Dardente, H., Klosen, P., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2003) MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* **15**: 778–786.

Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupré, S.M., Loudon, A.S.I., Lincoln, G.A., and Hazlerigg, D.G. (2010) A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* **20**: 2193–2198. [Demonstration of the transcriptional mechanisms that decode melatonin length into TSH expression in the *pars tuberalis*.]

Decourt, C., Robert, V., Anger, K., Galibert, M., Madinier, J.-B., Liu, X., Dardente, H., Lomet, D., Delmas, A.F., Caraty, A., Herbison, A.E., Anderson, G.M., Aucagne, V., and Beltramo, M. (2016) A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Sci Rep* **6**: 26908.

Doebelin, C., Bertin, I., Schneider, S., Schmitt, M., Bourguignon, J.-J., Ancel, C., Simonneaux, V., Simonin, F., and Bihel, F. (2016) Development of dipeptidic hGPR54 agonists. *ChemMedChem* **11**: 2147–2154.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., and Milgrom, E. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10 972–10 976.

Ducret, E., Anderson, G.M., and Herbison, A.E. (2009) RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* **150**: 2799–2804.

Elhabazi, K., Humbert, J.-P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.-J., Bucher, B., Becker, J.A.J., Sorg, T., Meziane, H., Petit-Demoulière, B., Ilien, B., and Simonin, F. (2013) Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* **75**: 164–171.

Figala, J., Hoffmann, K., and Goldau, G. (1973) Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster Phodopus sungorus Pallas. *Oecologia* **12**: 89–118.

Garcia-Segura, L.M., Lorenz, B., and DonCarlos, L.L. (2008) The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reprod Camb Engl* **135**: 419–429.

Hanon, E.A., Lincoln, G.A., Fustin, J.-M., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P.J., and Hazlerigg, D.G. (2008) Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol* **18**: 1147–1152. [This paper demonstrates that TSH produced by the *pars tuberalis* acts on tanycytes to regulate hypothalamic thyroid hormone metabolism.]

Henningsen, J.B., Gauer, F., and Simonneaux, V. (2016) RFRP neurons – the doorway to understanding seasonal reproduction in mammals. *Front Endocrinol* **7**: 36. [This paper reviewed the role of the hypothalamic peptide RFRP in the central control of seasonal reproduction.]

Hildebrandt, H., Mühlenhoff, M., and Gerardy-Schahn, R. (2010) Polysialylation of NCAM. *Adv Exp Med Biol* **663**: 95–109.

Hill, W.D., Arai, M., Cohen, J.A., and Trojanowski, J.Q. (1993) Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons. *J Comp Neurol* **329**: 328–336.

Jockers, R., Delagrange, P., Dubocovich, M.L., Markus, R.P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., and Zlotos, D.P. (2016) Update on melatonin receptors: IUPHAR review 20. *Br J Pharmacol* **173**: 2702–2725. [This paper provided a review of the melatonin receptors.]

Johnston, J.D., Schuster, C., Barrett, P., and Hazlerigg, D.G. (2007) Regulation of the ovine MT1 melatonin receptor promoter: interaction between multiple pituitary transcription factors at different phases of development. *Mol Cell Endocrinol* **268**: 59–66.

Kasahara, T., Abe, K., Mekada, K., Yoshiki, A., and Kato, T. (2010) Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 6412–6417.

Klosen, P., Bienvenu, C., Demarteau, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2002) The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* **50**: 1647–1657.

Klosen, P., Sébert, M.-E., Rasri, K., Laran-Chich, M.-P., and Simonneaux, V. (2013) TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **27**: 2677–2686. [This paper demonstrated that TSH produced by the *pars tuberalis* synchronizes reproduction via a regulation of the reproductive hypothalamic peptides RFRP and kisspeptin.]

Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., and Silver, R. (2006) Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2410–2415.

Lincoln, G.A. and Wu, F.C. (1991) Luteinizing hormone responses to N-methyl-D,L-aspartate during a photoperiodically-lnduced reproductive cycle in the ram. *J Neuroendocrinol* **3**: 309–317.

Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., and Chemineau, P. (1998) Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* **139**: 1508–1516.

Masson-Pévet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N., and Pévet, P. (1994) An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* **278**: 97–106. [This paper reviewed the brain distribution of melatonin receptor.]

Masson-Pévet, M., Gauer, F., Schuster, C., and Guerrero, H.Y. (2000) Photic regulation of mt(1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biol Signals Recept* **9**: 188–196.

Maywood, E.S., Bittman, E.L., and Hastings, M.H. (1996) Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* **54**: 470–477.

Migaud, M., Batailler, M., Pillon, D., Franceschini, I., and Malpaux, B. (2011) Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J Biol Rhythms* **26**: 486–496.

Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P.J., Iwasaw, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H.R., and Yoshimura, T. (2008) Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* **452**: 317–322. [This paper identified early genes whose expression is modified after a short to long photoperiod transfert.]

Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., Ebihara, S., Korf, H.-W., and Yoshimura, T. (2008) Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 18 238–18 242.

Porkka-Heiskanen, T., Khoshaba, N., Scarbrough, K., Urban, J.H., Vitaterna, M.H., Levine, J.E., Turek, F.W., and Horton, T.H. (1997) Rapid photoperiod-induced increase in detectable GnRH mRNA-containing cells in Siberian hamster. *Am J Physiol* **273**: R2032–R2039.

Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G.B., and Beauvillain, J.C. (1999) Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* **94**: 809–819.

Prevot, V., Bellefontaine, N., Baroncini, M., Sharif, A., Hanchate, N.K., Parkash, J., Campagne, C., and de Seranno, S. (2010) Gonadotrophin-releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells. *J Neuroendocrinol* **22**: 639–649.

Revel, F.G., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2006a) Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology* **147**: 4680–4687.

Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2006b) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* **16**: 1730–1735. [This paper demonstrated the pivotal role of hypothalamic kisspeptin in seasonal reproduction.]

Revel, F.G., Saboureau, M., Pévet, P., Simonneaux, V., and Mikkelsen, J.D. (2008) RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* **149**: 902–912.

Robins, S.C., Stewart, I., McNay, D.E., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., Kokoeva, M.V., and Placzek, M. (2013) α-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* **4**: 2049.

Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Pastor, F.E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., and Amat, P. (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* **247**: 89–164.

Roseweir, A.K., Kauffman, A.S., Smith, J.T., Guerriero, K.A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., Pineda, R., Gottsch, M.L., Tena-Sempere, M., Moenter, S.M., Terasawa, E., Clarke, I.J., Steiner, R.A., and Millar, R.P. (2009) Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **29**: 3920–3929.

Sáenz de Miera, C., Monecke, S., Bartzen-Sprauer, J., Laran-Chich, M.-P., Pévet, P., Hazlerigg, D.G., and Simonneaux, V. (2014) A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr Biol* **24**: 1500–1506.

Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F. Jr., Aparicio, S.A., and Colledge, W.H. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* **349**: 1614–1627.

Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J.-P., Laboureyras, E., Jhamandas, J.H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., Kieffer, B.L., Bourguignon, J.J., and Simonnet, G. (2006) RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 466–471.

Thompson, E.L., Patterson, M., Murphy, K.G., Smith, K.L., Dhillo, W.S., Todd, J.F., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* **16**: 850–858.

Turek, F.W., Elliott, J.A., Alvis, J.D., and Menaker, M. (1975) Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol Reprod* **13**: 475–481.

Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., and Tsutsui, K. (2012) Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* **153**: 373–385.

Vaněcek, J., Pavlík, A., and Illnerová, H. (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* **435**: 359–362.

Viguie, C., Caraty, A., Locatelli, A., and Malpaux, B. (1995) Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. II. Changes in N-methyl-D,L-aspartic acid-induced LHRH release during the stimulation of luteinizing hormone secretion by melatonin. *Biol Reprod* **52**: 1156–1161.

von Gall, C., Garabette, M.L., Kell, C.A., Frenzel, S., Dehghani, F., Schumm-Draeger, P.-M., Weaver, D.R., Korf, H.-W., Hastings, M.H., and Stehle, J.H. (2002) Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* **5**: 234–238.

Weaver, D.R., Liu, C., and Reppert, S.M. (1996) Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol Baltim Md* **10**: 1478–1487.

Witkin, J.W., Ferin, M., Popilskis, S.J., and Silverman, A.-J. (1991) Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of gnrh neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* **129**: 1083–1092.

Wittkowski, W., Hewing, M., Hoffmann, K., Bergmann, M., and Fechner, J. (1984) Influence of photoperiod on the ultrastructure of the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* **238**: 213–216.

Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2004) Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology* **145**, 4264–4267.

Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., and Ebihara, S. (2003) Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* **426**, 178–181.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Sebastien MILESI

Rôle de la signalisation hypothalamique TSH/T3 dans la reproduction saisonnière chez les hamsters djungariens (Phodopus sungorus) et syriens (Mesocricetus auratus)

Résumé

Chez les hamsters, les jours longs activent la reproduction. Cette activation photopériodique (AP) impliquerait la mélatonine, l'hormone thyroïdienne (HT) et les RFamides hypothalamiques. Si les jours courts inhibiteurs sont maintenus au-delà de 20 semaines, une réactivation photoréfractaire (RP) de l'axe hypothalamo pituitaire gonadotrope (HPG) est déclenchée. Les mécanismes de cette RP sont inconnus.

Notre analyse de la cinétique des changements moléculaires induits par l'AP et la RP montre dans les deux cas une inhibition précoce de l'expression de la Déiodinase 3 (Dio3), l'enzyme catabolisant les HT, dans les tanycytes. Associée à une inhibition tardive du transporteur MCT8 des HT, la diminution de Dio3 pourrait créer un pic d'HT dans l'hypothalamus. Dans les 2 activations, Kisspeptine et RFRP3 augmentent plusieurs semaines après l'inhibition de Dio3 et l'activation de l'HPG. Aussi, une inhibition d'RFRP3 lors de l'AP n'affecte pas l'HPG, mettant en cause le rôle du RFRP3.

Nous avons donc découvert une inhibition précoce de Dio3 pouvant induire l'activation saisonnière de l'HPG. Le régulateur saisonnier précoce de Dio3 reste à découvrir.

Mots clés : saisonnalité, TSH, Hormones thyroïdiennes, pars tuberalis, tanycytes, Déiodinase 3, reproduction, hamsters, photoréfractaire, photopériode

Abstract

In hamsters, reproduction is activated by long days. This photoactivation (PA) supposedly involves melatonin, hypothalamic thyroid hormones (TH) and RFamide peptides. Maintaining inhibitory short days for over 20 weeks triggers a photorefractory reactivation of the hypothalamo pituito gonadotropic axis (HPG) The mechanisms of this PR are so far unknown.

Our cinetic analysis of the dynamic molecular changes in PA and PR revealed a conserved early inhibition of tanycytic deiodinase 3 (Dio3), which catabolizes TH, in both activation mechanisms. Associated with a late decrease of the TH transporter MCT8, the inhibition of Dio3 could generate an early peak of hypothalamic TH. In both activations, RFamide upregulation occurs several weeks after the initial Dio3 inhibition. Also, pharmacological inhibition of RFRP3 during PA does not influence the HPG activity, questioning the role of RFRP3 in HPG activation.

We have thus uncovered a so far unreported early Dio3 inhibition that could be sufficient to seasonally reactivate the gonadotropic axis. The seasonal regulator of Dio3 remains to be discovered.

Keywords: Seasonality, TSH, thyroid hormones, pars tuberalis, tanycytes, Déiodinase 3, reproduction, hamsters, photorefractoriness, photoperiod