HAL
open science

Ontogénèse de l'axe gonadotrope chez le bar européen (Dicentrarchus labrax) et effets des xénoestrogènes sur sa mise en place

Florent Nihoul

To cite this version:

Florent Nihoul. Ontogénèse de l'axe gonadotrope chez le bar européen (Dicentrarchus labrax) et effets des xénoestrogènes sur sa mise en place. Physiologie [q-bio.TO]. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMLH19 . tel-02512831

HAL Id: tel-02512831

https://theses.hal.science/tel-02512831v1

Submitted on 20 Mar 2020

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.

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité
Physiologie et Biologie des organismes – Populations – Interactions

Préparée au sein de « Université Le Havre Normandie »

Ontogénèse de l'axe gonadotrope chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax)* et effets des xénoestrogènes sur sa mise en place

Présentée et soutenue par
Florent NIHOUL

Thèse soutenue publiquement le 19 septembre 2019 devant le jury composé de		
Mme Catherine PASQUALINI	Chargé de Recherche CNRS (HDR)	Rapporteur
M. Hervé TOSTIVINT	Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Mme Sylvie DUFOUR	Directeur de Recherche CNRS	Examinateur
Mme Arianna SERVILI	Chargé de Recherche IFREMER	Examinateur
M. Jean-Michel DANGER	Professeur à l'Université Le Havre Normandie	Directeur de thèse
Mme Salima AROUA	Maître de conférences à l'Université Le Havre Normandie	Responsable scientifique

Thèse dirigée par Jean-Michel DANGER sous l'encadrement scientifique de Salima AROUA
Laboratoire UMR-I 02 Sebio – Stress environnementaux et biosurveillance des milieux aquatiques

UNIVERSITÉ LE HAVRE NORMANDIE

ed 497 NBISE

Sebio UMR-I 02 Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques

« La vie trouve toujours son chemin »

Dr Ian Malcolm,
Jurassic Park, Steven Spielberg

Remerciements

Je voudrais sincèrement remercier Hervé Tostivint et Catherine Pasqualini d'avoir accepté la charge de rapporter ce travail de thèse, ainsi qu'à Sylvie Dufour et Arianna Servili d'examiner ma thèse. C'est un honneur et un plaisir de vous la présenter.

Je remercie également Jean-Michel Danger d'avoir dirigé mon travail de thèse, d'avoir su m'écouter et d'avoir été disponible quand j'en avais besoin.

Merci également pour le temps que tu m'as accordé, malgré ton emploi du temps très chargé, pour la relecture des articles et du manuscrit. Tu as également su être patient vis-à-vis de mon orthographe (trop) souvent imparfaite.

Je remercie et j'exprime toute ma gratitude à Salima Aroua pour son encadrement scientifique. Je la remercie également d'avoir monté ce projet et de m'avoir fait confiance pour en être l'acteur.

Merci également pour ton aide précieuse au cours des manips et surtout lors des rédactions, particulièrement celle de la thèse. Je pense qu'écrire correctement sera toujours difficile pour moi. Merci pour ton encadrement scientifique qui m'aura permis d'avancer autant scientifiquement qu'humainement. Je te remercie également pour avoir été bien plus qu'une encadrante scientifique et pour tous ces moments en dehors du laboratoire (L'Abri Côtier !!). J'espère qu'ils seront encore nombreux ! « *Inch Allah* ! », comme tu dis si bien !

Salima, merci d'avoir été là quand j'en avais besoin et je suis conscient aujourd'hui que cela n'a pas dû être tous les jours facile au cours de ces trois ans (bientôt quatre). Je t'en ai fait voir de toutes les couleurs, sur ces deux dernières années particulièrement, et je suis sincèrement désolé si à cause de moi, tu as quelques cheveux blancs aujourd'hui…

Merci à Jean-Michel Danger et à Frank Le Foll, directeurs successifs du laboratoire SEBIO, de m'avoir accueilli dans leurs locaux.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire SEBIO qui m'ont apporté leur aide (physique et morale) au cours de ces années.

Je remercie Florence Bultelle pour m'avoir introduit dans le monde de la recherche ainsi que pour son soutien moral. Je remercie Romain Coulaud… pour son aide dans ce monde obscure que sont les biostatistiques…. Je remercie aussi Madeleine Barriaux pour sa patience et Jeanne Foix pour nos conversations idyllique sur les Antilles.

Je remercie l'équipe technique de SEBIO (Agnès Poret, Aurélie Duflot et Mayélé Burlion-Giorgi) et plus particulièrement Stéphanie Olivier pour son aide dans les manips d'expo… Garde ta bonne humeur et ne change rien.

Je remercie tout particulièrement Alexandre Erraud et Matthieu Paiola, mes deux compères de bureau, pour tous ces moments passés ensemble, pour nos discussions dans les moments difficiles et pour votre soutien dans mes projets. Je vous souhaite d'aller loin les gars ! Merci aussi à Julie Hétru, qui a partagé notre bureau pendant quelques mois, pour m'avoir engraissé avec ses gâteaux et ses bonbons… sache que mes kilos en plus sont toujours là… Merci à Catarina Moreira pour ta constante bonne humeur.

Je remercie également Marc Rollin et Apolline (un « p » et deux « l ») Chabenat. Merci pour votre bonne humeur, pour nos sorties, votre soutien dans mes projets mais n'oubliez pas que vous êtes les prochains à passer la dure épreuve de l'écriture des remerciements !!

Merci à Géraldine pour son soutien, ses conseils avisés et tous les bons moments un rhum à la main. Je n'ai pas osé la mettre en citation alors je mets ici cette phrase, dite un soir d'anniversaire : « Tu sais boire ou tu ne sais pas boire ?! T'es bretonne ou t'es pas bretonne ?! Parce que moi je suis bretonne ». Voilà… hâte d'entendre de nouvelles « citations made in Gégé ».

Je remercie toute l'équipe « Die Grüppe », mes amis de longue date qui sont à mes yeux une famille. Merci pour votre soutien sans faille, dans la thèse comme dans ma reprise d'études en médecine. Sans vous je ne serai surement pas la personne que je suis devenue aujourd'hui. Merci plus particulièrement à Cécilia qui me permet de « squatter » sont appartement maintenant que je ne vis plus au Havre…

Je remercie mon Gusgus, mon chaton, qui m'a toujours attendu à la maison avec la même joie et qui chaque soir attendait ses caresses avec impatience.

Merci à mes parents, qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici, de m'avoir aidé en cette fin de thèse et pour être toujours présents.

Je remercie très (très) sincèrement Aurélie Duflot, qui, plus qu'une collègue, est une amie en or. Merci d'avoir été là tout au long de ma thèse, de m'avoir soutenu moralement (chose pas facile) et pour tous ces moments passés ensemble.

Un grand (grand) merci pour avoir été là durant cette « difficile » fin de thèse et pour les heures que tu as passé le soir à relire et corriger fautes et syntaxe… Je ne sais pas si je dois être fier ou pas d'avoir fait « péter ton record de présence continue au labo »…

Enfin, merci à toi Thomas. Je ne te le dirai jamais assez… Merci d'être à mes cotés depuis plus de trois ans. Merci pour ton soutien depuis tout ce temps et pour celui que tu m'apportes chaque jour, je n'y serai jamais arrivé sans toi. Tu as su me redonner l'envie dans les moments difficiles, me remotiver lors de mes « baisses de moral » et me soutenir dans mes projets. Sache que, quoi qu'il arrive, je serai toujours là pour toi.

Sommaire

Liste des figures et tableaux 1
Liste des abréviations 3
1. Introduction générale 7
1.1. La perturbation endocrinienne 10
1.1.1. Définition d'un perturbateur endocrinien 10
1.1.2. Effet et mode d'action des perturbateurs endocriniens 13
1.1.3. Mécanisme d'action des molécules œstrogénomimétiques 14
1.1.3.1. Les récepteurs nucléaires 14
1.1.3.2. Les récepteurs membranaires 16
1.2. L'axe gonadotrope 18
1.2.1. Les acteurs cérébraux principaux 20
1.2.1.1. Les kisspeptines 20
1.2.1.1.1. Structure des kisspeptines 21
1.2.1.1.1.1. Chez les mammifères 21
1.2.1.1.1.2. Chez les téléostéens 22
1.2.1.1.2. Fonction des kisspeptines 25
1.2.1.1.2.1. Chez les mammifères 26
1.2.1.1.2.2. Chez les téléostéens 29
1.2.1.1.3. Origine et localisation des neurones à kisspeptine 31
1.2.1.1.3.1. Chez les mammifères 31
1.2.1.1.3.2. Chez les téléostéens 32
1.2.1.2. Les gonadolibérines 33
1.2.1.2.1. Structure 35
1.2.1.2.2. Fonction des gonadolibérines 36
1.2.1.2.2.1. Chez les mammifères 36
1.2.1.2.2.2. Chez les téléostéens 37
1.2.1.2.3. Origine et localisation 37
1.2.1.2.3.1. Origine mésencéphalique de la GnRH2 38
1.2.1.2.3.2. Origine extra cérébrale des GnRH1 et GnRH3 39
1.2.1.3. Les autres facteurs de régulation de l'axe gonadotrope 40
1.2.2. Les acteurs hypophysaires de l'axe gonadotrope : les gonadotropines 46
1.2.2.1. Structure des gonadotropines 46
1.2.2.2. Fonction des gonadotropines 47
1.2.2.2.1. Chez les mammifères 47
1.2.2.2.2. Chez les téléostéens 48
1.2.2.3. Ontogenèse des gonadotropines 49
1.2.2.3.1. Ontogenèse chez les vertébrés non-téléostéens 49
1.2.2.3.2. Ontogenèse chez les téléostéens 50

1.2.2.3.3. Rôle des gonadotropines durant l'ontogenèse 51
1.2.3. Régulation du système hypothalamo-hypophysaire par les stéroïdes sexuels 52
1.3. Présentation du bar européen 54
1.3.1. Le bar européen : généralités 54
1.3.1.1. Ecologie du bar européen 54
1.3.1.2. Reproduction et cycle de vie du bar européen 54
1.3.2. Intérêt économique et stock de pêche 55
1.3.3. Le bar en Manche et en estuaire de Seine : point de vue écotoxicologique 56
1.4. Objectifs de la thèse 58
2. Matériels et méthodes 63
2.1. Provenance des animaux 63
2.2. Elevage larvaire 63
2.2.1. Système avec circulation d'eau 63
2.2.2. Système statique 65
2.3. Mise en place d'une méthode d'exposition 65
2.4. Exposition à l'éthynilestradiol (EE2) (article 2) 65
2.3.1.1.Exposition en bécher 66
2.3.1.2.Exposition en plaque 66
2.3.1.3.Prélèvements 66
2.4. Localisation des cellules par hybridation in situ (articles 1, 2 et 3) 76
2.4.1. Production des sondes 67
2.4.2. Procédure d'hybridation in toto 68
2.4.3. Procédure d'hybridation in situ sur coupe 68
2.5. Mesure des ARNm par PCR quantitative en temps réel (articles 1, 2, 3) 69
2.5.1. Extraction des ARN totaux et reverse transcription 69
2.5.2. Dosage par PCR quantitative en temps réel 70
3. Résultats 71
Développement et optimisation d'une technique d'élevage en laboratoire et d'une méthode d'exposition la plus adaptée 73
1. Introduction 75
2. Matériels et Méthodes 77
3. Résultats 79
4. Discussion 82
*Article 1 : Ontogeny of brain kisspeptin and GnRH systems in the European sea bass: potential new roles in early developmen*t 91
1. Introduction 94
2. Materials and methods 96
3. Results 99
4. Discussion 101
Article 2 : Evolution et caractérisation des cellules à FSHβ et LHβ au cours du développement larvaire du bar européen (Dicentrarchus labrax) 123
1. Introduction 125

2. Matériels et Méthodes 127
3. Résultats 130
4. Discussion 131
Article 3 : Effects of 17α-Ethinylestradiol (EE2) exposure during early life development on Kisspeptins and GnRHs ontogenesis of the European sea bass, Dicentrarchus labrax. 151
1. Introduction 154
2. Materials and methods 156
3. Results 158
4. Discussion 161
4. Discussion 179
4.1. Ontogenèse des acteurs cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope 182
4.1.1. Ontogenèse des systèmes à GnRH 182
4.1.2. Ontogenèse des systèmes à kisspeptine 187
4.1.3. Ontogenèse des systèmes à gonadotropines 192
4.1.4. Potentielles interactions entre les différents systèmes 195
4.1.5. Différents acteurs impliqués dans le contrôle de l'axe gonadotrope 197
4.1.5.1. La sérotonine 198
4.1.5.2. GABA et Neuropeptide Y 198
4.1.5.3. La dopamine 199
4.1.5.4. La mélatonine 202
4.1.5.5. La Gonadotropin Inhibiting Hormone (GnIH) 203
4.1.5.6. Les facteurs métaboliques 204
4.1.6. Rôle des kisspeptines et des GnRH au cours des premiers stades de vie 206
4.2. Effets des xénoestrogènes au cours du développement larvaire du bar européen 208
4.2.1. Œstrogènes et récepteurs aux œstrogènes 208
4.2.2. Œstrogènes et contrôle cérébral de la reproduction 209
4.2.3. Effets des xénoestrogènes sur l'axe gonadotrope 212
4.2.3.1. Effets des xénoestrogènes sur les systèmes à GnRH 212
4.2.3.2. Effets des xénoestrogènes sur les systèmes à kisspeptine 215
4.3. Autres sites d'action potentiels des xénoestrogènes 216
4.3.1. La sérotonine 217
4.3.2. GABA 217
4.3.3. La dopamine 218
5. **Conclusion et perspectives** 221
6. **Références bibliographiques** 227
Communications et travaux 259

Liste des figures et tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1 : Exemple de perturbateurs endocriniens naturels et synthétiques 12
Tableau 2 : Séquence peptidique des 18 variants de la GnRH présents chez les vertébrés 34

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du récepteur nucléaire aux œstrogènes 14
Figure 2 : Schéma des deux voies de régulation génique pas les œstrogènes 17
Figure 3 : Schéma de production des kisspeptines 22
Figure 4 : Structure génique et peptidique de la kisspeptine 1 chez le médaka 23
Figure 5: Structure génique et peptidique de kisspeptine 2 chez deux espèces de téléostéens 24
Figure 6 : Voies de signalisation du récepteur KISS1R 26
Figure 7 : Coupes schématiques de cerveaux illustrant la localisation comparée des différentes populations de neurones à GnRH chez plusieurs espèces de poissons 38
Figure 8 : Schéma des différents acteurs interagissant avec les neurones à GnRH et les cellules gonadotropes 43
Figure 9 : Schéma de l'action excitatrice ou inhibitrice des peptides du métabolisme sur l'axe gonadotrope chez les téléostéens 45
Figure 10 : Représentation de la pression anthropique sur la Manche 56

MATERIELS ET METHODES

Tableau 3 : Nombre d'individus prélevés par condition 67
Tableau 4 : Nombre d'individus aux différents temps de prélèvement 69

Figure 11 : Dispositif d'élevage en eau circulante et système statique en cuve cylindro-conique 64

RESULTATS

Développement et optimisation d'une technique d'élevage en laboratoire et d'une méthode d'exposition la plus adaptée

Figure 1 : Protocole d'élevage durant la période larvaire du bar européen 88
Figure 2 : Suivi de la mortalité au cours de l'exposition 89

Article 1 : Ontogeny of brain kisspeptin and GnRH systems in the European sea bass: potential new roles in early development.

Table 1: Primer sequences used for the real time quantitative PCR 115

Figure 1 : Gene expression profiles of *kiss1*, *kiss2*, *gnrh1*, *gnrh2* and *gnrh3* during sea bass larval development 116
Figure 2 : *Kiss1*-expressing cells in 50dph sea bass larvae detected by *in situ* hybridization 117
Figure 3 : *Kiss2*-expressing cells detected by *in situ* hybridization in sea bass larvae 118
Figure 4 : *Gnrh2*-expressing cells detected by *in situ* hybridization in sea bass larvae 119
Figure 5 : *Gnrh3*-expressing cells detected by *in situ* hybridization in sea bass larvae 120
Figure 6 : Schematic representations of brain distribution of kiss- and gnrh-expressing cells during sea bass larval development 121

Article 2 : Evolution et caractérisation des cellules à FSHβ et LHβ au cours du développement larvaire du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)

Tableau 1 : Séquence des amorces utilisées pour la qRT-PCR 145

Figure 1 : Profil d'expression de *fshβ* et *lhβ* au cours du développement larvaire chez le bar européen 146
Figure 2 : Détection par hybridation *in situ* des cellules exprimant les sous-unités FSHβ et LHβ sur hypophyse de bar adulte 147
Figure 3 : Détection par hybridation *in situ* des cellules exprimant les sous-unités FSHβ et LHβ chez la larve de bar âgée de 50 jours post éclosion 148

Figure 4 : Détection par hybridation *in situ* des cellules exprimant les sous-unités LHβ chez la larve de bar âgée de 50 jours post éclosion 149
Figure 5 : Localisation de l'hypophyse sur coupe transversale de larve de bar à 50 jours post éclosion en coloration HES 150

Article 3 : Effects of 17α-Ethinylestradiol (EE2) exposure during early life development on Kisspeptins and GnRHs ontogenesis of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*.

Table 1 : Primer sequences used for the real time quantitative PCR 171

Figure 1: Estrogen activity measured by YES assay in water sample at 2 and 8 days after the beginning of experiment. 172
Figure 2 : Fish mortality during experimental time 173
Figure 3 : Gene expression profiles of *kiss1*, *kiss2*, *gnrh2*, and *gnrh3* after exposure to DMSO, 0.5nM, or 50nM of EE2 174
Figure 4 : Gene expression profiles of *cyp19a1b* (Aromatase B) after exposure to DMSO, 0.5nM, or 50nM of EE2 175
Figure 5 : *In situ* hybridization detection of GnRH2 expressing neurons in 6dph sea bass larvae 176
Figure 6 : *In situ* hybridization detection of GnRH3 expressing neurons in 6dph sea bass larvae 177

DISCUSSION

Figure 12 : Représentation schématique du profil d'expression des trois *gnrh* et distribution des cellules à GnRH au cours du développement larvaire du bar européen 186
Figure 13 : Représentation schématique du profil d'expression des deux gènes kiss et distribution des cellules à kisspeptine au cours du développement larvaire du bar européen 191
Figure 14 : Représentation schématique du profil d'expression des deux sous-unités *fshβ* et *lhβ* durant les phases précoce, intermédiaire et tardive de développement de la larve de bar européen 193
Figure 15 : Représentation schématique de l'action neuroendocrine des différents neuropeptides sur la sécrétion et l'expression de GnRH1 201
Figure 16 : Représentation schématique des effets des peptides métaboliques sur les neurones à GnRH1 et sur les cellules gonadotropes 205
Figure 17 : Représentation schématique des voies d'actions potentielles des xénoestrogènes sur les neurones à kisspeptines (Kiss) et les neurones à GnRH chez les téléostéens 214
Figure 18 : Représentation schématique des voies d'activation par les xénoestrogènes via les récepteurs aux œstrogènes (ER) des neurones sérotoninergiques, GABAergiques et dopaminergique 219

Liste des abréviations

5-HT : Récepteurs sérotoninergiques (Récepteurs 5-hydroxytryptamine)
ACTH : Hormone corticotrope (Adreno CorticoTrophic Hormone)
AVPV : Antéro-ventral périventriculaire
BCIP : 5-brom-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine
BPA : Bisphénol A
BPS : Bisphénol S
cAMP : Adénosine monophosphate cycline
Ce : Cervelet
CREB : Facteur de transcription liant l'AMPc (cAMP Response Element Binding Protein)
DAG : Diacylglycerol
DBD : Domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain)
DEHP : Di(2-ethylhexyl) phtalate
DEPC : Diéthyl dicarbonate
DES : Diéthylstilbestrol
DMSO : Diméthylsulfoxide
DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine
E1 : Œstrone
E2 : Œstradiol
E3 : Œstriol
EE2 : Ethynilestradiol
ER : Récepteurs aux œstrogènes (Estrogen Receptors)
ESR1 = Erα : Récepteur nucléaire aux œstrogènes 1
ESR2a = Erβ1 : Récepteur nucléaire aux œstrogènes 2a
ESR2b = Erβ2 : Récepteur nucléaire aux œstrogènes 2b
ERE : Elément de réponse aux œstrogènes (Estrogen Response Element)
FAO : Food and Agriculture Organization
FSH : Hormone folliculo-stimulante (Follicle Stimulating Hormone)
FSH β: Sous-unité β de la FSH
FSHR : FSH Receptor
GABA : Acide γ-aminobutyrique (Gamma-AminoButyric Acid)
Gal-R1 : Récepteur de la galanine
GAP : Peptide associé à la GnRH (GnRH-associated peptide)
GFP : Protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)
GH : Hormone de croissance (Growth Hormone)
GnIH : Hormone inhibitrice des gonadotropines (Gonadotropin Inhibiting Hormone)
GnRH : Gonadolibérine (Gonadotropin Releasing Hormone)
GnRH-R : Récepteur à la GnRH (GnRH Receptor)
GPER : G Protein-coupled Estrogen Receptor
HES : Coloration Hématoxyline – Eosine – Safran
HPG : Axe hypothalamo-pituito-gonadique
ICES : International Council for the Exploration of the Sea
IHC : Immunohistochimie
IP_3 : Inositol triphosphate
IPN : Noyau interpédonculaire
ISH : Hybridation *in situ* (*In Situ* Hybridization)
Jpe: Jour post éclosion
Jpf : Jour post fécondation
KD : Knockdown
KO : Knockout
LBD : Domaine de liaison du liguand (Ligand Binding Domain)
LH : Hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone)
LHβ: Sous-unité β de la LH
LHR : LH Receptor
LHRH = GnRH : LH Releasing Hormone
MCH : Hormone de mélano-concentration (Melanin-Concentrating Hormone)
MO : Moelle allongée
Ms : Mésencéphale
MSH : Hormone mélanotrope (Melanocyte Stimulating Hormone)
NBT : Nitro blue tetrazolium chloride
NP : Nonylphénol
NPY : Neuropeptide Y
OB : Bulbe olfactif
OP : Placode olfactive
OT : Tectum optique
PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PCBs : Polychlorobiphényles
PAF : Paraformaldéhyde
PE : Perturbateur endocrinien
PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
Pit : Hypophyse
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase c
POA : Aire pré-optique
POMC : Pro-opiomelanocortine
PRL : Prolactine
Ps : Prosencéphale
Rb : Rhombencéphale
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
RT-qPCR : Retro-transcription et PCR quantitative
Syn : Synencéphale
Tel : Télencéphale
TH : Tyrosine hydroxylase
TSH : Hormone thyréotrope (Thyroid Stimulating Hormon)

Introduction générale

1. Introduction générale

Au cours des dernières décennies, l'augmentation de l'activité anthropique, des progrès en santé, ainsi que l'augmentation de la démographie ont conduit à l'utilisation accrue de molécules synthétiques dans les domaines de l'industrie, de l'agronomie et du pharmaceutique.

L'action néfaste de ces substances chimiques sur les organismes a suscité une forte inquiétude de la communauté scientifique et des organismes de santé publique (Carlsen et al., 1992 ; Clement, 1992). Parmi les classes de molécules présentes dans l'environnement, les perturbateurs endocriniens (PE) ont été le sujet de nombreuses préoccupations. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé a revu la définition des PE et les définit comme des «substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants ou (sous-)populations» (World Health Organisation (WHO) : Bergman, 2012). Cette définition a récemment été reprise au niveau de l'Union Européenne, qui les définit comme «une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien, et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations» (Commission Européenne du 4 juillet 2017). Les PE peuvent agir à différents niveaux de la régulation endocrinienne et perturber de grandes fonctions comme la reproduction (Kavlock et al., 1996). Parmi les PE, les xénoestrogènes sont des molécules capables de se fixer aux récepteurs aux œstrogènes. Par cette action, ils vont perturber les systèmes endocriniens œstrogéno-dépendants.

Des études *in situ* menées chez différentes espèces de vertébrés aquatiques ont montré l'apparition des troubles du développement et l'altération de la fonction de reproduction liée à une exposition aux PE. Par exemple chez l'alligator (*Alligator mississippiensis*), des mesures de la concentration en testostérone révèlent, chez les individus exposés *in situ*, une diminution de la testostérone plasmatique, par comparaison aux alligators vivant en milieu non contaminé (Guillette et al., 2000). En France et en Angleterre, l'exposition dans le milieu à des cocktails de PE provoque chez le gardon (*Rutilus rutilus*) l'apparition d'intersex (*i.e.* inclusion de tissu ovarien dans le tissu testiculaire avec développement d'ovocytes) ainsi qu'une augmentation de la vitellogénine chez les mâles, une protéine normalement produite par les femelles (Jobling et al., 2002 ; Gerbron et al., 2014). Les vertébrés aquatiques sont fortement exposés à

ces molécules, car celles-ci s'accumulent dans les milieux aquatiques, qui sont les réceptacles finaux des eaux d'épuration et des eaux de ruissellement.

Plusieurs études menées en laboratoire sur différentes espèces de téléostéens ont montré une altération de la fonction de reproduction. Par exemple, il a été montré chez le médaka (*Oryzias latipes*), qu'une exposition à l'éthynilestradiol (EE2) perturbait l'organisation gonadique chez les mâles qui présentaient du tissu ovarien dans les testicules. De plus, une exposition dès l'éclosion induit une diminution de la production d'œuf et provoque la transformation de mâles génétiques en femelles phénotypiques. Ces résultats ont été confirmés chez d'autres poissons comme le méné tête de boule (*Pimephales promelas*) ou le poisson-zèbre (*Danio rerio*), chez lesquels, l'exposition depuis l'éclosion provoque la transformation des mâles génétiques en femelles. Chez le poisson-zèbre, l'EE2 retarde également le développement des gonades. La majorité de ces travaux se sont focalisés sur les stades adultes et sur la reproduction (production d'œuf et succès de reproduction) (Pour revue : Aris et al., 2014). Il est vrai que le succès de reproduction est le marqueur de la santé d'une population et qu'il permet d'évaluer la pérennité d'une population/espèce. L'axe gonadotrope fait intervenir de nombreux acteurs cérébraux, hypophysaires et gonadiques et il est nécessaire d'évaluer comment ces acteurs sont impactés pour comprendre le mécanisme d'action de ces molécules. Ces dernières décennies, ce type d'études s'est multiplié, mais aujourd'hui on sait que ces systèmes s'expriment tôt et l'effet que peuvent avoir les xénoestrogènes sur cette mise en place n'est que peu étudié. Or, il est important d'évaluer si cette perturbation va avoir des effets irréversibles sur la mise en place des systèmes qui peuvent avoir des conséquences sur la puberté et la reproduction. Par ailleurs, l'expression précoce de ces acteurs semble intervenir dans un autre rôle que la reproduction et la perturbation précoce de ces systèmes pourrait conduire à des anomalies du développement et à des malformations, comme cela a pu être observé chez le méné tête de boule exposé à l'EE2 dès l'éclosion (Lange et al., 2001)

Des études ont montré, chez les vertébrés, une mise en place précoce des acteurs cérébraux de l'axe gonadotrope, mais leur nombre reste limité (Pour revue : Abraham et al., 2009 ; Sandvik et al., 2014). L'exposition aux xénoestrogènes, au cours du développement peut avoir des effets à long terme et transgénérationnels. Par exemple, entre les années 1930 et 1970, le diéthylstilbestrol (DES, Disltilbène©) était fréquemment prescrit pour prévenir des fausses-couches spontanées à répétition. Les enfants issus de mères ayant pris du diéthylstilbestrol ont présenté de nombreuses malformations de l'appareil génital associées à une stérilité ainsi qu'une fréquence de cancer uro-génital augmentée (pour revue : Al Jishi et

Sergi., 2017). Entre 2000 et 2010, des études épidémiologiques chez ces enfants de troisième génération ont permis de montrer qu'ils présentaient encore un certain nombre de malformations uro-génitales, surtout chez les garçons (hypospade et cryptorchidie) (pour revue : Al Jishi et Sergi., 2017). Chez les poissons, certains PE vont avoir un effet transgénérationnel. Par exemple, les descendants de poissons-zèbres mâles exposés à l'EE2 montrent un certain nombre de malformations comme l'apparition de lymphœdèmes à la base de la tête ou des otolithes, ou une modification de l'expression des gènes régulant le développement testiculaire, des récepteurs aux œstrogènes ou de facteurs de migration des cellules endothéliales ou de la lymphoangiogenèse (Valcarce et al., 2017)

Les xénoestrogènes peuvent également avoir des effets à court terme et intervenir dans des processus très éloignés de la reproduction. Le rôle de l'expression au cours de la période embryo-larvaire des kisspeptines et des GnRH n'a été que très peu documenté. Quelques études réalisées chez le médaka et le poisson-zèbre suggèrent une implication de ces peptides dans le développement cérébral et la communication neuronale (Wu et al., 2006 ; Hodne et al., 2013).

Notre modèle d'étude, le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), est une espèce présente en Atlantique Nord-Est. D'autre part, elle est intensivement élevée en aquaculture pour sa forte valeur économique. De ce fait, un grand nombre de données concernant son cycle de vie et sa reproduction sont disponibles. Chez la larve, la localisation des neurones à GnRH a été réalisée (Gonzales et al. 2002 ; 2004) mais aucune donnée concernant l'expression des kisspeptines et la localisation des neurones les produisant n'est disponible chez les larves. D'autre part, le bar européen vit en haute mer, entre 10 et 100 m de profondeur, mais les larves et juvéniles vivent au niveau du littoral et des estuaires, où ils trouvent protection et nourriture (Haffray et al., 2007). Dans l'estuaire de Seine, où la présence de perturbateurs endocriniens a été relevée, évoluent des populations de bars européens juvéniles (programme GIP Seine-aval 2012, 2017). L'effet que pourraient avoir ces molécules sur le système gonadotrope de ce poisson d'importance économique n'a jamais été étudié.

Le travail de cette thèse s'inscrit dans la problématique générale de l'étude des effets des perturbateurs endocriniens chez les téléostéens. Dans un premier temps, le but était de décrire la dynamique d'expression et la localisation des acteurs cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope au cours du développement larvaire du bar européen. Afin de répondre à cette question, des techniques d'hybridation *in situ* (ISH) et de PCR quantitative (qPCR) ont

été mises en œuvre. Dans un second temps, le but était de réutiliser les techniques précédemment développées afin d'évaluer quelles étaient les cibles des PE. Pour cela, il a fallu mettre en place un élevage en conditions contrôlées et exposer les larves à différents temps et concentrations de 17α-éthynilestradiol (EE2).

La finalité de ce travail est d'apporter de nouvelles connaissances sur le développement de l'axe gonadotrope chez le bar européen ainsi que de l'effet des PE sur le système neuroendocrinien de cette espèce et donc d'évaluer les risques encourus pour ces populations dans un contexte de pollution environnementale.

1.1. La perturbation endocrinienne

1.1.1. Définition d'un perturbateur endocrinien

Ce n'est que récemment, vers le milieu des années 1990, que l'Homme a pris conscience de son impact sur la santé de l'environnement. Bryan et Gibbs (1991) ont été les premiers à montrer chez un gastéropode que l'exposition à un biocide (le tributylétain) induisait l'apparition d'un imposex (développement d'organe mâle) chez les femelles. Puis, Guillette et ses collaborateurs (1994) ont été les premiers à montrer que les milieux étaient contaminés par des molécules pouvant avoir des effets sur les organismes. Ils ont constaté, chez les alligators mâles exposés *in situ* à différents polluants environnementaux, des anormalités du développement des gonades ainsi que des taux de testostérone plasmatique plus bas chez les mâles en milieu contaminé. Pendant longtemps, les études d'écotoxicologie se sont intéressées à la fonction de reproduction. Depuis quelques années, de plus en plus d'études explorent les effets potentiels des PE sur les autres axes endocriniens, comme l'axe thyréotrope, mais aussi somatotrope et corticotrope (Tyler et al., 1998 ; Adeel et al., 2017).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, un PE est une molécule naturelle ou synthétique qui altère le fonctionnement du système endocrinien et met en péril la santé d'un organisme et d'une population (WHO : Bergman, 2012). Ces molécules sont variées et impactent les systèmes endocriniens par des voies différentes. Certaines de ces molécules sont mimétiques et se fixent sur les récepteurs des molécules endogènes. D'autres molécules vont au contraire empêcher la fixation de l'hormone et la transduction du signal. Enfin, certains PE perturbent directement la production hormonale et/ou la régulation des hormones ou de leur récepteur (ANSES, 2017).

Les œstrogénomimétiques sont des perturbateurs endocriniens qui miment les œstrogènes endogènes et perturbent ainsi la régulation endocrinienne exercée par les œstrogènes. Ceux-ci vont, soit se fixer sur des récepteurs aux œstrogènes et ainsi les activer, soit empêcher la fixation des œstrogènes endogènes par compétition. Les systèmes, directement ou indirectement, œstrogéno-dépendants vont être perturbés et c'est, non seulement la fonction de reproduction, mais aussi toute la physiologie de l'organisme qui peut être touchée. La perturbation de ces systèmes va entraîner des effets au niveau du tissu, mais aussi de l'organisme. Ainsi, le comportement, les défenses immunitaires, le métabolisme, le développement et la reproduction de l'individu peuvent être perturbés. Dans ce cas, la fitness de la population peut être altérée et l'issue peut être fatale. Par exemple, l'exposition chronique durant 7 ans à de l'éthynilestradiol (œstrogène de synthèse, EE2) a conduit à la disparition de la population de méné tête de boule (*Pimephales promelas*) dans un lac artificiel (Kidd et al., 2007).

Les PE œstrogénomimétiques sont définis par leur mode d'action et regroupent un grand nombre de molécules naturelles ou synthétiques (Tab. 1). Parmi ces substances, on peut répertorier les hormones stéroïdes naturelles comme les phytoestrogènes (coumestanes, lignanes, flavonoïdes, stilbènes), les mycoestrogènes (zéaralénone) et les hormones d'origine animale (œstrone, œstradiol, œstriol), des substances synthétiques issues de l'industrie chimique (peinture, plastique, retardateur de flamme), agronomique (pesticide, engrais), pharmaceutique (hormone de synthèse) et cosmétique (filtres UV).

A ce jour, plusieurs centaines de molécules identifiées comme perturbateur endocrinien (potentiel ou avéré) ont été détectées dans l'environnement. L'amélioration des techniques de détection permet encore aujourd'hui d'ajouter de nouveaux polluants à la liste. Même si beaucoup d'entre eux sont retrouvés à des concentrations de l'ordre de la nanomole par litre, ils n'en sont pas moins dangereux. L'exposition chronique, même à faibles doses, peut entraîner des effets sur les organismes qui sont capables de bio-accumuler ces substances (Nurulnadia et al., 2014 ; Salgueiro-González et al., 2015). De plus, le mélange de plusieurs polluants peut entraîner un effet synergique et décupler le potentiel des PE (Armstrong et al., 2014 ; Kortenkamp, 2014). Ces cocktails sont fréquents dans les milieux aquatiques qui recueillent les eaux de ruissellement, de sortie de station d'épuration, voire de rejets directs d'égouts.

L'EE2 est un œstrogène de synthèse, utilisé en industrie pharmaceutique dans la contraception et la thérapie hormonale de substitution. *In vitro*, l'EE2 a une forte affinité avec les récepteurs aux œstrogènes, supérieure à celle de l'œstradiol (Legler et al. 2002, Cosnefroy et al. 2009). Cette molécule est excrétée par les urines et mal éliminée par les stations d'épuration. De ce fait, cette molécule est présente dans l'environnement. Elle est retrouvée à des concentrations variables, allant de 0 ng/l (Îles Milles, Canada) à 30 ng/l (Itata, Chili), dépendamment de la consommation par la population et des paramètres du milieu (Bertin et al., 2008 ; Viglino et al., 2008 ; Duong et al., 2010).

Tableau 1 : Exemple de perturbateurs endocriniens naturels et synthétiques.

Famille chimique	Composés	Sources
Phytoestrogènes	coumestanes, lignanes, flavonoïdes, stilbènes	Végétaux
Mycoestrogènes	zéaralénone	Champignon
Hormones naturelles	estrone, estradiol, estriol	Humains, animaux (élevage)
Pesticides	Atrazine, Lindane, Endosulfan, Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	Agriculture
Alkylphénols	Nonylphénol, Octylphénol	Détergents
Hormones de synthèse	17α-éthinylœstradiol, Diéthylstibestrol, Tamoxifène	Industrie pharmaceutique
Filtre UV	Benzophénones, 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC)	Industrie cosmétique
Phtalate	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP), Phtalate de dibutyle (DBP)	Industrie plastique

Plusieurs études montrent que l'EE2, même à faible dose, perturbe le développement et la reproduction des poissons. Chez les mâles et les juvéniles, l'EE2 induit la production de vitellogénine. L'EE2 perturbe les systèmes hormonaux, mais aussi la différenciation sexuelle, le développement des gonades avec l'apparition d'individus intersex, ainsi que la fertilité de poissons en diminuant le nombre d'œufs produits par les femelles (Gardon : Lange et al. 2008; Poisson-zèbre : Segner et al. 2003 ; Nash et al. 2004 ; Schafers et al. 2007; Xu et al. 2008).

1.1.2. Effets et mode d'action des perturbateurs endocriniens

Les systèmes endocriniens correspondent à des systèmes de communication entre différents organes qui régulent le métabolisme, la croissance et la reproduction. Ils font intervenir des hormones ou peptides qui vont circuler à travers l'organisme jusqu'à un organe cible où ils vont se fixer à un récepteur et l'activer. Les perturbateurs endocriniens vont intervenir à différents niveaux du système et vont perturber le bon fonctionnement de l'axe.

Récemment, l'Organisation Mondiale de la Santé a établi une liste de 800 molécules présentes dans l'environnement et ayant un effet perturbateur des systèmes endocriniens (WHO : Bergman et al., 2012). L'impact des perturbateurs endocriniens sur la reproduction et le développement sont les effets les plus étudiés chez les organismes.

Parmi les effets décrits, on peut citer quelques exemples. Chez le gardon sauvage (*Rutilus rutilus*) de nombreux poissons intersex (ovotestis), possédant du tissu gonadique dans les testicules, ont été observés dans les rivières d'Angleterre (Jobling et al., 2002). Chez le médaka, l'exposition à l'EE2, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, entraîne la diminution de la production des œufs (Scholz et Gutzeit, 2002). Au niveau moléculaire, les PE entraînent aussi des effets sur la production des hormones. Comme indiqué précédemment, chez les alligators mâles vivant dans des lacs contaminés, le niveau de testostérone mesuré est significativement plus bas que chez les mâles des lacs non contaminés et est similaire au niveau de testostérone des femelles alligators (Guillette et al., 1994). Chez de nombreuses espèces de poissons téléostéens, les PE perturbent la production de nombreuses enzymes ou protéines importantes dans la reproduction. Chez les mâles poissons-

zèbres, la vitellogénine, une lipoprotéine importante pour la constitution des réserves vitellines dans les œufs et uniquement synthétisée chez les femelles, est mesurée à des niveaux importants. De même, l'expression génique de l'aromatase b, une enzyme clef dans la production des œstrogènes à partir de la testostérone, augmente de manière importante chez les femelles et est également détectée chez les mâles (pour revue : Aris et al., 2014).

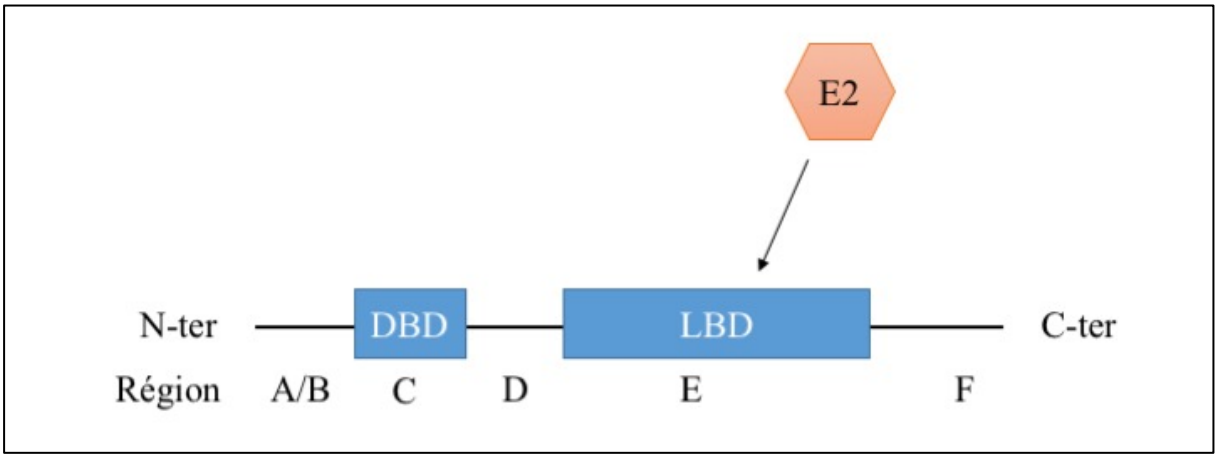
Ces quelques exemples, non exhaustifs de la diversité des réponses aux PE que peuvent présenter les organismes, montrent l'effet important que peuvent avoir certaines substances sur la fonction de reproduction. La plupart de ces effets sont observés suite à l'exposition à des composés à activité œstrogénique comme le 17β- œstradiol (E2), le 17α-éthynilestradiol (EE2), le bisphénol A (BPA) ou encore le nonylphénol (NP). De par leur activité œstrogénique, ces molécules sont qualifiées de xénoestrogènes quand elles ne sont pas d'origine naturelle.

1.1.3. Mécanisme d'action des molécules œstrogénomimétiques

Dans le cas des perturbateurs endocriniens de type œstrogénomimétique, l'interaction se fait via les récepteurs aux œstrogènes. Ces composés peuvent soit être agonistes des récepteurs et ainsi avoir les mêmes effets que les hormones naturelles, ou au contraire, ils peuvent être antagonistes des récepteurs et les bloquer de manière compétitive ou non compétitive, et donc inhiber l'action des hormones naturelles.

Chez les vertébrés, il existe deux types de récepteurs aux œstrogènes : les récepteurs nucléaires et les récepteurs membranaires.

1.1.3.1. Les récepteurs nucléaires



Les récepteurs nucléaires, localisés dans le noyau cellulaire, possèdent tous une structure commune (Fig. 1). Comme la plupart des récepteurs nucléaires, ils sont composés de 6 régions, nommées de A à F. La partie N-terminale (région A/B) est la plus variable entre les espèces. Cette région porte la fonction d'activation AF1 qui permet l'activation constitutive du récepteur via une interaction ligand-dépendante. A la suite, se situe la région C, la plus conservée, dans laquelle est localisé le «DNA Binding Domain» (DBD). Ce domaine DBD comporte deux structures en doigt de zinc (une hélice alpha et un feuillet bêta dont des résidus histidine et/ou cystéine complexent un atome de Zn) et permet au récepteur d'interagir avec

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du récepteur nucléaire aux œstrogènes

une région spécifique de l'ADN correspondant à l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) (pour revue : Nelson et Habibi, 2013). Le rôle de la région D est mal connu et pourrait correspondre à un site d'interaction de corépresseur avec le récepteur aux œstrogènes (pour revue : Aranda et Pascual., 2001). La région E contient le «Ligand Binding Domaine» (LBD) qui est le site de fixation du ligand œstrogénique. On trouve dans cette région la fonction d'activation AF2, qui est responsable de l'activité de régulation de la transcription. En se fixant à son récepteur, l'œstrogène déclenche la translocation de l'ensemble dans le noyau, la fixation à l'élément de réponse et régule ainsi la transcription du gène cible. Le LBD est essentiel pour l'interaction du récepteur avec des protéines de choc thermique ainsi que des facteurs de régulation qui vont permettre la régulation de l'activité du récepteur. Enfin, la région F, qui correspond à la partie C-terminale, n'a pas de rôle connu (Pour revue : Nelson et Habibi, 2013)

Chez les mammifères, on distingue deux types de récepteurs aux œstrogènes : ESR1 (ERα) et ESR2 (ERβ), qui sont codés par deux gènes paralogues. La localisation de ESR1 est ubiquitaire, alors que ESR2 n'est exprimé principalement que dans les poumons, les ovaires et la prostate (Couse et al., 1997). Chez les poissons, il existe un troisième type de récepteur aux œstrogènes, mis en évidence pour la première fois chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*) (Hawkins et al., 2000). Aujourd'hui, la présence de trois types de récepteurs aux œstrogènes chez les Actinoptérygiens a été démontrée chez de nombreuses espèces. Ils sont dénommés ESR1 (ou ERα), ESR2a (ou ERβ1 ou encore ERGamma) et ESR2b (ou ERβ2) (Pour revue : Nelson et Habibi, 2013 ; Segner et al., 2013).

D'un point de vue phylogénétique, ESR1 est conservé chez les vertébrés et ESR2b montre beaucoup d'homologie de structure entre les actinoptérygiens et les mammifères. Alors que ESR2a possède de nombreuses variations dans la séquence d'amino-acides et

proviendrait de la duplication génomique spécifique des poissons téléostéens (Pour revue : Nelson et Habibi, 2013). A noter que chez la truite arc-en-ciel, un 4ème récepteur aux œstrogènes a été décrit (Erα-2) et il n'est pas exclu que d'autres espèces de téléostéens possèdent aussi ce 4ème récepteur (Nagler et al., 2007)

D'un point de vue fonctionnel, les œstrogènes traversent facilement la membrane cytoplasmique. Sans liaison à un œstrogène, ces récepteurs sont cytoplasmiques et associés à une protéine de choc thermique inhibitrice (Nelson et Habibi, 2013). Après liaison de l'œstrogène avec son récepteur, celui-ci va se diriger vers le noyau et agir comme facteur de transcription (Bondesson et al.,2015). Dès lors, le facteur de transcription va se fixer sur un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) en amont d'un gène et réguler la transcription de celui-ci, ou bien se lier avec un autre facteur de transcription. Ce nouveau complexe va alors se lier un autre élément de réponse et réguler la transcription des gènes (Nelson et Habibi, 2013 ; Klein et Flanagan, 2016) (Fig. 2).

1.1.3.2. Les récepteurs membranaires

Il y a un peu plus d'une dizaine d'années, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) inductible par les œstrogènes a été identifié chez les mammifères sur la membrane plasmique et nommé GPER (G protein-coupled estrogen receptor) ou GPR30 (Thomas et al., 2005 ; Revankar et al., 2005).

Chez la souris, ce récepteur a été localisé par immunohistochimie dans de nombreuses régions comme le cortex, l'hippocampe et l'hypothalamus (Brailoiu et al., 2007 ; Hazell et al., 2009). Ces récepteurs sont capables de lier les œstrogènes et cette liaison entraîne une réponse rapide au niveau cellulaire et la transcription de certains gènes. Cette activation passe par un mécanisme commun des récepteurs couplés aux protéines G, c'est-à-dire l'activation de l'adenylyl cyclase permettant la production AMPcyclique qui va activer le facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding protein) (pour revue : Borrow and Handa, 2017) (Fig. 2).

Cependant, le rôle exact de ces récepteurs reste assez hypothétique. Il a été montré chez les mammifères que les GPER sont impliqués dans la modulation de la reproduction et de la réponse immunitaire (Thomas, 2012 ; Cabas et al., 2013 ; Rodenas et al., 2016), de plus, leur expression cérébrale augmente après un stress important (Tian et al., 2013) suggérant un rôle des GPER dans la réponse au stress.

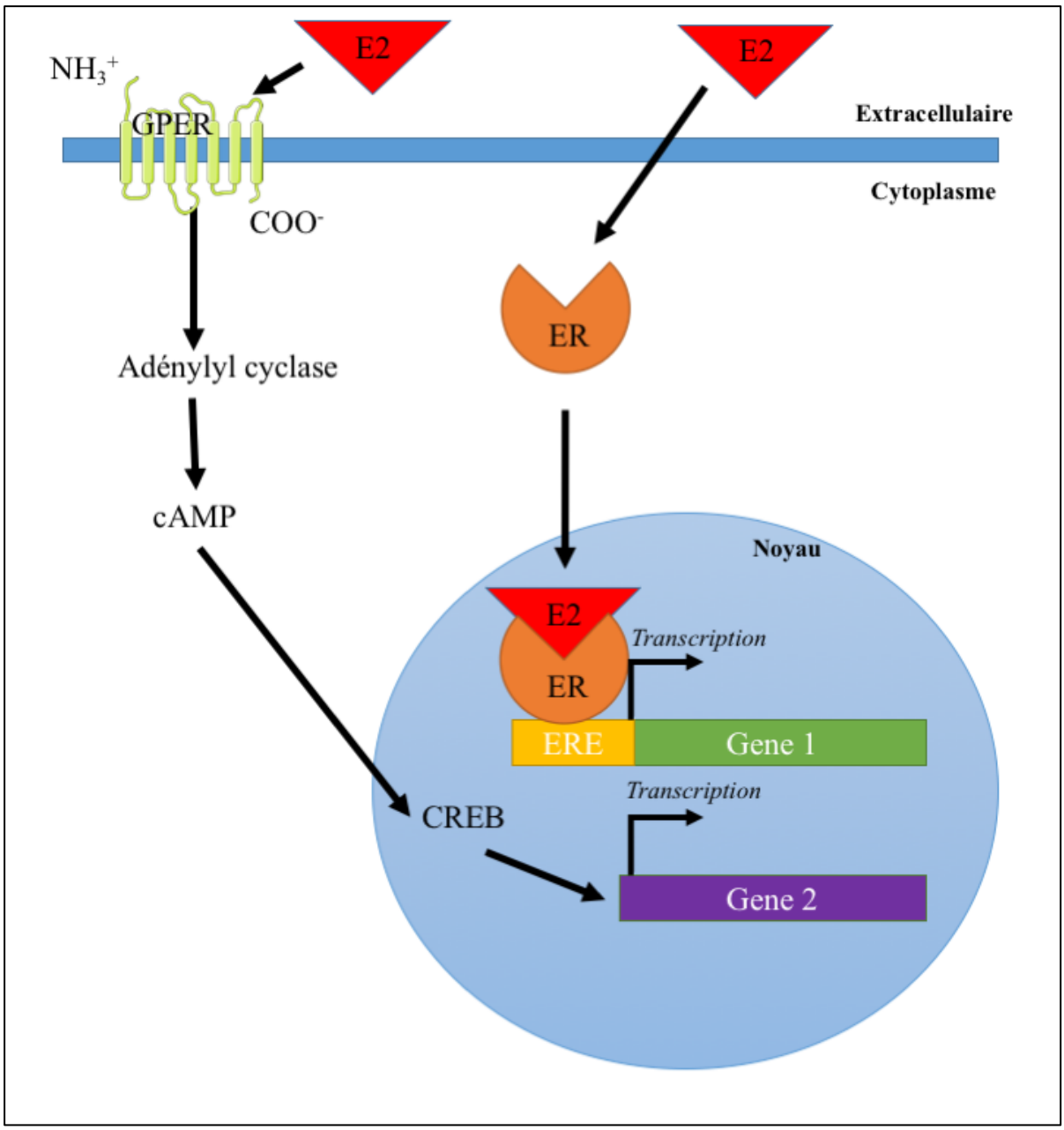


Figure 2 : Schéma des deux voies de régulation génique par les œstrogènes E2 : œstradiol, ER : Récepteur aux œstrogènes. ERE : Elément de réponse aux œstrogènes, GPER : Récepteur aux œstrogènes couplé à une protéine G ; cAMP : Adénosine Monophosphate Cyclique.

De récents travaux chez les téléostéens ont permis l'identification d'un second type de GPER (Cabas et al., 2013). Chez quelques téléostéens, comme l'anguille européenne, le tambour brésilien et le bar européen, deux gènes codants pour les GPER (*gpera* et *gperb*) ont été identifiés (Pang et al., 2008 ; Pinto et al., 2014 ; Lafont et al., 2016). Chez l'anguille européenne, la structure du gène *gpera* est une séquence de 1056 bp non interrompue. La structure du gène *gperb* est une séquence de 1062 bp et comporte également un exon unique.

La transcription de ces gènes et la traduction des messagers conduisent à la synthèse de polypeptides de, respectivement, 352 et 354 acides aminés (Lafont et al., 2016).

La structure du récepteur n'est pas précisément connue (Arnatt et Zhang, 2013), mais comme tous les RCPG, celui-ci est constitué de 7 domaines transmembranaires (Pinto et al., 2014 ; Lafont et al., 2016).

Par ailleurs, les 5 types de récepteurs aux œstrogènes (3 nucléaires et 2 membranaires) ne sont pas être exprimés partout de la même façon. Chez le bar européen, au niveau cérébral, ESR1 va principalement être impliqué dans l'axe gonadotrope et être exprimé dans les cellules à kisspeptines. Les récepteurs ESR2a et ESR2b vont avoir une répartition plus large et il semblerait que ceux-ci soient impliqués dans la régulation de fonctions neuronales (Halm et al., 2004 ; Muriach et al., 2008a ; 2008b). En ce qui concerne les GPER, *gpera* est restreint au cerveau et à l'hypophyse alors que *gperb* est exprimé dans différents tissus comme les branchies, les reins et les glandes surrénales (Pinto et al., 2014). Cette distribution suggère un rôle précis de chaque acteur au sein d'un tissu.

1.2. L'axe gonadotrope

La fonction de reproduction est un mécanisme essentiel pour la pérennité des espèces. Chez les vertébrés gnathostomes, la fonction de reproduction est assurée par l'axe gonadotrope. Celui-ci est composé de 3 organes : cerveau, hypophyse et gonades. La communication entre ces entités est assurée par des neuropeptides, neurohormones, et hormones qui vont agir de manière précise et permettre la régulation fine de la reproduction.

On appelle « axe gonadotrope » le système endocrinien contrôlant la fonction de reproduction chez les vertébrés. Celui-ci se compose de trois étages distincts, ayant chacun un rôle et des acteurs clefs dans la fonction de reproduction.

Au niveau cérébral, le siège de la fonction de reproduction se situe au niveau de l'hypothalamus. Là, deux acteurs principaux ont été décrits comme clefs de la reproduction et de la maturation sexuelle chez les organismes :

- Les gonadolibérines (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH), découvertes depuis les années 1970 et dont le rôle dans la fonction de reproduction a largement été étudiée (Kah et al., 2007)
- Les kisspeptines (Kiss), découvertes à la fin des années 1990 et dont le rôle dans la fonction de reproduction a été établi au début des année 2000 (Lee et al.,1996 ; De Roux et al., 2003 ; Seminara et al., 2003).

Les kisspeptines ont été identifiées comme jouant également un rôle dans la reproduction et plus particulièrement dans l'initiation de la puberté. Ce neuropeptide, initialement découvert chez les mammifères, est présent chez tous les vertébrés et les téléostéens possèdent deux types de kisspeptines. En plus de stimuler la synthèse et la libération des GnRH, les kisspeptines stimulent directement la libération des gonadotropines au niveau hypophysaire (pour revue : Oakley et al., 2009).

Les gonadolibérines (GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone) sont les acteurs majeurs contrôlant la fonction de reproduction. Leur rôle dans la reproduction est bien connu et décrit chez de nombreuses espèces depuis plusieurs décennies. Aujourd'hui, depuis leur découverte, de nombreux variants de la GnRH ont été décrits chez différentes espèces. Tous les gnathostomes possèdent entre 2 et 3 de ses variants, mais généralement, seulement un seul va avoir une action sur la libération des hormones hypophysaires (rôle hypophysiotrope) alors que l'autre a un rôle de neuromodulation et d'intégration des stimuli biotiques et abiotiques (pour revue : Kah et al., 2007).

En tandem avec l'hypothalamus, l'hypophyse est le second organe régulant la fonction de reproduction. On parle de système hypothalamo-hypophysaire permettant d'intégrer les facteurs externes (photopériode, température …) et internes (signaux hormonaux). Au niveau hypophysaire, la biosynthèse et la libération des gonadotropines sont régulées par les GnRH principalement, mais aussi par les kisspeptines. Chez les gnathostomes, il existe deux types de gonadotropines : l'hormone lutéinisante (LH, Luteinizing Hormone) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH, Follicle Stimulating Hormone). Ces hormones sont des hétérodimères, constitués d'une sous-unité commune (sous-unité GTHα) et d'une sous-unité spécifique (sous-unité LHβ ou FSHβ) (pour revue : Chedrese, 2009).

Enfin, au niveau des gonades, les gonadotropines activent la stéroïdogenèse et la gamétogenèse. Il va y avoir, d'une part la production des gamètes mâles et femelles, essentielle dans l'étape finale de la reproduction, et d'autre part, la production de stéroïdes

sexuels (androgènes, œstrogènes et progestérone) qui vont permettre d'exercer un rétrocontrôle sur les composantes cérébrales et hypophysaires et ainsi assurer le fonctionnement de l'axe gonadotrope. (pour revue : McLachlan, 2000 ; Driancourt et al., 2001). Les peptides gonadiques contribuent également au rétrocontrôle au niveau hypophysaire. Ces molécules non stéroïdiennes, l'activine, l'inhibine et la follistatine régulent directement la libération des hormones gonadotropes au niveau de l'hypophyse. L'activine a une action stimulatrice (Ling et al., 1986 ; Carrol et al., 1989) alors que la follistatine et l'inhibine sont inhibitrices (follistatine : Robertson et al., 1987 ; Ueno et al., 1987 ; Inhibine Carrol et al., 1987). Les activines et les inhibines agissent au niveau de récepteurs spécifiques (Atissano et Wrana, 1998, Gray et al., 2001) alors que les follistatines bloquent les activines et neutralisent leur action en empêchant la liaison au récepteur (De Winter et al., 1996)

Dans cette partie, nous présenterons uniquement les principaux acteurs de l'axe gonadotrope au niveau cérébral et hypophysaire.

1.2.1. Les acteurs cérébraux principaux

1.2.1.1. Les kisspeptines

Les kisspeptines ont, pour la première fois, été décrites en 1996 pour leur propriété anti-métastatique (Lee et al., 1996). En 2001, le récepteur orphelin GPR54 a été identifié comme récepteur de la kisspeptine chez l'Homme et le rat ; sa détection dans de nombreux tissus (cerveau, hypophyse, pancréas, foie, moelle épinière) a conduit à suggérer des rôles additionnels aux kisspeptines (Kotani et al., 2001).

Le rôle central des kisspeptines et de leur récepteur dans la fonction de reproduction a été mis en évidence en 2003 (De Roux et al., 2003). Les auteurs ont étudiés une cohorte familliale, dont les individus présentait un hypogonadisme hypognodotrope isolé (absence de développement des caractères sexuels secondaires). Or, en 2003, ils ont montré que ces symptomes étaient dûs à une mutation du gène codant pour le récepteur GPR54 (nommé aujourd'hui *kiss1r)* conduisant à la production d'une protéine non fonctionnelle. Ces observations ont été confirmées la même année chez des souris présentant les mêmes symptômes (Seminara et al., 2003). Dès lors, les investigations sur le «système kisspeptine» et son implication dans le contrôle de la puberté et la reproduction se sont multipliées chez l'ensemble des vertébrés (pour revue : Oakley et al., 2009 ; Mechaly et al., 2013).

Chez les téléostéens, les premières descriptions des kisspeptines ont été faites chez les organismes modèles que sont le poisson-zèbre (*Danio rerio*) et le médaka (*Oryzias latipes*).

Chez ces espèces, deux gènes paralogues codant pour deux protéines distinctes ont été décrits et nommés *kiss1* et *kiss2* (Kanda et al., 2008 ; Kitahashi et al., 2009). Par la suite, de nombreuses études se sont intéressées aux gènes codant pour les kisspeptines chez différents téléostéens, et à ce jour, les séquences d'ARNm codant pour Kiss1 ou Kiss2 ont été décrites chez 65 espèces de téléostéens (NCBI, le 07 juillet 2019)

1.2.1.1.1. Structure des kisspeptines

1.2.1.1.1.1. Chez les mammifères

Les kisspeptines sont codées chez l'Homme par le gène *KISS1* porté par le chromosome 1. Ce gène *KISS1* est composé de 4 exons et 3 introns. L'expression de ce gène produit un ARNm de 438 pb, résultant de la transcription partielle des exons III et IV (West et al., 1998).

Chez la souris, des études ont évoqué la possibilité de l'existence de variant d'épissage pour le gène *KISS1*, mais cela reste incertain et dépendrait du tissu et du stade de développement (Stafford et al., 2002 ; Lapatto et al., 2007 ; Mechaly et al., 2011).

La traduction de l'ARNm conduit à la production d'une pré-pro-hormone de 145 acides aminés qui est par la suite clivée en une prohormone de 54 acides aminés (Fig. 3). Cette prohormone est active, mais plusieurs études suggèrent qu'elle serait instable et donc secondairement clivée en 3 peptides : kisspeptine-10, kisspeptine-13 et kisspeptine-14 (West et al., 1998, Kotani et al., 2001, Oakley et al., 2009).

Parmi les produits de ce clivage, la Kisspeptine-10 est uniquement composée par la séquence «core». La comparaison de cette séquence «core» entre différentes espèces de vertébrés a montré un haut niveau de conservation (YNW/LNSFGLRY/F) alors que le reste de la séquence montre une faible conservation, confirmant l'importance de cette séquence dans la fixation au récepteur (Kotani et al., 2001 ; Ohtaki et al, 2001).

Les kisspeptines appartiennent à la famille des peptides RF-Amide. Les kisspeptines -10, -13, -14 et -54 présentent toutes un motif RFamide en C-terminal (Arg – Phe – NH2) et une séquence «core» hautement conservée. Elles possèdent toutes la même affinité avec le récepteur Kiss1R. Cependant, la répartition de ces peptides est différente dans les tissus

suggérant des rôles secondaires spécifiques à chacune des formes, mais qui n'ont, pour le moment, pas été décrits (Kotani et al., 2001).

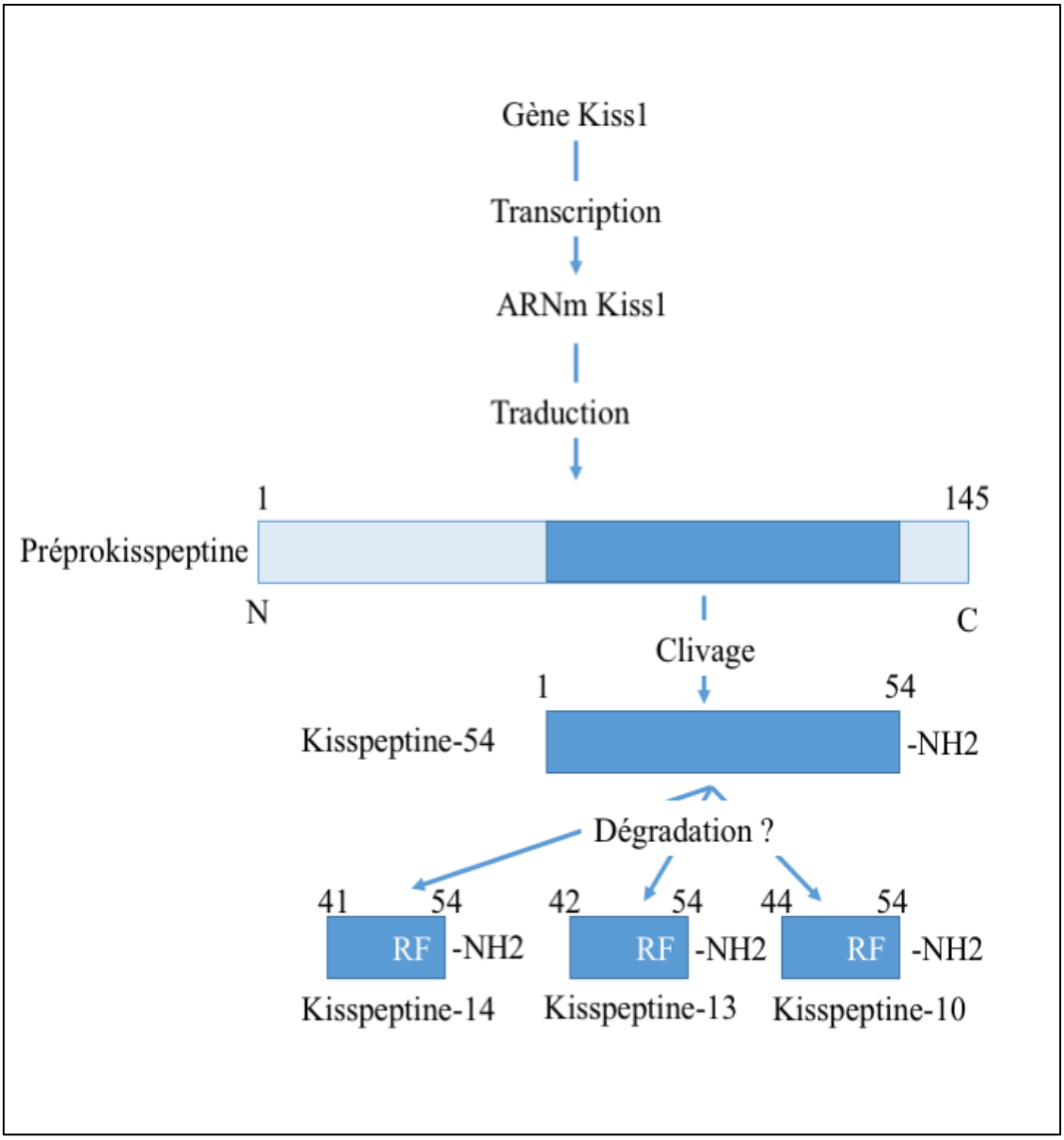


Figure 3 : Schéma de production des kisspeptines. L'ARNm codé par *Kiss1* conduit à la biosynthèse d'un précurseur de 145 aa qui est clivé en Kisspeptine-54. Le clivage/dégradation de ce dernier génère les Kisspeptines-10, -13 et -14 qui recouvrent les portions de 10, 13 et 14 aa N-terminales RF-amidées du polypeptide de 54 aa.

1.2.1.1.1.2. Chez les téléostéens

Chez les téléostéens, deux gènes paralogues, *kiss1* et *kiss 2* ont été décrits. Chez le médaka, le gène *kiss1* est comporte 4 exons et 3 introns. Toutefois, le premier exon n'est

jamais traduit et, classiquement, on considère que ce gène est composé de 3 exons et 2 introns. La séquence transcrite fait 392 bp (Kanda et al., 2008). La traduction de *kiss1* donne une pré-pro-hormone de 145 acides aminés similaire celle observée chez les mammifères (Kanda et al., 2008) (Fig. 4).

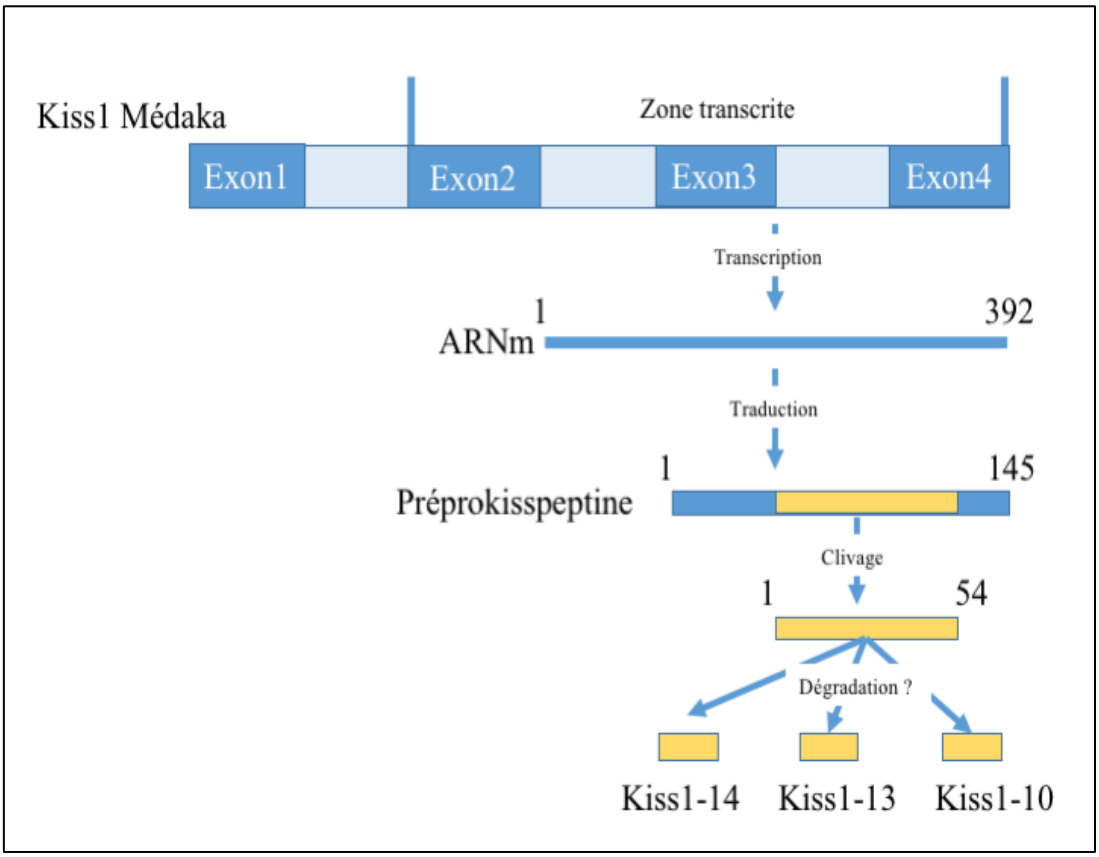


Figure 4 : Structure génique et peptidique de la kisspeptine 1 chez le médaka.

L'étude de la structure du gène *kiss2* chez la sole (*Solea senegalensis*) (Mechaly et al., 2011) et chez le médaka (Kitahashi et al., 2009) a montré que celui-ci était composé de 2 exons et 1 intron. Contrairement à *kiss1*, la présence de variant d'épissage de *kiss2* a aussi été rapportée chez la sole, produisant une protéine fonctionnelle dans un cas, et une protéine non fonctionnelle dans l'autre cas (Mechaly et al., 2011).

Chez le médaka, la transcription du gène *kiss2* produit un ARNm de 378 bp et, chez la sole, un ARNm de 390 bp (Kitahashi et al., 2009 ; Mechaly et al., 2011). Après traduction de ces ARNm, la séquence d'acides aminés compte respectivement 145 aa chez le médaka mais ne présente que 129 aa chez la sole. Celui-ci sera par la suite scindé en deux peptides de 51 (Kp51) et 78 (Kp78) acides aminés. Les 10 derniers acides aminés de Kp78 correspondent au peptide Kp70, responsable de l'activation du récepteur Kiss2R. Cependant, les étapes de clivage entre Kp78 et Kp10 sont inconnues, puisque aucun site de clivage n'a été trouvé sur la séquence (pour revue : Mechaly et al., 2013). (Fig. 5)

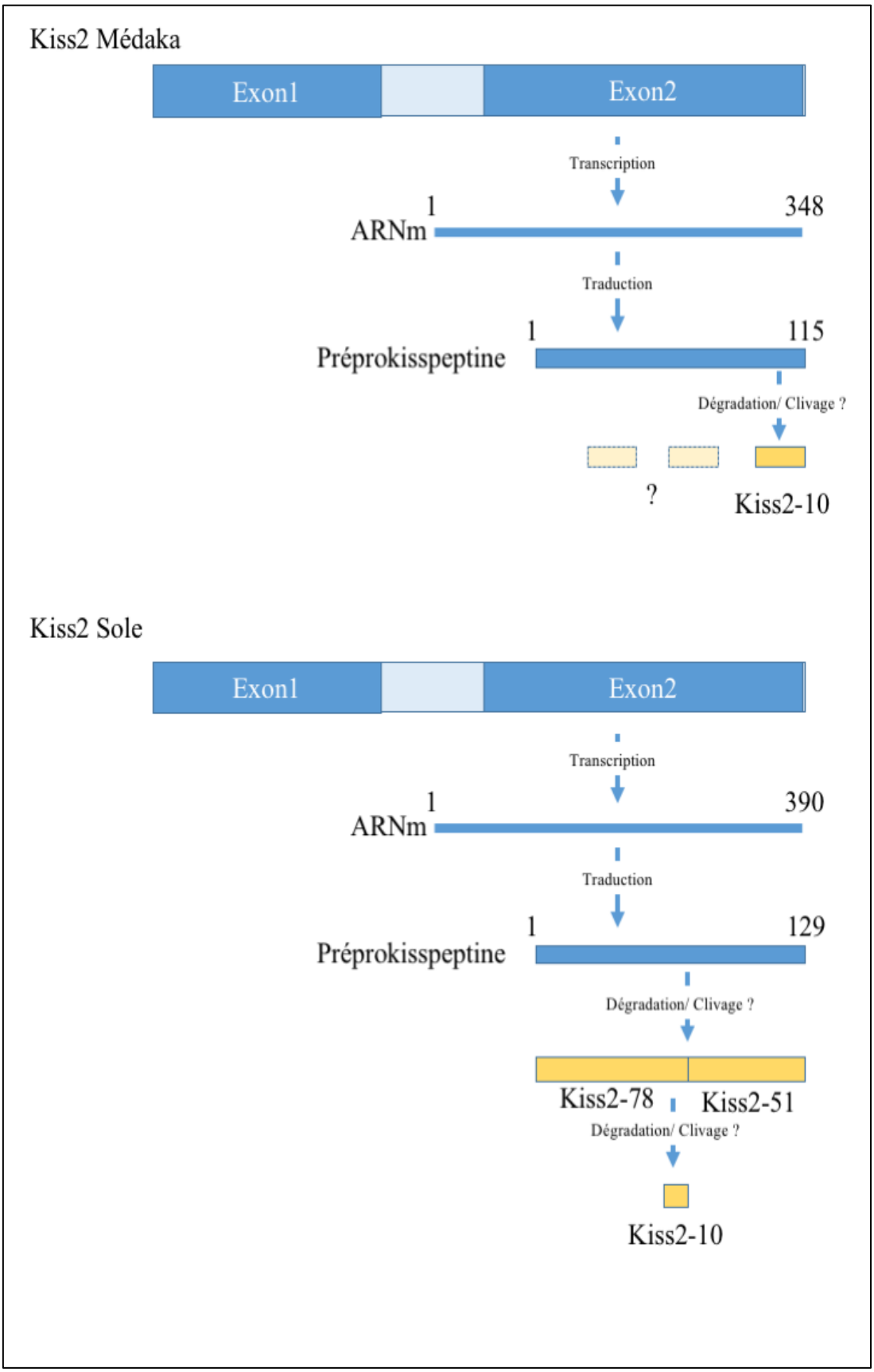


Figure 5: Structure génique et peptidique de kisspeptine 2 chez deux espèces de téléostéens.

De nombreuses espèces de téléostéens possèdent les deux gènes *kiss1* et *kiss2*. Toutefois, certaines espèces comme l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), le fugu (*Takifugu rubripes*), le tétraodon (*Tetraodon nigroviridis*), ont perdu secondairement le gène *kiss1* et n'expriment que le gène *kiss2* (pour revue : Mechaly et al., 2013).

1.2.1.1.2. Fonction des kisspeptines

Les kisspeptines agissent sur les cellules cibles via un récepteur couplé à une protéine G appartenant à la famille des rhodopsines, Kissr (anciennement nommé GPR54) (Fig. 6). Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires vont, une fois activés par la kisspeptine, entraîner une cascade de réactions intracellulaires. Les travaux de recherche ont permis de proposer différentes voies de signalisation intracellulaires du récepteur kissr. Une des voies de signalisation bien caractérisée chez les mammifères fait intervenir une protéine Gq/11 qui, libérée, va activer la phospholipase C. Ceci va générer la production de l'inositol triphosphate (IP_3) et de diacylglycerol (DAG) à partir du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) entrainant l'activation de la protéine kinase C (PKC), l'ouverture et la fermeture de canaux membranaires, et la mobilisation du calcium intracellulaire. (Pour revue : Oakley et al., 2009 ; Cvetković et al, 2013).

Chez les mammifères, le système « kisspeptine » fait intervenir deux acteurs : KISS1 et KISS1R. En revanche, chez les autres vertébrés, le système est plus complexe et peut faire intervenir plus de deux acteurs : jusque 3 gènes à kisspeptine (kiss 1, kiss2 et kiss3) chez le xénope ou le cœlacanthe et jusque 4 gènes kissr (kissr-1, kissr-2, kissr-3 et kissr-4) chez le cœlacanthe et le lépisosté (Pasquier et al., 2012b).

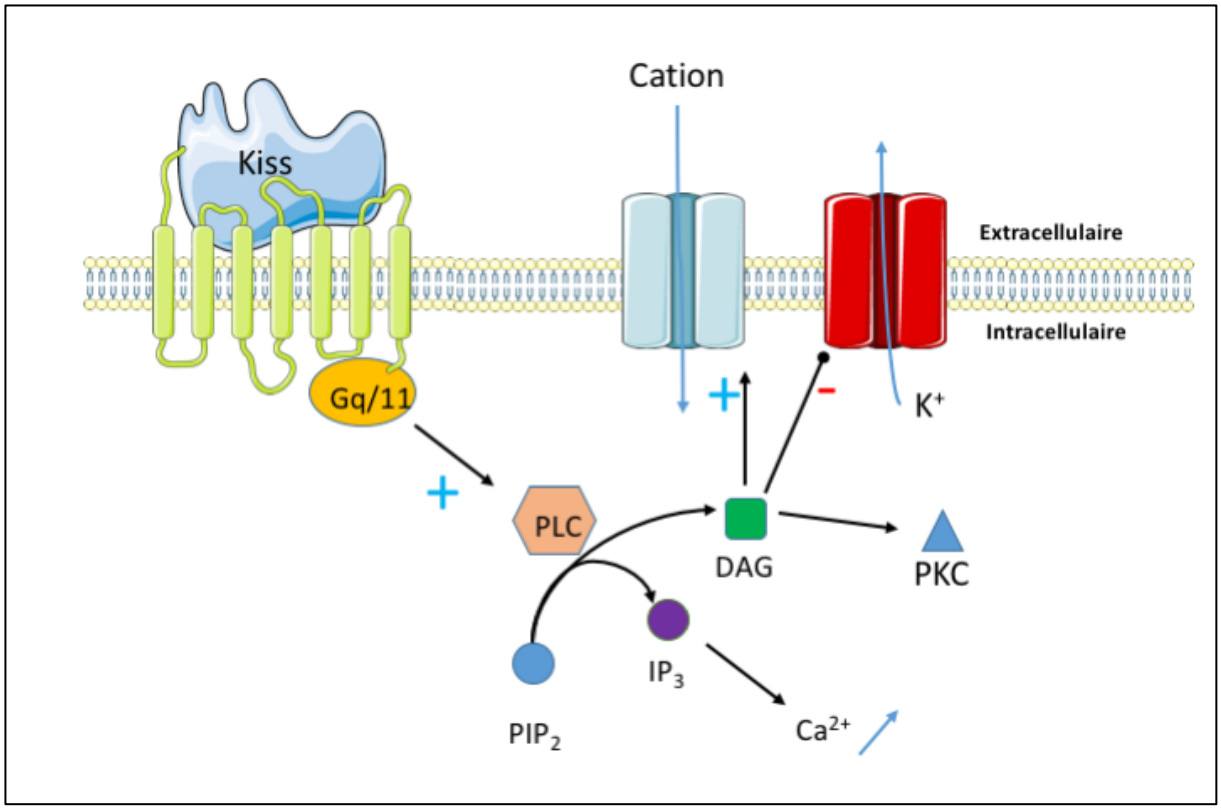


Figure 6 : Voies de signalisation du récepteur KISS1R. Une voie G-protéine dépendante conduit à l'activation de la Phospholipase C et à la production de l'inositol triphosphate (IP_3) et du diacylglycerol (DAG) aboutissant à l'activation d'une protéine Kinase C (PKC) et l'activation de canaux cation et la fermeture des canaux K^+. (D'après Oakley et al., 2009)

1.2.1.1.2.1. Chez les mammifères

Chez les mammifères, de nombreux travaux réalisés ces dernières années ont montré l'implication des kisspeptines dans différentes fonctions biologiques.

Les kisspeptines ont d'abord été caractérisées par leurs capacités anti-métastatiques, l'ADNc KISS-1 a été isolé des cellules de mélanomes (Lee et al., 1996). Les études suivantes ont confirmé les capacités du gène *KISS-1* à réduire le potentiel métastatique des cellules cancéreuses transfectées (Lee et al., 1996, Lee and Welch, 1997). Depuis, cette activité antimétastatique des kisspeptines a été identifiée dans les cellules de nombreux cancers (mélanome, cancers thyroïdien, ovarien, vessie, gastrique, œsophagien, pancréatique, pulmonaire, et hypophysaire). Les produits du gène *KISS-1* agiraient en diminuant la mobilité des cellules cancéreuses et leur pouvoir invasif (pour revue : Cvetkovic et al, 2013).

Des études montrent également l'implication du système kisspeptine dans les processus de tumorigenèse. En effet, pour les cancers du sein ou les carcinomes hépatiques,

une surexpression de KISS-1 et de son récepteur est observée et corrélée avec la progression de la maladie (Ikeguchi et al, 2003 ; Cvetkovic et al, 2013).

En 2003, pour la première fois, le rôle des kisspeptines a été relié à la fonction de reproduction. En effet, il a été montré que l'hypogonadisme hypogonadotrope isolé (absence de développement des caractères sexuels secondaires) chez l'Homme était lié à une mutation du gène *kiss1r* codant pour le récepteur de la kisspeptine. Ces patients souffrent d'une absence de développement des organes sexuels secondaires et d'une stérilité liée à une absence de puberté. La fonction des kisspeptines dans l'initiation de la puberté a été confirmée chez les souris présentant une mutation de *kiss1r* qui provoque les mêmes symptômes que les patients atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope isolé (De Roux et al., 2003 ; Seminara et al., 2003).

Dès lors, le rôle des kisspeptines dans la fonction de reproduction a été intensément étudié. Rapidement, il a été montré de manière concomitante chez différentes espèces de mammifères qu'au moment de la puberté, l'expression de *kiss1* et de *kiss1r* est accrue (Oakley et al., 2009). L'augmentation des kisspeptines peut être reliée à celle des pulses de GnRH et à l'accroissement de la libération des gonadotropines qui initient la puberté chez les mammifères (pour revue : Kauffman et Smith, 2013). Par exemple chez le rat, au moment de la puberté, l'expression de *kiss1* augmente (Navarro et al., 2004). Chez la souris, le nombre de neurones à kisspeptine dans le noyau antéro-ventral périventriculaire (AVPV) croît depuis la naissance jusqu'à la puberté (Clarkson et al., 2009), mais c'est seulement au moment de la puberté que le nombre de projection sur les neurones à GnRH augmente (Clarkson et Herbison, 2006). Au moment de la puberté chez la souris, la sensibilité des neurones à GnRH augmente en passant de 25% chez la souris juvénile à 45% chez la souris prépubère et à 90% chez la souris adulte (Han et al., 2005). Par ailleurs, quelques études supportent l'idée que l'initiation de la puberté, passant par les kisspeptines, serait œstrogèno-dépendante (Clarkson et Herbison, 2006). L'absence de neurones à kisspeptine chez les souris ayant un déficit en aromatase (souris ARKO) supporte cette hypothèse (Smith et al., 2005 ; Gottsch et al., 2009).
L'implication des kisspeptines dans la fonction de reproduction passe par l'effet des kisspeptines sur les neurones à GnRH. Nous avons vu que chez la souris, le nombre de projection sur les neurones à GnRH augmente (Clarkson et Herbison, 2006). La localisation en immunohistochimie a montré que la majorité des neurones à GnRH expriment KISS1R. De plus, chez la souris, les axones des neurones à kisspeptine sont localisés aux abords des neurones à GnRH. Enfin, il a été montré *in vitro* que l'ajout de kisspeptine provoquait la

dépolarisation de la membrane plasmique et la libération de GnRH (Messager et al., 2005 ; Colledge, 2009).

En plus des rôles anti-métastatiques et dans la reproduction, d'autres rôles des kisspeptines sont suggérés. La présence des récepteurs KISS1R dans différents tissus comme l'hippocampe ou l'amygdale a déjà été démontrée. La fonction précise des kisspeptines dans ces régions cérébrales est mal connue, mais elle semblerait jouer un rôle dans la communication neuronale, incluant la cognition ou la neurogenèse (Arai et al., 2005 ; Kauffman et al., 2007 ; Arai, 2009). De plus, *KISS1* est exprimé très tôt au niveau cérébral au cours du développement embryonnaire chez le rat où les neurones à kisspeptine sont localisés par hybridation *in situ* à 12 jours de développement embryonnaire (Desrozier et al., 2012). Cette expression précoce a conduit Franceschini et Desroziers (2013) à suggérer un rôle des kisspeptines dans la migration neuronale.

Ce rôle dans la migration et la prolifération cellulaire a également été montré sur les cellules trophoblastiques. En effet, *in vivo*, au premier trimestre de la grossesse, l'expression de *kiss1* était très importante au niveau des cellules trophoblastiques et, *in vitro*, la kisspeptine inhibe la migration et l'invasion par les cellules trophoblastiques, mais ne semble pas affecter leur prolifération (Bilban et al., 2004 ; Hiden et al., 2007). Ce rôle de kisspeptines dans la répression de l'invasion cellulaire peut être comparé à son rôle anti métastatique, mais qui, dans ce cas, permet la placentation normale.

Le rôle des kisspeptines dans d'autres axes endocriniens a également été montré. Chez le fœtus, kisspeptine stimule la production d'aldostérone (Nakamura et al., 2007), chez la souris et l'Homme, KISS1 et son récepteur ont été localisés au niveau des cellules bêta des îlots pancréatiques, où KISS1 exercerait une action autocrine et stimulerait la libération d'insuline (Hauge-Evans et al., 2006).

Enfin, la présence de KISS1R dans le système vasculaire a été observée chez l'Homme. Au niveau de portions aortiques, d'artères coronaires et de veine ombilicale, cultivées *in vitro,* les kisspeptines vont avoir un rôle vasoconstricteur et présenter un effet sur la résistance vasculaire. L'effet des kisspeptines sur la vasoconstriction est tout aussi fort que celui observé avec l'angiotensine (Mead et al., 2007).

1.2.1.1.2.2. Chez les téléostéens

Chez les téléostéens, une grande partie des travaux s'intéressant aux kisspeptines se sont focalisés sur leur rôle dans le contrôle de la reproduction et sur les acteurs de l'axe gonadotrope. En culture cellulaire, il a été montré que les cellules adenohypophysaire d'anguille européenne mises en présence de KISS1 (humaine) ont une expression moins importante de *lhβ* que les cultures non exposées (Pasquier et al., 2011)

L'injection de kisspeptine a permis d'étudier *in vivo* les effets sur la régulation des acteurs cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope. Chez le poisson-zèbre, des injections intrapéritonéales provoquent une augmentation de l'expression des sous-unités LHβ et FSHβ dans l'hypophyse (Kitahashi et al., 2009). Chez le bar européen prépubère, l'injection intramusculaire de Kiss1 et Kiss2 provoque une augmentation des concentrations plasmatiques en LH et FSH, avec une meilleure efficacité pour Kiss2 (Felip et al., 2009), ainsi qu'une augmentation de l'expression de *gnrh1* (Espigares et al., 2015). Chez cette espèce, *kiss1* est directement exprimé dans l'hypophyse au niveau des cellules gonadotropes (Escobar et al., 2013a) et est présent à la membrane des neurones à GnRH (Zmora et al., 2012)

Chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), l'injection de kisspeptines induit la libération de nombreuses hormones hypophysaires : LH, Prolactine, Hormone de croissance (Yang et al., 2010). Enfin, l'injection intrapéritonéale de Kiss2 chez le mérou à tâches oranges (*Epinephelus coioides*) induit l'expression de *gnrh3* ainsi que l'expression du récepteur *kissr1* (Shi et al., 2010).

De manière artificielle, chez la sériole (*Seriola lalandi*), l'administration de kisspeptines (Kiss1-10 et kiss2-10) stimule chez le mâle prépubère le développement des gonades. En parallèle, l'expression de *lhβ* et *fshβ* augmente suite à l'injection, confirmant ainsi le rôle stimulant des kisspeptines sur la libération des gonadotropines (Nacillado et al., 2013). De même chez *Morone sp.*, en exposant par injection péritonéale à la kisspeptine, le développement des gonades est accéléré. De plus, chez le mâle, l'exposition à Kiss2 augmente le poids des gonades, alors que chez la femelle, il semblerait que ce soit Kiss1 qui soit responsable de l'augmentation du poids des ovaires (Beck et al., 2012). Cela suggère que Kiss1 et Kiss2 ont des fonctions différentes chez le mâle ou la femelle.

Ces résultats indiquent que, chez les téléostéens, les kisspeptines exercent un contrôle sur l'expression des acteurs de l'axe gonadotrope. De plus, l'injection de kisspeptine stimule le développement des gonades ce qui suggère un rôle clef des kisspeptines au moment de la puberté.

En effet, chez le méné tête de boule (*Pimephales promeleas*), l'injection de Kiss1 d'origine murine au cours de la puberté induit une augmentation de l'expression de *gnrh1* et de *kissr1* (Filby et al., 2008). Par ailleurs, chez *Morone sp.*, l'injection de Kiss1 et Kiss2 à différents stades de maturation sexuelle est capable de médier l'initiation de la puberté (Beck et al., 2012).

En condition naturelle chez le tilapia, durant la puberté, les cellules à GnRH expriment à leur surface les KissR2, qui persistent ensuite chez l'adulte (Parhar et al., 2004). Chez le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*), au moment de la différenciation des gonades un accroissement d'expression de *kiss1* et de *kiss2* est mesuré, suivi par une diminution de l'expression de *kiss2* alors que *kiss1* ne varie pas, ce qui suggère que les deux types de kisspeptines interviennent au moment de la puberté, mais que seul Kiss1 a un rôle dans la reproduction (Selvaraj et al., 2015). Chez le poisson-zèbre et chez le médaka, l'expression de *kiss1* et *kiss2* augmente durant toute la période larvaire jusqu'à la différenciation sexuelle qui a lieu autour de 45 jours post fécondation. Puis, comme chez le maquereau, l'expression de *kiss2* diminue alors que celle de *kiss1* reste stable (Kitahashi et al., 2009). Chez le cobia, Park et ses collaborateurs (2012) rapporte une augmentation de l'expression de *kiss2* autour de la 13ème semaine après l'éclosion, ce qui correspond à la période de différenciation sexuelle chez cette espèce.

Ces résultats suggèrent un rôle important de Kiss2 dans l'initiation de la puberté chez les téléostéens et indiquent également que, comme chez les mammifères, la puberté chez les téléostéens est initiée par les kisspeptines.

De plus, chez les téléostéens, l'expression des kisspeptines varie en fonction de la saison et de l'état reproducteur de l'individu. Ainsi chez le bar, le fugu et chez le maquereau, l'activité des neurones à kisspeptine varie en fonction du statut reproducteur de l'individu (maquereau : Selvaraj et al., 2010 ; Fugu : Ando et al., 2018 ; bar européen : Migaud et al., 2008). Chez le bar européen mâle adulte, Migaud et al (2012) ont montré que le profil d'expression des kisspeptines variait au cours de l'année avec un pic d'expression de *kiss1* durant la période de reproduction. Par ailleurs, il a été montré une corrélation entre l'expression des kisspeptines et l'expression des acteurs de l'axe gonadotrope (*gnrh1*, *lhβ* et *fshβ*). Chez le fugu, l'expression de *kiss2* augmente au moment de la reproduction (Ando et al., 2018). Chez le maquereau espagnol, de la même manière, il a été montré que l'expression cérébrale de *kiss1* augmentait durant les phases de spermatogenèse et de vitellogenèse (Selvaraj et al., 2010).

Ces résultats montrent qu'en plus de son rôle dans l'initiation de la puberté, l'expression des kisspeptines varie au cours du cycle de reproduction, permettant ainsi son contrôle.

1.2.1.1.3. Origine et localisation des neurones à kisspeptine

1.2.1.1.3.1. Chez les mammifères

Le nombre et la répartition des neurones à KISS1 varient d'une part en fonction du sexe, mais aussi de l'espèce. Chez les muridés, une seule population de neurones a été localisée le long du troisième ventricule, dans l'aire rostrale préoptique du troisième ventricule (Franceschini et al., 2006) alors que chez les brebis, ces neurones apparaissent comme parsemés dans l'aire préoptique (Lehman et al., 2010). Chez la souris, le nombre de neurones à kisspeptine est plus important chez les femelles que chez les mâles (Iijima et al.2011 ; Desroziers et al. 2012), bien que cette différence ne soit pas vraie chez toutes les espèces (Smith et al. 2005 ; Clarkson and Herbison, 2006).

L'hybridation *in situ* a également permis de localiser les neurones exprimant les récepteurs aux kisspeptines. Chez le rat et la souris, l'expression du récepteur a été confirmée dans les neurones à GnRH1 ainsi que dans les différentes zones de l'hypothalamus, dans l'hippocampe et dans la matière grise périaqueducale (Irwig et al., 2004 ; Herbison et al., 2010). Les analyses en immunohistochimie confirment ces résultats en montrant que les neurones à kisspeptine projettent vers différentes zones de l'hypothalamus, mais aussi en dehors de celui-ci. Ces analyses ont également montré que les axones de neurones à kisspeptine établissaient un contact étroit avec les neurones à GnRH1 (Clarkson et Herbison, 2006 ; Ramaswamy et al., 2008)

Peu d'études se sont intéressées à l'origine ontogénique de ces neurones. Néanmoins, quelques données existent chez le rat et la souris, où ces neurones ont été détectés au cours du développement embryonnaire par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, et localisés au niveau du noyau arqué (Desroziers et al., 2012 ; Kumar et al., 2014). Cependant, l'origine précise de ces neurones n'est pas connue pour le moment.

1.2.1.1.3.2. Chez les téléostéens

Comme il a été dit précédemment, la situation chez les téléostéens va varier en fonction des espèces, avec la présence d'un ou de deux gènes codant pour les kisspeptines, Kiss1 et Kiss2. La description des localisations cérébrales des cellules exprimant *kiss1* et/ou *kiss2* a été réalisée chez plusieurs espèces.

Concernant le gène *kiss1,* différentes études ont montré son expression dans des neurones localisés au niveau d'une région dorsale du diencéphale, dans l'habenula (pour revue : Ogawa et Parhar, 2013). Chez le médaka, certains perciformes (bar européen et *Morone sp.)*, ou certains cyprinidés, une seconde population de neurones à Kiss1 a été observée au niveau de l'hypothalamus (Kanda et al., 2008 ; Servili et al., 2011 ; Zmora et al., 2012 ; Escobar et al., 2013a). La cartographie des neurones producteurs de kiss1 et l'étude de leurs projections ont pu être réalisées sur le poisson-zèbre grâce au développement d'anticorps spécifiques. Chez cette espèce, les neurones à Kiss1 localisés dans l'habénula, émettent des projections vers la partie basale des noyaux du raphé et vers les noyaux interpédonculaires (Servili et al, 2011).

Concernant les neurones exprimant le gène *kiss2*, une seule population de neurones a été localisée dans l'hypothalamus, mais un certain degré de variation existe dans la localisation en fonction des espèces. Chez le médaka, ces neurones sont retrouvés dans la partie dorsale de l'hypothalamus, au niveau périventriculaire ; alors que chez le poisson-zèbre et le poisson rouge, cette population est observée sur une zone plus large avec des neurones également localisés au niveau de l'aire préoptique (Pour revue : Ogawa et Parhar, 2013). Chez le bar européen, ces neurones ont été localisés uniquement au niveau de l'aire préoptique. Cependant, chez cette espèce, d'autres populations, dont le nombre de cellules varie en fonction de la période de reproduction, ont également été décrites à différents endroits de l'hypothalamus (recessus latéral, hypothalamus ventral) (Escobar et al., 2013a, 2013b).

Comme précédemment pour l'étude des neurones producteurs de Kiss1, des anticorps spécifiques ont été développés pour l'étude de Kiss2. Ces travaux montrent que les neurones à Kiss2 projettent dans différentes zones cérébrales : subpallium, thalamus, aire préoptique, habenula et les parties ventrales et caudales de l'hypothalamus (Servili et al., 2011). Chez le bar européen, la génération d'anticorps contre la préprokiss2 a permis de montrer que les neurones à Kiss2 projettent vers les mêmes structures cérébrales que chez le poisson-zèbre,

mais qu'en plus, ils projettent également vers les tectums optiques, *le torus* semicircularis et la neurohypophyse (Escobar et al., 2013a).

Concernant l'origine des neurones à kisspeptine, les données actuelles ne répondent pas encore à cette question. Les études menées jusqu'alors ont néanmoins permis de mettre en évidence, par des méthodes de PCR ou PCR quantitatives, une expression précoce des kisspeptines chez un certain nombre d'espèces (maquereau :Selvaraj et al., 2015 ; Tilapia : Park et al., 2012 ; médaka : Hodne et al., 2013 ; poisson-zèbre : Zhao et al., 2014). Chez le médaka, par exemple, l'expression de *kiss1* et *kiss2* a été mesurée au cours du développement embryonnaire. Les transcrits de *kiss1* et *kiss2* sont détectés dès la fécondation indiquant une transmission maternelle de ceux-ci, puis le relais est pris par l'embryon lui-même avec une expression des deux transcrits tout au long du développement embryonnaire (Hodne et al., 2013).

1.2.1.2. Les gonadolibérines

Dans les années 1970, un acteur majeur régulant la fonction de reproduction a été décrite chez les mammifères. Isolée à partir d'hypothalamus de porc et de mouton, cette hormone a initialement été nommée LHRH (LH Releasing Hormone), en rapport avec son effet sur la libération de l'hormone lutéinisante (LH), cette neurohormone est aujourd'hui connue sous le nom de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) du fait de son action sur la libération de LH ainsi que FSH au niveau hypophysaire (Amoss et al., 1971 ; Matsuo et al., 1971 ; Schally et al., 1971).

Rapidement après sa découverte, la génération d'anticorps a permis de décrire l'organisation cérébrale du système à GnRH chez le cochon d'inde. Ces observations ont permis de localiser les neurones à GnRH au niveau de l'éminence médiane et de l'aire préoptique dans l'hypothalamus (Barry et Dubois, 1974).

Cette hormone est un décapeptide présent chez tous les vertébrés et à ce jour, 18 variants de la GnRH ont été décrits chez les vertébrés dont 9 sont présents chez les poissons téléostéens (Tab. 2) (Chang et Pemberton, 2017). Au fur et à mesure de leurs découvertes, ces variants ont été nommés en fonction de l'espèce ou du groupe phylogénétique chez qui ils ont été décrits la première fois. Aujourd'hui, l'analyse phylogénétique de ces variants a permis de les regrouper en trois classes : GnRH1, GnRH2 et GnRH3 (White et al., 1998).

Tableau 2 : Séquence peptidique des 18 variants de la GnRH présents chez les vertébrés. Les acides aminés différents de la séquence LHRH sont marqué en rouge. * : variantes de GnRH des téléostéens. D'après Chang et Pemberton, 2018

Type	**Nom**	**Séquence**										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GnRH1	*mammalia/LHRH*	pQ	H	W	S	Y	G	L	R	P	G-NH2	*
	Guinea Pig	pQ	Y	W	S	Y	G	V	R	P	G-NH2	
	Chicken-I	pQ	H	W	S	Y	G	L	Q	P	G-NH2	
	Frog	pQ	H	W	S	Y	G	L	W	P	G-NH2	
	Sea Bream	pQ	H	W	S	Y	G	L	S	P	G-NH2	*
	Pejerrey/Medaka	pQ	H	W	S	F	G	L	S	P	G-NH2	*
	Herring	pQ	H	W	S	H	G	L	S	P	G-NH2	*
	Catfish	pQ	H	W	S	H	G	L	N	P	G-NH2	*
	Whitefish	pQ	H	W	S	Y	G	M	N	P	G-NH2	*
	Stickleback	pQ	H	W	S	Y	G	L	N	P	G-NH2	*
	Cœlacanth	pQ	Y	W	S	Y	D	L	R	P	G-NH2	
	Elephant Shark	pQ	H	W	S	I	D	N	R	P	-	
GnRH2	*Chicken-II*	pQ	H	W	S	H	G	W	Y	P	G-NH2	*
	Lamprey-II	pQ	H	W	S	H	G	W	F	P	G-NH2	
GnRH3	*Salmon*	pQ	H	W	S	Y	G	W	L	P	G-NH2	*
	Dogfish	pQ	H	W	S	H	G	W	L	P	G-NH2	
	Lamprey-I	pQ	H	W	S	L	E	W	K	P	G-NH2	
	Lamprey-III	pQ	H	W	S	H	G	W	K	P	G-NH2	

Chez les téléostéens, la GnRH a été isolée pour la première fois chez le saumon kéta (*Oncorhynchus keta*) et nommée sGnRH (salmonGnRH); cette hormone est aujourd'hui nommé GnRH3 (Sherwood et al, 1983). Depuis, différentes études ont montré que les téléostéens possèdent entre deux et trois variants de GnRH (pour revue Kah et al., 2007) mais ont en commun, au même titre que tous les gnathostomes, la chicken GnRH-II (cGnRH-II ou GnRH2) (pour revue Kah et al., 2007).

Chez beaucoup de téléostéens, la GnRH1 va avoir un rôle hypophysiotrope et agir sur la libération des hormones gonadotropes. Cependant, certaines espèces de téléostéens comme

le poisson-zèbre ne possèdent que 2 isoformes de la GnRH. Dans ce cas, la GnRH3 va posséder la fonction hypophysiotrope (Spicer et al., 2016).

1.2.1.2.1. Structure

Tous les gènes codant pour les différentes GnRH possèdent une base commune. Celui-ci se compose de 4 exons et de 3 introns. Dans la région 5', le premier exon n'est pas transcrit. Le second exon code pour différents peptides : un peptide signal permettant le transfert de la protéine dans le réticulum endoplasmique ; le décapeptide de la GnRH ; un site de clivage protéolytique (GKR) ; la région amino-terminale du peptide associé à la GnRH (GAP, GnRH-associated peptide). Le troisième et quatrième exons vont coder la partie centrale et carboxy-terminale du GAP. Enfin, la partie 3' du quatrième exon n'est pas traduite.

L'analyse de la structure des gènes a montré que ceux-ci dérivent d'un même gène ancestral qui s'est dupliqué au cours des deux duplications génomiques qui sont à la base de l'évolution des vertébrés. Chez différentes espèces de vertébrés, la GnRH1 et la GnRH2 sont retrouvées ce qui prouve l'origine ancienne de ces deux gènes (Pour revue : Tostivint., 2011), même si la GnRH1 est perdue secondairement chez certains téléostéens (Zohar et al., 2010).

Pendant longtemps, on a pensé que la GnRH3, propre aux téléostéens, était apparue à partir de la duplication de GnRH1 au cours de la troisième duplication génomique à la base du phylum des téléostéens (pour revue : Kah et al., 2007 ; Zohar et al, 2010). Or, de récentes données montrent dans le génome du xénope, le diamant mandarin (Aves) ou encore le poulet, une séquence semblable à celle de *gnrh3*, ce qui indique que la GnRH3 serait apparue au cours des deux premières duplications, mais aurait uniquement persisté chez les téléostéens (pour revue : Tostivint, 2011).

Par ailleurs, en toute logique, si au moins trois gènes des GnRH étaient présents chez l'ancêtre des non-téléostéens et des téléostéens, 6 copies du gène auraient dû être générées chez ces derniers au cours de la 3ème duplication génomique. Or, à ce jour, aucun de ces paralogues n'a été retrouvé chez les téléostéens ou dans les génomes (pour revue : Tostivint, 2011)

A partir de l'ARNm initial, une préprohormone, nommée prépro-GnRH est synthétisée. Elle est composée d'un peptide signal, d'un peptide biologiquement actif (GnRH), d'un tripeptide de clivage et d'un peptide associé, le GAP. Après clivage du peptide

signal et de la séquence GAP, l'hormone correspondant à un décapeptide est générée (Seeburg et Adelman, 1984).

Chez les mammifères, la GnRH est libérée de manière pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. C'est en se fixant au niveau d'un récepteur à sept domaines transmembranaires (GnRH-R) dans l'adénohypophyse, qu'elle va exercer une régulation sur les cellules gonadotropes en contrôlant la biosynthèse et la libération des gonadotropines (LH et FSH) (Counis et al., 2005).

Chez les téléostéens, le système diffère quelque peu. Il n'y a pas de système porte hypothalamo-hypophysaire chez les téléostéens. Des études neuroanatomiques réalisées chez le poisson rouge ont montré une innervation directe de l'adénohypophyse par les neurones à GnRH (Anglade et al, 1993). Les neurohormones sont donc libérées directement au contact des cellules cibles possédant des récepteurs à GnRH.

1.2.1.2.2. Fonction des gonadolibérines

1.2.1.2.2.1. Chez les mammifères

Les mammifères possèdent deux variantes de GnRH, les GnRH1 et GnRH2. La GnRH2 est commune à tous les vertébrés, exceptés quelques rongeurs mais son rôle reste assez incertain (Kah et al., 2007). La GnRH de type 1, a une action hypophysiotrope. Cette GnRH va induire la libération des gonadotropines hypophysaires en se fixant à un récepteur (Way et al., 2010). Elle est libérée de manière pulsatile avec une fréquence qui varie au cours du cycle. La variation de la fréquence et de l'amplitude des pulses va permettre le contrôle de la synthèse et de la libération de l'une ou l'autre des gonadotropines (FSH répondant à des fréquences lentes de GnRH, et LH répondant à des fréquences élevées de GnRH) (Knobil, 1980 ; Wildt et al., 1981).

La GnRH exerce son action via un récepteur à sept domaines transmembranaires (GnRH-R) qui a été cloné en premier lieu chez la souris (Reinhart et al., 1992 ; Tsutsumi et al., 1992). Chez les vertébrés, deux types de récepteurs ont été décrits (Kah et al., 2007). Le récepteur de type I caractérisé par l'absence de «queue» cytoplasmique en partie C-terminale. A l'inverse, le récepteur de type II possède une «queue» cytoplasmique en partie C-terminale (pour revue : Kah et al., 2007).

1.2.1.2.2.2. Chez les téléostéens

Les téléostéens possèdent entre 2 et 3 variants de GnRH. La GnRH2, commune à tous les vertébrés est exprimée en région mésencéphalique (pour revue : Kah et al., 2007). Chez les téléostéens, quelques études nous renseignent sur le rôle de ce peptide. En effet, il a été montré par immunohistochimie et traçage rétrograde que les neurones à GnRH2 projetaient vers la glande pinéale et pouvait ainsi moduler l'activité de celle-ci (Servili et al., 2010). De plus, chez le poisson rouge, des injections de GnRH2 vont, à faible dose, induire la ponte et, à forte dose, l'inhiber, amenant les auteurs à suggérer une participation de la GnRH2 dans la modulation de la reproduction (Volkoff et Peter, 1999).
La GnRH1 est la forme hypophysiotrope quand elle est présente. En effet, cette forme peut être absente chez certains téléostéens, et dans ce cas, c'est la forme GnRH3 qui va jouer ce rôle.

Hormis son action hypophysiotrope chez certaines espèces, la GnRH3 a un rôle encore mal défini. Chez le bar européen, des études immunohistochimiques ont montré que les neurones à GnRH3 émettaient des projections vers de nombreuses aires cérébrales suggérant un rôle de neuromodulateur pour cette forme (Gonzalez-Martinez et al. 2001, Gonzalez-Martinez et al. 2002a, Zmora et al. 2002).

De nombreux variantes de GnRH-R ont été identifiés chez les téléostéens. Ainsi, on trouve deux récepteurs chez le poisson rouge (Illing et al. 1999), trois chez le tilapia (Parhar et al. 2005) et le médaka (Okubo et al. 2003), quatre chez le poisson-zèbre (Tello et al. 2008) et jusqu'à cinq GnRH-R ont été clonés chez le bar européen (Moncaut et al. 2005). Ces récepteurs sont tous de type II et possèdent donc une queue cytoplasmique à l'extrémité C-terminale (Kah et al., 2007).

1.2.1.2.3. Origine et localisation

Depuis leur découverte par les équipes de Schally et Guillemin dans les années 70, de nombreuses études se sont intéressées à la description neuroanatomique des cellules productrices de GnRH. Trois populations distinctes de neurones à GnRH ont été décrites dans le cerveau des vertébrés : «the forebrain population (GnRH1), the midbrain tegmentum population (GnRH2), and the hypothalamic-preoptic area region subset that expresses teleost fish-specific GnRH3 » (Fig. 7).

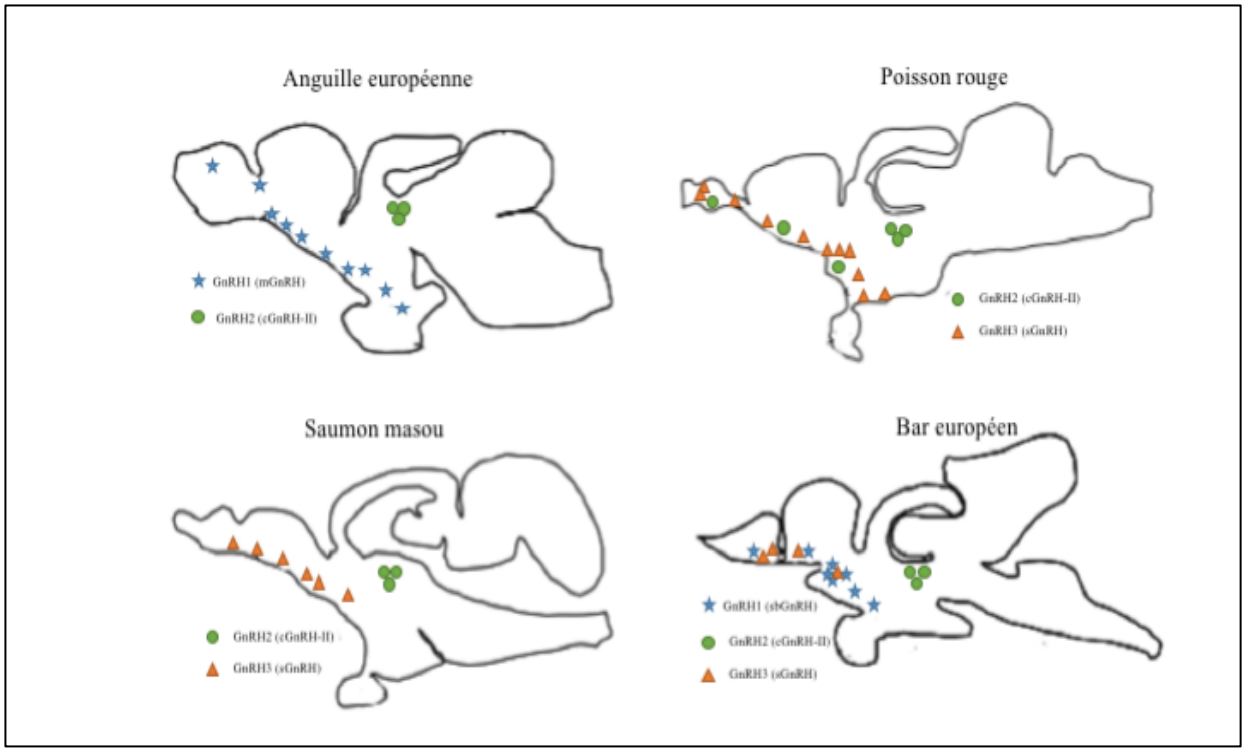


Figure 7 : Coupes schématiques de cerveaux illustrant la localisation comparée des différentes populations de neurones à GnRH chez plusieurs espèces de poissons. D'après Léthimonier et al., 2004

1.2.1.2.3.1. Origine mésencéphalique de la GnRH2

Les neurones exprimant la GnRH2 ont été localisés au niveau du synencéphale chez de nombreuses espèces de vertébrés (pour revue : Kah et al., 2007).

Plusieurs études menées dans différents taxa montrent toutes que les neurones exprimant la GnRH2 ont une origine cérébrale. Chez les téléostéens, ceux-ci apparaissent au niveau du primordium synencéphalique, à la transition entre le diencéphale et le mésencéphale (bar européen : Gonzales-Martinez et al., 2002b ; poisson-zèbre : Palevitch et al., 2007 ; Cichlidés : Pandolfi et al., 2002 ; Pour revue : Lethimonier al., 2004 ; Zohar et al., 2010).

Toutefois, une étude chez la dorade (*Sparus aurata*) et chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) décrit une seconde population de neurones à GnRH2 dans le rhombencéphale dans les premiers jours suivant la fécondation. Rapidement, cette seconde population disparaît et uniquement la population mésencéphalique persiste (Wong et al., 2004).

Chez le poisson-zèbre, cette zone située sous le troisième ventricule est décrite comme étant neurogène et hautement proliférative. D'autres zones localisées dans le rhombencéphale

sont aussi neurogènes et prolifératives (Kaslin et al., 2008). Il semble logique que les populations de GnRH2 apparaissent dans ces zones de neurogenèse. Cependant, la subsistance uniquement de la population mésencéphalique demeure inexpliquée.

1.2.1.2.3.2. Origine extra cérébrale des GnRH1 et GnRH3

Les neurones exprimant la GnRH1 et la GnRH3 ont une origine extra-cérébrale. Les premières cellules exprimant ces neurohormones sont détectées au niveau des placodes olfactives.

La GnRH1 étant présente chez les mammifères, celle-ci a largement été étudiée. Les cellules sont localisées, chez les adultes, au niveau de l'aire préoptique et projettent vers l'éminence médiane (pour revue : Kah et al., 2007). Chez la souris, lors du développement embryonnaire, les cellules exprimant la GnRH1 vont migrer à l'intérieur du cerveau, le long du nerf terminal, pour atteindre, premièrement le télencéphale puis l'aire préoptique et l'hypothalamus. Ces neurones projettent ensuite leurs axones vers l'éminence médiane afin de rejoindre le système porte hypothalamo-hypophysaire, où la GnRH va être libérée et rejoindre l'hypophyse (pour revue : Kaprara et Huhtaniemi, 2018).

Les téléostéens possèdent une ou deux isoformes de la GnRH, la GnRH1 et le GnRH3, en plus de la GnRH2, les GnRH1 et GnRH3 ont une origine commune dans les placodes olfactives et les populations cellulaires exprimant ces isoformes sont localisées dans les bulbes olfactifs, la partie ventrale du télencéphale et, bien sûr, l'aire préoptique et la partie médio-basale de l'hypothalamus. En l'absence de système porte hypothalamo-hypophysaire, les neurones hypophysiotropes projettent directement vers l'hypophyse, à proximité des cellules gonadotropes (pour revue : Kah et al., 2007 ; Anglade et al., 1993). Chez les téléostéens, la migration des neurones à GnRH1 est semblable à celle décrite chez les mammifères. Les cellules originaires des placodes olfactives migrent en suivant le trajet du nerf terminal et prennent place dans l'hypothalamus (Zohar et al., 2010).

L'origine des neurones produisant la GnRH3 est similaire à la GnRH1. Les travaux visant à étudier l'ontogenèse des neurones à GnRH3 ont été menés uniquement chez les téléostéens, car il s'agit du seul clade à posséder cette troisième variante. Les différentes études menées chez les téléostéens ont montré l'expression bien plus précoce de la GnRH3 comparée à la GnRH1 (Gonzales-Martinez et al., 2002b). Les neurones sont très tôt détectés

dans les placodes olfactives, puis, au cours du développement, migrent dans le cerveau en suivant le trajet du nerf terminal et finissent leur migration dans l'aire préoptique. L'origine commune de ces neurones avec les neurones à GnRH1 renforce l'hypothèse d'une relation phylogénétique proche et que la GnRH3 résulterait de la seconde duplication du génome (2R). De plus, la présence des trois formes de GnRH chez les Elasmobranches étaille cette hypothèse (pour revue : Gaillard et al., 2018). D'autre part, chez les espèces de téléostéens ne possédant pas de GnRH1, la GnRH3 va projeter vers l'hypophyse et remplir la fonction hypophysiotrope (Kah et al., 2007, Zohar et al., 2010). (Fig. 7)

1.2.1.3. Les autres facteurs de régulation de l'axe gonadotrope

En réalité, la régulation de l'axe gonadotrope au niveau cérébral peut être vue comme une arborescence avec les GnRHs qui occupent une place centrale, et, autour des celles-ci, différents facteurs de régulation vont avoir une action inhibitrice ou excitatrice des neurones à GnRH ou des cellules hypophysaires.

Nous allons nous intéresser ici particulièrement au cas des téléostéens, chez qui de nombreux peptides/neuropeptides ou neurotransmetteurs ont été décrits comme agissant sur la régulation de l'axe gonadotrope. Ces différents acteurs sont résumés sur la figure 8.

Autour des GnRH, il existe d'autres neurones de types gabaergiques, peptidergiques et aminergiques qui jouent également un rôle majeur dans la transmission de l'information aux neurones à GnRH. Des études menées chez le poisson rouge ont montré que l'injection de GABA ou de dopamine entraînait des effets sur la libération des gonadotropines. Par ailleurs, la libération du GABA, de ces neuropeptides ou amines est stimulée par les œstrogènes (Trudeau et al., 1993 ; Peng et al., 1994).

Parmi les neurotransmetteurs ayant un effet sur l'expression des GnRH, certains, comme la dopamine, vont avoir un effet inhibiteur sur leur libération. Chez le poisson rouge (*C. auratus*), des études ont montré que l'exposition *in vitro* et l'injection de dopamine inhibent la libération des GnRH au niveau hypothalamique (via le récepteur D1 et D2) et également la libération des gonadotropines au niveau de l'hypophyse (via le récepteur D2) (Yu et Peter, 1990 ; Yu et Peter, 1992). Les mêmes observations ont été faites également chez un cichlidé (*Astatotilapia burtoni*), où l'injection de dopamine inhibe la libération de la GnRH1 (Bryant et al., 2016). En outre, la dopamine peut inhiber directement la libération des gonadotropines au niveau hypophysaire. Chez l'anguille européenne, l'inhibition se fait via le

récepteur D2 et l'exposition *in vitro* des cellules hypophysaires à la dopamine a montré une activation de ce récepteur et une inhibition de la libération de la FSH (Jolly et al., 2016). La dopamine inhibe également l'action de certains facteurs considérés comme excitateurs tels que le GABA (Trudeau, 1997).

Plus récemment, un autre peptide, nommé GnIH (Gonadotropin Inhibiting Hormone) a été décrit comme exerçant un rôle majeur dans l'inhibition de l'expression des GnRH. Initialement décrit comme inhibiteur de la libération des gonadotropines au niveau hypophysaire, son action s'exerce aussi au niveau des neurones à GnRH de l'hypothalamus (Tsutsui et al., 2010). Chez les téléostéens, les neurones exprimant la GnIH sont principalement localisés au niveau du *nucleus posterioris periventricularis* dans l'hypothalamus et projettent vers l'hypophyse, ainsi que dans différentes aires cérébrales. Chez le bar européen, d'autres populations de neurones exprimant la GnIH ont été localisées dans les bulbes olfactifs, la partie ventrale du télencéphale, le mésencéphale et dans le rhombencéphale. Chez les téléostéens, entre 1 et 3 isoformes de GnIH ont été purifiées et possèdent des effets soit excitateurs ou inhibiteurs sur la libération des GnRH ou des gonadotropines. Chez le bar européen (*D. labrax*), deux isoformes sont décrites et toutes deux inhibent l'expression de la GnRH1, des deux kisspeptines, et la libération des gonadotropines (Paullada-Salmeron et al., 2016a ; 2016b). A contrario chez le tilapia, la GnIH stimule la libération des gonadotropines (Biran et al., 2014). Ce qui montre encore des systèmes complexes variant d'une espèce de téléostéen à l'autre (pour revue : Munoz-Cueto et al., 2017).

La mélatonine est une neurohormone sécrétée au niveau de la glande pinéale durant les périodes nocturnes et, depuis peu, son action sur la fonction de reproduction a été étudiée. Il a été montré que chez le fugu (*Takifugu alboplumbeus*), l'effet de saison, de la durée du jour et des rythmes lunaires ont un rôle sur la rythmicité du cycle de reproduction. Chez cette espèce, l'injection de mélatonine, stimule d'une part l'expression de *kiss2* et de son récepteur, mais aussi l'expression de *gnih* et de son récepteur (pour revue : Ando et al., 2018). Chez le bar européen, les effets de la mélatonine sont similaires et illustrent l'effet du système mélatoninergique sur l'inhibition du système GnRH et l'importance de ce système dans l'activation de la reproduction chez le bar européen (Servili et al., 2013). Néanmoins, la régulation fine et la collaboration entre ces systèmes nécessitent encore d'être analysés, mais il semblerait que les variations de concentration de mélatonine, dépendant de la durée du jour, jouent un rôle dans l'activation/l'inhibition du système GnRH, que ce soit directement ou indirectement.

Chez les téléostéens, de nombreuses études ont montré que la noradrénaline stimule la libération de la LH au niveau hypophysaire en agissant directement au niveau des neurones à GnRH de l'hypothalamus en stimulant la libération de GnRH (Chang et al., 1991 ; Yu et al., 1991 ; Linard et al., 1992 ; Yu et Peter, 1992).

Des études chez le poisson rouge (*C. auratus*) et la dorade japonaise (*Pagrus major*) ont montré que la sérotonine agit de la même façon et stimule la sécrétion des GnRH via les récepteurs 5-HT2 (Yu et al., 1991 ; Senthilkumaran et al., 2001).

L'acide γ-aminobutyrique (GABA) a aussi été décrit comme stimulateur de la libération des GnRH et des gonadotropines chez plusieurs espèces de téléostéens. Chez le poisson rouge (*C. auratus*) et la dorade japonaise (*P. major*) l'injection de GABA provoque la libération de GnRH au niveau hypothalamique (Kah et al., 1992 ; Senthikulmaranet al., 2001). En outre, chez la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*), le GABA stimule la sécrétion des gonadotropines (Mananos et al., 1999). De plus, l'expression de GABA est sensible aux stéroïdes sexuels. Chez le poisson rouge, des injections de testostérone et de progestérone inhibent la production de GABA alors que l'œstrogène stimule son expression (Trudeau et al., 1993).

Toujours au niveau cérébral, le neuropeptide Y (NPY) est depuis longtemps connu un acteur important dans la régulation de l'expression des gonadotropines. Chez le poisson rouge (*C. auratus*), l'injection de NPY stimule la libération de LH. Il agit aussi bien au niveau hypophysaire, qu'au niveau hypothalamique sur les cellules à GnRH (Peng et al., 1993). Des observations similaires ont été faites chez la dorade japonaise (*P. major*), où le NPY stimule la libération de GnRH (Senthikulmaran et al., 2001). De même que pour le GABA, la stimulation stéroïdienne jour un rôle dans l'expression de NPY. Comme montré chez le poisson rouge (*C. auratus*), l'injection de testostérone ou d'œstradiol induit l'augmentation de l'expression de NPY au niveau hypothalamique (Peng et al., 1994).

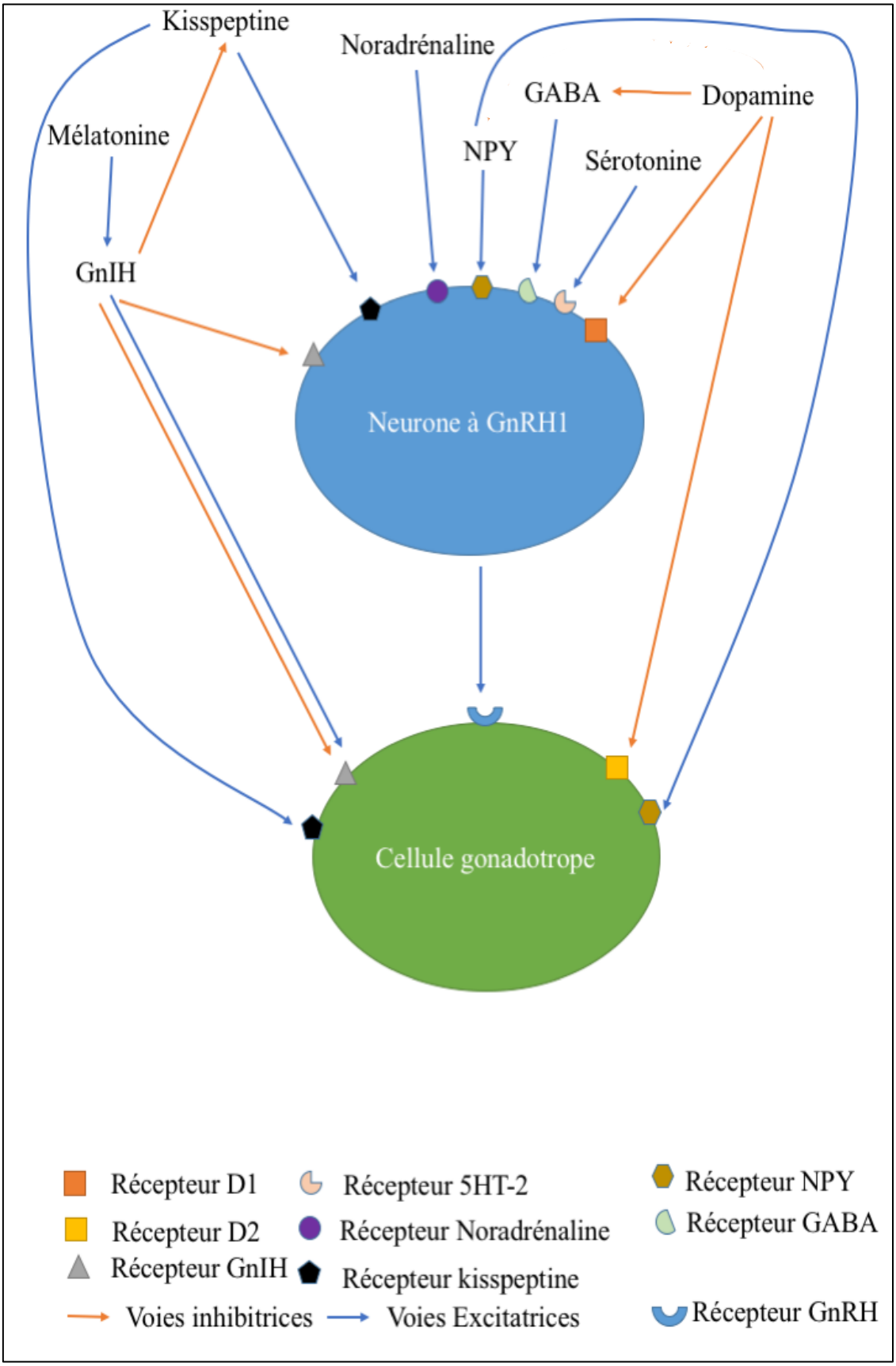


Figure 8 : Schéma des différents acteurs interagissant avec les neurones à GnRH et les cellules gonadotropes.

Plus connus pour leur rôle dans le métabolisme, de nombreux peptides ont une action inhibitrice ou excitatrice sur l'axe gonadotrope (Fig. 9).

L'orexine et la nesfatine sont des neuropeptides produits au niveau de l'hypothalamus des vertébrés. Ils ont un rôle inhibiteur sur la régulation de l'expression des GnRH et la libération des gonadotropines. Deux formes moléculaires de l'orexine, provenant du même précurseur ont été décrits chez les vertébrés : l'orexine A et l'orexine B. Chez les mammifères, l'orexine stimule la sécrétion de GnRH. Chez les téléostéens, ce rôle a aussi été étudié. Chez le poisson rouge (*C. auratus*), l'administration d'orexine inhibe la ponte et diminue l'expression de la GnRH2. De plus, l'orexine A et B ont été localisées au niveau hypophysaire chez certains téléostéens, suggérant une potentielle action de l'orexine au niveau de la libération des gonadotropines. La nesfatine est un peptide non modifié décrit en 2006. Chez les mammifères, l'injection de nesfatine entraîne la sécrétion de LH chez le rat. Tout comme l'orexine, l'effet de la nesfatine chez les téléostéens est inverse à ce qui est observé chez les mammifères. Chez le poisson rouge (*C. auratus*), l'injection de nesfatine entraîne une diminution de LH dans le plasma ainsi qu'une diminution de l'expression de *gnrh2, lhβ* et *fshβ* (pour revue : Shahjahan et al., 2014) (Fig. 9).

De nombreux autres peptides ayant un rôle métabolique vont avoir une action stimulatrice de l'axe gonadotrope.

Le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), isolé chez différentes espèces de vertébrés, est un peptide anorexigène. Son rôle sur la régulation de la fonction de reproduction a été étudié chez plusieurs espèces de téléostéen. Chez le poisson rouge (*C. auratus*) l'injection de PACAP provoque la libération de LH. Chez le tilapia et la femelle gourami, le PACAP augmente l'expression des sous-unités *gth* et *fshβ*. L'action sur l'axe gonadotrope de la galanine, un peptide orexigène, a été premièrement montrée chez les mammifères, où de nombreux axones des neurones à galanine projettent vers les GnRH. Le récepteur de la galanine (Gal-R1) a été localisé au niveau des cellules à GnRH et les expositions *in vitro* provoquent chez le rat la libération de GnRH. Chez les téléostéens, aucune étude n'a pour le moment montré l'effet de la galanine sur l'axe gonadotrope, mais les études immunohistochimiques ont montré la projection des axones, des neurones à galanine dans l'hypophyse, à proximité des cellules productrices des gonadotropines. Chez les mammifères, la MCH (Melanin-Concentrating Hormone) provoque la libération de LH. De plus, l'expression du récepteur à la MCH dans les cellules à GnRH et l'apposition des axones des neurones produisant la MCH avec les neurones à GnRH suggère également un rôle sur l'expression et la libération des GnRH. Chez les téléostéens, l'action de la MCH sur la

libération de la LH a été observée chez le poisson rouge (*C. auratus*) (pour revue : Shahjahan et al., 2014) (Fig. 9).

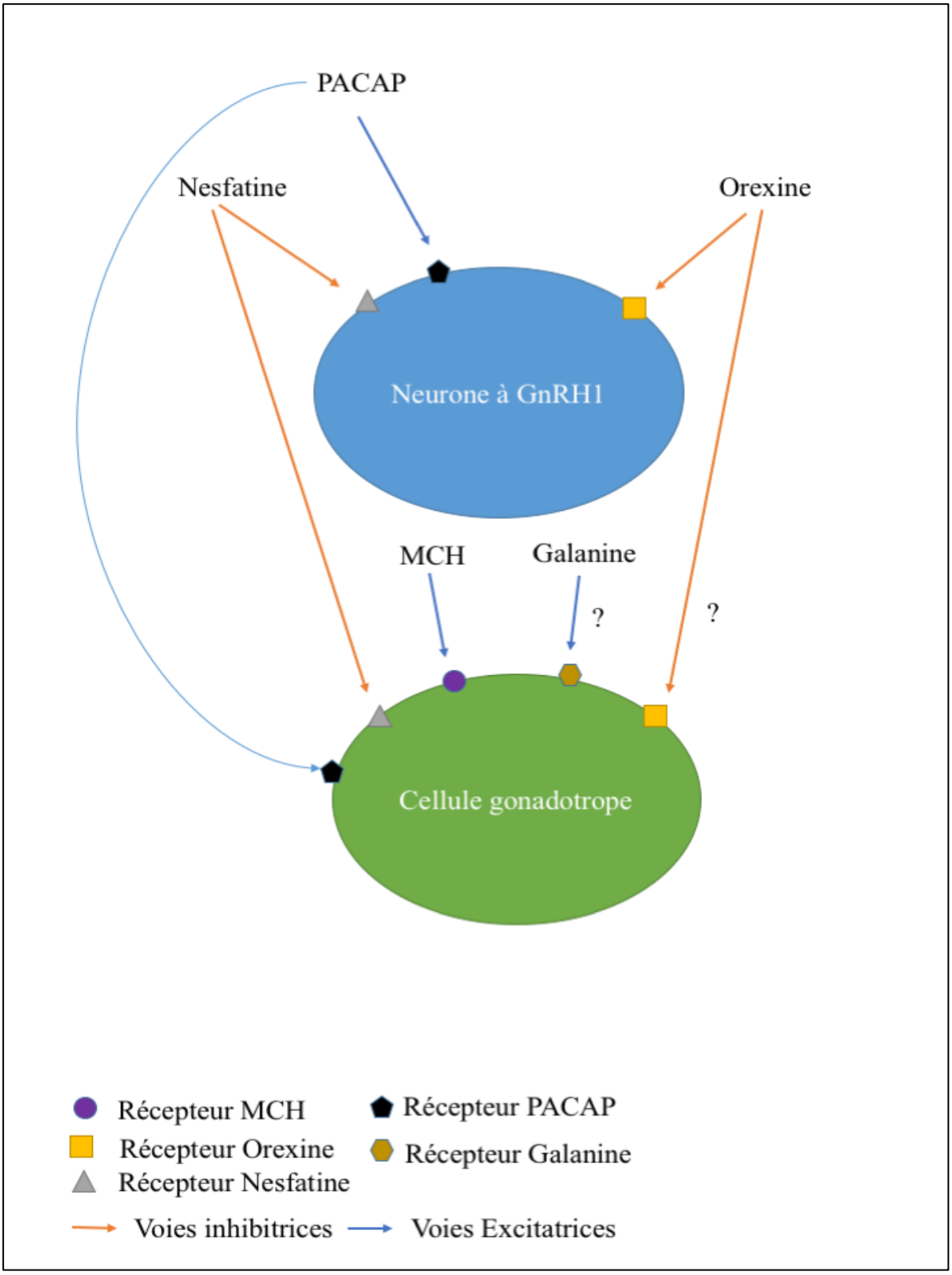


Figure 9 : Schéma de l'action excitatrice ou inhibitrice des peptides du métabolisme sur l'axe gonadotrope chez les téléostéens.

1.2.2. Les acteurs hypophysaires de l'axe gonadotrope : les gonadotropines

Les gonadotropines sont produit au niveau de l'hypophyse. Chez tous les vertébrés, l'hypophyse est reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire, composée par les axones des neurones hypothalamiques.

On distingue deux parties de l'hypophyse : la neurohypophyse et l'adénohypophyse. Alors que la neurohypophyse est principalement constituée de fibres qui libèrent différentes neuropeptides à proximité de l'hypophyse, l'adénohypophyse est constituée de différentes cellules spécialisées dans la production et la sécrétion d'hormone hypophysaire. Chez les poissons téléostéens, l'adénohypophyse est séparée en trois parties : la *pars distalis* antérieure, la *pars intermedia* et la *pars distalis* postérieure (Olivereau et Ball., 1964).

Le terme «gonadotropine» regroupe deux types d'hormones : l'hormone lutéinisante (LH : Luteinizing hormone) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH : Follicle Stimulating Hormone). La biosynthèse et la libération de ces hormones sont directement régulées par la GnRH, produite au niveau cérébral.

Les gonadotropines sont présentes chez tous les Gnathostomes et leur structure est conservée (Quérat et al., 2000). Une sous-unité GTHβ-like a été identifiée chez la lamproie (*Petromyzon marinus*), permettant ainsi de tracer l'histoire évolutive des gonadotropines chez les vertébrés (Sower et al., 2009; Osugi et al., 2012).

1.2.2.1. Structure des gonadotropines

Les gonadotropines sont hormones glycoprotéiques, hétérodimériques, glycosylées et constituées de deux sous-unités (Papkoff et al., 1967).

La sous-unité α (GTHα : Gonadotropic Hormone) est commune aux deux hormones gonadotropes. La sous-unité β est différente entre les deux gonadotropines (LHβ et FSHβ) et c'est elle qui donne sa spécificité à l'hormone (Papkoff et al., 1967).

Les deux sous-unités sont synthétisées indépendamment et s'assemblent ensuite pour former une hormone fonctionnelle. Les deux sous-unités sont maintenues entre elle par des liaisons non covalentes et la sous-unité β forme un repliement autour de la sous-unité α. Des ponts disulfures assurent la formation de repliement des deux sous-unités et permettent de donner aux hormones leur structure spatiale (Lapthorn et al., 1994). L'hormone ainsi formée

va être capable d'interagir spécifiquement avec son récepteur en fonction de la sous-unité β qui la compose (Combarnous et al., 1997).

Pendant longtemps, on pensait que les téléostéens ne possédaient qu'une seule gonadotropine. La première purification de gonadotropine fût réalisée chez la carpe et celle-ci était capable de stimuler la gamétogenèse ainsi que la spermiation, l'ovulation et l'ensemble du développement gonadique (Burzawa-Gerard, 1971 ; Fontaine et Gerard, 1980).

En 1988, une seconde hormone gonadotrope fût identifiée chez le saumon (Suzuki et al., 1988). Par la suite, ces deux gonadotropines ont été identifiées chez de nombreuses espèces et l'analogie a été établie entre les gonadotropines trouvées chez les téléostéens et celle identifiées précédemment chez les mammifères.

1.2.2.2. Fonction des gonadotropines

1.2.2.2.1. Chez les mammifères

Chez les mammifères la communication entre hypothalamus et hypophyse se fait via le système porte hypothalamo-hypophysaire, qui consiste en un réseau de capillaires localisé dans la zone externe de l'éminence médiane, qui se situe dans la partie basale de l'hypothalamus (Zohar et al., 2010).

Les gonadotropines sont libérées dans la circulation générale. Elles vont agir au niveau de tissus cibles, exprimant les récepteurs à la LH ou à FSH. Ces récepteurs sont transmembranaires et sont couplés à une protéine G. La région N-terminale est riche en leucine et est extracellulaire. Celle-ci est responsable de la spécificité du récepteur et de sa forte affinité.

A la suite de la région N-terminale, on trouve une zone responsable de l'ancrage du récepteur dans la membrane, qui est constituée de 7 domaines transmembranaires, avec 3 boucles extracellulaires et 4 boucles intracellulaires. Cette région va également permettre la transduction du signal.

Enfin, à la suite des 7 domaines transmembranaires, on trouve la région C-terminal qui est intracellulaire et couplé à la protéine G. Il existe une grande spécificité de ces récepteurs avec l'hormone hypophysaire qui est donnée par la sous-unité β de l'hormone (Pour revue : Combarnous et al., 1997 ; Vassart et al., 2004).

Les hormones gonadotropes vont ensuite induire des effets spécifiques en fonction du sexe. Chez le mâle, les cellules de Sertoli, localisées dans les tubes séminifères, expriment le récepteur à la FSH. L'activation de ce récepteur entraîne l'initiation de la spermatogenèse au moment de la puberté et durant toute la vie de l'individu. La LH va avoir une action sur les cellules de Leydig, localisées dans le tissu interstitiel. Celles-ci vont produire et sécréter de la testostérone à partir du cholestérol (pour revue : McLachlan., 2000).

Chez la femelle, l'action des hormones gonadotropes nécessitent une coordination des différents acteurs au niveau de l'ovaire. Au sein de l'ovaire, le follicule correspond à la cellule germinal entourée de cellules folliculaires. Ces follicules se forment durant la vie fœtale et reste quiescents jusqu'à la puberté. A ce moment, un stock de follicule croie et la granulosa va se former suite à la multiplication des cellules folliculaires. Puis, en périphérie se forme les thèques internes et externes.

A partir de ce moment, les follicules vont être sensibles à la FSH et vont poursuivre leur développement. Les autres vont entrer en atrésie et dégénérer. Après cette sélection, la FSH va également stimuler l'expression des récepteurs à LH au niveau de la thèque et permettre ainsi sa stimulation et la synthèse d'androgène. Après la décharge ovulante, la LH continue d'intervenir pour assurer une maturation ovocytaire (Pour revue : Driancourt et al., 2001).

1.2.2.2.2. Chez les téléostéens

Chez les téléostéens, les cellules d'un même type sont responsables de la production d'une même hormone et sont organisées en zone, contrairement aux mammifères, chez qui les cellules ne forment pas de masse spécialisée (Zohar et al., 2010).

Comme chez les mammifères, les organes cibles privilégiés sont les gonades : testicules et ovaires. En 1992, chez le saumon coho, deux récepteurs aux gonadotropines ont été décrits dans le tissu gonadique (Yan et al., 1992). Il a été montré que le récepteur de type II, n'interagit qu'avec la LH, alors que le récepteur de type I interagit avec la FSH préférentiellement, mais LH est capable de se fixer aussi avec moins d'affinité. Cependant, cela reste dépendant des espèces, car chez le poisson-zèbre, les mêmes résultats ont été observés, alors que chez la truite, chaque récepteur est spécifique à une hormone (So et al., 2005 ; Sambroni et al., 2007)

Chez les téléostéens, les mêmes cibles pour FSH et LH ont été décrites comme chez les mammifères. Chez le mâle, les cellules de Sertoli expriment à leur surface le récepteur de la FSH et celle-ci est impliquée dans la spermatogenèse (Miwa et al., 1994 ; Oba et al., 2001). Les cellules de Leydig vont aussi produire les androgènes dont la testostérone et sont sous le contrôle de la LH (Borg et al., 1994).

Contrairement aux mammifères, l'ovogenèse est similaire à la spermatogenèse. Le stock d'ovocytes n'est pas défini et à l'instar des spermatogonies chez le mâle, les femelles possèdent des ovogonies (Pour revue : Jalabert, 2005). Comme pour les mammifères, les gonadotropines contrôlent la folliculogenèse (*i.e* le développement du follicule). L'hormone FSH intervient dans la croissance du follicule et LH intervient lors de la maturation finale (Jalabert, 2005). De même, les deux hormones induisent la production des œstrogènes et des androgènes, FSH en agissant sur des récepteurs localisés dans la thèque et LH en agissant sur des cellules de la granulosa (Planas et al., 2000 ; Yan et al., 1992).

1.2.2.3. Ontogenèse des gonadotropines

A ce jour, peu d'études décrivent l'ontogenèse de l'hypophyse. Néanmoins, l'utilisation de knock-out, d'ablation et de mutant ont permis de mieux cerner l'origine des cellules hypophysaires au cours de l'embryogenèse.

L'utilisation des techniques comme l'hybridation *in situ* ou l'immunohistochimie dirigées vers des hormones hypophysaires a permis de localiser ces cellules durant l'ontogenèse au sein de la structure hypophysaire. L'histologie classique a également permis de localiser l'hypophyse à différent stade embryo-larvaire au sein de la structure céphalique.

1.2.2.3.1. Ontogenèse chez les vertébrés non-téléostéens

Chez le poussin, il a été montré que l'ablation de la partie la plus antérieure du feuillet neural conduit à la disparition de la placode à l'origine de l'adénohypophyse (Whitlock et al., 2005).

Tout comme chez les oiseaux, des résultats similaires ont été montrés chez les amphibiens tels que *Bufo japonica*. Chez ces organismes, les cellules responsables de la formation de l'adénohypophyse ont pour origine la partie antérieure de la crête neurale et migrent vers l'infundibulum au cours du développement larvaire (Kawamura et al., 1998).

Une fois la placode à l'origine de l'adénohypophyse mise en place, différents facteurs de différenciation devront intervenir afin de mettre en place les différentes lignées cellulaires impliquées dans les axes endocriniens. Ces facteurs ont été bien décrits chez le poisson-zèbre et localisés par ISH. La fonction de ces facteurs de différenciation a également été décrite chez l'Homme. Ils interviennent séquentiellement afin d'assurer la différenciation des types cellulaires et la mise en place de ces cellules hypophysaires. Parmi ces facteurs, *ascl1* et *lhx3* sont essentiels à la différenciation des cellules adénohypophysaire et à leur survie (Netchine et al., 2000 ; Pogoda et al., 2006).

1.2.2.3.2. Ontogenèse chez les téléostéens

Chez le poisson-zèbre, la localisation par ISH d'ARN de facteur de différenciation et de migration a montré qu'à l'origine la région adénohypophysaire provient de cellules localisés dans la région antérieure de la plaque neurale (Herzog et al., 2004 ; Sbrogna et al., 2003). De plus, en ciblant par ISH les ARN de la pro-opiomelanocortine (POMC), Liu et ses collaborateurs (2003) ont montré que les cellules exprimant POMC étaient étroitement associées aux placodes olfactives seulement 20 heures après la fécondation. Plus tard, entre 24 h et 48 h post fécondation, le marquage de POMC est détecté uniquement au niveau hypophysaire. Toujours chez le poisson-zèbre, il a été montré que le facteur de transcription *lim3* était impliqué dans le développement de l'adénohypophyse et aussi détecté de façon transitoire dans les placodes olfactives (Sbrogna et al., 2003). Ces résultats suggèrent que les cellules à l'origine de la formation de l'adénohypophyse sont originaires de la partie antérieure de la plaque neurale, tout comme les cellules qui par la suite formeront les placodes olfactives.

Chez la sole (*Solea senegalensis*), les sous-unités LHβ et FSHβ sont exprimées dès le premier jour après l'éclosion. Cela suggère un rôle des gonadotropines durant le développement larvaire chez cette espèce (Guzman et al., 2009)

Chez le bar européen, des techniques d'histologie classique, associées à de l'immunohistochimie ont permis de décrire l'ontogenèse de l'hypophyse et de certains types cellulaires durant les vingt six premiers jours post éclosion.

L'hypophyse est localisée dès le premier jour post éclosion cela grâce au marquage en immunohistochimie de plusieurs hormones. A cet âge, l'hypophyse n'est pas totalement formée et a une forme lenticulaire, logée sous l'hypothalamus, en arrière du chiasma optique.

Comme dit précédemment, chez les téléostéens, l'hypophyse est régionalisée et les différentes cellules endocrines forme des îlots. Ainsi dès le premier jour post éclosion, une large zone produisant l'hormone mélanotrope (MSH) est localisée, de même que pour l'ACTH, la TSH et la GH (Cambré et al., 1990).

Dans cette étude, l'auteur a suivi l'évolution de ces populations cellulaires au sein de l'hypophyse en développement durant 26 jours post éclosion. A ce stade, il a localisé les zones de production de l'ACTH, la MSH, la prolactine, la GH ainsi que la TSH. En revanche, les gonadotropines n'ont pas été localisées dans l'hypophyse au cours du développement du bar européen (Cambré et al.,1990).

1.2.2.3.3. Rôle des gonadotropines durant l'ontogenèse

On connaît peu de choses sur leur rôle durant l'embryogenèse. Chez le fœtus humain, plusieurs études ont été menées pour déterminer la concentration en hormones gonadotropes. Elles sont détectées dès le 68ème jour de gestation et la quantité de ces hormones varie au cours du développement en fonction du sexe, plus élevée chez les fœtus de sexe féminin que chez ceux de sexe masculin (Kaplan et Grumbach, 1976). Cette production d'hormones lutéinisantes et folliculostimulantes durant la vie fœtale a également été observée chez d'autres espèces. Chez le lapin, à partir du 18ème jour de gestation, elles sont localisées dans les cellules hypophysaires, puis la LH immunoréactive est détectable en première au 19ème jours de gestion, alors que la FSH immunoréactive est détectable au 24ème jours de gestation (Veyssière et al., 1982). Chez la souris, les cellules à FSH et LH sont localisées dans l'hypophyse dès le 14ème jours de gestation (Nemeskeri et al., 1988).

Cependant le rôle de cette expression précoce est mal défini. Chez le lapin, l'augmentation de la LH circulante est corrélée à une augmentation de la testostérone (Veyssière et al., 1982). Or, les androgènes ont récemment été décrits comme ayant un rôle dans la maturation de certains organes, dont le cerveau (Marečková et al., 2015).

Chez la sole, l'expression de la sous-unité FSHβ augmente durant la phase de différentiation alors que LHβ reste constante, ce qui suggère un rôle potentiel de FSH durant la différentiation larvaire de cette espèce (Guzman et al., 2009)

1.2.3. Régulation du système hypothalamo-hypophysaire par les stéroïdes sexuels

Cela a pour la première fois été montré chez les mammifères castrés qui présentaient un taux élevé de LH et FSH plasmatique. Le rétrocontrôle négatif, exercé par les stéroïdes sexuels, peut être quasiment rétabli en injectant aux animaux castrés des stéroïdes (pour revue : Gharib et al., 1990).

Ce rétrocontrôle négatif peut s'exercer au niveau hypophysaire, en agissant directement sur les cellules gonadotropes qui expriment les récepteurs aux œstrogènes. Chez la souris, les récepteurs ESR1 sont localisés au niveau de l'hypophyse. L'inactivation du gène codant pour ESR1 et la disparition de ces récepteurs au niveau hypophysaire inhibe le rétrocontrôle négatif des stéroïdes sexuels sur les gonadotropines (Singh et al., 2009 ; Sánchez-Criado et al., 2012)

Le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels s'exerce aussi au niveau cérébral et agit au niveau des cellules à GnRH ou des kisspeptines. Par effet de cascade, la diminution de la production de kisspeptines et/ou de GnRH sous l'influence des stéroïdes, entraîne la diminution de la production des gonadotropines.

Dans les neurones à kisspeptine des mammifères, et plus particulièrement chez les souris, il a été rapporté la présence de récepteurs ERα. De plus, leur présence semble essentielle pour le rétrocontrôle positif exercé par les œstrogènes à certain moment du cycle ovarien, c'est-à-dire pour permettre la décharge ovulante induite par un pic de LH qui est précédé par l'augmentation des œstrogènes (Dubois et al., 2015). De plus, l'expression de kisspeptines est négativement régulée par les œstrogènes (Sanchez-Criado et al., 2006). Chez les poissons téléostéens, le récepteur ERα semble aussi réguler l'activité des neurones à GnRH. Sa présence a été démontrée sur les cellules à Kiss2 chez le poisson rouge (*Carassius auratus*). En outre, les cellules à Kiss1 possèdent aussi les récepteurs ERβ2 alors que les cellules à Kiss2 possèdent ERα et ERβ1 (Wang et al., 2013).

En ce qui concerne les neurones à GnRH, il n'existe pas réellement de preuve de la présence des ER dans les cellules à GnRH. Dans l'hypothalamus, au niveau du noyau arqué abritant les neurones à GnRH, beaucoup d'ER ont été localisés. Néanmoins, aucune co-localisation n'a été observée au niveau des neurones à GnRH. Dans tous les cas, les ER nucléaires ainsi que les GPER semblent jouer un rôle dans la régulation des GnRH. Une de

ces voies de régulation passe par l'expression des kisspeptines, et d'autres facteurs, régulés par les œstrogènes, peuvent réguler l'expression des GnRH. Les tentatives de co-localisation des récepteurs aux œstrogènes dans les neurones à GnRH ont toutes montré que les récepteurs était exprimés dans la même zone que les GnRH, mais pas dans les mêmes cellules (pour revue : Wolfe et al., 2012 ; Radovick et al., 2012).

Chez les téléostéens, comme chez les mammifères, les stéroïdes sexuels sont acteurs du contrôle de l'expression des GnRH et peuvent être positifs ou négatifs en fonction du statut reproducteur de l'individu. Plusieurs études montrent que chez différentes espèces de téléostéen, l'injection d'œstradiol ou de testostérone en phase de prévitellogenèse, diminue l'expression des GnRH (*Oncorhynchus mykiss* : Vacher et al., 2002 ; Vetillard et al., 2006 *Oreochromis niloticus* : Soga et al., 1998). Ces stéroïdes peuvent également avoir un effet stimulateur. De nombreuses études menées chez les téléostéens supportent un rétrocontrôle positif des stéroïdes sexuels similaire à celui observé chez les mammifères (Amano et al., 1994 ; Breton et Sambroni, 1996 ; Trudeau, 1997). Cependant chez les téléostéens, la localisation de récepteurs aux œstrogènes ou aux androgènes sur les neurones à GnRH n'a jamais été démontrée (Navas et al., 1995 ; Muriach et al., 2008a, 2008b). Ainsi, on peut penser que la régulation de l'expression des GnRH va s'exercer via d'autres systèmes qui sont sensibles aux stéroïdes.

Les kisspeptines occupent une place importante dans l'expression des GnRHs (cf chapitre Kisspeptine). Chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), les trois récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ERα, ERβ1 et Erβ2) ont été localisés dans les cellules exprimant la Kiss2 au niveau cérébral. De plus, l'absence de stéroïdes sexuels chez les femelles ovariectomisées montre une diminution de l'expression de Kiss2 qui est rétablie après injection d'œstrogène (Kanda et al., 2012). Chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), la gonadectomie montre chez les mâles une augmentation de l'expression de *kiss2,* mais ne révèle pas d'effet chez les femelles ovariectomisées (Alvarado et al., 2016). Ces résultats montrent d'une part que la sensibilité des neurones à kisspeptine est sexe-dépendante, saison-dépendante et espèce-dépendante, et d'autre part que l'expression des kisspeptines est régulée par les œstrogènes.

1.3. Présentation du bar européen

1.3.1. Le bar européen : généralités

1.3.1.1. Ecologie du bar européen

Le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) est un téléostéen marin de l'ordre des perciformes et de la famille des moronidés. L'aire de répartition de cette espèce va de la Norvège jusqu'au Sénégal, avec une présence en mer Méditerranée et en mer Noire. Il vit depuis les eaux côtières jusqu'à 100 m de profondeur. Il occupe également les estuaires, les lagunes et parfois les rivières (Haffray et al., 2007).

Le bar européen est une espèce euryhaline qui tolère les faibles salinités (3‰) aussi bien que la salinité de la mer Méditerranée (38‰). C'est également une espèce poïkilotherme qui vit à des températures allant de 9°C jusqu'à 24°C (Haffray et al., 2007).

1.3.1.2. Reproduction et cycle de vie du bar européen

La distribution du bar européen, ainsi que son mode de vie, sa croissance, et sa reproduction sont dépendantes de la température (Gutiérrez et Morales-Nin, 1986 ; Henderson et al., 2011). Au niveau des îles Britanniques et de la Manche, la reproduction a lieu durant l'hiver, entre janvier et mars, lorsque les températures en Manche se situent entre 8,5°C et 11°C (Thompson and Harrop, 1987).

Chez le bar, les femelles pondent 200 000 œufs/kg de poids corporel et ainsi une femelle de 3 kg peut pondre jusqu'à 600 000 œufs. Les œufs mesurent entre 1,02 et 1,39 mm (FAO, 2017) et sont pélagiques. Les œufs éclosent 4 jours après la fécondation et les larves rejoignent les côtes, les lagunes et les estuaires entre 1 et 2 mois après l'éclosion (Kelley, 1988 ; Jenning and Pawson, 1992). Ces lieux sont des nurseries, assurant protection et abondance de nourriture pour les larves et les juvéniles en développement. Durant la première année, les juvéniles restent plus en amont des estuaires et lorsqu'ils grandissent, descendent progressivement vers les embouchures (Kelley, 1988). Le bar européen reste dans les estuaires jusqu'à atteindre une taille de 20 à 30 centimètres (2 - 3 ans) pour les mâles et 31 à 40 centimètres (3 - 4 ans) pour les femelles, ce qui correspond à la maturité sexuelle. Ils quittent les estuaires en automne et migrent vers les eaux profondes et effectueront leur première reproduction l'hiver suivant (Perez-Rufaz et Marcos, 2015).

Du fait du temps de maturation sexuelle relativement long chez cette espèce, ainsi que de sa sédentarité dans le même estuaire pendant plusieurs année, Doyle et ses collaborateurs (2017) suggèrent que le bar européen est une espèce de téléostéen particulièrement à risque du fait de la pression anthropique qui peut s'exercer localement.

1.3.2. Intérêt économique et stock de pêche

Outre son intérêt écologique, le bar européen est une espèce à forte valeur économique. Récemment, le génome de cette espèce a été séquéncé et est disponible sur les bases de données (Tine et al., 2014). La reproduction et la physiologie de cette espèce ont été fortement étudiées depuis les années 1970. De plus, c'est une des premières espèces, avec la dorade, qui a fait l'objet de nombreuses recherches sur la maîtrise de son cycle de vie en vue de son exploitation en aquaculture (Barnabé et al., 1972). Depuis des décennies maintenant, le bar européen est une des espèces les plus élevées en aquaculture. La production européenne a été multipliée par un facteur 10 ces deux dernières décennies et avoisinait en 2014 les 160 000 T produites (FAO, 2015). Dans l'Union Européenne, près de 60 000 T sont produites par an. Les fermes aquacoles sont concentrées principalement en mer Méditerranée, ce qui représente une valeur économique de 304 millions d'euros (Commission Européenne : ec.europa.eu, 2017).

Malgré la forte production aquacole de cette espèce, le bar européen reste une espèce fortement pêchée en Europe. En 2007, 10 000 T de bars européens ont été pêchées par les pêcheurs professionnels (Haffray et al., 2007). De plus, cette espèce est particulièrement recherchée par les pêcheurs amateurs et, en France, on estime que 4 T de bars sont pêchées en «pêche récréative». Cependant, ces dernières années, une diminution des stocks sauvages de bar européen a été constatée lors de campagnes de pêches scientifiques.

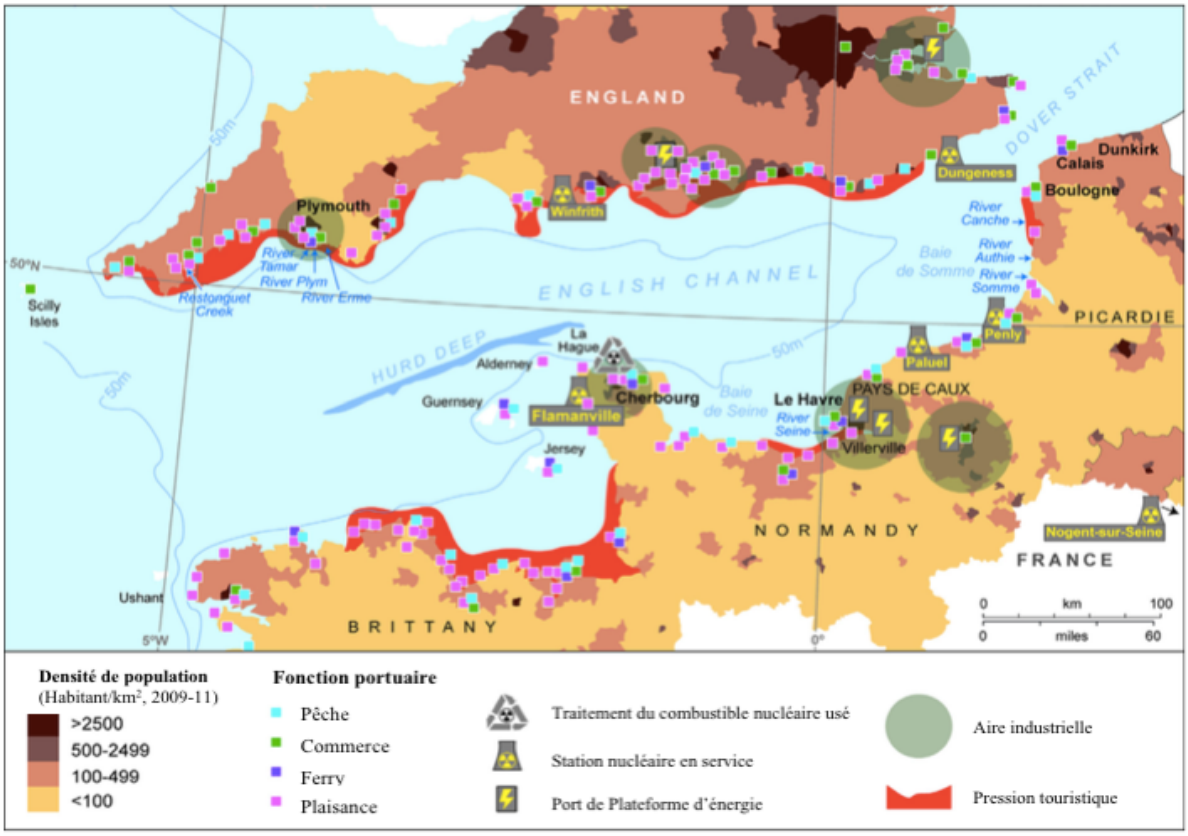
En 2012, le conseil international pour l'exploitation de la mer (ICES), alerté par la situation préoccupante du bar européen, a préconisé une augmentation de la taille de capture à 36 cm, une augmentation de la taille de mailles des filets, une limitation de capture pour la pêche professionnelle et amateur, et une interdiction de pêche pendant la période de reproduction du bar européen (ICES, 2012). En 2015, l'ICES a de nouveau alerté les gouvernements des nations européennes sur la situation préoccupante du bar européen en insistant sur la situation dangereuse dans certaines mers comme la Manche. L'ICES recommandait, à ce moment-là dans son rapport, de rapidement diminuer les quotas de pêches

commerciales et amateurs afin d'enrayer la diminution des stocks et de permettre d'augmenter le stock de ponte et le recrutement des larves, en déclin depuis 2008 (ICES, 2017)

En conséquence, différentes mesures ont été appliquées au niveau européen en 2015, puis en 2017. En 2015, la taille de capture a été augmentée à 42 cm (850/98/EU). Puis en 2017, la pêche au chalut a été interdite dans certaines zones de fraie (2017/127/UE) et le quota de bars a été diminué à 1/jour/personne pour les pêcheurs amateurs.

En 2018, devant la diminution des stocks qui n'avait pas été enrayée, d'autres mesures ont été prises par le conseil de l'Union Européenne. Les quotas de pêche pour les zones au-dessus du 48ème parallèle ont été diminués à 5 tonnes par an et par bateau pour les ligneurs et à 1,2 tonnes par an et par bateau pour les chalutiers avec une interdiction de pêche de février à mars 2018. De plus, la pêche amateur est désormais interdite au-dessus du 48ème parallèle (Règlement 2018-120 du conseil de l'Union Européenne).

1.3.3. Le bar en Manche et en estuaire de Seine : point de vue écotoxicologique



En estuaire de Seine, la présence de juvéniles de bar européen d'un an a été décrite en eaux peu profondes (Morin et al., 2015).

La Manche est soumise à une importante pression anthropique (Fig. 10) à cause de la forte activité touristique et de circulation maritime importante. Elle reçoit aussi la pollution de la Seine, puisque 41% des apports fluviaux en Manche proviennent de la Seine (Tappin et Millward, 2015).

L'estuaire de Seine est soumis à une forte pression anthropique. En effet, ce fleuve baigne trois grandes agglomérations (Paris, Rouen, Le Havre) qui font l'objet d'un trafic maritime intense, Le Havre étant le second et Rouen le 5ème grand port maritime de France. De plus, la zone entre Rouen et Le Havre est fortement industrialisée, avec une forte activité pétrochimique. En outre, la région Normandie a une forte activité agricole (agriculture céréalière en Seine-Maritime et élevage bovin dans le Calvados). Ainsi, la Seine reçoit les eaux usées d'un tiers de la population française. Cette forte pression anthropique, amenée par les eaux de ruissellement et les rejets directs ou indirects (issus des stations d'épuration), en

Figure 10 : Représentation de la pression anthropique sur la Manche. Adapté de Tappin et Millward, 2015

font le fleuve le plus pollué d'Europe (Minier et al., 2006 ; Tappin et Millward, 2015).

Les organismes résidents en estuaire de Seine vont être exposés à cette contamination et de nombreuses molécules ayant une activité œstrogénique ont été détectées (Minier et al., 2006 ; Tappin et Millward, 2015) tels que :

- des composés halogénés (PCBs, PCDD);
- les composés organiques (Nonylphénol);
- les composés bromés (HBCDDs);
- les pesticides organochlorés (Lindane);
- les hydrocarbures aromatiques (HAP);
- les phtalates (DEHP, DBP, BBP);
- les œstrogènes naturels et synthétiques (E1, E2, E3, EE2).

Certains de ces composés ont fait l'objet d'un suivi durant les dernières années. Les alkylphénols sont représentés principalement par le nonylphénol (NP), le nonylphénol-ethoxylate (NPE) et les concentrations de ces composés ont été déterminées dans l'estuaire.

Entre 399-2214 ng/L ont été dosés dans l'eau et 405-3636 ng/g dans la matière en suspension (Tappin et Millward, 2015). En ce qui concerne les phtalates, les DEHP, le DBP et les DnBP ont été également dosés en estuaire de Seine respectivement à concentration de 160-314 ng/L, 71-181 ng/L et à 67-319 ng/L (Tappin et Millward, 2015). La concentration en estuaire de Seine en bisphénol A a également été mesurée entre 2007 et 2010 à une concentration de 317 ng/L entre Paris et Rouen (Gaspéri et al. 2010).

En ce qui concerne les œstrogènes, qu'ils soient naturels ou synthétiques, ils sont également présents en estuaire Seine. L'œstrone (E1) et l'œstradiol (E2) représentent à eux deux 80 % des œstrogènes mesurés en Seine. Entre 0,5 ng/L et 21 ng/L de molécules œstrogéniques, naturelles ou synthétiques, ont été mesurés entre 2007 et 2010 dans la Seine (Gaspéri et al., 2010). De plus, afin d'identifier le potentiel œstrogénique de ces molécules, l'activité œstrogénique a été mesurée entre mai et novembre 2011 dans l'estuaire de Seine. Dans tous les échantillons prélevés, entre 1,6 et 7 ng/L de composés à activité œstrogénique ont été mesurés, avec un maximum de 78 ng/L trouvés au niveau du pont de Tancarville (Budzinski et al., 2012).

Ces molécules proviennent de diverses origines et sont présentes en estuaire de Seine à différentes concentrations. Elles ont un effet œstrogénique supposé pour certaines ou avéré pour d'autres.

L'estuaire de Seine est une zone de nurserie et un refuge pour les larves et juvéniles de nombreuses espèces de Téléostéen, dont le bar européen. L'effet que peut avoir la pollution sur les nurseries et sur le développement des larves, leur future reproduction ainsi que la pérennité des populations n'a été que peu étudié.

Une supposition a été apportée par Kelley (1988), qui trouve des larves de bars dans tous les estuaires du Royaume Uni entre 1933 et 1987, excepté dans Mersey, un estuaire qui est fortement anthropisé.

1.4. Objectifs de la thèse

Nous avons vu que les perturbateurs endocriniens, particulièrement ceux de type œstrogénique sont capables d'induire des effets sur le succès de reproduction ainsi que sur les régulations des systèmes centraux impliqués dans la reproduction et le développement.

Du fait de son mode de vie, le bar européen est particulièrement exposé à l'effet des perturbateurs endocriniens durant les phases précoces de son développement, lors desquelles de nombreux phénomènes de neurogenèse sont observés au niveau cérébral.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la problématique générale de l'étude de la perturbation neuroendocrinienne chez les téléostéens et plus particulièrement chez une espèce sauvage.

Ainsi, ce travail de thèse s'organise autour d'une question centrale : la mise en place des systèmes GnRHs et Kisspeptines est-elle impactée par les perturbateurs œstrogénomimétiques chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) ?

Pour répondre à cette question, nous avons procédé en différentes étapes :

Nous avons développé les techniques d'hybridation *in situ* et de RT-qPCR nécessaires à la localisation et la mesure des transcrits des trois GnRH, des deux Kisspeptines, ainsi que des sous-unités LHβ et FSHβ.

A l'aide de ces outils, nous avons décrit et localisé les différentes populations cellulaires et nous avons suivi les niveaux d'ARNm correspondant à ces gènes entre 0 et 50 jours post éclosion chez la larve de bar européen.

Expérimentalement, nous avons exposé les larves de bars entre 0 et 8 jours post éclosion à un perturbateur œstrogénomimétique modèle, l'EE2. Puis, à l'aide des outils précédemment utilisés, nous avons évalué l'effet de l'EE2 sur l'expression des GnRHs et des Kisspeptines et sur la localisation des neurones à GnRH2 et GnRH3.

L'objectif de ce travail de thèse est d'apporter des connaissances nouvelles sur l'ontogenèse des systèmes GnRHs et Kisspeptines chez les téléostéens et plus particulièrement chez le bar européen.

De plus, ce travail permettra de mieux cerner la sensibilité des acteurs cérébraux de l'axe gonadotrope aux œstrogénomimétiques durant les phases précoces de développement chez le bar européen, afin de déterminer les cibles impactées par ces molécules.

Matériels et Méthodes

2. Matériels et méthodes

Dans cette partie, les différentes méthodes utilisées au cours de ce travail de thèse vont être brièvement présentées ; les protocoles détaillés de l'ensemble des travaux étant intégrés dans les différentes sections du chapitre «Résultats».

2.1. Provenance des animaux

Les animaux étudiés au cours de ce travail de thèse proviennent de trois endroits différents, dont deux écloseries marines spécialisées dans la production de bar européen : l'écloserie marine Aquastream (Ploemeur, France) et l'écloserie marine de Gravelines Ichtus (Gravelines, France) ; et la station marine IFREMER de Palavas-les-Flots (France). Les animaux étaient livrés au laboratoire soit au stade « œuf » et l'éclosion était réalisée au laboratoire, soit au stade « larve ».

2.2. Elevage larvaire

L'élevage des larves a fait l'objet de mise au point et différentes techniques ont été testées afin d'optimiser le taux d'éclosion et de survie des animaux. A l'arrivée au laboratoire, les œufs fécondés sont acclimatés à une température de 15°C et à une salinité de 32‰. Ils sont ensuite disposés dans les différents systèmes testés. Deux systèmes ont été comparés pour l'éclosion et le développement larvaire : un système avec circulation d'eau et un système statique.

2.2.1. Système avec circulation d'eau

Le système consiste en un aquarium en verre (30 L) muni d'un robinet à débit réglable positionné sur le bas de l'aquarium (Fig. 11A). Celui-ci est disposé dans un bac collecteur de 100 litres. Par gravité, l'eau de l'aquarium se déverse dans le bac collecteur où elle est filtrée (Einhell, Villepinte, France) et oxygénée. A l'aide d'une pompe de relevage (Einhell, Villepinte, France), l'eau du bac collecteur est renvoyée dans l'aquarium. Les débits d'arrivée et de sortie d'eau sont réglés afin de maintenir un niveau d'eau constant dans l'aquarium. Dans ce système, l'eau utilisée est de l'eau de mer artificielle (Marine sea salt Tetra, Melle,

France) préparée à une salinité de 32 ‰ et maintenue à 15°C. Après acclimatation, les œufs sont disposés dans l'aquarium à une densité de 250 œufs/litre. Les œufs sont maintenus en agitation par le mouvement d'eau entraîné par la pompe de relevage.

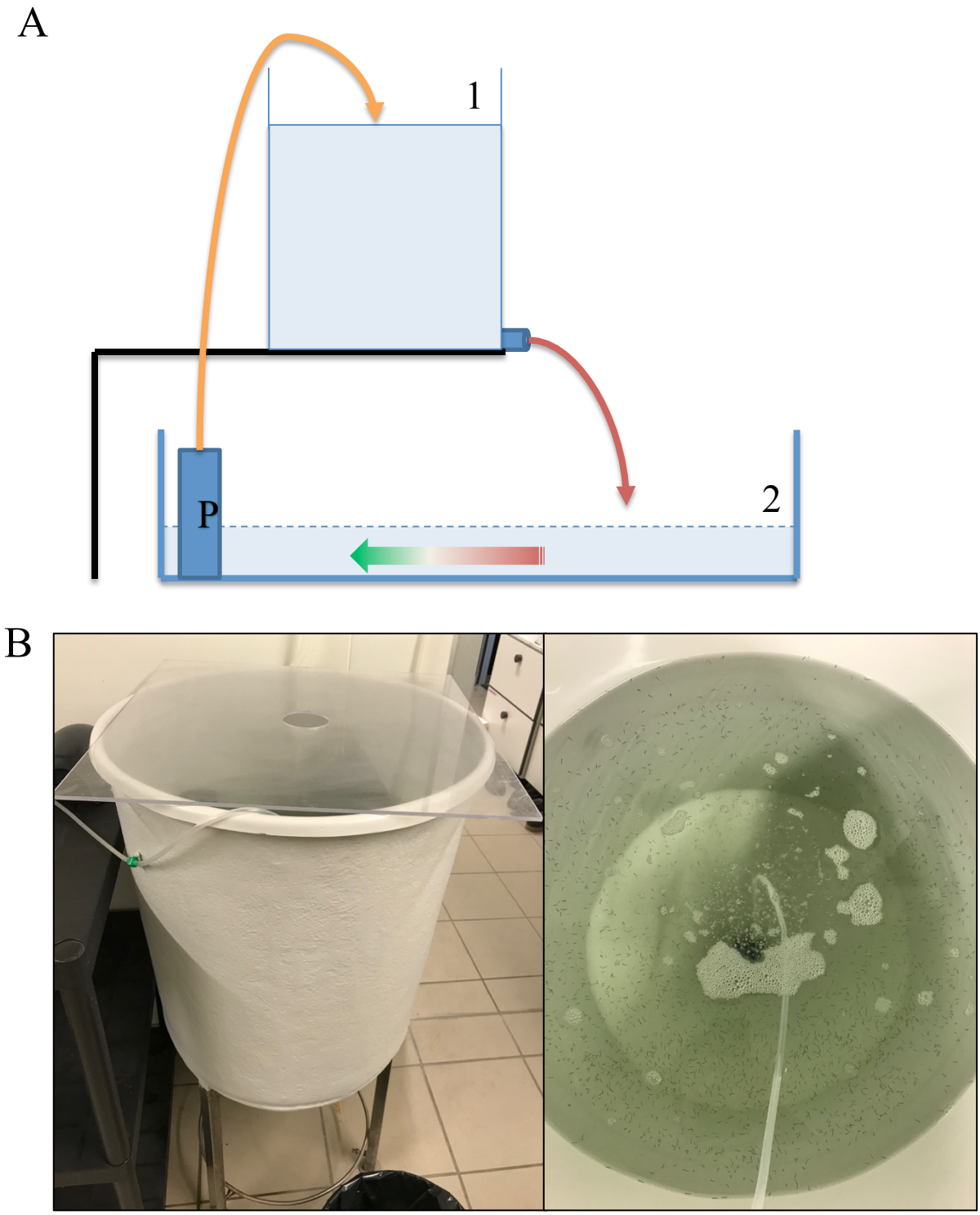


Figure 11 : (A) Dispositif d'élevage en eau circulante. 1 : Bac d'élevage, 2 : Bac de récupération et de filtration, P : pompe de relevage. Les flèches indiquent le sens de circulation de l'eau. (B) Dispositif d'élevage en système statique en cuve cylindro-conique

2.2.2. Système statique

Le système consiste en l'utilisation de cuves cylindro-coniques (60 litres) qui sont des cuves généralement utilisées en écloserie (Fig. 11B). Elles contiennent de l'eau de mer artificielle (Marine sea salt, Tetra) ou naturelle passée sur charbon actif et UV (Aquacaux, Octeville-sur-Mer), à une salinité de 32 ‰ et à une température maintenue à 15°C. L'eau est oxygénée par bullage. Après acclimatation, les œufs sont transférés dans les cuves à une densité de 200 œufs/litre. Les œufs sont maintenus en agitation par le mouvement d'eau entraîné par le système de bullage. A l'éclosion, les larves sont transférées dans des aquariums (40 litres) à une densité d'environ 200 larves/litre.

2.3. Mise en place d'une méthode d'exposition

Dans les différents systèmes, les paramètres physico-chimiques sont mesurés quotidiennement et maintenus constants : température 15 ± 0.6°C, salinité 32 ‰ ± 1 et pH 8.2 ± 0.1 ; la qualité de l'eau (nitrites et nitrates) est également suivie. Les œufs ou animaux morts sont systématiquement enlevés chaque matin. L'eau est renouvelée à raison de 2 fois/semaine.

La période d'incubation des œufs (1 à 3 jours au sein du laboratoire, les œufs arrivant entre 48 et 72h post fécondation) et les 7 premiers jours de développement sont réalisés à l'obscurité. A partir de 7 jours post éclosion (jpe), les animaux sont peu à peu acclimatés à la lumière avec une augmentation journalière de 2 heures d'éclairement jusqu'à atteindre un cycle 12/12 (jour/nuit).

A 7 jpe (moment de l'ouverture de la bouche), les larves sont nourries avec des rotifères vivants (*Brachionus sp.*) à une concentration de 2 rotifères/mL. Puis à partir de 13 jpe, elles sont nourries avec un mélange rotifères/nauplii d'artémies, à une concentration de 2 rotifères et 2 nauplii par mL. Enfin, à 20 jpe, les larves sont nourries exclusivement avec des nauplii d'artémies à une concentration de 4 nauplii par mL.

2.3.1. Exposition à l'éthynilestradiol (EE2) (article 2)

Les animaux utilisés pour les expérimentations d'exposition proviennent des élevages larvaires réalisés au laboratoire.

Les animaux sont exposés par balnéation au 17-alpha éthinylestradiol selon le protocole utilisé chez le poisson zèbre par Vosges et collaborateurs (2010). Brièvement, une solution mère à 10 mM d'éthinylestradiol (Sigma) est réalisée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). A partir de la solution mère, différentes solutions intermédiaires (à 500 µM et 5 µM) sont réalisées en eau de mer naturelle filtrée. La contamination du milieu se fait à partir des solutions intermédiaires directement ajoutées à l'eau du milieu (dilution au 1/10000ème). Différentes conditions d'exposition ont été testées et comparées : en bécher et en plaque 24 puits. Pour les conditions témoin «solvant», du DMSO a été ajouté afin d'obtenir une concentration identique à celle introduite du fait du traitement à l'EE2.

2.3.1.1. Exposition en bécher

A l'éclosion, les larves sont disposées dans des béchers (1 litre) contenant 500 mL d'eau de mer naturelle filtrée et passée aux ultraviolet L'expérimentation a été organisée de la manière suivante : 4 conditions testées (témoin, témoin solvant (DMSO), 0.5 nM EE2 et 50 nM EE2), 6 réplicas par condition, n=100 larves/réplica. Les expérimentations sont réalisées en pièce thermorégulée à 15°C. Tous les deux jours, 50 % du milieu est renouvelé et contaminé de nouveau.

2.3.1.2. Exposition en plaque

Après acclimatation, les œufs sont disposés en plaques 24 puits stériles (Greiner Bio-One, Les Ulis, France) dans 2 mL d'eau de mer naturelle à raison d'un œuf/puit. L'expérimentation a été organisée de la manière suivante : 4 conditions testées (témoin, témoin solvant (DMSO), 0.5 nM d'EE2, 50 nM d'EE2), n= 360 poissons par condition. A l'éclosion, la contamination est réalisée par renouvellement du milieu, 50 % du volume du puit est remplacé par le même volume d'eau contaminée. Les plaques sont placées en étuve thermostatée à 15°C. Tous les deux jours, la moitié du volume des puits est retirée et remplacée par le même volume d'eau contaminée.

2.3.1.3. Prélèvements

Tous les deux jours, des larves sont prélevées pour les analyses ultérieures (Tab. 3). Pour partie, les individus prélevés sont immergés dans 200 µL de RNA later (Ambion) et conservés à -20°C jusque l'analyse des niveaux d'expression des gènes d'intérêt. Les autres larves sont fixées dans du paraformaldéhyde (PAF) à 3.7 % pendant 24h, rincées au « Phosphate Buffer Saline » (PBS) 1X et conservées dans une solution de PBS/Glycérol 50 % à -20°C, jusqu'aux analyses par hybridation *in situ (HIS).*

Tableau 3 : Nombre d'individus prélevés par condition en RNA later (A) et en PAF 3,7% (B)

A				
Nombre de pools	6	6	6	6
Nombre d'individus par pool	5	5	5	5
B				
Age (jpe)	2	4	6	8
Nombre d'individus prélevés	18	18	18	18

2.4. Localisation des cellules par hybridation *in situ* (articles 1, 2 et 3)

2.4.1. Production des sondes

Les tissus utilisés (cerveaux et hypophyses) pour la production des sondes proviennent de bars adultes. Après homogénéisation des tissus, à l'aide du kit Soft Tissue Homogenizer CK14 (Bertin) ; les ARN_{totaux} sont extraits par la méthode phénol - chloroforme, puis remis en suspension dans de l'eau DNAse/RNAse free. Un traitement DNase (Turbo DNA-free kit, Ambion), afin d'éviter une contamination par de l'ADN génomique, puis une reverse transcription à l'aide de l'enzyme MMLV-RT (Promega) sont ensuite réalisés pour obtenir des ADNc. A l'aide d'amorces spécifiques dessinées à partir des séquences du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) pour les gènes d'intérêt, des fragments des gènes *kiss1* (304 pb), Kiss2 (223 pb), GnRH1 (221 pb), GnRH2 (247 pb), GnRH3 (342 pb), LHβ (483 pb) et FSHβ (372 pb) ont été amplifiés par PCR. Les produits PCR ont été clonés dans un vecteur TOPO (Invitrogen) et séquencés (Genewiz).

Après linéarisation des plasmides, les sondes ARN sens et antisens sont synthétisées en utilisant DIG-UTP labelling mix (Roche) et les polymérases T3/T7 ou Sp6. Les sondes

sont ensuite traitées à la DNAse I (Roche), précipitées en éthanol absolu et chlorure de lithium, et remises en suspension dans de l'eau DNAse/RNAse free, et stockées à -20°C.

2.4.2. Procédure d'hybridation *in toto*

Les larves sont rincées plusieurs fois dans une solution PTW (PBS1X, Tween20 0.1 %) et traitées à la protéinase K pendant 40 min à 37°C. Après post-fixation en PAF 3.7 %, les larves sont transférées dans la solution d'hybridation SH (formamide, SSC5X, Tween20 et SDS), puis elles sont mises en contact avec les sondes à la concentration de 600 ng/mL pendant 1 nuit à 62°C.

Les sondes en excès sont éliminées par des rinçages successifs dans du SH et les échantillons progressivement équilibrés en solution saline (SSC 2X) à 62°C et en MABT (acide maléique, NaCl et Tween20 à pH 7.4). Une étape de blocage des sites non spécifiques est réalisée par immersion des échantillons dans une solution de solution de blocage (MABT, 4 % blocking powder (Roche), 15 % de sérum fœtal de veau) pendant 1 heure. Puis, l'immunodétection des sondes hybridées est réalisée par incubation avec des anticorps anti-dioxigénine (dilution 1 : 1000) couplés à une phosphatase alcaline à 4°C pendant 12 h.

Après élimination des anticorps en excès par rinçage au MABT, l'activité de la phosphatase alcaline est révélée par ajout du substrat NBT-BCIP (nitroblue tetrazolium chromogène et bromochloryndolyl phosphate) en tampon alcalin (Tris-HCl, NaCl, $MgCl_2$, Tween20 et lévamisole, pH 9.5). La coloration est arrêtée par rinçage en PTW et les organismes sont fixés en PAF 3.7 % pendant 24 h avant d'être conditionnés en PBS/glycérol et stockées à -20°C avant inclusion et coupe au cryostat.

2.4.3. Procédure d'hybridation *in situ* sur coupe

Du fait de l'ossification de la boîte crânienne, à partir de 50 jpe, les hybridations ont été réalisées sur coupe. Pour cela, les échantillons sont inclus en gélatine et coupés au cryostat (Microm HM 525) à une épaisseur de 20 µm avant d'être traités en ISH.

Les coupes sont rincées en PBS 1X et équilibrées en solution saline (SSC 5X), puis mises en contact avec les sondes en solution d'hybridation (formamide, SSC 5X, Tween20, SDS, héparine et ARNt de levure) pendant 1 nuit en chambre humide à 62°C.

Les sondes en excès sont éliminées par rinçage en SSC 2X, puis en SSC 0.1X, puis les coupes sont équilibrées en MABT (acide maléique, NaCl et Tween20, à pH 7.4). Une étape

de blocage des sites non spécifiques est réalisée par traitement des coupes par une solution de blocage (MABT, 4 % blocking powder (Roche), 25 % de sérum fœtal de veau). Les coupes sont ensuite mises en contact avec des anticorps anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline pendant 2 heures à 4°C. Après élimination des anticorps en excès par rinçage au MABT, la révélation est réalisée en présence de NBT-BCIP en tampon alcalin (Tris-HCl, NaCl, $MgCl_2$, Tween20 et lévamisole, pH 9.5). Après rinçage au PBS 1X, les lames sont montées en mowiol et observées à l'aide d'un microscope Nikon EclipseTE2000-U. Les prises de vue sont réalisées à l'aide d'un appareil numérique Nikon D3s.

2.5. Mesure des ARNm par PCR quantitative en temps réel (articles 1, 2, 3)

2.5.1. Extraction des ARN totaux et reverse transcription

Les échantillons correspondant à des pools d'individus (Tab. 4) sont homogénéisés en présence de Tri-Reagent (1 mL) à l'aide du kit Soft Tissue Homogenizer CK14 (Bertin). Après ajout de chloroforme et centrifugation, la phase aqueuse contenant les ARNs est isolée. La précipitation des acides nucléiques est réalisée par addition d'isopropanol et stockage à -80°C pendant 12 h. Après centrifugation et rinçage à l'éthanol, les ARNs sont remis en suspension dans de l'eau DNAse/RNAse free puis subissent un traitement DNAse à l'aide du Turbo DNA-free Kit (Ambion) afin d'éliminer une éventuelle contamination par de l'ADN génomique. Les ARNs sont ensuite stockés à - 80°C.

La synthèse des ADNc est réalisée à partir de 1 µg d'ARN total et à l'aide de l'enzyme Superscript Reverse Transcriptase III (invitrogen) selon les indications du fabricant. Les ADNc obtenus sont ensuite stockés à - 20°C.

Tableau 4 : Nombre d'individus aux différents temps de prélèvement et stockés en RNA later.

Age (jour post fécondation)	4	10	20	30	40	50	60
Nombre de pools	8	8	8	8	8	8	8
Nombre d'individu par pool	14	14	7	7	7	2	2

2.5.2. Dosage par PCR quantitative en temps réel

La technique utilisée ici est dite « relative » et permet de quantifier l'expression d'un gène, relativement à l'expression d'un gène de ménage ou de référence, qui est supposé avoir une expression stable, quelles que soient les conditions expérimentales.

La réaction de PCR a été réalisée via le thermocycleur Rotor Gene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le mélange réactionnel était constitué de 5 µL de QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (Quiagen), 1,5 µL de cDNA dilué au 1:25ème et 0,5 µL d'amorce sens et antisens (200 nM de chaque amorce) pour un volume final de 10 µL.

Après optimisation, les conditions suivantes ont été choisies pour la réaction de PCR : 95°C durant 15 minutes, suivi de 45 cycles constitués chacun de 15 secondes à 94°C, 25 secondes à la température d'hybridation des amorces (entre 57 et 60°C), puis 25 secondes à 72°C.

Différents gènes de référence ont été testés (L13, Efα et Fau) et, après analyse statistique, le gène *l13* (codant pour la protéine L13 de la sous-unité ribosomale 60S) a été sélectionné comme étant le plus stable dans nos conditions.

L'expression relative des gènes cibles a été mesurée en utilisant la méthode du $2^{\Delta\Delta Ct}$, faisant intervenir :

- L'efficacité de la réaction du gène de référence et du gène cible, calculé à partir de dilutions en série de facteur 5 des ADNc.
- Le Ct du gène cible et du gène de référence, c'est-à-dire le nombre de cycles à partir duquel l'amplification devient exponentielle.
- Un calibreur, qui permet de s'assurer de la répétabilité de la technique entre les différents cycles de qPCR pour un même gène.

Résultats

Elevage du bar européen en laboratoire

Développement et optimisation d'une technique d'élevage en laboratoire et d'une méthode d'exposition la plus adaptée

Florent Nihoul[1] ; Mayélé Burlion-Giorgi[1] ; Agnès Poret[1] ; Jean-Michel Danger[1] ; Salima Aroua[1,*]

[1]*Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques UMR-I 02SEBIO - Université Le Havre Normandie -FR CNRS 3730 SCALE, Le Havre, France*

L'un des objectifs de ce travail de thèse était d'évaluer l'effet d'un perturbateur endocrinien sur l'ontogenèse de l'axe gonadotrope chez le bar européen. Notre précédente étude (cf. article 1) a montré que la plupart des acteurs cérébraux de cet axe apparaissent tôt au cours de la période larvaire. Afin d'exposer les larves durant ces périodes, nous avons dû obtenir un élevage de bar européen.

Avec cet élevage, nous souhaitions obtenir des individus à différents âges, afin de réaliser des expositions précoces, durant la mise en place de ces acteurs, ainsi que des expositions plus tardives au cours du développement larvaire.

Dans cette partie sont présentés les résultats sur les techniques d'élevage : système semi-ouvert et fermé avec circulation d'eau, et les techniques d'expositions, en plaque et en bécher.

1. Introduction

Le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) est une espèce à fort intérêt économique. En Europe, c'est l'une des espèces les plus consommées (IFREMER). Du fait de son intérêt commercial, c'est l'une des premières espèces, avec la dorade, à avoir été élevée de manière intensive en aquaculture. L'élevage du bar européen, et plus particulièrement l'éclosion et le développement larvaire, a fait l'objet d'une optimisation à la fin des années 1970 afin de pouvoir effectuer le cycle biologique complet (Barnabé, 1976, Barnabé et Le Coz, 1987 ; Barnabé et Tournamille, 1972).

Les premiers jours suivant l'éclosion sont les plus sensibles et différentes conditions d'élevage ont été finement ajustées afin de définir l'optimum de conditions abiotiques comme la température, la salinité, la luminosité, l'alimentation ou l'oxygénation (Barnabé, 1973 ; 1976 ; Girin, 1976, Barahona-Fernandes et al., 1977). Dans les années 1980, l'élevage du bar a été testé en «eau verte», c'est à dire en eau contenant des micro-algues qui assurent l'alimentation des invertébrés tels que les rotifères qui permettent l'alimentation des larves de bar. Or, cette technique d'élevage entraine, chez le bar européen, une augmentation du nombre de malformations comme la déformation du squelette axial et des arcs mandibulaires (Barahona- Fernandes, 1982) et l'augmentation du nombre d'individus présentant des lordoses dérivant de l'absence de vessie natatoire fonctionnelle (Chatain, 1987). Le système en eau verte a été rapidement abandonné au profit de l'élevage en système à renouvellement continu d'eau.

En 1985, un protocole d'élevage, connu sous le nom de «technique française», a été

proposé par Coves. Outre le renouvellement d'eau, celui-ci établi pour la première fois un protocole standard en terme de salinité, d'oxygénation et d'alimentation. Aujourd'hui, ce protocole a été revu et optimisé et donne un protocole standard pour l'élevage de bar.

Dans notre étude, nous avons, à partir des différents protocoles (Barnabé et Tournamille, 1972 ; Cove, 1985), mis en place notre propre protocole en tenant compte des limitations techniques dues aux contraintes du laboratoire. Avec ce protocole, nous avons testé deux contenants :

- un aquarium en système semi-ouvert avec une circulation d'eau de mer artificielle reconstituée (Marine Sea Salt, Tétra).
- un système clos en cuve cylindro-conique avec soit de l'eau de mer artificielle ou soit de l'eau de mer naturelle filtrée et stérilisée sous UV (Aquacaux, Octeville-sur-mer).

L'élevage du bar depuis l'éclosion jusqu'à la fin de la période larvaire devait nous permettre d'obtenir des larves en conditions contrôlées et à différents stades afin de pouvoir réaliser les expositions à l'EE2 à différentes périodes du développement.

Afin de réaliser les expositions à l'EE2, nous avons testé différentes méthodes d'exposition. Chez les poissons téléostéens, les expositions au stade embryo-larvaire ont déjà été réalisées chez différentes espèces comme le médaka ou le poisson-zèbre.

Du fait de leur très petite taille, les injections intrapéritonéales chez la larve sont très difficiles et l'exposition via la nourriture contaminée peut aussi être compliquée à ce stade car les larves ne s'alimentent pas durant les premiers jours. Classiquement, l'exposition au stade embryon-larvaire se fait par contamination de l'eau et balnéation mais différents procédés d'exposition ont été décrits dans la littérature. Par exemple, chez le médaka au stade embryo-larvaire, de précédents travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont utilisé une technique d'exposition en boite de Petri, sans agitation ni bullage (Vicquelin et al., 2011).

Nos travaux s'inspirent beaucoup de ce qui a précédemment été montrés en perturbation endocrinienne chez la larve de poisson-zèbre, où l'exposition à l'éthynilestradiol entraine une perturbation de l'ontogenèse des neurones à GnRH3. Dans ces études, l'exposition est réalisée en petit aquarium de 2 litres en condition semi-statique (Vosges et al., 2010, 2012).

D'autres études décrivent l'utilisation de plaques de culture pour réaliser les expositions. Comme décrit par Yan et ses collaborateurs (2016) ou Wagner et ses

collaborateurs (2017) les œufs fécondés sont distribués aléatoirement dans des plaques 96 puits en conditions statiques.

Dans notre étude, nous nous sommes inspirés de ces différentes techniques. Le premier objectif de cette étude était de permettre la mise en place d'un élevage de bar européen dans nos locaux afin d'avoir accès à différents stades de développement et ce en conditions contrôlées. Le second objectif était de définir la meilleure méthode d'exposition pour la larve de bar européen.

2. Matériels et Méthodes

Origines des organismes et acclimatation

Les œufs déjà fécondés ont été obtenus à l'écloserie marine de Gravelines (Gravelines, France). La vérification de la fécondation a été réalisée par l'entreprise à 1 jour post fécondation puis les œufs ont été acheminés vers le laboratoire en cubitainer de 50 litres saturé en O_2.

Arrivés au laboratoire, les œufs ont été placés en pièce thermo-régulée à 15°C, puis acclimatés progressivement à une salinité de 32 ‰.

Système d'élevage

Dans cette étude nous avons testés deux techniques d'élevages : un système semi-ouvert et un système clos.

Après acclimatation, les œufs fécondés ont été placés dans le système semi-ouvert. Celui-ci est composé d'un aquarium de 20 litres, qui sert à l'éclosion et au développement des larves. L'eau est amenée dans l'aquarium grâce à une pompe de relevage (Einhell, Villepinte, France) depuis un bac de filtration situé en dessous. L'eau s'échappe de l'aquarium par un robinet à sa base et est entrainé par gravité dans le bac de filtration, où elle est filtrée (Einhell) et oxygénée par bullage. Les débits d'entrée et de sortie d'eau ont été réglés afin de maintenir un renouvellement d'eau de 60 litres / heure ainsi qu'un niveau constant dans l'aquarium.

Nous avons également utilisé un système statique au cours de ce travail de thèse. Celui-ci est composé de cuves cylindro-conique de 60 litres, qui sont généralement utilisées en écloseries professionnelles. Dans ce système, seule le bullage permet un mouvement d'eau

dans la cuve. Après acclimatation, les œufs sont transférés dans les cuves et l'intensité du bullage est réglée afin que les œufs soient en mouvement mais qu'ils ne soient pas choqués contre les parois de la cuve.

Origine de l'eau

Deux types d'eau ont été utilisés. Afin de pouvoir contrôler les paramètres physico-chimiques de l'eau, nous avons dans un premier temps produit de l'eau artificielle à une salinité de 32 ‰ à partir de sel (Marine sea salt, Tetra) et d'eau distillée. Celle-ci a été utilisée dans différentes expériences utilisant les deux systèmes.

Nous avons également utilisé de l'eau naturelle provenant de la ferme aquacole Aquacaux (Octeville-sur-mer, France). Après pompage à distance du rivage, l'eau passe à travers différents filtres en vue d'éliminer les particules, puis sur charbon actif et est finalement stérilisée sous UV. Sur l'eau naturelle, seules la température et la salinité ont été contrôlées au moment de l'utilisation.

Conditions biotiques et abiotiques durant le développement larvaire

Dans les deux types de système, nous avons utilisé un protocole d'élevage préalablement défini à partir de la littérature et avec les conseils de professionnels. Ce protocole n'a pas été modifié au cours des différentes tentatives.

La température et le pH de l'eau sont respectivement maintenus à 15°C et 8,2 $\pm$0,05 durant toute la période larvaire. Au début de l'élevage, l'incubation des œufs, ainsi que les 7 jours post éclosion se font dans l'obscurité complète. Puis à partir de 8 jours, la luminosité est progressivement augmentée, à raison de + 2 heures par jour, jusqu'à atteindre 12 h / 12 h (jour / nuit).

La période des 7ers jours correspond aussi au début de l'alimentation. Les larves sont nourries entre 7 et 13 jours post éclosion avec des rotifères vivants (*Brachionus sp*). Entre 13 et 20 jours post éclosion, les larves sont nourries avec un mélange de rotifères et de nauplii A0 d'artémies (*Artemia salina*). A partir de 20 jours, les larves ne sont plus nourries qu'avec des nauplii A0.

Ce protocole d'élevage est résumé sur la figue 1.

Exposition à l'EE2

Afin de réaliser les expositions à l'EE2, nous avons testé d'une part l'exposition en bécher, en condition semi-statique, et d'autre part, une exposition en plaque 24 puits.

Cent larves ont été réparties dans 12 béchers de 1 litre contenant chacun 0,5 litre d'eau de mer naturelle filtrée, stérile et oxygénée par bullage. Ces béchers ont été répartis par groupe de trois dans les différentes conditions : «contrôle», «Témoin DMSO», «0,5 nM d'EE2» et «50 nM d'EE2» (cf. Article 3, «Materials and Methods»). Chaque jour, le nombre de mort était comptabilisé et tous les deux jours, 50% de l'eau était renouvelée et le milieu re-contaminé.

L'exposition en plaque a été réalisée en plaque 24 puits stériles (Greiner Bio-One, Les Ulis, France). Avant l'éclosion, les œufs fécondés ont été répartis (1 œuf par puit) dans les puits avec 2 ml d'eau de mer naturelle, filtrée et stérilisée, sans oxygénation. A l'éclosion, les plaques ont été réparties dans les différentes conditions («contrôle», «Témoin DMSO», «0,5 nM d'EE2» et «50 nM d'EE2») et contaminés ou non. La mortalité a été relevé quotidiennement et tous les deux jours, 50% de l'eau était renouvelée et le milieu re-contaminé. Les plaques sont placées en enceinte thermostatée à 15°C, en condition statique et sans bullage.

3. Résultats

3.1. Techniques d'élevage

3.1.1. Système semi-ouvert

Les premières expériences ont été réalisées en système semi-ouvert. Quelques heures après la mise en route du système, les œufs, entrainés par le flux se sont accumulés au niveau du robinet d'évacuation et ont adhérés au filtre à l'entrée du robinet. Cela a provoqué une réduction du débit de sortie, une monté du niveau d'eau et un débordement du système. Le flux d'eau dans l'aquarium a également changé à cause de l'absence de débit de sortie et des zones dépourvues de courant sont apparues, où les œufs se sont déposés et se sont accumulés. Rapidement, les œufs sans agitation ni oxygénation sont morts, entrainant une prolifération bactérienne importante et une contamination de l'eau.

Les œufs sains ont été transférés dans de l'eau propre et le système a été nettoyé mais les larves survivantes ont fini par mourir au bout de quelques jours.

3.1.2. Système cylindro-conique clos

Ce système a été testé pour la première fois en octobre 2016. Les œufs fécondés ont été acclimatés à 15°C et à une salinité de 32 ‰ avant d'être transférés dans des bonbonnes cylindro-coniques contenant environs 15 litres d'eau de mer artificielle reconstituée. Les œufs ont été mis sous agitation grâce à un bullage disposé dans le cône de purge à la base de la cuve.

Deux jours après le transfert, les œufs ont éclos avec un taux supérieur à 90%. Une purge par le bas a permis d'éliminer les chorions, les œufs avortés et les larves mortes. A l'éclosion, les larves sont mobiles, avec un phototropisme positif. A ce stade, elles ne peuvent pas s'opposer au courant et le bullage a été diminué afin d'éviter les chocs des larves contre les parois de la cuve.

Cependant, un taux important de mortalité a été observé dans les premiers jours après éclosion et, à 15 jours post éclosion, la mortalité était trop importante pour continuer l'élevage.

Une seconde tentative a été réalisée en novembre 2016 dans les mêmes systèmes. Cette fois, de l'eau de mer naturelle filtrée et stérilisée a été utilisée. Comme précédemment, les œufs ont été acclimatés avant d'être transférés dans les systèmes.

Deux jours après le transfert, les œufs ont éclos et le pourcentage d'éclosion était supérieur à 90 %. Durant les 3 premiers jours, une purge par le fond a été faite afin d'éliminer les chorions, les larves mortes et les œufs avortés puis les larves ont été transférés dans des aquariums 40 litres contentant de l'eau propre.

Vers 7 jours après l'éclosion, l'ouverture de la bouche a été observée et les larves ont été progressivement exposées à la lumière. Durant les phases lumineuses, les larves ont été nourries et des comportements de chasse ont été observés.

Entre 7 et 9 jours, un pic de mortalité a été observé et entre 50 et 60 % des individus sont morts.

Entre 16 et 18 jours post éclosion, un second pic de mortalité a été observé avec de nouveau une mortalité entre 50 et 60% des individus restants. L'utilisation de nauplii d'artémies peut servir de marqueur d'alimentation. Les naupliis sont orange vif et peuvent être observées par transparence dans l'estomac de la larve. D'après nos observations, seuls quelques individus avaient l'estomac orange, montrant qu'ils s'alimentaient. Pour les autres,

il est difficile de savoir s'ils continuaient de se nourrir de rotifère ou s'ils n'étaient pas capables de s'alimenter.

Malheureusement, malgré les différentes tentatives visant à réduire les deux pics de mortalité, nous avons à chaque fois perdu trop de larves et rarement continué après 20 jours d'éclosion.

3.2. Méthodes d'exposition

3.2.1. Exposition en bécher

Lors de l'exposition en bécher, les larves sont mortes rapidement. Durant ce test, nous n'avons pas mesuré la mortalité car celle-ci était très importante dès le premier jour.

De plus, il était assez difficile de comptabiliser les morts avec précision du fait de l'oxygénation entrainant un brassage de l'eau et de la putréfaction rapide des larves mortes.

En cinq jours, la totalité des larves étaient mortes et l'exposition a dû être arrêtée.

3.2.2. Exposition en plaque 24 puits

Lors de ce premier test en plaque, le taux de mortalité observé après éclosion (œufs non éclos et larves mortes lors de l'éclosion) était de 7 %. Durant les premiers jours, le taux de mortalité toutes conditions confondues était bas (<1 %) puis à 5 et 6 jours post éclosion, il a augmenté respectivement à 6 % et 7 %.

En observant les mortalités condition par condition, le pic de mortalité est retardé dans la condition 0,5 nM d'EE2 (8% de mortalité 7 jours post éclosion au lieu de 5 jours post éclosion chez le témoin et 50 nM d'EE2, respectivement 11 % et 7 % de mortalité) (Fig. 2A)

Par ailleurs, à la fin de l'exposition (10 jours post éclosion), les mortalités journalières augmentent dans toutes les conditions (Contrôle : 26 % ; Témoin DMSO : 17 % ; 0,5 nM d'EE2 : 27 %). Pour la condition 50 nM d'EE2, le pic de mortalité est avancé de 2 jours car on observe à 8 jours post éclosion une mortalité de 12 %. Cette mortalité reste importante à 9 et 10 jours post éclosion (8 % de mortalité) (Fig. 2B)

En observant le cumul de mort, la mortalité est similaire entre chaque condition (Contrôle : 27 % ; Témoin DMSO : 21 % ; 0,5 nM d'EE2 : 29 % ; 50 nM d'EE2 : 22 %) (Fig. 2C)

4. Discussion

Durant ces deux dernières années, nous avons tenté de mettre en place un élevage de bar européen au sein du laboratoire afin de pouvoir obtenir facilement des individus en conditions contrôlées. Nous avons pu mettre en place un système qui permet un haut taux d'éclosion ainsi qu'une survie des larves pendant 20 jours après l'éclosion. Néanmoins, l'objectif de maintenir les larves durant toute la phase larvaire, voir au-delà, n'est pas encore atteint.

Nos observations ont montré que les paramètres physico-chimiques sont importants pour le bon développement des œufs et pour leur éclosion.

Durant ce travail, nos expériences ont montré que les œufs doivent être en mouvement. Barnabé et Tournamille (1972) ont également observé une mortalité plus importante quand les œufs stagnaient au fond, sans mouvement d'eau. Cependant, nos expositions en plaques sans agitation (Article 2), ont montré un taux d'éclosion supérieur à 80 %. On peut supposer que c'est l'accumulation des œufs qui est mortelle car elle priverait d'oxygène les couches inférieures. L'oxygénation est donc un paramètre clef dans la survie des œufs et l'agitation prévient la formation de zones anoxiques.

Nous avons aussi remarqué, au cours de nos expériences, que la qualité de l'eau était importante. En effet, dans le système semi-ouvert et le système statique, nous avons utilisé de l'eau de mer artificielle. Cela permettait d'obtenir une qualité d'eau stable tout au long de l'année ainsi qu'un accès facilité à l'eau, le laboratoire ne bénéficiant pas d'une arrivée d'eau de mer. Que ce soit dans l'un ou l'autre des systèmes, nous avons observé un fort taux de mortalité après l'éclosion avec l'utilisation de l'eau de mer artificielle. Dans la littérature, peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'eau de mer artificielle sur le développement des larves alors que le stade larvaire est une période sensible, où la présence ou l'absence de certains composés provoque des malformations conduisant souvent à la mort (Strathmann, 1987). Néanmoins, chez l'oursin, quatre marques de sels ont été testées et comparées entre elles et avec l'eau de mer naturelle. Il ressort de cette étude que certaines marques vont provoquer chez les larves d'oursin une surmortalité et des malformations. La toxicité observée est, selon l'auteur, due aux traces de métaux lourds plus ou moins importantes en fonction des marques mais toujours supérieures à celles observées en milieu naturel (Shimek, 2008). Comme soulignée dans une autre étude, la concentration d'aluminium (en µmol/kg) est de 630 à 27 000 fois plus élevée dans les sels artificiels que dans l'eau de mer naturelle. Il en

est de même pour le plomb (entre 148 et 22 250 fois plus), le lithium, le cuivre, l'argent ou encore le manganèse (pour revue : Atkinson et Bingman, 1999).

La toxicité de ses éléments sur la survie des larves de poissons a été étudiée depuis plusieurs années dans le cadre de la pollution des environnements aquatiques. Plusieurs études montrent que ces éléments, même à l'état de trace, vont perturber profondément de nombreux procédés physiologiques, engendrer des malformations et conduire à une mortalité plus importante. Par exemple, l'exposition au plomb engendre des formations incomplètes de l'œil, des œdèmes cardiaques ou des malformations de la colonne vertébrale chez les larves de plusieurs espèces de téléostéens (pour revue : Sfakianakis et al., 2015 ; Jezierska et al., 2009).

Nous n'avons pas pu obtenir la composition en éléments traces du sel artificiel utilisé au début de notre étude mais nous avons observé que le passage de l'eau artificielle à l'eau de mer naturelle a amélioré la survie des larves après l'éclosion. On peut donc supposer que des éléments dans ce sel sont létaux et entrainent une mortalité chez les larves de bar.

Notre étude montre aussi que la mortalité observée chez la larve peut être due à des paramètres biotiques. Durant nos différentes tentatives d'élevage, le maintien des larves au delà de 20 jours après l'éclosion n'a pas été possible. Nous avons observé deux pics importants de mortalité durant les 20 premiers jours de vie des larves : le premier autour de 7 jours post éclosion et le second autour de 16 jours post éclosion.

En ce qui concerne le premier pic de mortalité, il concorde avec le début de l'alimentation. Il a été rapporté que le premier repas peut être fatal si la bouche n'est pas suffisamment ouverte (risque d'étouffement) ou si le tractus digestif n'est pas bien formé (risque d'occlusion). Barnabé et Tournamille (1972) ont montré que les nauplii d'artémie étaient trop grosses à ce stade par rapport à l'ouverture de la bouche. Par la suite, ils ont utilisé du plancton prélevé en milieu naturel mais qui n'a pas non plus permis l'alimentation. Les auteurs ont eu recours à une alimentation industrielle broyée en fines particules. Dans notre étude, nous avons nourri les larves avec des rotifères mais il fût difficile d'observer la présence de rotifère dans l'estomac malgré l'observation de comportement de chasse.

Au-delà des possibles malformations de la bouche ou du tractus, nous avons transféré, lors de nos expériences, les larves dans un milieu propre ce qui peut être stressant. De plus, les larves sont réparties en aquarium cubique de 40 litres et afin de les maintenir au noir, les parois sont occultées avec du plastique adhésif opaque. A 7 jours, lors du début de l'exposition à la lumière, les larves sont nourries mais les aquariums ne sont découverts que

partiellement. Il est possible que la superposition du plastique et du verre crée une surface réfléchissante qui empêche les larves de voir les proies et donc de se nourrir efficacement (observations personnelles).

Une autre explication serait que ce pic de mortalité pourrait être lié à la formation tardive de certains organes. Autour de 7 jours, la vessie natatoire se gonfle (Chatain, 1987). Si celle-ci se gonfle mal, les larves ne sont alors plus capables de nager correctement ni de chasser et meurent rapidement. Les problèmes au moment de l'insufflation de cette vessie peuvent être liés à une malformation de celle-ci ou à un paramètre physico-chimique qui ne permettait pas une bonne insufflation. Nous n'avons pas identifié de facteurs qui pourraient être responsables de ce problème mais cela fait partie de futures perspectives de recherche et de développement du système.

Malgré les changements d'eau fréquents (tous les trois jours), il est possible qu'un renouvellement constant d'eau soit nécessaire. A ce stade, les larves sont fragiles et supportent mal les variations du milieu. En effet, des variations de quelques unités de salinité ou de température vont entrainer chez les larves des mortalités importantes (Johnson et Katavic, 1986). Dans nos expériences, la température mesurée quotidiennement variait entre 14,5°C et 15,5°C, mais on ne peut pas exclure que cette variation, en plus d'autres changements, comme les nitrites ou les nitrates, aient eu un effet sur la survie des larves.

Les mortalités importantes peuvent être également dues à un développement bactérien que nous n'avons pas su déceler. Barnabé et Tournamille (1972) ont utilisé dans leurs expériences une couverture antibiotique à base de streptomycine et de pénicilline.

Par ailleurs, malgré les difficultés rencontrées pour obtenir un élevage, nous avons pu exposer des larves entre 0 et 10 jours post éclosion.

Nos premières expériences ont montré que l'exposition en bécher n'était pas concluante et entrainait des difficultés de maintien des larves et de contrôle de la mortalité. Comme observé au cours de la mise en point de l'élevage larvaire, les chocs et les courants d'eau entrainent une mortalité accrue. Cette méthode en bécher n'a pas été répétée.

Par la suite, nos résultats d'exposition en plaque sont encourageants. Cette technique a montré plusieurs avantages. L'eau contaminée est produite en plus petite quantité et réduit les risques d'exposition de l'expérimentateur liés à la manipulation de gros volumes. Le nombre de larves utilisées étant connu ainsi que le taux d'éclosion, la mortalité précise dans chaque condition peut facilement être estimée. Les mortalités observées au bout de 10 jours sont comprises entre 20 et 30 % ce qui reste faible sachant que le bar est une espèce qui pond

200 000 œufs/kg de poids corporel afin de pallier à une mortalité importante au cours du développement (FAO, 2017).

Cette méthode a permis de réaliser plusieurs expositions dans des conditions à chaque fois similaire et est facilement transférable à d'autres molécules.

Pour conclure, au cours de ces travaux, nous avons élucidé certaines étapes et paramètres clefs et nous sommes parvenus à faire éclore, avec un fort taux d'éclosion, les œufs et à les maintenir durant 20 jours les larves.

Néanmoins, les mortalités observées à 7 et 16 jours peuvent être multiparamétriques. Ces différents paramètres doivent être testés et améliorés, si possible, afin d'obtenir dans le futur un élevage viable permettant le maintien et le développement des larves dans des conditions optimales.

Par ailleurs, nous avons développé au cours de ce travail de thèse une méthode nous permettant de réaliser facilement des expositions et de contrôler les conditions ainsi que les individus séparément. Cependant, le but de l'optimisation de l'élevage est *in fine* d'obtenir des larves à différents stades de développement. La taille des larves entre 0 et 10 jours post éclosion se prête facilement à ces conditions d'exposition. Dans l'avenir, il faudra envisager d'adapter si possible cette méthode à de plus gros individus.

Références bibliographiques

Atkinson, M. and C. Bingman. 1999. The Composition of Several Synthetic Seawater Mixes. March 1999 *Aquarium Frontiers On-line*.

Barahona-Fernandes MH. 1982. Body déformation in hatchery reared European sea bass Dicentrarchus labrax (L). Types, prevalence and effect on fish survival. Journal of Fish Biology 21:239–249.

Barahona-Fernandes MH, Girin M, Metailler R. 1977. Expériences de conditionnement d'alevins de bar (Pisces, Dicentrarchus labrax) a différent aliment composé. Aquaculture 10:53–63.

Barnabe G, Boulineau-Coatanea F, Rene F. 1976. Chronologie de la morphogénèse chez le loup ou le bar Dicentrarchus labrax (L.) (Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. Aquaculture 8:351–363.

Barnabe G, Le Coz C. 1987. Large-scale cage rearing of the European sea bass, Dicentrarchus labrax (L.), in tropical waters. Aquaculture 66:209–221.

Barnabe G. TJ-C. 1972. Expériences de reproduction artificielle de Loup Dicentrarchus labrax (Linne 1758). (ISTPM, editor.). Available from: https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2063/

Barnabe G. 1973. Compte-rendu sommaire de la campagne 1972-1973 de reproduction contrôlée du loup à Sète. Available from: https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5995/

Chatain B. 1987. La vessie natatoire chez Dicentrarchus labrax et Sparus auratus. Aquaculture 65:175–181.

Coves D. 1985. Etat actuel de l'élevage du loup, *Dicentrarchus labrax*, en écloserie. Aquatique revue (3), (27-30).

Girin M. 1976. La ration alimentaire dans l'élevage larvaire du bar, Dicentrarchus labrax (L.) = The feeding ration in the larval culture of sea bass, Dicentrarchus labrax (L.). Available from: http://www.vliz.be/en/imis?refid=4802

IFREMER. FAO Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758). Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en#tcNA00EA

Jezierska B, Ługowska K, Witeska M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiology and Biochemistry 35:625–640.

Johnson DW, Katavic I. 1986. Survival and growth of sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae as influenced by temperature, salinity, and delayed initial feeding. Aquaculture 52:11–19.

Sfakianakis DG, Renieri E, Kentouri M, Tsatsakis AM. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. Environmental Research 137:246–255.

Shimek R. 2008. The Toxicity of Some Freshly Mixed Artificial Sea Water; A Bad Beginning For A Reef Aquarium by Ronald L. Shimek, Ph.D. - Reefkeeping.com. Available from: http://reefkeeping.com/issues/2003-03/rs/feature/index.php

Strathmann MF. 1987. Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae. University of Washington Press. Available from: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8920142

Vicquelin L, Leray-Forget J, Peluhet L, LeMenach K, Deflandre B, Anschutz P, Etcheber H, Morin B, Budzinski H, Cachot J. 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. Aquatic Toxicology 105:235–245.

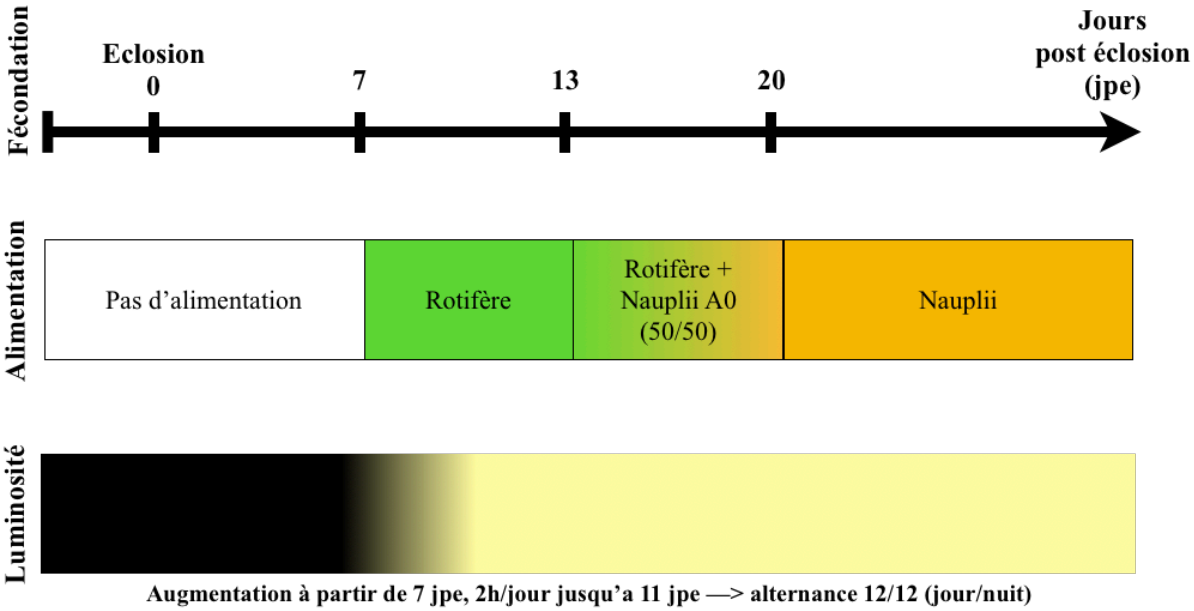
Vosges M, Kah O, Hinfray N, Chadili E, Le Page Y, Combarnous Y, Porcher J-M, Brion F. 2012. 17α-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. Reproductive Toxicology 33:198–204.

Vosges M, Le Page Y, Chung B, Combarnous Y, Porcher J-M, Kah O, Brion F. 2010. 17α-Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. Aquatic Toxicology 99:479–491.

Wagner SD, Kurobe T, Hammock BG, Lam CH, Wu G, Vasylieva N, Gee SJ, Hammock BD, Teh SJ. 2017. Developmental effects of fipronil on Japanese Medaka (Oryzias latipes) embryos. Chemosphere 166:511–520.

Yan L, Gong C, Zhang X, Zhang Q, Zhao M, Wang C. 2016. Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil. Environmental Toxicology and Pharmacology 48:39–45.

Figures



Température = 15°C

pH = 8,2

Figure 1 : Protocole d'élevage durant la période larvaire du bar européen.

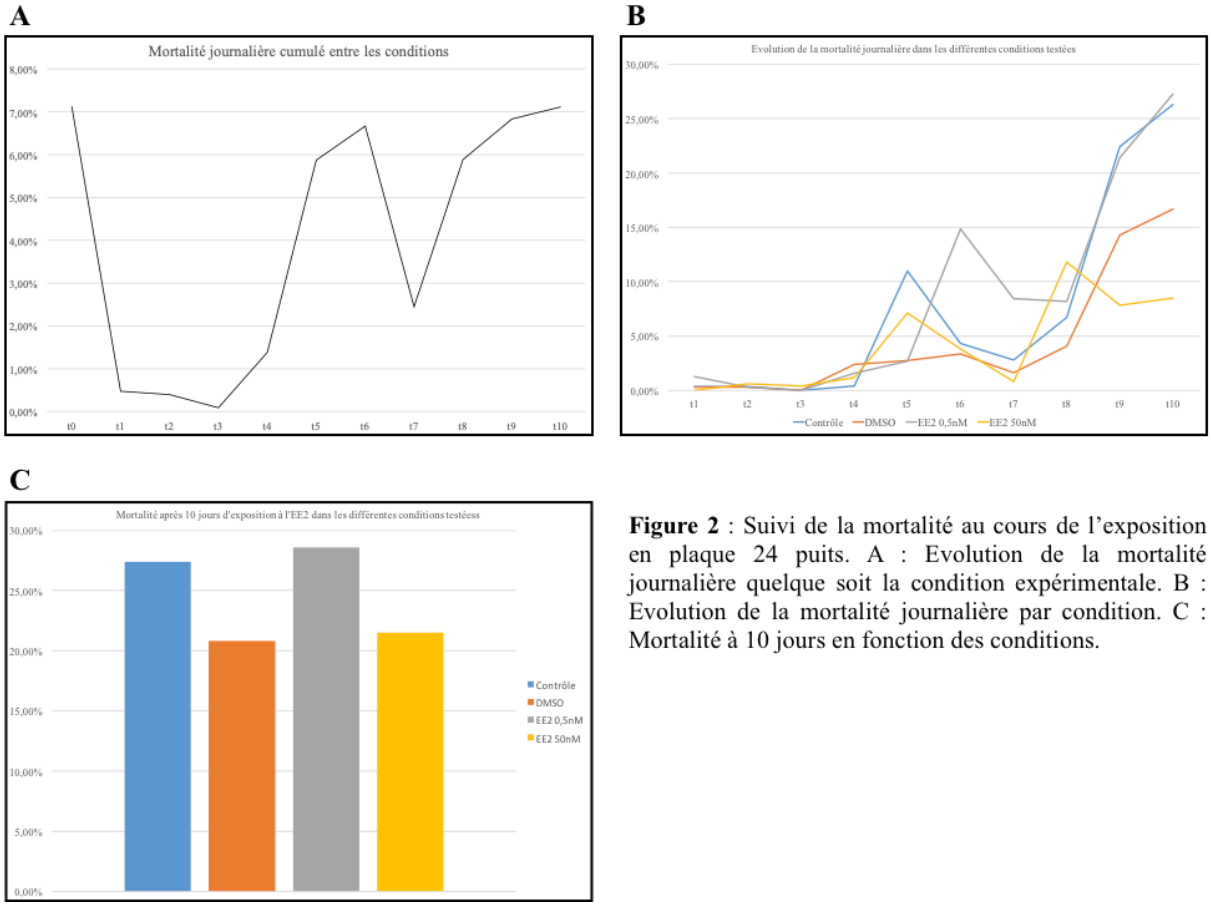


Figure 2 : Suivi de la mortalité au cours de l'exposition en plaque 24 puits. A : Evolution de la mortalité journalière quelque soit la condition expérimentale. B : Evolution de la mortalité journalière par condition. C : Mortalité à 10 jours en fonction des conditions.

Article 1

Ontogeny of brain kisspeptin and GnRH systems in the European sea bass: potential new roles in early development

Florent Nihoul[1] ; Adeline Germain[1] ; Sabrina Jolly[1] ; Aurélie Duflot[1] ; Jean-Michel Danger[1] ; Salima Aroua[1,*]

[1]*Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques UMR-I 02SEBIO - Université Le Havre Normandie -FR CNRS 3730 SCALE, Le Havre, France*

Title

Ontogeny of brain kisspeptin and GnRH systems in the European sea bass: potential new roles in early development.

Authors

Florent Nihoul[1] ; Adeline Germain[1] ; Sabrina Jolly[1] ; Aurélie Duflot[1] ; Jean-Michel Danger[1] ; Salima Aroua[1,*]

Affiliation

[1]Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques UMR-I 02SEBIO - Université Le Havre Normandie -FR CNRS 3730 SCALE, Le Havre, France

*Corresponding author

Université Le Havre Normandie - UMR-I 02 SEBIO - 25 rue Philippe Lebon - BP 1123, 76063 Le Havre Cedex, France. / E-mail address: salima.aroua@univ-lehavre.fr

Abstract

Kisspeptins and GnRHs are considered as key players in the cerebral control of the reproductive function. Improving our knowledge of the origin and the organization of the different kisspeptin and GnRH systems could contribute to a better understanding of their respective functions and interactions. To this end, using a combination of quantitative real time PCR (qPCR) and *in situ* hybridization (ISH), we studied the temporal and spatial expression patterns of the two *kiss* (*kiss1* and *kiss2*) and the three *gnrh* (*gnrh1*, *gnrh2* and *gnrh3*) genes during the larval development of the European sea bass. All transcripts were measured by qPCR as early as 4 days post-hatching (dph), and showed two different profiles, of expression throughout the larval development: *kiss1*, *gnrh2* and *gnrh3* mRNA levels decreased while *kiss2* and *gnrh1* mRNA levels increased. Using ISH, we showed that the ontogeny of *kiss*-expressing cells is different for the two genes. *Kiss1*-expressing cells were first detected at 50dph in the dorsal diencephalon, whereas *kiss2*-expressing cells were detected as early as 4dph in the caudal prosencephalon, and then expanded inside the diencephalon from 30dph. *Gnrh1*-expressing cells were not detected in the developing brain, while localization of *gnrh2*- and *gnrh3*-expressing cells varied. *Gnrh2*-expressing cells were observed in the mesencephalon and the rhombencephalon at 4 and 10dph, and thereafter, the

rhombencephalic signal became undetectable. *Gnrh3*-expressing cells were first detected in the olfactory placodes at 4dph and later extended from the olfactory bulbs to the diencephalon. This study provides the first description of the ontogeny of kisspeptin system in teleosts, new insight regarding the ontogeny of GnRH systems in sea bass and suggests potential additional roles for kisspeptins and GnRHs during larval development.

Keywords

Teleost, larva, kisspeptins, GnRHs, ISH, qPCR

1. Introduction

Kisspeptin (kiss) and its receptor (*kissr*) are known for their implication in the mammalian reproductive function. First described as an anti-metastatic peptide in melanoma cell line (Lee et al., 1996), the implication of the kisspeptin system in reproduction was suggested later in humans and mice as genetic inactivation of *kissr* (previously named *GPR54*) induced hypogonadotropic hypogonadism (De Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). Since then, studies conducted in mammalian and non-mammalian species have improved knowledge of kisspeptin systems and their roles in regulating the reproductive function (for reviews: Pinilla et al., 2012; Tena-Sempere et al., 2012; Putteeraj et al., 2016). In particular, the key role of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion has been extensively demonstrated in mammalian vertebrates (for reviews: Colledge, 2009; Oakley et al., 2009), but not in teleosts (for review: Kanda 2018).

In teleosts, two situations have been described regarding kisspeptin (*kiss*) genes: some species such as fugu or stickleback possess a single *kiss* gene whereas others such as zebrafish or medaka have two *kiss* genes (Pasquier et al., 2012; for review: Pasquier et al., 2014). Regarding GnRH, the main cerebral factor controlling reproduction, teleosts possess two or three paralogs of *gnrh* genes: *gnrh1*, *gnrh2*, and *gnrh3* (for reviews: Kah et al., 2007; Roch et al., 2014). In teleosts which possess two *gnrh* genes (*gnrh2* and *gnrh3*), the GnRH3 is the hypophysiotropic form, whereas in the others, GnRH1 is the form that stimulates gonadotropin release, GnRH2 and GnRH3 being considered as neuromodulators (for reviews: Zmora et al., 2002; Kah et al., 2007; Zohar et al., 2010).

To date, the roles and potential interactions of these different peptides in teleosts remain unclear, especially during early development. One way to characterize the function of each gene is to investigate the organization of its different expressing-neurons in the brain. Concerning GnRH, the type 1 and type 3 GnRH systems shared a common distribution with

cells located in the olfactory bulbs, the ventral telencephalon, and the diencephalon, mostly in the preoptic area. The type 2 GnRH system is constituted by cells located at the boundary between the diencephalon and the mesencephalon (sea bream: Gothilf et al., 1996; sea bass: González-Martínez et al., 2002a; Kah et al., 2007). Regarding kisspeptin systems, kiss1 neurons are found in the dorsal part of the diencephalon (in the habenular region) and kiss2 neurons are present in the hypothalamus (zebrafish: Servili et al., 2011; sea bass: Escobar et al., 2013a; zebrafish, goldfish, medaka: Ogawa and Parhar, 2013). This led the authors to suggest a role for kiss1 in neuromodulation and for kiss2 in the control of reproduction (zebrafish: Servili et al., 2011; sea bass: Escobar et al., 2013a). In addition to these data collected in adult fish, some studies have focused on the developmental expression patterns of these systems. Regarding the ontogenesis of GnRH systems, an early expression of the different GnRH forms has been demonstrated in several fish species during embryonic (*H. burtoni*: White and Fernald, 1998; medaka: Okubo et al., 2006; zebrafish: Wu et al., 2006) or larval development (African catfish: Dubois et al., 2001; sea bass: González-Martínez et al. 2002b, 2004; seabream: Wong et al., 2004). In European sea bass, the organization of the three GnRH systems was studied at both the messenger and protein levels (González-Martínez et al. 2002a, 2004). Due to their relatively recent discovery, less data have been collected concerning the ontogenesis of kisspeptin systems in fish, but gene expression has already been demonstrated during the early stages of development in some species (zebrafish and medaka: Kitahashi et al., 2009; medaka: Hodne et al., 2013; chub mackerel: Selvaraj et al., 2015). Altogether, these data suggest a role for kisspeptin and GnRH systems during the development and potential early interactions between them.

The European sea bass is a species of high commercial value that has been well studied in terms of reproductive physiology (Barnabé and Billard, 1984; Servili et al., 2014), permitting the management of the reproductive cycle and the development of the farming industry. In this species, a brain atlas has been established (Cerdá-Reverter et al., 2001a, 2001b, 2008) facilitating the description of different neuronal networks including those of GnRHs (larva and adult: González-Martínez et al., 2001, 2002, 2004) and kisspeptins (adult: Escobar et al., 2013a, 2013b).

In the present study, we investigated for the first time in a teleost the ontogenesis of kisspeptin systems in parallel to GnRH systems. Using a combination of quantitative PCR and *in situ* hybridization techniques, temporal and spatial expression patterns of the two kiss (*kiss1* and

kiss2) and the three GnRH systems (*gnrh1*, *gnrh2* and *gnrh3*) are described during European sea bass larval development.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Fixed sea bass larvae were obtained from a local hatchery (Aquastream, Ploemeur, France) at 4, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days post hatching (dph). During this period, size and morphometric parameters changed in larval specimens in the manner described by Barnabé et al. (1976). Larvae were fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS 1X, pH7.4) at 4 °C; then washed in PBS and gradually transferred in a 50% glycerol/PBS solution for storage at -20°C until the *in situ* hybridization (ISH) studies. For qPCR assays, larvae were immersed in RNA later solution (Ambion Inc., Austin, TX) and stored at -20°C until experiments. All procedures were in accordance with the French and European legislation concerning the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes.

2.2 RNA isolation and reverse transcription

Larvae samples were homogenized in a Soft Tissue Homogenizer CK14 (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France). Total RNA were extracted in Tri-Reagent (Ambion Inc.) according to the manufacturer's instructions. Following extraction, samples were treated with TURBO DNA-free kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and the first strand of cDNA was synthesized from 1µg of total RNA using Superscript Reverse Transcriptase III and random hexamers (Invitrogen).

2.3 Quantitative real time PCR

Quantitative real time PCR analysis was performed by using a Rotor Gene Q device (Qiagen, Courtaboeuf, France). The mix consisted of 5µl of QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (Qiagen), 1.5µl of diluted cDNA template (1:25) and forward/reverse primers (200nM each) in a final volume of 10µl. Primers used for the quantitative real time PCR assays are shown in Table 1.

After testing and optimization, the following conditions were chosen: denaturation at 95 °C for 15min, followed by 45 cycles of 15s at 94°C, 25s at a temperature ranging from 57 to 60°C according to the target gene (Table 1), 25s at 72°C. The first derivative of the melting curve (from 55°C to 95°C) was systematically plotted at the end of assay to make sure that a

single peak was obtained. Specificity of PCR amplification was further verified by sequencing the amplicon obtained (Genewiz, Bishop's Stortford, UK).

For each target gene, to determine the efficiency of the qPCR reaction, serial dilutions of cDNA from a pool of cDNA prepared from the different life stages studied were assayed in duplicate. For each PCR run, samples were analyzed in duplicate, and a non-template control was added to confirm the absence of contamination. In addition, a calibrator sample was added in each run to adjust for assay to assay variations. Different reference transcripts were tested (*ef1*, *L13* and *fau*) and their stability compared using Bestkeeper software (BestKeeper© 2004 M. W. Pfaffl). Transcript encoding for ribosomal protein L13 was chosen as a reference and relative expression levels were calculated by ΔΔCt method.

2.4 Sequence cloning and riboprobes synthesis

Using specific primers for *kiss2* (F: TTCCAGCCCGTGTTTCTCTC, R: TCTTCCATGTTCAAATCATGTCACA), *gnrh2* (F: TGGGACACCTGAAGTGACAA, R: ACACTCCTCCTCTGGGGTCT) and *gnrh3* (F: ATGGAAGCGAACAGCAGAGT, R: GCCGATCCATCACTGGTGT) a polymerase chain reaction (PCR) was performed on cDNA pool from adult brain. PCR conditions were: an initial step at 95°C for 2min, 32 cycles at 95°C for 30s, 59 or 60°C for 30s, 72°C for 30s, and a final step at 72°C for 5min. PCR products were cloned in TOPO vector (Invitrogen) and sequenced by Genewiz. Concerning *kiss1* and *gnrh1*, plasmids were kindly provided by Dr. Olivier Kah. After plasmid linearization, probes were synthesized with DIG-UTP labelling mix and T3, T7 or SP6 polymerases according to the manufacturer's instructions (Roche, Indianapolis, IN). Each probe was tested on adult tissue to ensure its function and specificity.

2.5 Whole mount in situ hybridization

This procedure was applied to larvae from 4 to 30dph. Larvae were washed in PTW (PBS, 0.1% Tween 20), treated with proteinase K (10µg/ml in PTW) for 40 min at 37 °C and post-fixed for 1h in 3.7% PFA. A prehybridization step was performed for 5h at 65°C in hybridization solution (HS: 50% deionized formamide, 5X SSC, 0.1% Tween 20, 0.5% SDS) supplemented with 25 µg/ml heparin and 100 µg/ml baker's yeast tRNA. The hybridization step was carried out overnight at 65°C in HS containing the appropriate probe (600ng/ml). Probes in excess were removed by washing in HS and progressive equilibration to 2X SSC. Larvae were then bathed in a blocking solution (BS: 100mM maleic acid and 150mM NaCl, 1% Tween 20, pH7.5), and a saturation step was performed in BS containing 4% blocking

powder (BB) (Roche) and 15% Fetal Bovine Serum (FBS) for 1h at room temperature. Then, the larvae were incubated overnight at 4°C with an anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Roche) diluted to 1: 1000 in BS containing 1% BB and 5% FBS. The alkaline phosphatase activity was detected by using NBT-BCIP (Roche) in alkaline solution (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$ 0.1% Tween 20 and 500µM levamisole, pH 9.5) at room temperature in the dark for 6 to 12h. Coloration was stopped by successive washes in PBS 1X. Tissues were then fixed in 3.7% PFA at room temperature overnight and embedded in gelatin. Larvae were sectioned at 20µm using a MicromHM525 cryostat (MMFrance, Brignais, France). For each ISH procedure, a positive control, corresponding to a larva or an adult brain, was included.

2.6 In situ hybridization on cryosection

From 50dph, because of the ossification of the skull, *in situ* hybridization was performed on cryosections. Briefly, heads were isolated and embedded for cryosectionning. Adjacent sections from the same larva were treated with anti-sense or sense probes. Sections were washed twice for 15 min with 1X PBS / Active DEPC (0.1%) and equilibrated in 5X SSC. Slides were incubated overnight at 65°C in HS containing 600ng/slide of the probe, in a box containing 50% deionized formamide and 50% of 5X SSC to avoid dehydration. Washes were performed twice with 2X SSC and once with 0.1X SSC for 1h. Sections were then equilibrated in BS twice for 10 minutes, and saturated in BS solution containing 4% blocking reagent (Roche) and 15% FBS serum for 1h at room temperature. Sections were incubated for 2h at 4°C with an anti-digoxigenin antibody coupled with alkaline phosphatase (Roche) diluted to 1: 1000 in BS solution added with 5% FBS and 1% BB. Detection was conducted in alkaline solution containing NBT-BCIP (Roche) or Sigma FAST FastRed TR/Naphtol AS-MX (Sigma-Aldrich, Damstadt, Germany). For each ISH procedure, a positive control, corresponding to sections of adult brain, was included. Sections were photographed using a Nikon inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-U, Japan) and a Nikon D3s camera (Nikon, Japan).

2.7 Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using RStudio software (Version 1.0.136). After testing the normality and the homogeneity of variances, comparison of means was performed with a non-parametric Kruskal and Wallis test followed by Nemenyi post-hoc test. The level of significance was set to 0.05.

3. Results

In this study, genes and transcripts are written in italics and lower case (*e.g.*, *kiss1*), and the protein symbol is the same as the gene symbol, but not italicized (*e.g.*, kiss1).

3.1 *Kiss* and *gnrh* mRNA levels in whole larvae during development

Specific qPCR protocols were developed for each *kiss* and *gnrh* genes in sea bass larvae. They were then applied for the analysis of their respective expression during sea bass larval development.

3.1.1. kiss1 and kiss2

Both *kiss1* and *kiss2* mRNA were detected at all larval stages (Fig.1A). At the first sampling time (4dph), Ct values indicated a greater amount of *kiss1* transcripts compared to *kiss2* transcripts (Ct kiss1 = 25.5; Ct kiss2 = 27.9). Moreover, *kiss1* and *kiss2* exhibited different expression profiles. Concerning *kiss1*, relative mRNA levels significantly ($p<0.05$) decreased (x0.4) from 4dph to 30dph. Then, relative mRNA levels remained relatively constant until 60dph. In contrast, *kiss2* relative mRNA levels remained constant from 4dph to 30dph. At 40dph *kiss2* relative expression increased significantly (x3.3 compared to 4dph, $p<0.05$), and remained high at 50dph (x4.5 relative to 4dph, $p<0.05$) and 60dph (x2.9 relative to 4dph $p<0.05$) (Fig. 1A).

3.1.2. gnrh1, gnrh2 and gnrh3

The three *gnrh* mRNA levels were detected at all larval stages. *Gnrh1* relative mRNA levels were lower than those of the two other GnRH forms: mean Ct values at 4dph was 33.02 for *gnrh1*, 25.26 for *gnrh2* and 22.99 for *gnrh3*.

Furthermore, two different expression profiles were observed for the GnRH forms. mRNA levels for *gnrh1* slightly increased during larval development (Fig. 1B) whereas *gnrh2* and *gnrh3* decreased over developmental time. In detail, *gnrh2* expression was significantly reduced from 40dph (x0.4 compared to 4dph, $p<0.05$) and further decreased at 60dph (x0.25 compared to 4dph, $p<0.05$). Regarding *gnrh3*, a significant decrease was observed starting at 30dph (x0.4 compared to 4dph, $p<0.05$) and was even more pronounced at 60dph (x0.2 compared to 4dph, $p<0.05$) (Fig. 1B).

3.2 Localization of *kiss*- and *gnrh*-expressing cells in the developmental brain of sea bass

During larval development, the brain morphology changes drastically. The following nomenclature for brain regions is used: from 4 to 10dph, the brain regions are named prosencephalon, mesencephalon and rhombencephalon following the antero-posterior axis; later, from 20 to 50dph, they are named telencephalon, diencephalon, mesencephalon, *cerebellum* and *medulla oblongata*.

3.2.1. kiss1 and kiss2

Regarding *kiss1*-expressing cells, no labeled cells could be detected by ISH before 50dph. At this developmental stage, positive cells appeared to be exclusively located in the dorsal part of the diencephalon, more specifically in the habenular region, where only a weak signal was detectable (Fig. 2).

Kiss2-expressing cells were detected as early as 4dph. Labeled cells were symmetrically localized in the caudal part of the prosencephalon, close to the eyes (Fig. 3A). At 10dph, a higher number of *kiss2*-expressing cells were detected in the same area (Fig. 3B). From 20 to 50dph, labeled cells were located more deeply inside the diencephalon, in the future hypothalamic region (Fig. 3C, D and E). No signal was detected in sections treated with the sense probe (Fig. 3F).

3.2.2. *gnrh1, gnrh2 and gnrh3*

The first signals detected for *gnrh*-expressing cells were observed at 4dph, and they only concerned *gnrh2*- and *gnrh3*-expressing cells. Interestingly, *gnrh1*-expressing cells were not detected at that time nor at any other larval stage studied, neither in the brain nor in the other tissues of larvae.

For *gnrh2*-expressing cells, two populations of cells were detected in the brain of 4dph larvae. One population was located in the ventral mesencephalon and the other was detected in the ventral part of the rhombencephalon (Fig. 4A). At 10dph, the number of cells constituting the rhombencephalic population decreased but remained detectable (Fig. 4B). From 20dph and in later larval stages, staining was not observed in the rhombencephalon anymore. In contrast, the mesencephalic population of *gnrh2*-expressing cells remained detectable and the number of stained cells increased throughout the larval development. At 50dph, these cells were quite large and organized along the longitudinal fissure in the synencephalic area (Fig. 4C).

At 4dph, *gnrh3*-expressing cells were located in the olfactory placodes (Fig. 5A). At 10dph, stained cells were also detected in the olfactory bulbs (Fig. 5B). At 20 and 30dph, more

stained cells were detected and appeared widespread in the olfactory bulbs. At 50dph, various clusters of *gnrh3*-expressing cells were observed ranging from the olfactory bulbs to the diencephalon (Fig. 5C). At this stage, the strongest signal was observed in the olfactory bulbs compared to other cell populations scattered along the ventral telencephalon (Fig. 5C).

4. Discussion

In this study, by combining real time qRT-PCR and *in situ* hybridization methods, we were able to measure and map the mRNA of the different kisspeptins and GnRHs during sea bass larval development. Moreover, this study is, to our knowledge, the first to describe the neuroanatomical ontogeny of kisspeptin systems in the brain of a teleost fish.

4.1 Kisspeptin expression during larval development

In order to better understand the ontogenesis of the 'kisspeptin systems', *kiss1* and *kiss2* mRNA levels were analyzed during sea bass larval development. Our results revealed opposite expression profiles, *kiss1* mRNA expression decreasing throughout the larval period whereas *kiss2* mRNA expression increased during this period, suggesting different roles. *Kiss* mRNA levels have been measured in some fish species during the early life stages. In Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), where only *kiss2* has been identified, Park et al. (2012) measured its expression during the 24 weeks post-hatching (wph). They observed a first increase at 2wph during the larval period, followed by a second one at 13wph concomitantly with the pubertal period in tilapia, leading the authors to suggest a potential involvement of Kiss2 in sex differentiation (2wph), and puberty (13wph). In the ovoviviparous black rockfish (*Sebastes schlegeli)*, where only the *kiss1* gene was characterized, an increase in *kiss1* mRNA was observed 20 days after birth, during gonadal development (Song et al., 2015). In chub mackerel (*Scomber japonicus*), both *kiss1* and *kiss2* mRNA were detected in larvae and showed a similar decreasing trend during larval development (Selvaraj et al., 2015). In pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*), *kiss1* and *kiss2* mRNAs were detected during the first week and no significant variation was observed during the following 7 weeks (Tovar Bohórquez et al., 2017). In all these studies, because of the concomitance of *kiss* expression and gonadal differentiation, authors have suggested the involvement of kisspeptins in this process. In sea bass, gonadal differentiation occurs around 150 day post fertilization (dpf) (Blázquez et al., 2009), that is several weeks after the variations in *kiss* gene expression measured in the present study. This suggests a potential role of kisspeptins in other developmental processes.

Embryonic expression of *kiss* genes has been reported in two fish species. In zebrafish (*Danio rerio*), both *kiss1* and *kiss2* mRNAs were detected from 1dpf and their expression levels increased during the next 7dpf (Kitahashi et al., 2009; Zhao et al., 2014). In medaka (*Oryzia latipes*), *kiss1* and *kiss2* transcripts from maternal origin were detected at 2 hours post fecundation (hpf) and from zygotic origin at 17hpf (Hodne et al., 2013).

Moreover, functional studies performed in medaka and zebrafish gave more information on the potent role of kisspeptins during development. In zebrafish, early treatment by Kiss1 induced proliferation of GnRH3 neurons and stimulated the number of synaptic boutons on these cells located in the terminal nerve (Zhao et al., 2014). In medaka, Hodne et al. (2013) have performed knockdown experiments for both kisspeptins and their receptors (*gpr54-1* and *gpr54-2*). On the basis of their results, they concluded that before zygotic transition, *kiss1* and *gpr54-1* are crucial for survival since a knockdown of either gene leads to death of embryos before gastrulation. After zygotic transition, knockdown of *gpr54-2* led to death of embryos just after gastrulation whereas *kiss1* and *gpr54-1* allowed embryo survival but induced disruption in eye and brain development (Hodne et al., 2013). Taken together, these results suggest an involvement of the kisspeptin systems early during the development of the brain and its maturation. Nevertheless, these findings should be taken with caution as in another study, zebrafish mutant lines for kisspeptins (*kiss1*$^{-/-}$, *kiss2*$^{-/-}$ and *kiss1*$^{-/-}$; *kiss2*$^{-/-}$) and kiss receptors (*kissr1*$^{-/-}$, *kissr2*$^{-/-}$ and *kissr1*$^{-/-}$; *kissr2*$^{-/-}$) were produced and, interestingly, the animals were viable, normally developed and fertile (Tang et al., 2015).

Regarding the ontogeny of kisspeptin expressing cells, the results obtained in the present study indicate that, in the developing brain of sea bass, kiss1 and kiss2 have different temporal patterns and origins (Fig. 6). Concerning *kiss1*-expressing cells, we first detected them at 50dph in the dorsal part of the boundary between prosencephalon and mesencephalon, area of the future habenula where *kiss1* cells were detected in adult zebrafish (Servili et al., 2011) and sea bass (Escobar et al., 2013a). The first *kiss1*-expressing cells observed in the brain of larvae were detected at 50dph when *kiss1* transcript levels in whole larvae decreased. It has been demonstrated in different teleost species that, in addition to the brain, *kiss1* and *kiss2* mRNAs are expressed in peripheral organs (sea bass, zebrafish and medaka: Felip et al., 2009; chub mackerel: Selvaraj et al., 2010; rohu: Saha et al., 2016; *Catla catla*: Rather et al., 2016, 2017; pejerrey: Tovar boharquez et al., 2017; European eel: Pasquier et al., 2017). One hypothesis would be that before 50dph, *kiss1* is expressed in the sea bass larva but at levels under the detection limit of ISH. From 50dph, despite a global decrease of *kiss1* relative levels in the whole larva, an increase of *kiss1* expression in discrete brain area has permitted

their detection. *Kiss2*-expressing cells were detected from 4 days post hatching (dph) in the caudo-ventral part of prosencephalon. Later, the cell populations increased and expanded inside the preoptic region, which is the location described for *kiss2*-expressing neurons in adult sea bass (Escobar et al., 2013a). This increase in *kiss2*-expressing cells is concomitant with the increase of *kiss2* mRNA levels measured in the whole larvae.

Our results show that *kiss1*- and *kiss2*-expressing cells originate from 2 distinct diencephalic brain regions (dorsal for *kiss1* cells and ventral for *kiss2* cells) (Fig. 6). Interestingly, studies investigating the distribution of kisspeptin cells in adult fish brain described a population of kiss1 neurons in the habenula of several species (for review: Ogawa and Parhar, 2013) including sea bass (Escobar et al., 2013a; 2013b), while a second population was also described in the hypothalamus of adult sea bass, but only during the reproductive period (Escobar et al., 2013a). In the same studies, *kiss2*-cell populations were described ventrally in different hypothalamic regions. In addition to the localization already documented in adult sea bass, we found *kiss1*- and *kiss2*-expressing cells in the region described as proliferation area in zebrafish (Grandel et al., 2006). Altogether, our results on the ontogeny of kisspeptin systems in the brain of sea bass suggest that the 'kisspeptin systems' observed in the adult brain are set up early during the larval development. In addition, the presence of kisspeptin expressing cells in the brain of developing larvae reinforces the idea of their potential roles in brain development and maturation.

4.2 GnRH expression during larval development

The expression of the three GnRH forms was followed during larval development by qPCR. Although each form was detected at 4dph, *gnrh1* mRNA levels were lower than those of *gnrh2* and *gnrh3* at the same developmental stage. Similar observations were also made in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) and in the cobia (*Rachycentron canadum*), where the three GnRH forms were detected from 1dph with a weaker representation of *gnrh1* mRNA compared to the other forms leading the authors to propose a predominant role for GnRH2 and GnRH3 during development (Wong et al., 2004; Mohamed et al., 2007). Nevertheless, it is not the case in all fishes and thus, in chub mackerel (*Scomber japonicus*), *gnrh1* and *gnrh2* mRNA levels are equivalent and lower than *gnrh3* mRNA (Selvaraj et al., 2015). When comparing the expression profiles of the different GnRH forms, the results appeared to differ relative to each species. In our study, two distinct expression profiles were observed in sea bass, *gnrh1* mRNA levels tend to increase during the larval period whereas mRNA levels for the other two GnRH forms had a decreasing tendency. Similar trends were observed in chub

mackerel during the first 30dph (Selvaraj et al., 2015) whereas in gilthead seabream, the three forms of GnRH shared the same increasing profile (Wong et al., 2004) and in cobia, a peak in mRNA levels was observed for the three GnRH forms around 6dph (Mohamed et al., 2007). In zebrafish, where only two forms are present, namely GnRH2 and GnRH3, similar increasing trends were observed during the first 7dpf, then *gnrh2* mRNA levels continued to increase while *gnrh3* mRNA decreased (Kitahashi et al., 2009).

In addition to the expression profiles, many studies have tried to propose and investigate the roles for the different GnRH peptides by examining the distribution of their expressing/producing cells. Using *in situ* hybridization, immunohistochemistry and more recently transgenic fishes, the ontogeny of the different GnRH systems was described in several fish species (cichlid *H. burtoni*: White and Fernald, 1998; african catfish: Dubois et al., 2001; sea bass: González-Martínez et al., 2002, 2004; seabream: Wong et al., 2004; medaka: Okubo et al., 2006; Takahashi et al., 2016a; zebrafish: Wu et al., 2006; Palevitch et al., 2006). Interestingly, comparison of the different localization studies showed that the first *gnrh* expressing cells detected are the *gnrh2* cells. This suggests a predominant role in early development for this form. In the present study, two populations of *gnrh2*-expressing cells were detected at 4dph, one located in the mesencephalon, and the other in the rhombencephalon. These two populations of *gnrh2*-expressing cells are still detected at 10dph, but the rhombencephalic population disappeared at 20dph, confirming the results obtained in seabream and sea bass by Wong and collaborators (2004). Interestingly, in a previous study describing the development of the GnRH system in sea bass using immunohistochemistry, this rhombencephalic population was not detected (González-Martínez et al., 2004) suggesting that *gnrh2* was transiently expressed. Regarding the other population, it remained detectable in the synencephalon area in accordance with the previous studies performed in sea bass (González-Martínez et al., 2002, 2004). The *gnrh3*-expressing cells are generally detected subsequently/later in teleosts studied so far (seabream: Wong et al., 2004; medaka: Okubo et al., 2006; Takahashi et al., 2016a; zebrafish: Wu et al., 2006; hybrid striped bass: Yashuvi et al., 2006). In our study, we were able to detect them at 4dph (Fig. 6), in the olfactory placodes of sea bass larvae, whereas González-Martínez et al. (2002, 2004) detected them later at 7dph. This delay could be explained by the difference in animal rearing conditions, and particularly the rearing temperature which is known to play a major role in larval growth and development (Houde, 1989). Alternatively, it may result from a difference in the fish strain/population, Atlantic in our case versus Mediterranean in the

studies of González-Martínez et al. (2002, 2004). In our study, the location of *gnrh3*-expressing cells changed throughout the larval development with a detection in the olfactory bulbs (OB) at 10 and 20dph, in the OB and ventral telencephalon at 30dph and finally from the OB to the hypothalamus at 50dph (Fig. 6), in accordance with the description done of sea bass (González-Martínez et al., 2004) and several other fish species (masu salmon: Amano et al., 2002; sea bream: Wong et al., 2004; zebrafish: Abraham et al., 2008). Indeed, it is generally accepted in most vertebrates, and clearly demonstrated *in vivo* in transgenic medaka, that the majority of hypothalamic GnRH neurons migrate from the olfactory placode during development (Okubo et al., 2006; Takahashi et al. 2016a). Finally, *gnrh1*-expressing cells are the latest GnRH cells detected in the developing brain of fish species having 3 forms of GnRH (cichlid *H. burtoni*: White and Fernald, 1998; seabream: Wong et al., 2004; medaka: Okubo et al., 2006; hybrid striped bass: Yashuvi et al., 2006). In our study, we were not able to detect them probably due to the low levels of expression. Nevertheless, González-Martínez et al. (2002) detected *gnrh1*-expressing cells at 30dph in the telencephalon of sea bass larvae.

Some functions have already been suggested for each form of GnRH: GnRH1 is considered as the hypophysiotropic form (Kah et al., 2007), GnRH2 as a neuromodulator (Dubois et al., 2001) and an anorexigenic factor (Matsuda et al., 2008), and GnRH3 as a neuromodulator involved in sexual behavior (Dubois et al., 2001; Yamamoto et al., 1997; Ogawa et al., 2006). In addition, our study, which demonstrates an early expression of the different GnRH forms, changes in expression profiles during the development, and sequential appearance of *gnrh*-expressing cells in the developing brain, strongly suggests that the different GnRH forms may also play different roles during the larval period. This point was recently investigated through knockdown (KD) and knockout (KO) studies in zebrafish and medaka (Wu et al., 2006; Abraham et al., 2008, 2010; Spicer et al., 2016; Liu et al., 2017; Marvel et al., 2018; 2019; for review: Whitlock et al., 2019). Using morpholinos (MO) against *gnrh2* and *gnrh3* in zebrafish, Wu et al. (2006) observed impairments in brain and eye development in MO-injected embryos, *i.e.* change in midbrain shape, alteration of the midbrain/hindbrain boundary and reduction of the eye size. However, using similar methodology, namely MO against *gnrh3* in zebrafish, Abraham et al. (2008) did not obtain the same results; in their case, MO-injected embryos had normal general morphology but exhibited an altered network of GnRH3 neurons. Despite the different results obtained, these functional studies confirmed the involvement of GnRHs in fish developmental brain process. More recently, several

studies have investigated the role of *gnrh* genes by the generation of KO fish lines. In medaka, *gnrh1* KO fish were obtained, the animals were viable but the females were infertile (Takahashi et al., 2016b) confirming the role of GnRH1 in the control of reproduction, but also indicating a different action in males and females. In zebrafish, which possesses two GnRH forms, two groups have developed KO lines for GnRH3 which is assumed to be the hypophysiotropic form (Spicer et al., 2016; Liu et al., 2017). Interestingly, in both cases, the animals seem to develop normally and keep their reproductive capacity, leading the authors to suggest potential compensatory effects exerted by other neuropeptides such as GnRH2. This hypothesis was recently tested by the generation of a double KO zebrafish line for *gnrh2* and *gnrh3*, and unexpectedly, fish that did not produce any GnRH forms, were viable, developed and reproduced normally (Marvel et al., 2018). The authors discussed the apparent opposition between results obtained in KD and KO studies that could be due to compensatory mechanisms developed in KO fish lines to ensure normal development and reproduction. In the same group, a *gnrh2* KO zebrafish line was also studied (Marvel et al., 2019). In this case, the animals exhibited an increase in size and food consumption from the larval stages confirming the anorexigenic role of GnRH2. Moreover, adult females displayed a decrease in oocyte quality suggesting that GnRH2 is also involved in the control of reproduction.

5. Conclusions

We have demonstrated an early appearance and organization of kisspeptins and GnRHs neurons during sea bass development. Additionally, our results on gene expression demonstrated that both kisspeptins and GnRHs are expressed and regulated during larval development suggesting their involvement in specific 'developmental' functions such as brain development. Moreover, the similar gene expression profiles for *kiss2* and *gnrh1*, and for *kiss1*, *gnrh2* and *gnrh3* during sea bass larval development, lead us to suggest relationships between kiss2/gnrh1 on the one hand and, in the other hand, between kiss1/gnrh2/gnrh3. Interestingly, the kiss2/gnrh1 interaction has been shown in adult sea bass (Espigares et al., 2015) and chub mackerel (Ohga et al., 2018), in which intracerebroventricular injections of kiss2 induced changes in *gnrh1* gene expression. These hypotheses in sea bass larvae will need to be further examined in the future.

Aknowledgments

We are grateful to Dr O. Kah (CNRS) for the gift of *in situ* hybridization probes and to Dr B. Chatain (Ifremer) and G. Dutto (Ifremer) for sample providing. We thank Drs A. Servili

(Ifremer) and A. Andouche (MNHN) for technical assistance in ISH, and Dr R. Coulaud (ULH) for his help in statistical analysis. We are also indebted to Nicholas Josephs who, as an English native speaker, kindly accepted to correct this manuscript.
This work was supported by the Research Federation CNRS 3730 SCALE and the Normandy Region. F. Nihoul was supported by a PhD fellowship from the Normandy Region.

References

Abraham, E., Palevitch, O., Ijiri, S., Du, S.J., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2008. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*(3), 394‑405. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01654.x

Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2010. Targeted gonadotropin-releasing hormone-3 neuron ablation in zebrafish: effects on neurogenesis, neuronal migration, and reproduction. *Endocrinology*, *151*(1), 332‑340. https://doi.org/10.1210/en.2009-0548

Amano, M., Okubo, K., Ikuta, K., Kitamura, S., Okuzawa, K., Yamada, H., Aida, K., Yamamori, K., 2002. Ontogenic origin of salmon GnRH neurons in the ventral telencephalon and the preoptic area in masu salmon. *General and Comparative Endocrinology*, *127*(3), 256‑262.

Barnabé, G., Boulineau-Coatanea, F., René, F., 1976. Chronologie de la morphogénèse chez le loup ou bar *Dicentrarchus labrax* (L.) (Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. *Aquaculture*, *8*(4), 351‑363. https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90117-4

Barnabé, G., Billard, R., 1984. L'Aquaculture du bar et des sparidés, Institut national de la recherche agronomique (Éd.), Paris, France: INRA.

Blázquez, M., Navarro-Martín, L., Piferrer, F., 2009. Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, *312*(7), 686‑700. https://doi.org/10.1002/jez.b.21286

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2001a. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *Journal of Morphology*, *247*(3), 217□228. https://doi.org/10.1002/1097-4687(200103)247:3<217::AID-JMOR1013>3.0.CO;2-U

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2001b. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The diencephalon.

Journal of Morphology, *247*(3), 229‑251. https://doi.org/10.1002/1097-4687(200103)247:3<229::AID-JMOR1014>3.0.CO;2-K

Cerdá-Reverter, J.M., Muriach, B., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2008. A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): the midbrain and hindbrain. *Acta Histochemica*, *110*(6), 433‑450. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.01.001

Colledge, W.H., 2009. Kisspeptins and GnRH neuronal signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *20*(3), 115‑121. https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.005

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10972□10976. https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100

Dubois, E.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Bogerd, J., Goos, H.J., 2001. Development of three distinct GnRH neuron populations expressing two different GnRH forms in the brain of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *The Journal of Comparative Neurology*, *437*(3), 308‑320.

Escobar, S., Felip, A., Gueguen, M.-M., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O., Servili, A., 2013a. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Journal of Comparative Neurology*, *521*(4), 933‑948. https://doi.org/10.1002/cne.23211

Escobar, S., Servili, A., Espigares, F., Gueguen, M.-M., Brocal, I., Felip, A., Gomez, A., Carillo, M., Zanuy, S., Kah, O., 2013b. Expression of kisspeptins and kiss receptors suggests a large range of functions for kisspeptin systems in the brain of the European sea bass. *PloS One*, *8*(7), e70177. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070177

Espigares, F., Carrillo, M., Gómez, A., Zanuy, S., 2015. The forebrain-midbrain acts as functional endocrine signaling pathway of Kiss2/Gnrh1 system controlling the gonadotroph activity in the teleost fish European sea bass (Dicentrarchus labrax). *Biology of Reproduction*, *92*(3), 70. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125138

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gómez, A., 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *312*(1), 61−71. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.017

Funes, S., Hedrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., Gustafson, E. L., 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *312*(4), 1357□1363.

González-Martínez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J.A Kah, O., 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Comparative Neurology*, *429*(1), 144□155. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000101)429:1<144::AID-CNE11>3.0.CO;2-B

González-Martínez, D., Zmora, N., Zanuy, S., Sarasquete, C., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2002. Developmental expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *23*(4), 255‑267.

González-Martínez, D., Zmora, N., Saligaut, D., Zanuy, S., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2004. New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *28*(1‑2), 1‑15. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.001

Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C.A., Selmanoff, M., Chen, T.T., Kah, O., Elizur, A., Zohar, Y. (1996). Three Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone in a Perciform Fish (Sparus Aurata): Complementary Deoxyribonucleic Acid Characterization and Brain Localization. *Biology of Reproduction*, *55*(3), 636□645. https://doi.org/10.1095/biolreprod55.3.636

Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., Brand, M., 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental Biology*, *295*(1), 263‑277. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.040

Hodne, K., Weltzien, F.-A., Oka, Y., Okubo, K., 2013. Expression and putative function of kisspeptins and their receptors during early development in medaka. *Endocrinology*, *154*(9), 3437‑3446. https://doi.org/10.1210/en.2013-1065

Houde, E. D., 1989. Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. *Fishery Bulletin, 87(3),* 471-495.

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., Lareyre, J.J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective.

General and Comparative Endocrinology, *153*(1–3), 346–364. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.030

Kanda, S., 2018. Evolution of the regulatory mechanisms for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrates-hypothesis from a comparative view. *General and Comparative Endocrinology*. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.11.014

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology*, *150*(2), 821–831. https://doi.org/10.1210/en.2008-0940

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, *88*(23), 1731–1737.

Liu, Y., Tang, H., Xie, R., Li, S., Liu, X., Lin, H., Zhang, Y., Cheng, C.H.K., 2017. Genetic evidence for multifactorial control of the reproductive axis in zebrafish. *Endocrinology*, *158*(3), 604–611. https://doi.org/10.1210/en.2016-1540

Matsuda, K., Nakamura, K., Shimakura, S.-I., Miura, T., Kageyama, H., Uchiyama, M., Shioda, S., Ando, H., 2008. Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and Behavior*, *54*(1), 83–89. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.01.011

Marvel, M.M., Spicer, O.S., Wong, T.T., Zmora, N., Zohar, Y., 2018. Knockout of the Gnrh genes in zebrafish: effects on reproduction and potential compensation by reproductive and feeding-related neuropeptides. *Biology of Reproduction*. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy078

Marvel, M.M., Spicer, O.S., Wong, T.T., Zmora, N., Zohar, Y., 2019. Knockout of Gnrh2 in zebrafish (Danio rerio) reveals its roles in regulating feeding behavior and oocyte quality. *General and Comparative Endocrinology*. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.04.002

Mohamed, J.S., Benninghoff, A.D., Holt, G.J., Khan, I.A., 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *Journal of Molecular Endocrinology*, *38*(1–2), 235–244. https://doi.org/10.1677/jme.1.02182

Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews*, *30*(6), 713–743. https://doi.org/10.1210/er.2009-0005

Ogawa, S., Akiyama, G., Kato, S., Soga, T., Sakuma, Y., Parhar, I.S., 2006. Immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone type-III suppresses male reproductive behavior of cichlids. *Neuroscience Letters*, *403*(3), 201–205.

https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.02.041

Ogawa, S., Parhar, I.S., 2013. Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts. *General and Comparative Endocrinology*, *181*, 169□174. https://doi.org/10.1016/j.ygcen. 2012.08.023

Ohga, H., Selvaraj, S., Matsuyama, M., 2018. The roles of kisspeptin system in the reproductive physiology of fish with special reference to chub mackerel studies as main axis. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00147

Okubo, K., Sakai, F., Lau, E.L., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Naruse, K., Aida, K., Nagahama, Y., 2006. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology*, *147*(3), 1076‑1084. https://doi.org/10.1210/en.2005-0468

Palevitch, O., Kight, K., Abraham, E., Wray, S., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2006. Ontogeny of the GnRH systems in zebrafish brain: *in situ* hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. *Cell and Tissue Research*, *327*(2), 313‑322. https://doi.org/10.1007/s00441-006-0279-0 Palevitch

Park, J.W., Kim, J.H., Jin, Y.H., Kwon, J.Y., 2012. Expression profiles of Kiss2, GPR54 and GnRH Receptor I mRNAs in the early life stage of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Development and reproduction*, *16*(1), 31‑38.

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Tostivint, H., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2012. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. *Frontiers in Endocrinology*, *3*, 173. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00173

Pasquier, J., Kamech, N., Lafont, A.-G., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2014. MOLECULAR EVOLUTION OF GPCRS: Kisspeptin/kisspeptin receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*, *52*(3), T101□T117. https://doi.org/10.1530/JME-13-0224

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Denis, F., Lefranc, B., Dubessy, C., Moreno-Herrera, A., Vaudry, H., Leprince, J., Dufour, S., Rousseau, K., 2017. Eel Kisspeptins: Identification, Functional Activity, and Inhibition on both Pituitary LH and GnRH Receptor Expression. *Frontiers in Endocrinology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00353

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, *92*(3), 1235‑1316. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010

Putteeraj, M., Soga, T., Ubuka, T., Parhar, I.S., 2016. A "Timed" Kiss Is Essential for Reproduction: Lessons from Mammalian Studies. *Frontiers in Endocrinology*, *7, 121*.

https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00121

Rather, M.A., Bhat, I.A., Gireesh-Babu, P., Chaudhari, A., Sundaray, J.K., Sharma, R., 2016. Molecular characterization of kisspeptin gene and effect of nano-encapsulted kisspeptin-10 on reproductive maturation in *Catla catla*. *Domestic Animal Endocrinology*, *56*, 36□47. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.01.005

Rather, M.A., Bhat, I.A., Rathor, P.K., Gireesh-Babu, P., Chaudhari, A., Kumar, S.J., Sharma, R., 2017. In silico analysis and expression studies of kisspeptin gene in *C. catla*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(11), 2485□2496. https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1222970

Roch, G.J., Busby, E.R., Sherwood, N.M., 2014. GnRH receptors and peptides: skating backward. *General and Comparative Endocrinology*, *209*, 118□134. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.025

Saha, A., Pradhan, A., Sengupta, S., Nayak, M., Samanta, M., Sahoo, L., Giri, S.S., 2016. Molecular characterization of two kiss genes and their expression in rohu (*Labeo rohita*) during annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *191*, 135□145. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.10.008

Selvaraj, S., Kitano, H., Fujinaga, Y., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., Matsuyama, M., 2010. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology*, *169*(1), 28□38. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.011

Selvaraj, S., Kitano, H., Ohga, H., Yamaguchi, A., Matsuyama, M., 2015. Expression changes of mRNAs encoding kisspeptins and their receptors and gonadotropin-releasing hormones during early development and gonadal sex differentiation periods in the brain of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *General and Comparative Endocrinology*, *222*, 20–32. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.019

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., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*, *349*(17), 1614–1627. https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322

Servili, A., Le Page, Y., Leprince, J., Caraty, A., Escobar, S., Parhar, I.S., Seong, J.Y., Vaudry, H., Kah, O., 2011. Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology*, *152*(4), 1527‑1540. https://doi.org/10.1210/en.2010-0948

Servili A., Herrera-Pérez P., Paullada Salmerón J.A., Kah O., Munoz-Cueto J.A., 2014. Neuroendocrine regulation of reproduction in sea bass, in Sánchez Vázquez, F.J., Muñoz-Cueto, J.A. (Eds.). *Biology of European sea bass*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 116-161.

Song, H., He, Y., Ma, L., Zhou, X., Liu, X., Qi, J., Zhang, Q., 2015. Characterisation of kisspeptin system genes in an ovoviviparous teleost: *Sebastes schlegeli*. *General and Comparative Endocrinology*, *214*, 114‑125. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.010

Spicer, O.S., Wong, T.T., Zmora, N., Zohar, Y., 2016. Targeted mutagenesis of the hypophysiotropic Gnrh3 in zebrafish (*Danio rerio*) reveals no effects on reproductive performance. *PLOS ONE*, *11*(6), e0158141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158141

Takahashi, A., Islam, M.S., Abe, H., Okubo, K., Akazome, Y., Kaneko, T., Hioki,H., Oka, Y., 2016a. Morphological analysis of the early development of telencephalic and diencephalic gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in enhanced green fluorescent protein-expressing transgenic medaka lines. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(4), 896‑913. https://doi.org/10.1002/cne.23883

Takahashi, A., Kanda, S., Abe, T., Oka, Y., 2016b. Evolution of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis regulation in vertebrates revealed by knockout medaka. *Endocrinology*, *157*(10), 3994‑4002. https://doi.org/10.1210/en.2016-1356

Tang, H., Liu, Y., Luo, D., Ogawa, S., Yin, Y., Li, S., Zhang, Y., Hu, W., Parhar, I.S., Lin, H., Liu, X., Cheng, C.H.K., 2015. The kiss/kissr systems are dispensable for zebrafish reproduction: Evidence from gene knockout studies. *Endocrinology*, *156*(2), 589‑599. https://doi.org/10.1210/en.2014-1204

Tena-Sempere, M., Felip, A., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, *175*(2), 234‑243. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.015

Tovar Bohórquez, M.O., Mechaly, A.S., Hughes, L.C., Campanella, D., Ortí, G., Canosa, L. F., Somoza, G.M., 2017. Kisspeptin system in pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis).* Characterization and gene expression pattern during early developmental stages.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, *204*, 146‑156. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.014

White, R.B., Fernald, R.D., 1998. Ontogeny of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. *General and Comparative Endocrinology*, *112*(3), 322‑329. https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7142

Whitlock, K.E., Postlethwait, J., Ewer, J., 2019. Neuroendocrinology of reproduction: Is gonadotropin-releasing hormone (GnRH) dispensable? *Frontiers in Neuroendocrinology*, *53*, 100738. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.02.002

Wong, T.T., Gothilf, Y., Zmora, N., Kight, K.E., Meiri, I., Elizur, A., Zohar, Y., 2004. Developmental expression of three forms of Gonadotropin-Releasing Hormone and ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biology of Reproduction*, *71*(3), 1026‑1035. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028019

Wu, S., Page, L., Sherwood, N.M., 2006. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *257‑258*, 47‑64. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.06.010

Yamamoto, N., Oka, Y., Kawashima, S., 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology*, *65*(6), 403‑412. https://doi.org/10.1159/000127203

Yashuvi, Y., Klenke, U., Palevitch, O., Abraham, E., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2006. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in hybrid striped bass Morone sp.: whole-mount in situ hybridization analysis. *Journal of Fish Biology*, *69*(sa), 20‑30. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01074.x

Zhao, Y., Lin, M.-C.A., Mock, A., Yang, M., Wayne, N.L., 2014. Kisspeptins modulate the biology of multiple populations of Gonadotropin-Releasing Hormone neurons during embryogenesis and adulthood in zebrafish (*Danio rerio*). *PLOS ONE*, *9*(8), e104330. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104330

Zmora, N., González-Martínez, D., Muñoz-Cueto, J.A., Madigou, T., Mañanos-Sanchez, E., Doste, S.Z., Zohar, Y., Kah, O., Elizur, A., 2002. The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Journal of Endocrinology*, *172*(1), 105‑116.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 438□455. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017

Table 1: Primer sequences used for the real time quantitative PCR. (F: Forward; R: Reverse)

gene	Accession number	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Primer sequence 5'-3'
gnrh1	AF224279	130	60	F: GGTCCTATGGACTGAGTCCAGG
				R: TGATTCCTCTGCACAACCTAA
gnrh2	AF224281	80	60	F: GTGTGAGGCAGGAGAATGCA
				R: CTGGCTAAGGCATCCAGAATG
gnrh3	AF224280	80	57	F: TGTGGGAGAGCTAGAGGCAAC
				R: GTTTGGGCACTCGCCTCTT
Kiss1	FJ008914	100	57	F: CTCAAAGCTGGTCCTCCCTC
				R: GGTCTTGTGTCACTTTCCGT
Kiss2	FJ008915	200	57	F: GGATTCCAGCCCGTGTTTCT
				R: TAGGCACCTCCAGTTCTCGT
ef-1	AJ866727	75	60	F: CTAAGAACGGACAGACCCGC
				R:TGACTCCAACGATGAGCTGC
L13	DQ836931	96	60	F: GGCTAAGGCCCGTCTCATTG
				R: GCACGAACCTTGGTGTGGTA
fau	EF190887	100	60	F: CAAACTGAGAGCGACCGGAG
				R: GCGTCCGATCTTCATCCCTG

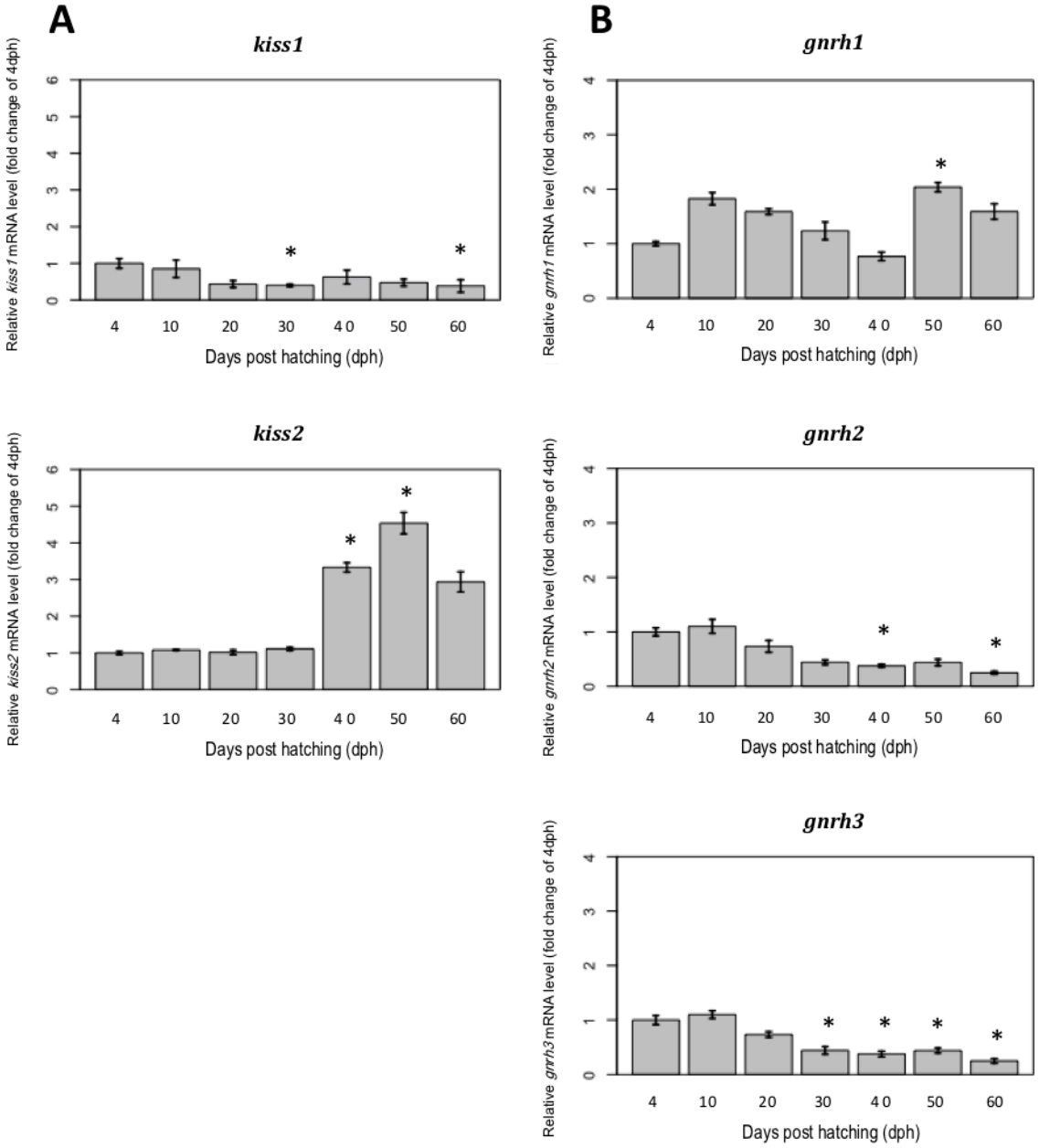


Figure 1 - Gene expression profiles of *kiss1*, *kiss2*, *gnrh1*, *gnrh2* and *gnrh3* during sea bass larval development. A: *kiss1* and *kiss2*. B: *gnrh1*, *gnrh2* and *gnrh3*. Quantitative RT-PCR values were normalized against the ribosomal protein *L13* and represent fold change of the targeted mRNA levels relative to that of 4dph larvae. mRNA levels were measured in whole larvae. * significant differences compared to 4dph ($p<0.05$).

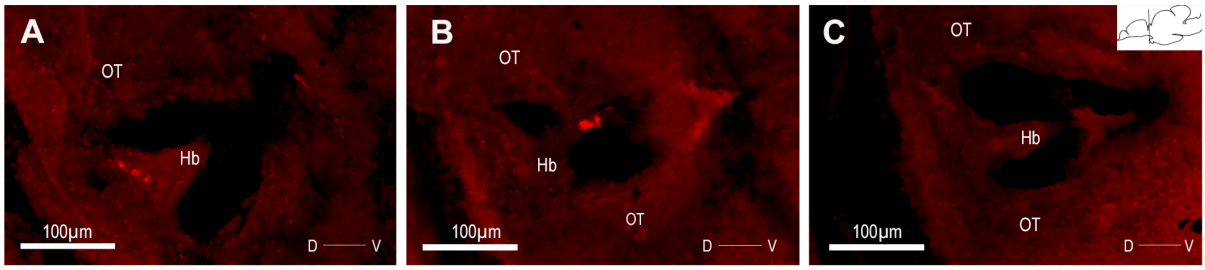


Figure 2 - *Kiss1*-expressing cells in 50dph sea bass larvae detected by *in situ* hybridization. (A and B) Successive coronal sections showing *kiss1*-expressing cells in the habenular area. Sections are oriented along the dorso-ventral axis. Negative control did not show any signal (C). Hb: Habenula; OT: Optic tectum. Bar = 100µm

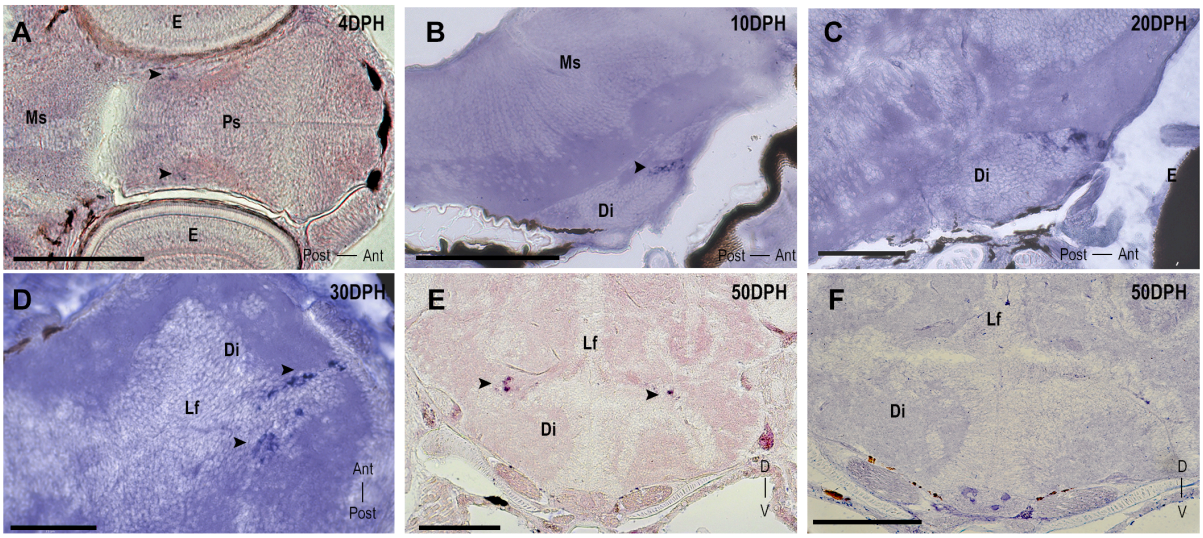


Figure 3 - *Kiss2*-expressing cells detected by *in situ* hybridization on frontal (A, C, D), sagittal (B) and transverse (E and F) sections of sea bass larvae.

At 4 and 10dph, expressing cells were detected in the caudal part of the prosencephalon (A and B). From 20 to 50dph, cells were located more deeply inside the diencephalon (C, D and E). No specific signal was detected in sections treated with the sense probe (F). Di: Diencephalon; E: Eye; Lf: Longitudinal fissure; Ms: Mesencephalon; Ps: Prosencephalon. A, B, C, D: Bar = 100µm; E, F: Bar = 200µm .

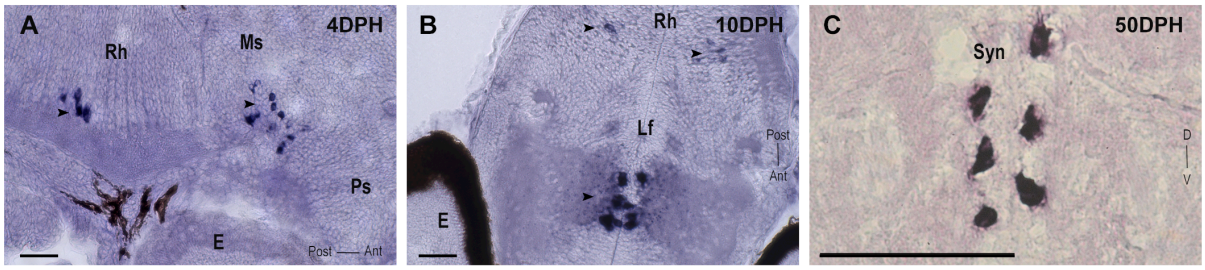


Figure 4- *Gnrh2*-expressing cells detected by *in situ* hybridization on sagittal (A), frontal (B) and transverse (C) sections of sea bass larvae.

At 4 and 10dph, two populations of expressing cells were detected; one located at the boundary between the prosencephalon and the mesencephalon and the second in the ventral part of the rhombencephalon (A and B). From 10 to 50dph, a large number of cells were detected in the synencephalon, organized along the longitudinal fissure (C). E: Eye; Lf: Longitudinal fissure; Ms: Mesencephalon; Ps: Prosencephalon; Rh: Rhombencephalon; Syn: Syncencephalon. Bar = 100µm.

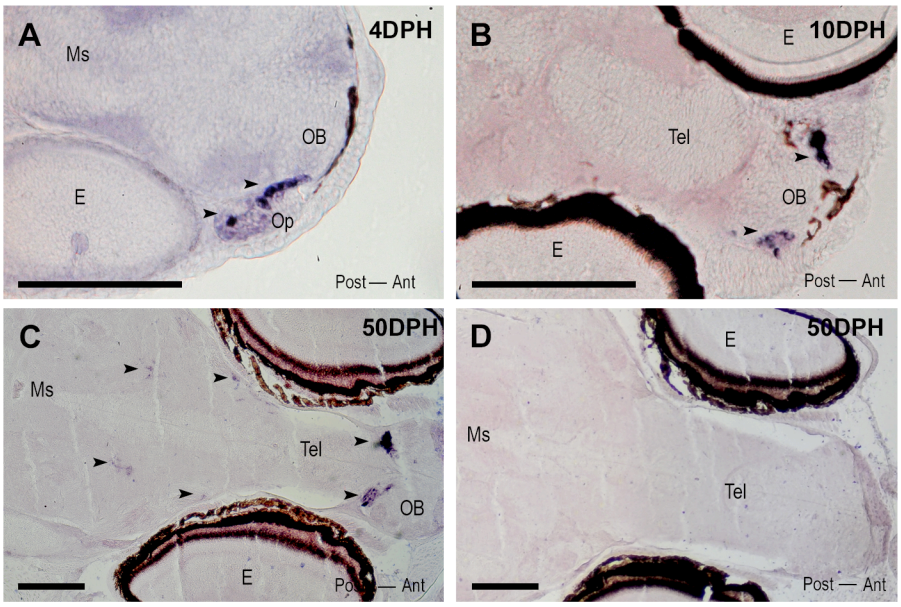


Figure 5 - *Gnrh3*-expressing cells detected by *in situ* hybridization on frontal (A, B, C, D) sections of sea bass larvae.

From 4 to 10dph, expressing cells were detected in the olfactory placodes and in olfactory bulbs (A and B). From 20 to 50dph, stained cells expended in the olfactory bulbs and in the rostral part of the telencephalon and at 50dph, different clusters of *gnrh3*-expressing cells were observed in discrete regions ranging from the olfactory bulbs to the diencephalon (C). No specific signal was detected in sections treated with the sense probe (D). E: Eye; Ms: Mesencephalon; OB: Olfactory Bulbs; Op: Olfactory Placodes; Tel: Telencephalon. A, B: Bar = 100µm; C, D: Bar = 200µm

Figure 6

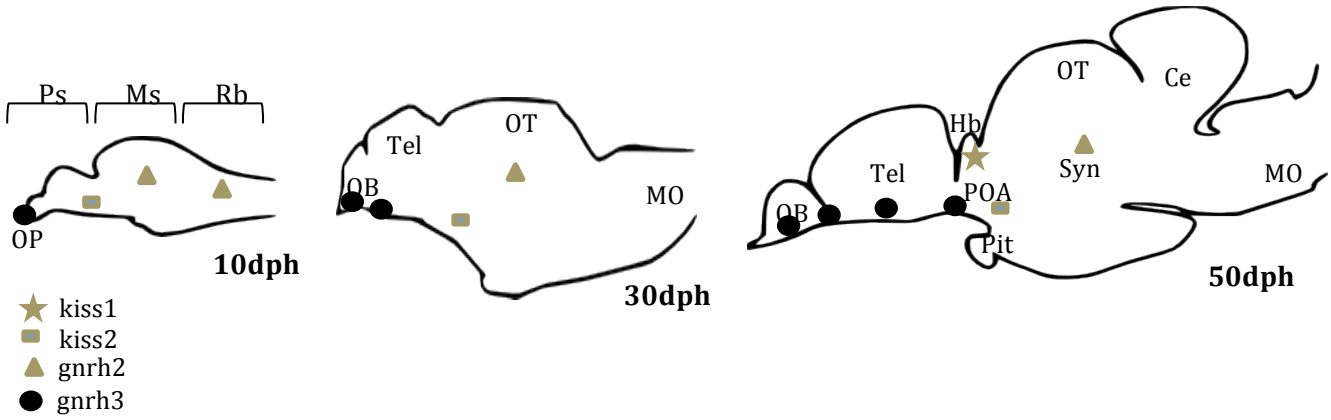


Figure 6 – Schematic representations of brain distribution of kiss- and gnrh-expressing cells during sea bass larval development.

Distribution of *kiss1*-, *kiss2*-, *gnrh2*-and *gnrh3*-expressing cells is showed in sea bass larvae at 10, 30, and 50dph. Abbreviations: Ce, corpus of the cerebellum; Di, Diencephalon; Hb, Habenula; MO, Medulla oblongata; Ms, Mesencephalon; OB, Olfactory bulbs; OP, Olfactory placodes; OT, Optic tectum; Pit, Pituitary; POA, preoptic area; Ps, Prosencephalon; Rb, Rhombencephalon; Syn, Synencephalon; Tel, Telencephalon. (Drawings modified from González-Martínez et al, 2002).

Article 2

Evolution et caractérisation des cellules à FSHβ et LHβ au cours du développement larvaire du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)

Florent Nihoul[1] ; Adeline Germain[1] ; Stéphanie Olivier[1] ; Jean-Michel Danger[1] ; Salima Aroua[1,]

[1]*Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques UMR-I 02SEBIO - Université Le Havre Normandie -FR CNRS 3730 SCALE, Le Havre, France*

1. Introduction

Chez les vertébrés, la fonction de reproduction est contrôlée par l'axe gonadotrope qui est constitué d'une partie cérébrale, d'une partie hypophysaire et d'une partie gonadique. Au niveau cérébral, une des neurohormones principales contrôlant l'axe est la gonadolibérine (GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone). La GnRH va exercer son action au niveau hypophysaire permettant la synthèse et la libération des deux hormones gonadotropes ou gonadotropines, l'hormone lutéinisante (LH, Luteinizing Hormone) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH, Follicle Stimulating Hormone) (Chedrese, 2009) Ces deux hormones, libérées dans la circulation générale, vont agir au niveau gonadique et contrôler la gamétogenèse et la stéroïdogenèse. Chez les mâles, la FSH est impliquée dans l'initiation de la spermatogenèse et la LH dans le contrôle de la production de testostérone par les cellules de Leydig (Miwa et al., 1994 ; Yan et Swanson, 1994 ; Oba et al., 2001). Chez les femelles, la situation va différer en fonction des organismes. Chez les mammifères, un stock de follicules primordiaux est mis en place durant la vie embryonnaire ou au moment de la naissance. Ces follicules restent quiescents jusqu'à la puberté date à laquelle débute le développement des follicules sous le contrôle de la FSH. La LH intervient dans le contrôle de la synthèse des androgènes et la maturation ovocytaire (Pour revue : Driancourt, 2001). Chez les téléostéens, les mitoses goniales perdurent tout au long de la vie de l'organisme. Dans ce cas, la FSH est impliquée dans les premières étapes de la croissance ovocytaire (prolifération, recrutement, croissance…) et la LH intervient dans un deuxième temps contrôlant la maturation des ovocytes et l'ovulation (Pour revue : Jalabert, 2005).

Les gonadotropines (GTH) sont des glycoprotéines composées de deux sous-unités α et β. La sous-unité α est commune aux deux hormones gonadotropes (LH et FSH) et à l'hormone thyréotrope (TSH) alors que la sous-unité β est spécifique à chacune d'entre elles (Combarnous et Volland-Nail, 1997). Ces deux sous-unités sont synthétisées indépendamment et assemblées en une hormone fonctionnelle par un repliement de la sous-unité β formant comme une "ceinture de sécurité" autour de la sous-unité α (Lapthron et al., 1994). Les cellules productrices des différentes sous-unités des GTH sont principalement localisées dans l'hypophyse, mais quelques études ont également montré des productions extra hypophysaires. Chez la souris, les sous-unités α et FSHβ ont été détectées par immunohistochimie dans le testicule (Markkula et al., 1995). Des travaux réalisés chez le rat montrent l'expression des sous-unités α et LHβ dans le tissu testiculaire (Zhang et al., 1995). Chez l'homme, des cellules produisant de la FSH ont été observées dans la prostate (Hurkadli

et al., 1990) et les testicules (Yoon et al., 1987), et des cellules à FSH ont également été détectées dans la muqueuse de l'estomac (Mandrekar et al., 1990).

Chez les téléostéens, comme chez les mammifères, les gonadotropines sont majoritairement produites au niveau hypophysaire, mais dans ce cas par deux types cellulaires distincts (salmonidés : Nozaki et al, 1990a, b ; thon : Kagawa et al, 1998 ; anguille : Schmitz et al, 2005). Chez la plupart des téléostéens, les deux types cellulaires sont localisés dans la partie proximale de la *pars distalis* mais on retrouve les cellules à FSH plus internalisées dans l'hypophyse, et quelques populations de cellules à LH en marge de la *pars intermedia* (Pour revue : Zohar et al., 2010 ; Weltzien et al., 2014). De plus, comme chez les mammifères, les sous-unités des hormones gonadotropes sont également exprimées dans des tissus sans liens apparents avec la reproduction comme les reins, le foie ou les branchies (poisson-zèbre : So et al, 2005).

L'ontogenèse des systèmes gonadotropes a été étudiée chez quelques téléostéens (tilapia : Fan et al, 2003, Yan et al, 2012 ; daurade : Wong et al, 2004 ; sole : Guzman et al, 2009 ; poisson-zèbre : Chen et Ge, 2012 ; *Monopterus albus* : Wu et al, 2012). L'expression des différentes sous-unités des GTH a été suivie au cours des premiers stades de vie jusqu'à la différenciation sexuelle ; dans la plupart des cas, la sous-unité FSHβ est la première à être détectée (tilapia : Fan et al, 2003, Yan et al, 2012 ; daurade : Wong et al, 2004 ; sole : Guzman et al, 2009 ; poisson-zèbre : Chen et Ge, 2012).

L'utilisation d'une lignée transgénique de médaka exprimant la "Green Fluorescent Protein" (GFP) sous le contrôle du promoteur de la LHβ a permis de suivre la localisation des cellules à LH au cours du développement embryo-larvaire (Hildahl et al., 2012). Les premières cellules GFP-positives sont décrites dans la région intestinale des embryons et non dans la région hypophysaire. Pourtant, à la même période, l'expression de marqueurs de différenciation hypophysaire (pit1 et lhx3) dans la région céphalique manifeste la mise en place de l'hypophyse (Hildahl et al., 2012).

Chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), les travaux de Cambré et al. (1990) se sont intéressés au développement de l'hypophyse et à la chronologie d'apparition des différents types cellulaires (MSH, ACTH, TSH, PRL, GH et LH). Par immunohistochimie, les auteurs ont montré la production des hormones MSH, ACTH, TSH et GH dès l'éclosion, et localisé les cellules productrices de ces hormones. Les cellules à PRL sont présentes à partir de 9 jours post éclosion. En revanche, pendant la période étudiée (26 jours post éclosion), les cellules gonadotropes exprimant la LH n'ont pas été détectées (Cambré et al., 1990).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'ontogenèse des gonadotropines au cours du développement larvaire du bar européen. Nous avons utilisé en tandem les techniques d'hybridation *in situ* et de RT-qPCR, afin de localiser les cellules exprimant les sous-unités LHβ et FSHβ et de suivre la dynamique d'expression des gènes *lhβ* et *fshβ* au cours du développement larvaire du bar européen.

2. Matériels et méthodes

Origine des animaux

Les larves de bar européen utilisées dans cette étude proviennent de l'écloserie Aquastream (Ploemeur, France). Les larves obtenues à 4, 10, 20, 30, 40 et 50 jours post éclosion, ont été conditionnées de deux manières différentes en fonction de leur utilisation ultérieure.

Pour les dosages par PCR quantitative, les larves sont immergées dans du RNA later (Ambion, Austin, TX). A leur arrivée au laboratoire, les échantillons sont redistribués en pool de cinq individus par tube et stockés à -20°C.

Pour les larves destinées aux analyses par ISH, les larves sont immergées et fixées à l'aide de paraformaldéhyde à 3,7% (PFA). Les échantillons sont ensuite rincés plusieurs fois à l'aide de PBS 1X, puis graduellement transférés en PBS/glycérol 50% avant d'être stockés à -20°C.

Extraction et transcription inverse

L'extraction des ARNs a été réalisée sur les larves provenant de la Société Aquacaux (Octeville-sur-mer, France). Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide de Soft Tissue Homogenizer CK14 (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) dans 1 ml de Tri-Reagent (Ambion), et l'extraction des ARN totaux réalisée en accord avec le protocole du fournisseur (Ambion). A la suite de l'extraction, un traitement à la désoxyribonucléase I est réalisé à l'aide du TURBO DNA-free (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), puis les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN à l'aide de la Superscript Reverse Transcriptase III et des amorces aléatoires (Invitrogen).

PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les analyses de RT-qPCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil Rotor Gene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France), dans un mélange réactionnel (volume final = 10µl) constitué de 5µl de QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (Qiagen), 1.5µl d'ADNc dilué (1:25) et 0.5µl de chaque amorce spécifique (200nM). Le détail des amorces utilisées pour les analyses des sous-unités LHβ et FSHβ est présenté dans le tableau 1.

Après optimisation, les conditions de réaction suivantes ont été appliquées: une étape de dénaturation à 95°C durant 15 min, suivie par 45 cycles de 15s à 94°C, 25s à 60 ou 57 °C (tableau 1), 25s à 72°C. A la fin de chaque analyse, une courbe de fusion est réalisée (entre 55 et 95°C) afin de vérifier la présence d'un seul signal de fusion.

Pour chaque gène, l'efficacité de réaction a été mesurée par la dilution en série d'un pool d'ADNc provenant des différents stades étudiés. Dans chaque analyse PCR, les échantillons sont analysés en duplicat et un témoin négatif sans ADNc est ajouté afin de vérifier l'absence de contamination. De plus, un échantillon "calibrateur" est ajouté dans chaque analyse PCR afin d'ajuster et de pallier aux variations entre analyses. Différents gènes de référence ont été testés (*ef1*, *L13* et *fau*) et leur stabilités comparées sur BestKeeper Software (© 2004 M. W. Pfaffl). Il est ressorti de cette analyse que le messager codant pour la protéine ribosomal L13 était le plus stable dans nos conditions. Il a donc été choisi comme référence et utilisé pour calculer l'expression relative de nos gènes d'intérêt à l'aide de la méthode du ΔΔCt.

Clonage de séquence et synthèse des sondes ARN

Des amorces spécifiques pour chaque gène ont été développées à partir des séquences de *D. labrax* (Tab. 1) à l'aide de Primer3. Les amorces utilisées pour la sous-unité FSHβ (F : CAAGGTTCAAAGCAACAGCA ; R : GGCCTCTCATAGTGGCTGAG) et la sous-unité LHβ (F : GTTTGTTTCTGGGAGCCACA ; R : GCAGTGGTAAATGTGACAATCC) ont permis l'amplification par PCR de deux fragments (FSHβ : 372pb et LHβ : 483pb) à partir d'un pool de ADNc d'hypophyse de bar adulte. Les PCR ont été réalisées selon les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation de 2 min à 95°C, puis 32 cycles comprenant 30 s à 95°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C, et une étape finale d'élongation de 5 min à 72°C.

Les produits PCR obtenus ont ensuite été insérés dans un vecteur TOPO (Invitrogen) et des bactéries *E. coli* compétentes transformées (OneShot TOP10 Competent Cells, Invitrogen). Après isolement des bactéries positives et extraction des plasmides à l'aide de

minipreps (Plasmid Miniprep Kit, Qiagen), les plasmides avec inserts ont été séquencés (Genewiz, Bishop's Stortford, UK).

Après linéarisation des plasmides, les sondes marquées à la digoxygénine sont synthétisées à l'aide d'un mix DIG RNA Labeling Kit et une polymérase spécifique T3 ou T7, en accord avec le protocole du fournisseur (Roche, Indianapolis, IN).

Hybridation in situ sur coupe

Les larves fixées au PFA 3.7% sont incluses en gélatine et des coupes de 20µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat MicromHM525 (MMFrance, France). Des sections adjacentes de la même larve sont traitées avec les sondes sens et antisens. Les coupes sont rincées deux fois en PBS 1X /DEPC actif 0.1% puis équilibrées en SSC 5X. Les lames sont ensuite incubées durant la nuit à 62°C dans une solution d'hybridation (HS : 50% formamide déionisée, SSC 5X, Tween 20 0.1%, SDS 0.5%) contenant 600ng de sonde par lame, en chambre humide (50% de formamide déionisée et 50% de SSC5X) pour éviter l'évaporation de la solution d'hybridation.

L'excédent de sonde et les appariements non spécifiques sont éliminés par deux rinçages successifs au SSC 5X à 65°C durant 1h, puis deux rinçages au SSC 0.1X de 1h. Après équilibration en MABT (100mM acide maléique et 150mM NaCl, 1% Tween 20, pH7,5) et saturation durant 1h à température ambiante des sites non spécifiques dans une solution de blocage contenant 4% de Blocking Reagent (Roche) et 15% de sérum de veau fœtal, les coupes sont mises en contact avec l'anticorps. Les lames sont disposées en chambre humide et incubées 2h à 4°C dans une solution MABT contenant 5% de sérum de veau fœtal, 1% de Blocking Reagent et un anticorps anti-digoxygénine couplé à une phosphatase alcaline (Roche) à la dilution de 1/1000ème.

Après deux rinçages successifs de 10 min en MABT, la détection des anticorps est réalisée en solution alcaline (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl2 (pH 9.5), 0.1% Tween 20 et 500µM lévamisole) à l'aide du NBT/BCIP (Roche) à l'obscurité et à température ambiante. La coloration est arrêtée par plusieurs rinçages en PBS 1X et les lames sont montées en Mowiol (Sigma). L'observation et la prise d'images sont réalisées à l'aide d'un microscope inversé Nikon (Nikon Eclipse TE2000-U, Japon) et un appareil photo Nikon D3s (Nikon, Japon).

Analyses statistiques

Les données de qPCR sont exprimées en moyenne d'expression relative au gène de référence ± SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées avec RStudio (Version 1.0.136). Après avoir testé la normalité et l'homogénéité des variances, la comparaison des moyennes a été effectuée en utilisant un test non paramétrique de Kruskal et Wallis suivi par un test post-hoc de Nemenyi. Le niveau de significativité est fixé à 0.05.

3. Résultats

Evolution des niveaux d'expression des sous-unités fshβ et lhβ durant le développement larvaire (figure 1).

Les transcrits codant pour les deux sous-unités spécifiques des gonadotropines, *fshβ* et *lhβ* ont été suivis par PCR quantitative en temps réel au cours des 60 premiers jours de vie du bar. Les ARNm codant pour la *fshβ* et la *lhβ* ont été détectés dès 4 jours post éclosion (jpe) et à tous les stades étudiés. On remarque cependant que les niveaux d'expression sont relativement faibles avec des valeurs de Ct, au premier temps de prélèvement, plutôt élevés (Moyenne de Ct à 4jpe, Ct *fshβ* : 28,7 ; Ct *lhβ* : 29,3). Les transcrits codant pour la sous-unité *fshβ* sont plus abondants à 4 jpe, que ceux codant pour *lhβ*.

Par ailleurs, deux profils d'expression différents sont observés pour les deux sous-unités (Fig.1). En ce qui concerne la sous-unité *fshβ*, on observe une tendance à la baisse des niveaux de transcrits au début du développement larvaire. Cette baisse devient significative à 20 jpe (x0.4 ; $p<0.05$ en comparaison avec le stade 4 jpe), puis les niveaux sont relativement stables jusqu'à 60 jpe.

A l'inverse, les niveaux de transcrits de la sous-unité *lhβ* sont relativement stables sur les 50 premiers jours de développement larvaire. A 60 jpe, les niveaux d'ARNm codant pour la sous-unité *lhβ* augmentent drastiquement ; on observe des niveaux significativement plus haut en comparaison avec ceux à 20 et 30 jpe (respectivement x 9.5 par rapport à 20 jpe et x5.5 par rapport à 30 jpe ; $p<0.05$).

Localisation des cellules exprimant les sous-unités FSHβ et LHβ

Les sondes spécifiques à la sous-unité FSHβ et LHβ ont été testées sur hypophyse adulte (Fig. 2). Nous avons observé, pour FSHβ un marquage en bande large oblique traversant l'hypophyse au niveau de la *pars tuberalis* sur les coupes incubées avec les sondes antisens. Sur les coupes adjacentes, traitées avec la sonde sens, aucun marquage n'a été observé (Fig. 2A). Pour la sonde anti-sens LHβ, on observe plusieurs cellules marquées au

niveau de la *pars distalis* de l'hypophyse alors qu'avec les sondes sens, aucune cellule marquée n'a été détectée (Fig. 2B).

Afin de suivre l'ontogenèse des cellules exprimant les sous-unités spécifiques des gonadotropines, *lhβ* et *fshβ*, des hybridations *in situ* ont été réalisées sur des individus aux différents stades larvaires. Chez les larves entre 4 et 40 jpe, aucune cellule marquée n'a été détectée, que ce soit pour les sondes ciblant la sous-unité *fshβ* ou la sous-unité *lhβ*.

Les premières cellules marquées exprimant la *lhβ* ou la *fshβ*, ont été observées à 50 jpe. Ces cellules sont localisées au niveau de la partie proximale de l'intestin (*fshβ*: Fig. 3 : A, B ; *lhβ*: Fig. 4 : A, B). Les coupes adjacentes, traitées avec les sondes sens, ne montrent pas de cellules marquées (*fshβ*: Fig. 3 : H ; *lhβ*: Fig. 4 : C).

4. Discussion

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'ontogenèse des cellules gonadotropes chez le bar européen en combinant des analyses de mesure des niveaux d'expression des gènes et des analyses de localisation cellulaire. Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur l'étude des deux sous-unités spécifiques des gonadotropines, la sous-unité FSHβ et la sous-unité LHβ et avons suivi leur expression au cours du développement larvaire.

Expression des sous-unités LHβ et FSHβ au cours du développement larvaire du bar européen

L'analyse des niveaux d'expression des différentes sous-unités des gonadotropines a été réalisée chez différents vertébrés au cours des premiers stades de vie embryonnaires et/ou larvaires.

Chez les mammifères, différentes études se sont intéressées aux gonadotropines pendant la vie fœtale et ont montrées une production des hormones gonadotropes au cours de cette période. Chez l'homme, les gonadotropines sont détectées dans le plasma dès le 68ème jour de vie fœtale (Kaplan et Grumbach, 1976). De plus, les auteurs rapportent des différences de concentration en FSH et LH en fonction du sexe du fœtus. Chez les fœtus de sexe féminin, les concentrations en LH et FSH sont plus importantes que chez les fœtus de sexe masculin,

suggérant un rôle de ces hormones dans la différenciation et le développement des organes sexuels (Kaplan et Grumbach, 1976).

Chez le lapin, les productions de LH et FSH sont détectées dans l'hypophyse à partir de 19 jours et 24 jours de gestation chez les fœtus des deux sexes (Veyssière et al., 1982). Les mesures au niveau plasmatique indiquant une libération des hormones dans la circulation générale, montrent des résultats légèrement différents. La LH est détectée dans les deux sexes à 20 jours de gestation ; quant à la FSH, elle est détectée dans le plasma à 27 jours de gestation chez les femelles et n'est jamais détectée chez les fœtus mâles (la gestation durant 32 jours chez cette espèce) (Veyssière et al., 1982). Chez le rat, dans une étude s'intéressant à l'ontogenèse de l'adénohypophyse par immunohistochimie, Nemeskeri et al. (1988) observent les premières cellules gonadotropes hypophysaires à 15 jours de gestation (temps de gestation = 21 jours).

Chez les amphibiens, l'expression des gonadotropines a été mesurée durant la mise en place des organes sexuels. Chez le xénope (*Xenopus laevis*), une augmentation de l'expression hypophysaire de la sous-unité LHβ au cours de la métamorphose est constatée. Cette augmentation, plus importante chez les femelles que chez les mâles, est suivie d'une diminution après la métamorphose complète. Concernant, la sous-unité FSHβ, les niveaux d'expression restent à un niveau stable au cours de la métamorphose (Urbatzka et al., 2010). Ces résultats amènent les auteurs à suggérer un rôle de la LH dans le développement des organes sexuels, particulièrement chez la femelle. Chez *Rana esculenta*, la localisation par immunohistochimie des sous-unités LHβ et FSHβ a montré qu'au cours de la métamorphose, le nombre de cellules à gonadotropines augmente au niveau hypophysaire (Pinelli et al., 1996). L'ensemble des résultats amènent à penser que les gonadotropines jouent un rôle pendant la vie embryonnaire et/ou larvaire des individus dans la mise en place des organes sexuels, en particulier chez les femelles.

Chez les téléostéens, différentes études se sont également intéressées aux hormones gonadotropes au cours des premiers stades de vie. Chez la daurade (*Sparus auratus*), différents acteurs de l'axe HPG ont été suivis de la fécondation à 36 jours post-fécondation (jpf ; l'éclosion ayant lieu 40 h post-fécondation) (Wong et al., 2004). Les résultats obtenus montrent une détection des transcrits codant pour la *fshβ* dès le premier jour post fertilisation. En revanche, les transcrits codant pour la *lhβ* ne sont pas détectés durant la période étudiée. De plus, le suivi du profil d'expression de *fshβ* montre des fluctuations des niveaux d'expression avec des augmentations significatives des transcrits à 5, 14 et 28 jpf. Or les

premières cellules germinales primordiales sont détectées à 14 jpf, conduisant les auteurs à proposer un rôle de la FSH dans le développement des gonades et la prolifération des cellules germinales (Wong et al., 2004). Chez la sole (*Solea senegalensis*), l'analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR a montré que les transcrits codant pour la sous-unité *fshβ* sont détectés dès l'éclosion. Ils augmentent au cours du développement larvaire pour atteindre un niveau maximal à 15 jpe (climax de la métamorphose) puis reviennent à un niveau basal juste après la métamorphose. Enfin une seconde augmentation significative des niveaux de transcrits de la sous-unité *fshβ* est observée vers 100 jpe (période un peu avant la différenciation gonadique ~120 jpe). Concernant la sous-unité *lhβ,* les premiers transcrits sont détectés à 5 jpe, ils restent à des niveaux bas pendant toute la période larvaire puis ne sont plus détectés après la métamorphose (Guzman et al., 2009). Ces résultats amènent à penser ici encore que la FSH serait importante dans les stades précoces du développement et, chez la sole, serait impliquée dans la différenciation sexuelle. Chez le pejerrey (*Odontesthes bonariensis)*, où la différenciation sexuelle est dépendante de la température, l'expression des sous-unités des gonadotropines a été mesurée au cours des premières semaines de développement chez des animaux élevés à différentes températures 17°C (température produisant groupe femelle), 25°C (température produisant groupe mixte) et 29°C (température produisant groupe male) (Shinoda et al., 2010). Dans ce cas, les auteurs observent des résultats différents en fonction des groupes avec des niveaux d'ARNm pour *lhβ et fshβ* plus bas dans le groupe femelle comparés à ceux mesurés dans le groupe mâle. Des résultats qui suggèrent dans ce cas une implication des deux gonadotropines dans la différenciation sexuelle du pejerrey (Shinoda et al., 2010).

Chez le bar européen, nos travaux montrent une expression des deux sous-unités lhβ et fshβ dès 4 jpe. L'analyse des niveaux d'expression au cours des 60 premiers jours de développement montre des profils différents pour les deux sous-unités. Alors que les niveaux de transcrits codant pour FSHβ baissent au début du développement, ceux codant pour la LHβ restent à des niveaux constants jusqu'à 50 jpe puis augmentent drastiquement à 60 jpe. Ces variations d'expression des gonadotropines durant les premiers mois de vie ont lieu durant la période où les premières cellules germinales sont détectées chez les larves et où la gonade indifférenciée se forme (Roblin et Bruslé, 1983 ; Piferrer et al., 2005). Ces données viennent compléter nos précédents travaux (Nihoul et al., en révision) et montrent la mise en place progressive au cours des premiers stades de vie larvaire des différents acteurs de l'axe gonadotrope.

De plus, les travaux de Moles et al (2007), qui s'intéressent aux stades un peu plus tardifs (entre 50 et 300 jpe), décrivent une augmentation importante des transcrits codant pour les sous-unités des GTH pendant la période de différenciation sexuelle (~150 à 250 jpe) amenant les auteurs à proposer un rôle de ces hormones dans le processus de différenciation sexuelle chez le bar européen (Moles et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats obtenus chez différentes espèces de téléostéens montre un lien entre l'expression des GTH et le développement gonadique voire la différenciation sexuelle des individus suggérant fortement l'implication des GTH dans le contrôle de ces processus.

Cependant, la compréhension des mécanismes d'action nécessite davantage d'investigations.

Par ailleurs, une récente étude utilisant des lignées de poisson-zèbre KO pour LHβ ou FSHβ, a permis de préciser le rôle des gonadotropines chez cette espèce. Dans cette étude, les poissons fshβ -/- obtenus montrent une puberté retardée de près d'un mois par rapport aux animaux contrôles. En revanche, une fois la puberté passée, les animaux se reproduisent normalement. Concernant les poissons zèbres lhβ -/-, les auteurs observent des animaux se développant normalement avec une taille des individus et un rapport gonadosomatique similaire aux contrôles au moment de la puberté. Néanmoins, une fois la puberté passée, deux cas de figure vont être rencontrés selon les sexes : dans le cas des mâles, les animaux se reproduisent normalement et dans le cas des femelles lhβ -/-, la maturation des ovocytes n'est pas complète rendant les animaux infertiles (Zhang et al, 2015).

De plus, des croisements ont été réalisés de manière à obtenir des animaux doubles mutants (fshβ -/-, lhβ -/-) et dans ce cas, tous les animaux obtenus sont des mâles.

Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer un rôle pour la FSH dans le contrôle de la puberté et pour la LH dans le contrôle de la maturation des gamètes (Zhang et al, 2015). De plus les données obtenues dans le cas des doubles mutants (fshβ -/-, lhβ -/-) montrent ici aussi l'implication des GTH dans la différenciation sexuelle du poisson zèbre.

Localisation des cellules exprimant les sous-unités LHβ et FSHβ

Afin de compléter les données ontogénétiques recueillies par les mesures de niveaux d'expression, nous avons cherché au cours de cette étude à réaliser une description de la

localisation et de l'organisation des cellules gonadotropes par des analyses en hybridation *in situ*.

Chez le bar adulte, la localisation hypophysaire des cellules à LH et des cellules à FSH a été décrite, et comme chez les autres téléostéens, ces hormones sont produites par deux populations cellulaires distinctes localisées au niveau de la *pars distalis* (Moles et al., 2011, Escobar et al., 2013 ; Espigares et al., 2015). En revanche, peu de données sur ces cellules sont disponibles au cours du développement larvaire. Au cours d'une étude réalisée par Cambré et al (1990), les auteurs se sont intéressés à l'ontogenèse de l'hypophyse et à la chronologie d'apparition des différentes populations cellulaires incluant les gonadotropines entre 1 et 26 jpe. Par des techniques d'immunohistochimie, les auteurs décrivent chez les individus, dès l'éclosion, la présence d'une hypophyse en cours de formation produisant différentes hormones dont l'hormone mélanotrope (MSH), la thyréostimuline (TSH), l'hormone corticotrope (ACTH) et l'hormone de croissance (GH). En revanche, aucune cellule à GTH n'a été détectée entre 1 et 26 jpe chez la larve de bar.

Dans notre étude, malgré l'utilisation de sondes spécifiques visant les sous-unités LHβ et FSHβ du bar européen, nous n'avons détecté aucune cellule exprimant la LHβ ou la FSHβ dans la région hypophysaire et cela, quel que soit le stade étudié (entre 4 et 60 jpe).

Or, chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) les cellules à FSH sont détectées au niveau hypophysaire à 15 jpe; et les cellules à LH sont quant à elles détectées bien plus tardivement, chez l'adulte sexuellement mature (Saga et al., 1993 ; Nozaki et al., 1990a). Chez la daurade, les cellules à FSH sont détectées au niveau hypophysaire chez la larve à 22 jpe alors les cellules à LH sont détectées chez le juvénile à 82 jpe (García-Ayala et al., 2003). Chez *Xiphophorus maculatus*, il a été rapporté que les cellules exprimant la FSH sont localisées dans l'hypophyse dès 2 jpe. Les cellules à LH quant à elles, sont détectées un mois et demi plus tard, au début de la puberté (Magliulo-Cepriano et al., 1994). Chez le pejerrey, les cellules à FSH et à LH sont également détectées précocement, mais à l'inverse des cas précédents, ce sont les cellules à LH qui sont observées les premières (2-3 semaines après éclosion) alors que les cellules à FSH sont observées 3-4 semaines après éclosion (Miranda et al., 2001).

Ces observations montrent qu'il existe des variations dans l'ontogenèse des cellules gonadotropes entre les différentes espèces de téléostéens. De manière générale les cellules à LH et FSH n'apparaissent pas simultanément, avec, chez un certain nombre de téléostéens, les cellules à FSH qui semblent se mettre en place plus tôt que les cellules à LH (truite arc-en-

ciel: Saga et al., 1993; Nozaki et al., 1990b ; daurade : García-Ayala et al., 2003 ; *Xiphophorus maculatus* : Magliulo-Cepriano et al., 1994). Cette différence en termes de chronologie d'apparition suggère des rôles différents pour ces deux hormones avant la différenciation des gonades. Les gonadotropines joueraient un rôle dans la mise en place de l'axe gonadotrope, en particulier pour la FSH qui, chez les salmonidés, serait impliquée dans le développement de la gonade et de la larve (Saga et al., 1993). Cela a également été suggéré chez la daurade, où la FSH aurait un rôle dans la mise en place de l'axe gonadotrope alors que LH aurait un rôle dans l'initiation de la reproduction (García-Ayala et al., 2003).

Au cours de notre étude, malgré la détection des transcrits codant pour les sous-unités *lhβ* et *fshβ* dès les premiers jours de développement larvaire par PCR quantitative en temps réel, les cellules exprimant ces transcrits ne sont pas détectées à ces stades. Cela peut être lié à la sensibilité plus faible de la technique utilisée afin de localiser les cellules, à savoir l'hybridation *in situ* comparativement à la technique de quantification. De plus, la quantification ayant été réalisée sur des pools d'individus entiers, on peut émettre l'hypothèse d'une expression basale des sous-unités des GTH dans un grand nombre de cellules de différents tissus. Ceci expliquerait que les cellules ne soient pas détectées par l'hybridation *in situ,* mais que la somme des transcrits puisse elle être quantifiée.

Les premières cellules exprimant les sous-unités FSHβ ou lhβ ont été observées chez les larves âgées de 50 jours. Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, ces cellules n'étaient pas localisées au niveau hypophysaire, mais au niveau intestinal. Seules quelques études font part de l'expression des gonadotropines en dehors de l'hypophyse. Chez les mammifères, par des techniques d'immunohistochimie, des cellules produisant l'une ou l'autre des gonadotropines ont été détectées dans le tissu testiculaire. Ceci a été montré chez la souris (Markkula et al., 1995), le rat (Zhang et al., 1995) et l'homme (Yoon et al., 1987). Par ailleurs, chez l'homme, des cellules à FSH ont également été détectées au sein de la prostate (Hurkadli et al., 1990) et dans un tissu sans rapport avec la fonction de reproduction, à savoir la muqueuse stomacale (Mandrekar et al., 1990). Dans ce dernier cas, les auteurs ont émis l'hypothèse d'une action paracrine de la FSH au sein de l'estomac sans pour autant définir et comprendre sa fonction à cet endroit. Il est par ailleurs à signaler que d'autres hormones décrites comme hypothalamo-hypophysaires ont été détectées dans la muqueuse de l'estomac de mammifères (corticolibérine chez l'homme : Kruseman et al., 1982 ; ACTH chez le rat et le chat : Larson, 1980). Enfin, dans une étude s'intéressant aux récepteurs de la LH, il a été montré une expression au niveau de l'estomac, de l'iléon et du

colon chez l'homme et le rat (Sand et al., 2013) ; confirmant l'hypothèse d'une production et d'une action locale des gonadotropines au niveau du tractus digestif (Sand et al., 2013).

Chez les téléostéens, la présence extra-hypophysaire des hormones gonadotropes a également été décrite. Chez la daurade, des cellules exprimant soit LHβ, soit FSHβ, ont été localisées par ISH dans le tissu ovarien (Wong et al., 2004). Chez le poisson zèbre, les transcrits codant pour la sous-unité FSHβ ont été détectés dans le cerveau, les gonades, le foie et les reins. Dans cette même étude, les transcrits codant pour la sous-unité LHβ sont détectés dans le cerveau, les gonades, le foie, les reins, les branchies et les muscles (So et al., 2005). Plus récemment, chez la larve de médaka, les cellules exprimant la LHβ ont été localisées au niveau de l'intestin (Hildahl et al., 2012 ; Weltzien et al., 2014). Bien que l'hypophyse se mette en place dès 48 heures après la fécondation, la présence de cellules gonadotropes dans l'hypophyse n'a été décrite qu'à 14 jours post fécondation (Hildahl et al., 2012). En utilisant une lignée transgénique *lhb-gfp*, les auteurs ont montré que durant la formation du tube digestif, les cellules exprimant *lh*β apparaissent au niveau de celui-ci (Weltzien et al., 2014). Ces observations ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse d'une implication de cette LH intestinale dans la stéroïdogenèse. D'après eux, la LH produite au niveau de l'intestin activerait l'enzyme *cyp11a1* de la couche syncytiale du sac vitellin permettant ainsi la production de prégnénolone à partir du cholestérol contenu dans le sac vitellin (Weltzien et al., 2014).

Concernant les récepteurs aux GTH, une étude réalisée chez le poisson chat africain (*Clarias gariepinus*) montre que les transcrits codant pour le récepteur à LH (*lhr*) sont abondamment représentés dans les gonades et la glande surrénale. En plus faible quantité, ces transcrits sont également retrouvés dans le muscle, le cerveau, les vésicules séminales, le cœur, le foie et l'estomac (Vischer et Bogerd, 2003) suggérant ici encore des actions des GTH en dehors du contrôle de la fonction gonadique. Enfin, chez le bar européen, l'analyse de l'expression des récepteurs à LH et à FSH (*lhr* et *fshr*) dans différents tissus a montré que chez l'adulte, les *fshr* ne sont exprimés que dans les gonades ; les transcrits de *lhr*, en revanche ont une distribution tissulaire plus large et sont détectés dans les gonades, mais également, en plus faible quantité, dans le rein et la rate (Rocha et al., 2007).

Nos résultats viennent donc compléter le nombre encore restreint d'études s'intéressant à l'expression des GTH (LH et FSH) et de leurs récepteurs (lhr et fshr) dans des tissus extra-hypophysaires. Il s'agira dans les futurs travaux de s'intéresser aux rôles des gonadotropines dans ces tissus via des études fonctionnelles.

Pour conclure, nous avons montré que dès 4 jours les sous-unités FSHβ et LHβ sont exprimées. Nos résultats montrent deux schémas d'expression différents. L'expression de la sous-unité LHβ augmente au cours du développement larvaire, à l'inverse, l'expression de la sous-unité FSHβ diminue au cours du développement larvaire chez le bar européen. L'expression de ces hormones, bien avant la différenciation sexuelle, suggère chez le bar européen, comme chez d'autres téléostéens, un rôle des gonadotropines dans la mise en place progressive des différents acteurs de l'axe gonadotrope.

Nous avons montré par ISH l'expression de ces sous-unités au niveau intestinal. Leur rôle reste inconnu et leur présence à ce niveau est peu décrite dans la littérature.

Dans un futur travail, il serait intéressant d'étudier la localisation et l'expression de la sous-unité GTHα, commune aux deux hormones gonadotropes, ainsi que la localisation des hormones LH et FSH par immunohistochimie. L'expression tissulaire des transcrits codant pour les récepteurs aux gonadotropines a été décrite chez le bar européen adulte, mais il serait intéressant de compléter cette description par la localisation des récepteurs LHR et FSHR, particulièrement au niveau intestinal, chez la larve de bar.

Pour compléter cette étude, il serait également pertinent de déterminer si l'expression extra hypophysaire persiste chez le bar adulte, afin de définir si les gonadotropines intestinales sont transitoires ou persistent chez l'adulte et ainsi définir si elles ont un rôle à ce niveau uniquement chez la larve.

Cette étude s'ajoute aux précédentes observations faites montrant l'expression d'hormone hypophysaire dans des organes loin du système nerveux central et, dans le cas des hormones gonadotropes, pas de rôles directs dans la reproduction. De plus, ces travaux complètent notre précédente étude sur la mise en place des acteurs cérébraux de l'axe gonadotrope chez la larve de bar européen.

Remerciements

Nous remercions le Dr. R. COULAUD pour son aide en analyse statistique. Cette étude a été financée par la Fédération de Rechercher CNRS 3730 SCALE et la région Normandie. F. Nihoul a été financé par une bourse de thèse de la région Normandie.

Références Bibliographiques

Cambré, M., Mareels, G., Corneillie, S., Moons, L., Ollevier, F., Vandesande, F., 1990. Chronological appearance of the different hypophysial hormones in the pituitary of bass larvae (Dicentrarchus labrax) during their early development: An immunocytochemical demonstration. General and Comparative Endocrinology 77, 408–415. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90231-A

Chedrese, P.J. (Ed.), 2009. Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. Springer US.

Chen, W., Ge, W., 2012. Ontogenic Expression Profiles of Gonadotropins (fshb and lhb) and Growth Hormone (gh) During Sexual Differentiation and Puberty Onset in Female Zebrafish. Biol Reprod 86. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094730

Combarnous, Y., Volland-Nail, P., 1997. Les gonadotropines. Editions Quae.

Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology 55, 1211–1239. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00479-4

Escobar, S., Felip, A., Gueguen, M.-M., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O., Servili, A., 2013. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Comparative Neurology 521, 933–948. https://doi.org/10.1002/cne.23211

Espigares, F., Zanuy, S., Gómez, A., 2015. Kiss2 as a Regulator of Lh and Fsh Secretion via Paracrine/Autocrine Signaling in the Teleost Fish European Sea Bass (Dicentrarchus labrax)1. Biology of Reproduction 93. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131029

Fan, H.G., Wang, D.S., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., 2003. Molecular cloning of the three gonadotropin subunits and early expression of FSHβ during sex differentiation in the nile tilapia, <Emphasis Type="Italic">Oreochromis niloticus</Emphasis>. Fish Physiology and Biochemistry 28, 143–144. https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030502.48938.c0

Garcia Ayala, A., Villaplana, M. , Garcia Hernández, M.P., Chaves Pozo, E., Agulleiro, B., 2003. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of Sparus aurata L. (Teleostei). An immunocytochemical study. General and Comparative Endocrinology 134, 72–79. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00198-9

Guzmán, J.M., Bayarri, M.J., Ramos, J., Zohar, Y., Sarasquete, C., Mañanós, E.L., 2009. Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (Solea senegalensis). Comparative Biochemistry and

Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 154, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.623

Hildahl, J., Sandvik, G.K., Lifjeld, R., Hodne, K., Nagahama, Y., Haug, T.M., Okubo, K., Weltzien, F.A., 2012. Developmental tracing of luteinizing hormone β-subunit gene expression using green fluorescent protein transgenic médaka (*Oryzias latipes*) reveals a putative novel developmental function. Developmental Dynamics 241, 1665–1677. https://doi.org/10.1002/dvdy.23860

Hurkadli, K.S., Sheth, A.R., Garde, S.V., Doctor, V.M., Sheth, N.A., 1990. Immunocytochemical localisation of follicle stimulating hormone (FSH) in normal, benign and malignant human prostates. Br J Cancer 61, 225–229.

Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reprod. Nutr. Dev. 45, 261–279. https://doi.org/10.1051/rnd:2005019

Kagawa, H., Kawazoe, I., Tanaka, H., Okuzawa, K., 1998. Immunocytochemical Identification of Two Distinct Gonadotropic Cells (GTH I and GTH II) in the Pituitary of Bluefin Tuna,Thunnus thynnus. General and Comparative Endocrinology 110, 11–18. https://doi.org/10.1006/gcen.1997.7049

Kaplan, S.L., Grumbach, M.M., 1976. THE ONTOGENESIS OF HUMAN FOETAL HORMONES. II. LUTEINIZING HORMONE (LH) AND FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH). European Journal of Endocrinology 81, 808–829. https://doi.org/10.1530/acta.0.0810808

Kruseman, A.C.N., Linton, ElizabethA., Rees, LesleyH., Lowry, P.J., Besser, G.M., 1982. CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR IMMUNOREACTIVITY IN HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT. The Lancet, Originally published as Volume 2, Issue 8310 320, 1245–1246. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)90105-2

Lapthorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., Isaacs, N.W., 1994. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature 369, 455–461. https://doi.org/10.1038/369455a0

Larsson, L.I., 1980. Immunocytochemical characterization of ACTH-like immunoreactivity in cerebral nerves and in endocrine cells of the pituitary and gastrointestinal tract by using region-specific antisera. J Histochem Cytochem. 28, 133–141. https://doi.org/10.1177/28.2.6243680

Magliulo-Cepriano, L., Schreibman, M.P., Blüm, V., 1994. Distribution of Variant Forms of Immunoreactive Gonadotropin-Releasing Hormone and β-Gonadotropins I and II in the

Platyfish, Xiphophorus maculatus, from Birth to Sexual Maturity. General and Comparative Endocrinology 94, 135–150. https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1067

Mandrekar, P.S., Sheth, A.R., Doctor, V.M., Zaveri, J.P., Sheth, N.A., 1990. Immunocytochemical localization of follicle stimulating hormone in normal human stomach. The Anatomical Record 227, 334–339. https://doi.org/10.1002/ar.1092270308

Markkula, M., Hämäläinen, T., Loune, E., Huhtaniemi, I., 1995. The follicle-stimulating hormone (FSH) beta- and common alpha-subunits are expressed in mouse testis, as determined in wild-type mice and those transgenic for the FSH beta-subunit/herpes simplex virus thymidine kinase fusion gene. Endocrinology 136, 4769–4775. https://doi.org/10.1210/en.136.11.4769

Miranda, L.A., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2001. Immunocytochemical Identification of GtH1 and GtH2 Cells during the Temperature-Sensitive Period for Sex Determination in Pejerrey, Odontesthes bonariensis. General and Comparative Endocrinology 124, 45–52. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7687

Miwa, S., Yan, L., Swanson, P., 1994. Localization of Two Gonadotropin Receptors in the Salmon Gonad by in Vitro Ligand Autoradiography. Biol Reprod 50, 629–642. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.629

Moles, G., Carrillo, M., Mañanós, E., Mylonas, C.C., Zanuy, S., 2007. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). General and Comparative Endocrinology 150, 75–86. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.07.012

Molés, G., Zanuy, S., Muñoz, I., Crespo, B., Martínez, I., Mañanós, E., Gómez, A., 2011. Receptor Specificity and Functional Comparison of Recombinant Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Gonadotropins (Fsh and Lh) Produced in Different Host Systems1. Biology of Reproduction 84, 1171–1181. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086470

Nemeskéri, Á., Sétáló, G., Halász, B., 1988. Ontogenesis of the Three Parts of the Fetal Rat Adenohypophysis. NEN 48, 534–543. https://doi.org/10.1159/000125060

Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Miyata, K., Nakai, Y., Oota, Y., Suzuki, K., Kawauchi, H., 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. General and Comparative Endocrinology 77, 348–357. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90224-A

Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Dickhoff, W.W., Nakai, Y., Suzuki, K., Kawauchi, H., 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (Salmo gairdneri irideus). General and Comparative Endocrinology 77, 358–367. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90225-B

Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2001. Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 4TH International Symposium on Fish Endocrinology 129, 441–448. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00374-8

Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., González, A., 2005. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). General and Comparative Endocrinology, 5th International Symposium on Fish Endocrynology 142, 102–110. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.011

Pinelli, C., Fiorentino, M., D'Aniello, B., Tanaka, S., Rastogi, R.K., 1996. Immunohistochemical Demonstration of FSH and LH in the Pituitary of the Developing Frog,Rana esculenta. General and Comparative Endocrinology 104, 189–196. https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0161

Roblin, C., Bruslé, J., 1983. Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du Loup Dicentrarchus labrax, en conditions d'élevage. Reproduction Nutrition Développement 23, 115–127. https://doi.org/10.1051/rnd:19830110

Rocha, A., Gómez, A., Zanuy, S., Cerdá-Reverter, J.M., Carrillo, M., 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. Molecular and Cellular Endocrinology 272, 63–76. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.04.007

Saga, T., Oota, Y., Nozaki, M., Swanson, P., 1993. Salmonid Pituitary Gonadotrophs, III. Chronological Appearance of GTH I and Other Adenohypophysial Hormones in the Pituitary of the Developing Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss irideus). General and Comparative Endocrinology 92, 233–241. https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1159

Sand, E., Bergvall, M., Ekblad, E., D'Amato, M., Ohlsson, B., 2013. Expression and distribution of GnRH, LH, and FSH and their receptors in gastrointestinal tract of man and rat. Regulatory Peptides 187, 24–28. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.09.002

Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Belle, N.L., Elie, P., Dufour, S., 2005. Differential Regulation of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Expression during Ovarian Development and under Sexual Steroid Feedback in the European Eel. NEN 81, 107–119. https://doi.org/10.1159/000086404

Shinoda, T., Miranda, L.A., Okuma, K., Hattori, R.S., Fernandino, J.I., Yoshizaki, G., Somoza, G.M., Strüssmann, C.A., 2010. Molecular cloning and expression analysis of *Fshr* and *Lhr* in relation to *Fshb* and *Lhb* subunits during the period of temperature-dependent sex

determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Molecular Reproduction and Development 77, 521–532. https://doi.org/10.1002/mrd.21179

So, W.-K., Kwok, H.-F., Ge, W., 2005. Zebrafish Gonadotropins and Their Receptors: II. Cloning and Characterization of Zebrafish Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Subunits—Their Spatial-Temporal Expression Patterns and Receptor Specificity. Biol Reprod 72, 1382–1396. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038216

Urbatzka, R., Lorenz, C., Lutz, I., Kloas, W., 2010. Expression profiles of LHβ, FSHβ and their gonadal receptor mRNAs during sexual differentiation of Xenopus laevis tadpoles. General and Comparative Endocrinology 168, 239–244. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.02.012

Veyssière, G., Berger, M., Jean-Faucher, C., Turckheim, M.D., Jean, C., 1982. PITUITARY AND PLASMA LEVELS OF LUTEINIZING HORMONE AND FOLLICLE-STIMULATING HORMONE IN MALE AND FEMALE RABBIT FETUSES. Journal of Endocrinology 92, 381–387. https://doi.org/10.1677/joe.0.0920381

Vischer, H.F., Bogerd, J., 2003. Cloning and Functional Characterization of a Gonadal Luteinizing Hormone Receptor Complementary DNA from the African Catfish (Clarias gariepinus). Biol Reprod 68, 262–271. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004515

Weltzien, F.-A., Hildahl, J., Hodne, K., Okubo, K., Haug, T.M., 2014. Embryonic development of gonadotrope cells and gonadotropic hormones – Lessons from model fish. Molecular and Cellular Endocrinology, Molecular and Cellular Biology of Gonadotropes: An integrated view with new horizons 385, 18–27. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.016

Wong, T.-T., Gothilf, Y., Zmora, N., Kight, K.E., Meiri, I., Elizur, A., Zohar, Y., 2004. Developmental Expression of Three Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone and Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Gilthead Seabream (Sparus aurata)1. bire 71, 1026–1035. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028019

Wu, Y., He, Z., Zhang, L., Jiang, H., Zhang, W., 2012. Ontogeny of Immunoreactive Lh and Fsh Cells in Relation to Early Ovarian Differentiation and Development in Protogynous Hermaphroditic Ricefield Eel Monopterus albus. Biol Reprod 86. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095646

Yan, H., Ijiri, S., Wu, Q., Kobayashi, T., Li, S., Nakaseko, T., Adachi, S., Nagahama, Y., 2012. Expression Patterns of Gonadotropin Hormones and Their Receptors During Early Sexual Differentiation in Nile Tilapia Oreochromis niloticus. Biol Reprod 87. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101220

Yoon, D.J., Golimbu, M., Schinella, R., Stein, B., Sklar, C.A., David, R., 1987. Immunocytochemical localization of hFSH as an index of Sertoli cell function in the human

testis. European Journal of Endocrinology 116, 333–338. https://doi.org/10.1530/acta.0.1160333

Zhang, F.P., Markkula, M., Toppari, J., Huhtaniemi, I., 1995. Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis. Endocrinology 136, 2904–2912. https://doi.org/10.1210/en.136.7.2904

Zhang, Z., Zhu, B., Ge, W., 2015. Genetic Analysis of Zebrafish Gonadotropin (FSH and LH) Functions by TALEN-Mediated Gene Disruption. Molecular Endocrinology 29, 76–98. https://doi.org/10.1210/me.2014-1256

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. General and Comparative Endocrinology 165, 438–455. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017

Figures

Gène	Numéro d'accession	Taille amplicon (pb)	Température de fusion (°C)	Séquence de l'amorce (5' - 3')
lhβ	AF543315	164	60	F : GTTGTCCCAAGTGTCACCCA
				R : CACACCAGGTGGACAGTCAG
fshβ	AF543314	190	57	F : CACCGAGGTCATCTACACCAC
				R : ACAAGTGGTACACTCGCAGTT
L13	DQ836931	96	60	F: GGCTAAGGCCCGTCTCATTG
				R: GCACGAACCTTGGTGTGGTA

Tableau 1 : Séquence des amorces utilisées pour la qRT-PCR. (F : Forward ; R : Reverse)

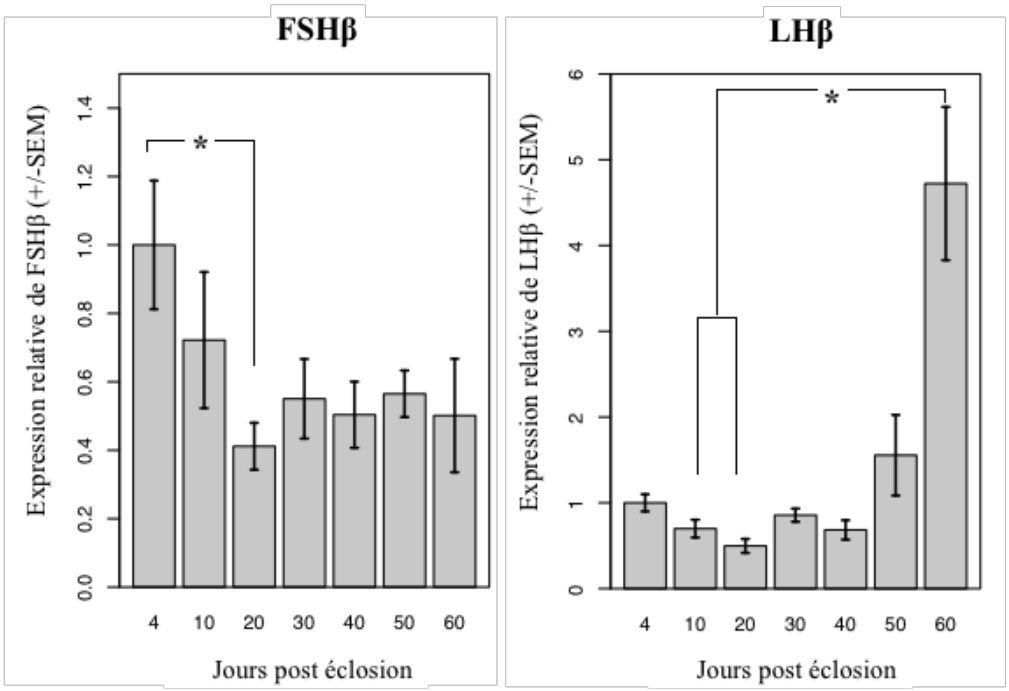


Figure 1. : Profil d'expression de *fshβ* et *lhβ* au cours du développement larvaire chez le bar européen. Les valeurs de qRT-PCR ont été normalisées par rapport à l'expression de la protéine ribosomale L13 et la variation d'expression a été représentée relativement à l'expression à 4 jours post éclosion. * : différence significative ($p<0,05$)

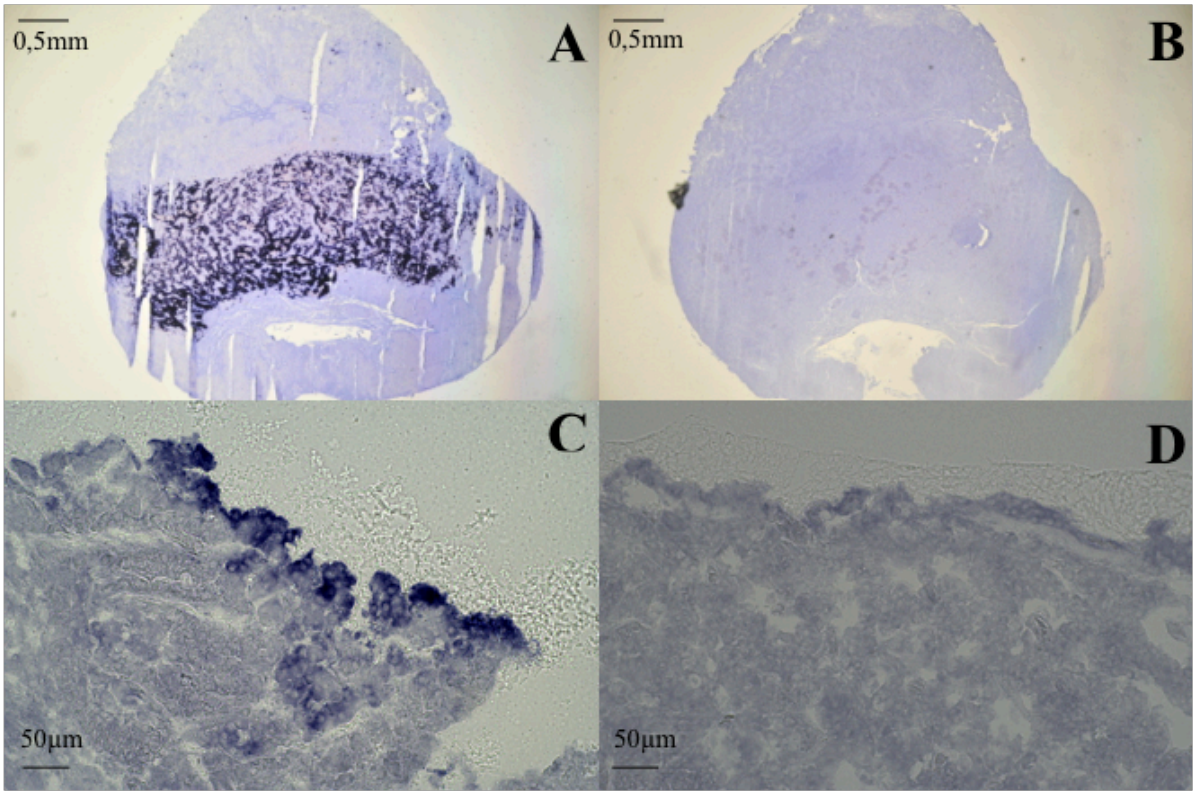


Figure 2 : Détection par hybridation *in situ* des cellules exprimant les sous-unités FSHβ et LHβ sur hypophyse de bar adulte. A : Section traitée avec la sonde anti-sens et montrant les cellules exprimant *fshβ*. B : Coupe adjacente traitée avec la sonde sens *fshβ*. C : Section traitée avec la sonde anti-sens et montrant les cellules exprimant *lhβ*. D : Coupe adjacente traitée avec la sonde sens *lhβ*. L'échelle est indiqué par le trait noir.

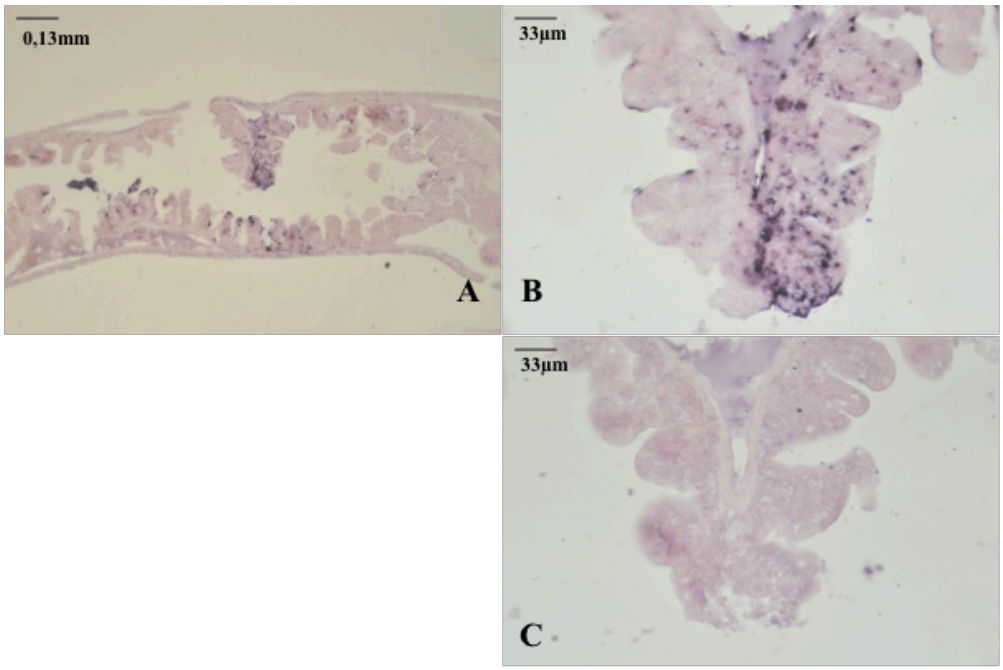


Figure 3 : Détection par hybridation *in situ* des cellules exprimant les sous-unités FSHβ chez la larve de bar âgée de 50 jours post éclosion. A et B : Localisation des cellules exprimant *fshβ* au niveau de la muqueuse intestinale chez la larve de bar européen de 50 jours. C : Contrôle négatif sur une coupe adjacente à B ne présentant pas de cellule marquée. La ligne noire indique l'échelle.

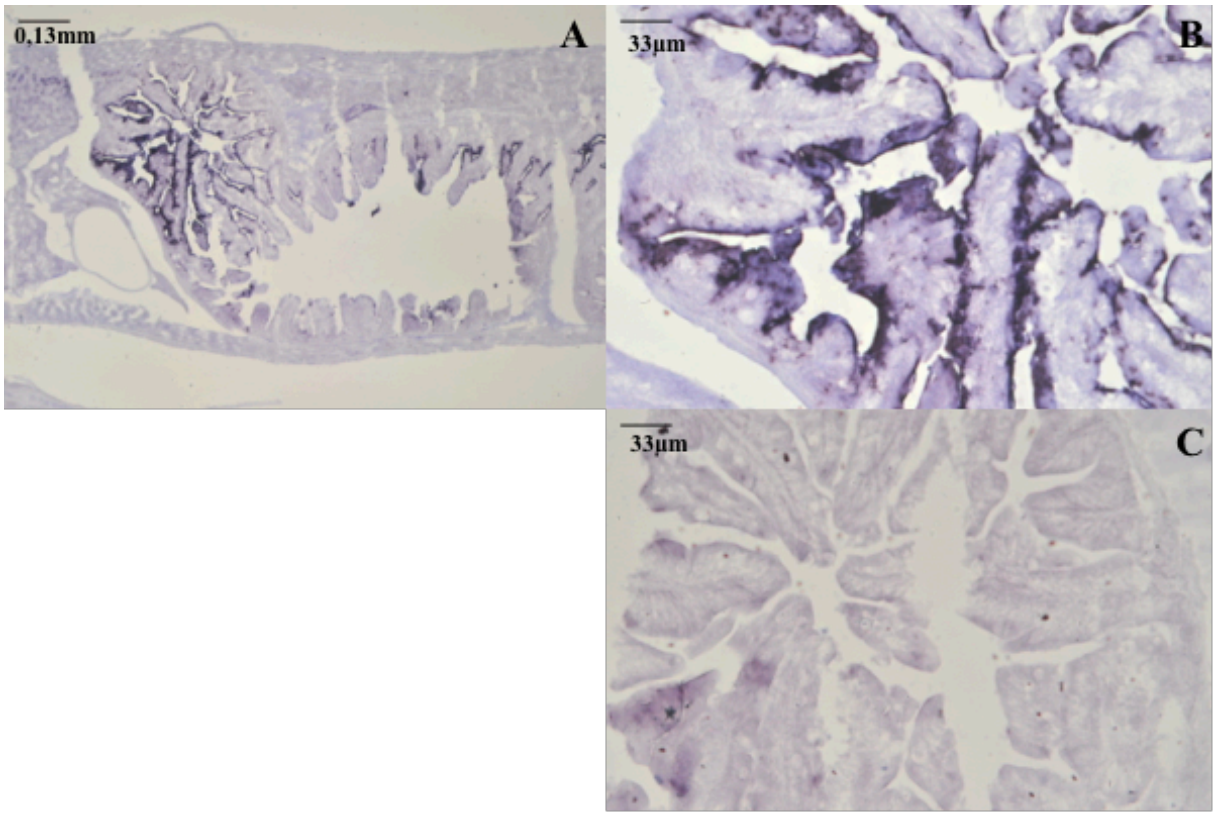


Figure 4 : Détection par hybridation *in situ* des cellules exprimant les sous-unités LHβ chez la larve de bar âgée de 50 jours post éclosion. A et B : Localisation des cellules exprimant *lhβ* au niveau de la muqueuse intestinale chez la larve de bar européen de 50 jours. C : Contrôle négatif sur une coupe adjacente à B ne présentant pas de cellule marquée. La ligne noire indique l'échelle.

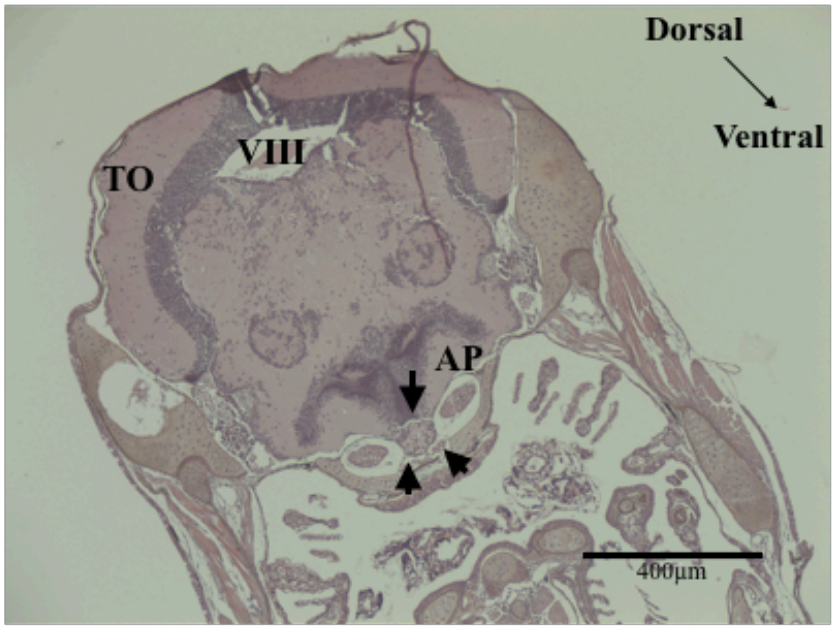


Figure 5 : Localisation de l'hypophyse (indiqué par la flèche noire) sur coupe transversale de larve de bar à 50 jours post éclosion, en coloration Hematoxyline - Eosine - Safran (HES). Inclusion, coupe et coloration réalisés avec le service de d'anatomocytopathologie de l'hôpital Jacques Monod (Montivilliers). TO : Tectum Optique ; VIII : 3ème ventricule ; AP : Aire préoptique.

Article 3

Effects of 17α-Ethinylestradiol (EE2) exposure during early life development on Kisspeptins and GnRHs ontogenesis of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*.

Florent Nihoul[1] ; Sofia Soloperto[1] ; Stéphanie Olivier[1] ; Aurélie Duflot[1] ; Agnès Poret[1] ; Marie-Pierre Halm-Lemeille[2] ; Jean-Michel Danger[1] ; Salima Aroua[1*]

[1] *Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques UMR-I 02 SEBIO - Université Le Havre Normandie - FR CNRS 3730 SCALE, Le Havre, France*

[2] *Laboratoire Environnement Ressources, Centre Manche Mer du Nord, IFREMER, Port en Bessin, France*

Title

Effects of 17α-Ethinylestradiol (EE2) exposure during early life development on Kisspeptins and GnRHs ontogenesis of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*.

Authors

Florent Nihoul[1] ; Sofia Soloperto[1] ; Stéphanie Olivier[1] ; Aurélie Duflot1 ; Agnès Poret[1] ; Marie-Pierre Halm-Lemeille[2] ; Jean-Michel Danger[1] ; Salima Aroua[1*]

Affiliation

[1] Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques UMR-I 02 SEBIO - Université Le Havre Normandie - FR CNRS 3730 SCALE, Le Havre, France

[2] Laboratoire Environnement Ressources, Centre Manche Mer du Nord, IFREMER, Port en Bessin, France

***Correspondence**

Université Le Havre Normandie - UMR-I 02 SEBIO - 25 rue Philippe Lebon - BP 1123, 76063 Le Havre Cedex, France. / E-mail address: salima.aroua@univ-lehavre.fr

Abstract

In vertebrate species, the reproductive function is regulated by the brain-pituitary-gonads axis. At the brain level, the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and kisspeptins are the main actors of the reproductive axis. Among the different factors acting on them, estrogens play a major role in influencing their development and activity. Thus, exposure to endocrine disrupting chemicals as xenoestrogens during the sensitive larval period could disrupt the ontogenesis of the GnRH and kisspeptin systems. In the present study, we exposed sea bass larvae to different concentrations of 17α-ethinylestradiol (EE2) (0.5nM and 50nM) to evaluate, by using a combination of quantitative real time PCR and *in situ* hybridization, the effect on the temporal and spatial expression of *gnrh1*, *gnrh2*, *gnrh3*, *kiss1* and *kiss2* genes. In parallel, we measured the expression of *cyp19a1b* as positive control of EE2 exposure. Our results demonstrate that EE2 affect the expression of *kiss2*, *gnrh2*, *gnrh3* and *cyp19a1b genes* but not *kiss1* gene during the early developmental stages. These data reinforce the idea that the larval development is a sensitive critical period in regard to endocrine disruption.

1. Introduction

Estrogens, mostly known for their key role in the reproductive function, are also described as important factors in several systems such as the cardiovascular system (Dworatzek and Mahmoodzadeh, 2017), the bone (Manolagas et al., 2013), the adipose tissue (Kim et al, 2014) or the central nervous system (Diotel et al., 2018). In the brain, through interactions with their specific membrane and nuclear receptors, estrogens have been shown to act on cell proliferation, migration and differentiation, on synaptic plasticity and on cell survival (Brannvall et al., 2002; McCarthy, 2008; Shi et al., 2013; Coumailleau et al., 2015; Wang et al., 2018). These estrogenic activities described on adult brain are also observed in the developing brain (McCarthy et al., 2008; Coumailleau et al., 2014; Diotel et al., 2018).

Estrogenic endocrine disrupting compounds (EDCs) can interfere with biological processes by mimicking endogenous hormones and their interactions with estrogen receptors (ERs). Because of their habitat, fish are particularly exposed to EDCs and several reports have described the impact of xenoestrogens on fish endocrine functions and particularly on reproduction with reported effects ranging from changes in gene expression levels to a complete sex reversion in laboratory fish models as well as in natural fish populations (for review: Adeel et al., 2017; Aris et al., 2014; Mills and Chichester, 2005).

For instance, several studies performed on roach (*Rutilus rutilus*) have demonstrated the feminizing effects of estrogenic EDCs. In 1998, Jobling and collaborators performed a field study on wild fish from UK and showed that the occurrence of intersex fish (with gonads containing both male and female gametes) were correlated with the proportion of wastewater treatment works effluent in the river. Then, several experimental studies with controlled exposures of roach to wastewater effluents containing estrogenic compounds have demonstrated the induction of feminization of the reproductive ducts especially when the exposure occurred during the early life stages (Rodgers-Gray *et al.*, 2001; Liney *et al.*, 2005; Lange et al, 2012). This has also been confirmed in other teleost species, where sex reversal has been observed after exposures to natural or synthetic estrogens (medaka: Yamamoto et Matsuda, 1963; Papoulias et al, 2000; Tilapia: Nakamura and Takahashi,1973; zebrafish: Nash et al. 2004; Segner et al. 2003; Xu et al. 2008), in addition to other disorders as vitellogenin production in males, altered egg production in females or reduction of the fertilization rate (for review: Caldwell et al, 2012).

In vertebrates, the reproductive function is under the control of the Brain-Pituitary-Gonads (BPG) axis. At the brain level, two main actors, the Gonadotropin Releasing Hormones (GnRHs) and the kisspeptins (Kiss) are produced. These peptides act on pituitary cells and

control the synthesis and release of the gonadotropin hormones (Luteinizing hormone, LH and Follicle Stimulating Hormone, FSH). The gonadotropins exert their actions on gonads controlling both steroidogenesis and gametogenesis (Chedrese et al., 2009).
In order to understand the sites and mechanisms of actions of the estrogenic EDCs on the reproductive function, some studies have investigated the influence of these molecules on the different components of the BPG axis (Qin et al., 2014; Vosges et al., 2010).
In the fathead minnow *Pimephales promelas*, a 2-years chronic exposure to ethinylestradiol (EE2) in an experimental lake led to a population collapse, indicating a disruption of reproductive functions (Kidd et al., 2007). In the adult rare minnow *Gobiocypris rarus*, exposure to EE2 induced variation in the expression of several target genes involved in the BPG axis including the lhβ subunit, the gonadotropin receptors (Qin et al, 2014) as well as kiss1, kiss2 and GnRH isoforms (Yang et al., 2016). In zebrafish, exposure of embryos to EE2 had various effects: it induced malformation such as edema or abnormal body axis curvature (Santos et al., 2014); it impacted the expression of genes related to growth (Schiller et al., 2013). Regarding the BPG axis, it was demonstrated that exposure to EE2 or nonylphenol disrupt the development of forebrain GnRH neurons (Vosges et al., 2010; Vosges et al, 2012) and strongly induce the expression of the brain aromatase gene (cyp19a1b) (Vosges et al., 2010; Vosges et al, 2012). A strong activation of the expression of cyp19a1b was also observed after exposure of zebrafish to different analogs of bisphenol (Cano-Nicolau et al, 2016).

The European sea bass is a species of high commercial value living in Atlantic coastal waters and Mediterranean Sea. Since 1960-70's, in order to develop the aquaculture, the species has been largely studied (Barnabé, 1984), and the European sea bass was the first marine non-salmonid species to be commercially cultured in Europe (FAO.2005-2019). In addition to the farmed production which account for 191 000 tons in 2016, wild sea bass are also caught mostly in the Atlantic with 5300 tons fished in 2016 (EUMOFA, 2019). Nevertheless, since 2010, a continuous decline of the fish stock is measured in the north Atlantic (ICES, 2018) conducing the European council to adopt fishing regulations for this species from 2015 (EU Regulation 2015/523; 2016/72; 2017/127; 2018/1308; 2019/124). The strong fishing pressure and the change in environmental conditions are probably the reasons of the decline of the stock, but it needs further investigations.

The aim of the present study is to assess the consequence of exposure to estrogenic compound on the ontogenesis of kisspeptin and GnRH systems in sea bass larvae. Using a combination of *in situ* hybridization and real time quantitative PCR analysis, the effects of 17alpha-ethynilestradiol (EE2) was evaluated on temporal and spatial expression patterns of *kiss* and *gnrh* genes during early larval stages of European sea bass.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Fertilized eggs of sea bass were obtained from a local hatchery (Ecloserie Marine de Gravelines, Gravelines, France). After their transfer to the laboratory, eggs were acclimatized in natural filtered and aerated sea water (Aquacaux, Octeville-sur-mer, France) at a temperature of 15°C and a salinity of 33ppt. Before hatching, eggs were randomly transferred into 24 well plates (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France), one egg per well in 2ml of sea water and kept in an incubator at 15°C in the dark. All procedures were in accordance with the French and European legislation concerning the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes.

2.2 Exposure conditions and sampling

A stock solution of 100mM of 17α-ethynilestradiol (EE2) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) and serially diluted to obtain the experimental solutions of 5µM and 500µM.

When the hatching rate reached 80%, newly hatched larvae were exposed to the nominal concentration of 0.5nM and 50nM of EE2 (respectively 0.15µg/L and 15µg/L) or to the solvent control (DMSO; 0.0005% v/v). Plates were kept in an incubator at 15°C in the dark with a renewal of half of the medium every 2 days. Every day, the mortality was assessed and dead larvae were eliminated. Larvae were exposed during 8 days, and sequential sampling were performed at 2-, 4-, 6- and 8-days post hatching (dph). For each sampling time, 18 larvae were randomly collected for the RT-qPCR assays. At 6dph, and 18 larvae for *in situ* hybridization per condition. For the RT-qPCR, larvae were immersed in RNA later (Ambion Inc., Austin, TX) and stored at -20°C until analyses. For the ISH, larvae were fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) at room temperature overnight and embedded in gelatin. There were then sectioned at 20µm using a MicromHM525 cryostat (MMFrance, France) and slices were stored at -20°C until analysis. In addition, 10mL of the contaminated water was collected and

stored at -20°C for further analysis by yeast estradiol sensitive (YES) assay (Toxem, Le Havre, France).

2.3 RNA isolation and reverse transcription

Larvae samples (18 larvae dispatched in 6 replicates) were homogenized in a Soft Tissue Homogenizer CK14 (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France). Total RNA were extracted in Tri-Reagent (Ambion Inc., Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. All samples were submitted to a deoxyribonuclease I treatment following the extraction (Roche, Indianapolis, IN). First strand cDNA was synthesized from 1µg of total RNA using Superscript Reverse Transcriptase III and random hexamers (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). cDNAs were stored at -20°C until analyses.

2.4 Quantitative Real Time PCR

Specific primers for European sea bass *cyp19a1b* (Accession number AY138522.1) were designed (F: GGCTACACCCTCAACAGCAT, R: CCACCAAAACCCCTCTGTGT). To optimize the assay, different annealing temperatures were tested and amplification product was sequenced (Genewiz, Bishop's Stortford, UK). Gene specific primers for *kiss1*, *kiss2*, *gnrh1, gnrh2* and *gnrh3* genes have been tested and optimized in a previous study (Nihoul et al., in review) (table 1).

Quantitative real time PCR assays were performed by using a Rotor Gene Q device (Qiagen, Courtaboeuf, France). The mix consisted of 5µl of QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (Qiagen, France), 1.5µl of diluted cDNA template (1:25) and forward/reverse primers (200nM each) in a final volume of 10µl. The following conditions were chosen: denaturation at 95 °C for 15min, followed by 45 cycles of 15s at 94°C, 25s at a temperature ranging from 57 to 60°C according to the target gene, 25s at 72°C. Directly after the amplification phase, a melting curve analysis was carried out to confirm the presence of a single PCR product. Serial dilutions were prepared from a pool of cDNA of all conditions to be used as standard for each target gene. Each sample was analyzed in duplicate for each gene. In each run, a non-template control was added to confirm the absence of contamination and a calibrator sample was added to adjust for assay to assay variations. Different reference genes were tested (*ef1*, *L13* and *fau*) and their stability compared using Bestkeeper software (© 2004 M. W. Pfaffl). Transcript encoding for ribosomal protein L13 was then chosen as a reference and relative expression levels were calculated by ΔΔCt method.

2.5 In situ hybridization

As in our previous study, only *kiss2*-, *gnrh2*- and *gnrh3*-expressing cells were detected before 10dph in the developing brain; we focused herein on these genes.

Riboprobe synthesis was performed as described in Nihoul et al. (in review). Briefly, after plasmid linearization, probes were synthesized with DIG-UTP labelling mix and T3 or T7 polymerases according to the manufacturer's instructions (Roche, Indianapolis, IN).

For each gene, *in situ* hybridization was performed on cryosections using 2 fishes treated by the 'sense probe' (as controls) and 4 fishes treated with the 'antisense probe'. Sections were washed twice for 15 min with 1X PBS / Active DEPC (0.1%) and equilibrated in 5X SSC. Slides were incubated overnight at 65°C in hybridization solution (50% deionized formamide, 5X SSC, 0.1% Tween 20, 0.5% SDS) containing 600 ng/slide of probe in a box containing 50% deionized formamide and 50% of 5X SSC to avoid dehydration. Washes were performed twice with 2X SSC and once with 0.1X SSC for 1h. Sections were then equilibrated in BS twice for 10 minutes, and saturated in BS solution containing 4% blocking reagent (Roche) and 15% FBS serum for 1h at room temperature. Sections were incubated 2h at 4°C with an anti-digoxigenin antibody coupled with alkaline phosphatase (Roche, France) diluted to 1: 1000 in BS solution added with 5% FBS and 1% BB. The detection was conducted in alkaline solution containing NBT-BCIP (Roche). Sections were photographed using a Nikon inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-U, Japan) and a Nikon D3s camera (Nikon, Japan).

2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (R Core Team, 2019). After testing the normality and the homogeneity of variances, comparison of means was performed with a non-parametric Kruskal and Wallis test followed by Wilcoxon post-hoc test with Holm correction. The level of significance was set to 0.05.

3. Results

3.1 Measurement of EE2 in the exposure medium (fig. 1)

In order, to ensure the presence of EE2 in the water of exposure, analyses were performed in samples of water before the renewing of the medium at day 2 and 8 (corresponding to 2 days after the introduction of the contaminant). The results obtained indicated that in water samples from 'DMSO' and '0.5nM EE2', no estrogenic activity has been detected. In contrast, in water samples from '50nM EE2', an estrogenic activity was measured. At day 2, an estrogenic activity corresponding to 23nM estradiol equivalent was dosed in the water of

exposure, while at day 8 (corresponding to the end of the experiment), an estrogenic activity equivalent to 27nM of estradiol was measured.

3.2 Larval mortality (fig. 2)

Mortality has been followed during the experimental period. The results indicated no difference in terms of cumulative mortality between exposed and control groups. However, regarding the curve shapes, the peak in mortality arose at different time point in function to exposure condition. The first increase in larval mortality is observed in the '50nM EE2' group at 4dph. In 'DMSO' and '0.5nM EE2' groups, mortality peaks were observed at 5dph. Finally, in the 'water control' group, the peak in larval mortality arose at 6dph.

3.3 Effects of the EE2 on target gene expression

To investigate whether xenoestrogens had any effects on *kiss*, *gnrh* or *cyp19a1b* gene expression, larvae were treated with various doses (0.5nM and 50nM) of EE2 over 8 days post hatching.

3.3.1 Effect on kisspeptin gene expression (fig. 3A and 3B)

Both *kiss1* and *kiss2* mRNAs were detected at each larval stage investigated. For *kiss1* gene, despite some small variations in mRNA levels, no significant changes were observed among the different experimental conditions at any larval stages. Regarding *kiss2* gene expression, no significant variations were observed between the control 'DMSO' and the EE2 treated groups after 2, 6 and 8 days of exposure. In contrast, a weak but significant decrease in *kiss2* mRNA levels was observed after 4 days of exposure in 50nM EE2 group compared to the control DMSO (x0.68 compared to DMSO, $p<0.05$) whereas no significant change was observed in the 0.5nM EE2 group.

3.3.2 Effect on gnrh gene expression (fig. 3C and 3D)

Due to an error in the experimental procedure and the small quantity of total RNA available for qPCR quantification, *gnrh1* mRNA levels were unfortunately not quantified.

Regarding *gnrh2* and *gnrh3* mRNAs, both were detected at each larval stage investigated and in each experimental condition (DMSO and EE2 groups). After 2 days of exposure, no significant changes were observed in *gnrh2* mRNA levels when comparing the EE2 exposed groups to the control DMSO group. In contrast, at the later treatment time, the expression levels of the *gnrh2* gene were affected by the exposure to EE2. After 4 days of exposure, a significant decrease in *gnrh2* mRNA levels is observed in 50nM EE2 exposed group

compared to the control DMSO group (x 0.71, $p<0.05$). This effect is still observed after 6 days of 50nM EE2 exposure (x 0.37, $p<0.05$) but is not anymore significant after 8 days of EE2 exposure. Measurement and comparison of *gnrh3* mRNA levels at each sampling time showed that up to 6 days of EE2 exposure, the expression of the *gnrh3* gene is not significantly affected. In contrast, after 8 days of EE2 exposure, a significant decreased in gnrh3 mRNA levels is observed in both 0.5nM EE2 (x0.63, $p<0.05$) and 50nM EE2 (x0.56, $p<0.05$) conditions as compared to control DMSO.

3.3.3 Effect on cyp19a1b gene expression (fig. 4)

The brain aromatase *cyp19a1b* gene expression was analyzed in larvae of each experimental group. mRNA levels were detected and measured in each group at each sampling time (2, 4, 6, 8 days). Whereas, no significant changes in *cyp19a1b* mRNA levels were detected after 2 days of EE2 exposure, a weak but significant increase in *cyp19a1b* mRNA levels was measured after 4 days in both conditions (0.5nM EE2: x1.72, $p<0.05$; 50nM EE2: x2.16”), $p<0.05$), after 6 days (0.5nM EE2: x1.82, $p<0.05$) and after 8 days (0.5nM EE2: x1.06, $p<0.05$) as compared to the control DMSO.

3.4 Effect of EE2 on brain gnrh2- and gnrh3-expressing cells (fig. 5 and fig. 6)

To investigate the effect of EE2 on the spatial distribution of *gnrh2*- and *gnhr3*-expressing cells, larvae were exposed from hatching to 6 dph and then cell location was investigated using *in situ* hybridization.

In control larvae, *gnrh2*-expressing cells were detected in the mesencephalon. Similar observations were made in larvae exposed to 0.5nM EE2 (n=3). In contrast, in 50nM EE2 exposed larvae (n=3), no labeled cells could be detected neither in the brain nor in other part of the body of larvae.

Concerning *gnrh3*-expressing cells, in control larvae, stained cells were localized in the olfactory bulbs. In 0.5nM EE2 exposed larvae, *gnrh3*-labeled cells were observed in the same area but with a weaker staining. In 50nM EE2 exposed larvae, the signal of stained cells in the olfactory bulbs is even weaker. In addition, some *gnrh3*-expressing cells were also observed in the rostral part of the telencephalon. However, this observation has been done in one single fish and need to be repeated.

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the effects of a xenoestrogen, the synthetic 17α-ethynilestradiol (EE2), on the ontogenesis of GnRH and Kisspeptin systems in the European sea bass. By combining the measurement of gene expression by quantitative RT-PCR and the location of brain cells by *in situ* hybridization, we demonstrated that EE2 interferes with the development of GnRH (gnrh2 and gnrh3) and kisspeptin (kiss1 and kiss2) during early developmental stages.

4.1 Brain aromatase: an ubiquitous positive control of estrogenic exposure

The *cyp19a1b* gene is coding for the brain aromatase (also named Aromatase B) which, due to its remarkable sensitivity to estrogens, has been proposed as biomarker for xenoestrogens exposure in vivo and in vitro (Pour revue: Diotel et al., 2010; Le Page et al., 2011). In zebrafish, exposure of embryos to EE2 induces a strong increase of *cyp19a1b* gene expression even at low concentration (Vosges et al., 2010). This strong sensitivity to estrogenic compounds was confirmed by several studies (Halm et al., 2002; Hinfray et al., 2006; Menuet et al., 2005; Mouriec et al., 2009; Cano-Nicolau et al., 2016).

This ability to answer to estrogen is given by an Estrogen Responsiveness Element (ERE), closely associated to *cyp19a1b* promoter in zebrafish (Kazeto et al., 2004). In different fish species (zebrafish, catfish, fugu, goldfish, medaka and tilapia), studies on *cyp19a1b* gene structure showed that ERE is conserved through teleost species (for review: Diotel et al., 2010). In sea bass, despite the lack in *cyp19a1b* genomic data, it has been showed that aromatase activity in brain of female increase during the spawning season, when the estradiol rate is the highest (Mananos et al., 1997; Gonzales and Piferrer, 2003).

In our experiment, the exposure to EE2 induced a weak but significant increase of c*yp19a1b* gene expression. This increase in c*yp19a1b* mRNA levels is observed after 4 days of EE2 exposure, confirming in sea bass larvae the sensitivity of this gene to estrogenic compounds.

4.2 Xenoestrogens affects the development of GnRH system

The present study investigates for the first time in fish the potential disruptive effects of xenoestrogens on the diverse GnRH isoforms during larval development. In sea bass, three different *gnrh* genes (*gnrh1, gnrh2, gnrh3*) have been cloned (Zmora et al, 2002) and the neuroanatomical organization of the different cell populations have been described in the

brain of adult and developing fish (Gonzalez-Martinez et al, 2001; 2002; 2004; Nihoul et al, in press).

In the present study, we demonstrated that exposure of sea bass larvae to 17α-ethinylestradiol (EE2) induced significant changes in gnrh2 and gnrh3 ontogenesis. The observed modifications affected either the gene expression or the cell localization in the developing brain.

Regarding *gnrh2*, after 4 days of exposure to 50nM EE2, a decrease in gene expression is observed as compared to controls. This was further confirmed by the *in situ* hybridization analysis where the *gnrh2*-expressing cells were not anymore detected in the mesencephalic area. A negative effect of EE2 exposure was also observed on *gnrh3* gene expression but in this case, it was observed after 8 days of treatment. In addition, the localization of *gnrh3*-expressing cells was also affected by EE2 exposure. Indeed, some *gnrh3* cells were detected in the telencephalon of EE2 exposed fish whereas in controls there were only detected in the olfactory bulbs.

Some few studies have already demonstrated disruptive effects of xenoestrogens on GnRH neurons ontogeny. In zebrafish, exposure of embryos to EE2, nonylphenol (Vosges et al, 2010, 2012) or bisphenol A and S (Qiu et al, 2016) induces an increase in GnRH3 neurons (which in zebrafish is the hypophysiotropic form). In medaka, the exposure of embryos to bisphenol A had various effects depending on the time of exposure: at 3 days post fertilization (dpf corresponding to 2 days of exposure), an increase in *gnrh3* gene expression is observed whereas an opposite effect is observed at 5dpf with a decrease in *gnrh3* mRNA levels (Iganaki et al, 2016).

The xenoestrogens can exert their disruptive effects through estrogen receptors. In teleost, 5 types of receptors has been described: 3 nuclear receptors (Esr1, Esr2a and Esr2b) (for review: Nelson and Habibi, 2013) and 2 membrane receptors (GPERa and GPERb) (European eel: Lafont et al., 2016; European sea bass: Pinto et al., 2018). In zebrafish, by using an Esr antagonist, it was demonstrated that the different xenoestrogens act through an estrogen receptor pathway to disrupt GnRH3 neuron ontogeny (Vosges et al, 2012; Qiu et al, 2016).

In the adult sea bass, the neuroanatomical description of the three Esr (Esr1, Esr2a and Esr2b) has been performed (Muriach et al., 2008a, 2008b) and by crossing these data with the distribution of GnRH cells, we can hypothesize that this Esr pathway also exist in sea bass. For GnRH3 neurons, the three Esr forms can contribute as there were detected in the ventral telencephalon and diencephalon, and for GnRH2 neurons, if the xenoestrogens act via this

pathway, it will be through Esr1 (Muriach et al, 2008a). These hypotheses will need to be further examined in the future.

4.3 Xenoestrogens affect kiss2 but not kiss1 system

In the present work, the effect of EE2 on the kisspeptin systems was also investigated through the measurement of *kiss1* and *kiss2* gene expression. Our results showed that EE2 exposure exert a different action on the two *kiss* genes. Regarding the *kiss1* gene, we did not observe any significant variation in mRNA levels whatever the dose and the duration of EE2 exposure. Concerning the *kiss2* gene, a weak but significant decrease in kiss2 mRNA levels was measured after 4 days of EE2 treatment; nevertheless the effect is not maintained the following days.

In mammals, several studies have investigated and demonstrated effects of different kind of xenoestrogens (BPA, PCBs, Genistein) on the kisspeptin system (Pour revue: Patisaul, 2013). In teleost, studies are scarce but the subject begins to arouse interest. In zebrafish, Qiu et al (2016) have investigated the effects of BPA and BPS exposure of embryos on the expression of various genes related to the reproductive axis including *kiss1* gene. They demonstrated that BPA and BPS induce an up-regulation of *kiss1* gene expression. Unfortunately, they did not investigate the *kiss2* gene. Both *kiss1* and *kiss2* gene were investigated in juvenile and adult fishes. In *Catla catla,* pubertal female exposed to BPA during two weeks, an increase in brain *kiss1* and *kiss2* gene expression is observed (Faheem et al., 2018). In adult rare minnow (*Gibiocypris rarus)*, exposure to EE2 for 6 days induced an increase of mRNA levels for both *kiss1* and *kiss2* (Yang et al., 2016). In these cases, both *kiss* genes are sensitive and up-regulated by estrogenomimetic compounds which contrast with our results. This difference could be due to the fact that we do not investigate the same developmental stages.

Indeed, in adult sea bass, during breeding season, the expression of *kiss2* increase in parallel with the increase of the gonado-somatic index, leading the authors to suggest the implication of estrogen in the control of *kiss2* expression (Migaud et al., 2012). Moreover, it has been demonstrated in adult sea bass that kiss1 hypothalamic cells expressed *Esr1* and *Esr2b* genes and that kiss2 cells expressed only *Esr2b* (Escobar et al., 2013).

All these data strongly support the idea of a potential estrogenic control of kiss genes in sea bass. Nevertheless, it seems that during the early larval stages, the kiss genes are less sensitive to estrogenic coumpouds.

In conclusion, in the present study, we demonstrate that exposure to xenoestrogens during the larval period is able to disrupt the ontogeny of GnRH and kiss systems by altering either the gene expression or the cell localization. The consequences of such perturbations on the development and reproductive success remain to be determined. However, it confirms the need of further studies on the neuroendocrine effects of endocrine disruptors.

Aknowledgments

We thank Dr R. Coulaud (ULH) for his help in statistical analysis. This work was supported by the Research Federation CNRS 3730 SCALE and the Normandy Region. F. Nihoul was supported by a PhD fellowship from the Normandy Region.

Bibliography

Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. Environment International 99, 107–119. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010

Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M., 2014. Occurrence of 17α-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. Environment International 69, 104–119. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011

Barnabé, G., Billard, R., Centre d'aquaculture et d'halieutique, Institut national de la recherche agronomique (Eds.), 1984. L'Aquaculture du bar et des sparidés: INRA, Paris, France.

Brännvall, K., Korhonen, L., Lindholm, D., 2002. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Mol. Cell. Neurosci. 21, 512–520.

Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Anderson, P.D., Länge, R., Sumpter, J.P., 2012. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17β-estradiol, estriol, and 17α-ethinylestradiol. Environ. Toxicol. Chem. 31, 1396–1406. https://doi.org/10.1002/etc.1825

Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T.D., Kah, O., Coumailleau, P., 2016. Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. Front Neurosci 10, 112. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00112

Chedrese, P.J. (Ed.), 2009. Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. Springer US.

Coumailleau, P., Pellegrini, E., Adrio, F., Diotel, N., Cano-Nicolau, J., Nasri, A., Vaillant, C., Kah, O., 2015. Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1849, 152–162. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.07.002

Diotel, N., Charlier, T.D., Lefebvre d'Hellencourt, C., Couret, D., Trudeau, V.L., Nicolau, J.C., Meilhac, O., Kah, O., Pellegrini, E., 2018. Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. Front Neurosci 12, 84. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00084

Diotel, N., Page, Y.L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. Frontiers in Neuroendocrinology 31, 172–192. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003

Dworatzek, E., Mahmoodzadeh, S., 2017. Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. Pharmacol. Res. 119, 27–35. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.019

Escobar, S., Servili, A., Espigares, F., Gueguen, M.-M., Brocal, I., Felip, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S., Kah, O., 2013. Expression of Kisspeptins and Kiss Receptors Suggests a Large Range of Functions for Kisspeptin Systems in the Brain of the European Sea Bass. PLoS ONE 8, e70177. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070177

Faheem, M., Jahan, N., Khaliq, S., Lone, K.P., 2019. Modulation of brain kisspeptin expression after bisphenol-A exposure in a teleost fish, Catla catla. Fish Physiology and Biochemistry 45, 33–42. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0532-y

González, A., Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. General and Comparative Endocrinology 132, 223–230. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00086-8

González-Martínez, D., Zmora, N., Mañanos, E., Saligaut, D., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2002. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides: GnRHs in the Brain and Pituitary of Sea Bass. Journal of Comparative Neurology 446, 95–113. https://doi.org/10.1002/cne.10190

González-Martinez, D., Zmora, N., Saligaut, D., Zanuy, S., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2004. New insights in developmental origins of different GnRH

(gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (Dicentrarchus labrax). Journal of Chemical Neuroanatomy 28, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.001

Gonzalez-Martinez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Munoz-Cueto, J.A., Kah, O., 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the european sea bass (Dicentrarchus labrax). The Journal of Comparative Neurology 429, 144–155. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000101)429:1<144::AID-CNE11>3.0.CO;2-B

Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2002. Exposure to exogenous 17beta-oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 60, 285–299.

Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (Danio rerio). Environ. Toxicol. 21, 332–337. https://doi.org/10.1002/tox.20203

ICES. 2018. Report of the Working Group on Celtic Seas Ecoregion (WGCSE), 9–18 May 2018, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2018/ACOM:13. 1887 pp.

Inagaki, T., Smith, N., Lee, E.K., Ramakrishnan, S., 2016. Low dose exposure to Bisphenol A alters development of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons and larval locomotor behavior in Japanese Medaka. Neurotoxicology 52, 188–197. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.003

Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (Danio rerio) juveniles. Aquat. Toxicol. 69, 25–34. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.008

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 8897–8901. https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104

Kim, J.H., Cho, H.T., Kim, Y.J., 2014. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. Endocr. J. 61, 1055–1067.

Lafont, A.-G., Rousseau, K., Tomkiewicz, J., Dufour, S., 2016. Three nuclear and two membrane estrogen receptors in basal teleosts, Anguilla sp.: Identification, evolutionary

history and differential expression regulation. General and Comparative Endocrinology 235, 177–191. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.11.021

Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushitani, H., Kobayashi, T., Hirai, T., Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2012. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. Aquatic Toxicology 109, 250–258. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.004

Le Page, Y., Vosges, M., Servili, A., Brion, F., Kah, O., 2011. Neuroendocrine Effects of Endocrine Disruptors in Teleost Fish. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 14, 370–386. https://doi.org/10.1080/10937404.2011.578558

Liney, K.E., Jobling, S., Shears, J.A., Simpson, P., Tyler, C.R., 2005. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (Rutilus rutilus) exposed to effluents from wastewater treatment works. Environ. Health Perspect. 113, 1299–1307. https://doi.org/10.1289/ehp.7921

Mañanós, E.L., Núñez Rodríguez, J., Le Menn, F., Sanuy, S., Carrillo, M., 1997. Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish, the Mediterranean sea bass (Dicentrarchus labrax). Reprod. Nutr. Dev. 37, 51–61.

Manolagas, S.C., O'Brien, C.A., Almeida, M., 2013. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. Nature Reviews Endocrinology 9, 699–712. https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.179

McCarthy, M.M., 2008. Estradiol and the developing brain. Physiol. Rev. 88, 91–124. https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2007

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.-M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J. Comp. Neurol. 485, 304–320. https://doi.org/10.1002/cne.20497

Migaud, H., Ismail, R., Cowan, M., Davie, A., 2012. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (Dicentrarchus labrax). General and Comparative Endocrinology 179, 384–399. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.07.033

Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of The Total Environment 343, 1–34. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.070

Mouriec, K., Lareyre, J.J., Tong, S.K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., Anglade, I., 2009. Early regulation of brain aromatase (cyp19a1b)

by estrogen receptors during zebrafish development. Dev. Dyn. 238, 2641–2651. https://doi.org/10.1002/dvdy.22069

Muriach, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Cerdá-Reverter, J.M., 2008a. Distribution of estrogen receptor 2 mRNAs (Esr2a and Esr2b) in the brain and pituitary of the sea bass (Dicentrarchus labrax). Brain Res. 1210, 126–141. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.053

Muriach, B., Cerdá-Reverter, J.M., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2008b. Molecular characterization and central distribution of the estradiol receptor alpha (ERalpha) in the sea bass (Dicentrarchus labrax). J. Chem. Neuroanat. 35, 33–48. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.05.010

NAKAMURA M., TAKAHASHI H., 1973. Gonadal sex differentiation in Tilapia mossambica, with special regard to the time of ostrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 24, 1-13.

Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. Environmental Health Perspectives 112, 1725–1733. https://doi.org/10.1289/ehp.7209

Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. General and Comparative Endocrinology 192, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032

Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, Oryzias latipes. Mar. Environ. Res. 50, 181–184.

Patisaul, H.B., 2013. Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the kisspeptin system. Adv. Exp. Med. Biol. 784, 455–479. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6199-9_21

Pérez-Ruzafa, A., Concepción, M., 2015. Ecology and Distribution of Dicentrarchus labrax (Linnaeus 1758), in: Biology of European Sea Bass. pp. 3–33.

Pinto, P.I.S., Estêvão, M.D., Andrade, A., Santos, S., Power, D.M., 2016. Tissue responsiveness to estradiol and genistein in the sea bass liver and scale. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 158, 127–137. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.023

Qin, C., Xu, L., Yang, Y., He, S., Dai, Y., Zhao, H., Zhou, Z., 2014. Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed Lactobacillus rhamnosus CICC 6141 and

Lactobacillus casei BL23. Reproduction 147, 53–64. https://doi.org/10.1530/REP-13-0141

Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L., 2016. Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish. Endocrinology 157, 636–647. https://doi.org/10.1210/en.2015-1785

Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. Exposure of juvenile roach (Rutilus rutilus) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. Environ. Sci. Technol. 35, 462–470.

Santos, D., Matos, M., Coimbra, A.M., 2014. Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. Neurotoxicol Teratol 46, 18–25. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.08.002

Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R., Fenske, M., 2013. Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. Reprod. Toxicol. 42, 210–223. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.003

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. Ecotoxicol. Environ. Saf. 54, 302–314.

Shi, Y., Liu, X., Zhu, P., Li, J., Sham, K.W.Y., Cheng, S.H., Li, S., Zhang, Y., Cheng, C.H.K., Lin, H., 2013. G-protein-coupled estrogen receptor 1 is involved in brain development during zebrafish (Danio rerio) embryogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 435, 21–27. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.130

Vosges, M., Kah, O., Hinfray, N., Chadili, E., Le Page, Y., Combarnous, Y., Porcher, J.-M., Brion, F., 2012. 17α-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. Reproductive Toxicology 33, 198–204. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.005

Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B., Combarnous, Y., Porcher, J.-M., Kah, O., Brion, F., 2010. 17α-Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. Aquatic Toxicology 99, 479–491. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.009

Wang, S., Zhu, J., Xu, T., 2018. 17β-estradiol (E2) promotes growth and stability of new dendritic spines via estrogen receptor β pathway in intact mouse cortex. Brain Res. Bull. 137, 241–248. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.011

Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., Song, H., 2008. Exposure to 17alpha-ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (Danio rerio). Aquat. Toxicol. 88, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.020

Yamamoto, T.O., Matsuda, N., 1963. Effects of estradiol, stilbestrol and some alkyl-carbonyl androstanes upon sex differentiation in the medaka. Orvzias latipes. Gen. Comp. Endocrinol. 3, 101–110.

Yang, Y., Gao, J., Yuan, C., Zhang, Y., Guan, Y., Wang, Z., 2016. Molecular identification of Kiss/GPR54 and function analysis with mRNA expression profiles exposure to 17α-ethinylestradiol in rare minnow Gobiocypris rarus. Mol. Biol. Rep. 43, 737–749. https://doi.org/10.1007/s11033-016-4014-y

Zmora, N., González-Martínez, D., Muñoz-Cueto, J.A., Madigou, T., Mañanos-Sanchez, E., Doste, S.Z., Zohar, Y., Kah, O., Elizur, A., 2002. The GnRH system in the European sea bass (Dicentrarchus labrax). Journal of Endocrinology 12.

Table 1: Primer sequences used for the real time quantitative PCR. (F: Forward; R: Reverse)

gene	Accession number	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Primer sequence 5'-3'
gnrh1	AF224279	130	60	F: GGTCCTATGGACTGAGTCCAGG
				R: TGATTCCTCTGCACAACCTAA
gnrh2	AF224281	80	60	F: GTGTGAGGCAGGAGAATGCA
				R: CTGGCTAAGGCATCCAGAATG
gnrh3	AF224280	80	57	F: TGTGGGAGAGCTAGAGGCAAC
				R: GTTTGGGCACTCGCCTCTT
Kiss1	FJ008914	100	57	F: CTCAAAGCTGGTCCTCCCTC
				R: GGTCTTGTGTCACTTTCCGT
Kiss2	FJ008915	200	57	F: GGATTCCAGCCCGTGTTTCT
				R: TAGGCACCTCCAGTTCTCGT
ef-1	AJ866727	75	60	F: CTAAGAACGGACAGACCCGC
				R:TGACTCCAACGATGAGCTGC
L13	DQ836931	96	60	F: GGCTAAGGCCCGTCTCATTG
				R: GCACGAACCTTGGTGTGGTA
fau	EF190887	100	60	F: CAAACTGAGAGCGACCGGAG
				R: GCGTCCGATCTTCATCCCTG

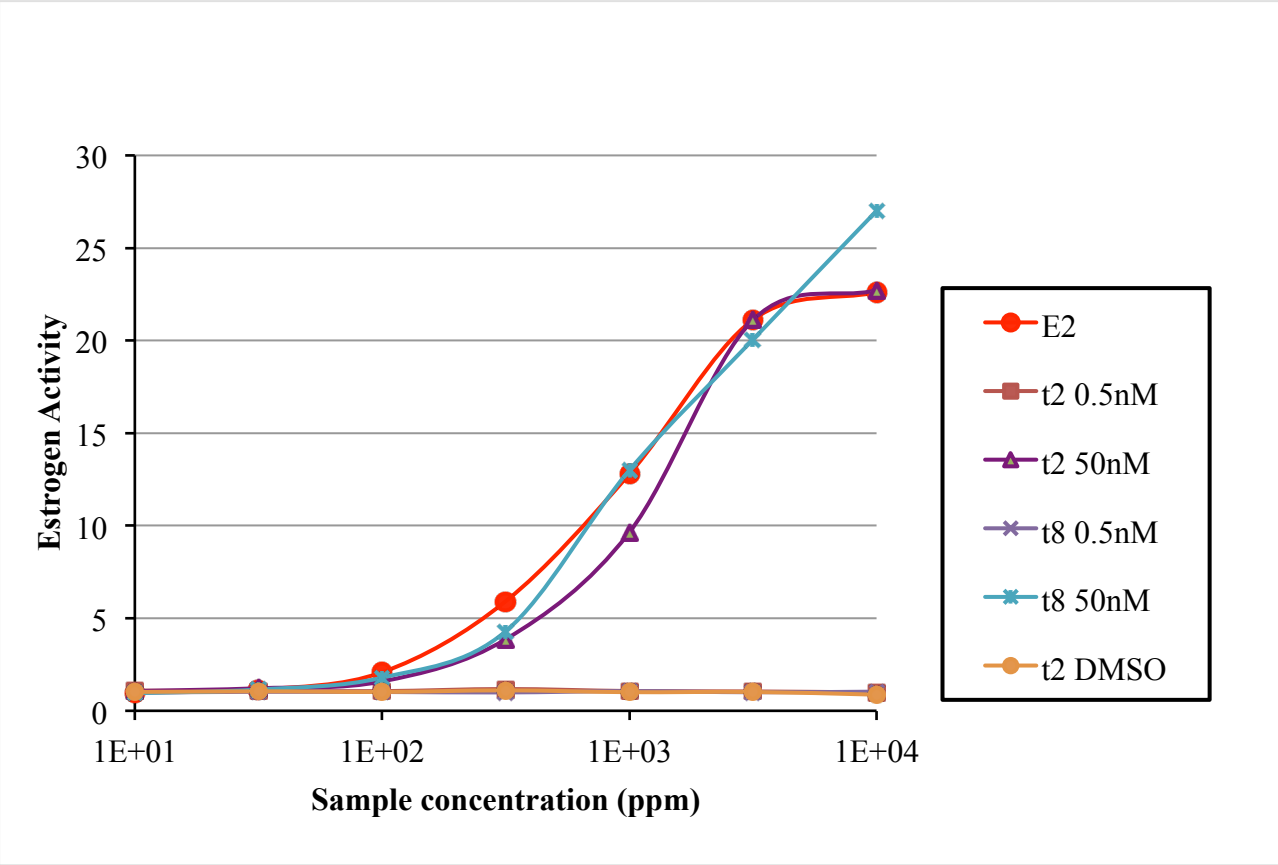


Figure 1: Estrogen activity measured by YES assay in water sample at 2 and 8 days after the beginning of experiment.

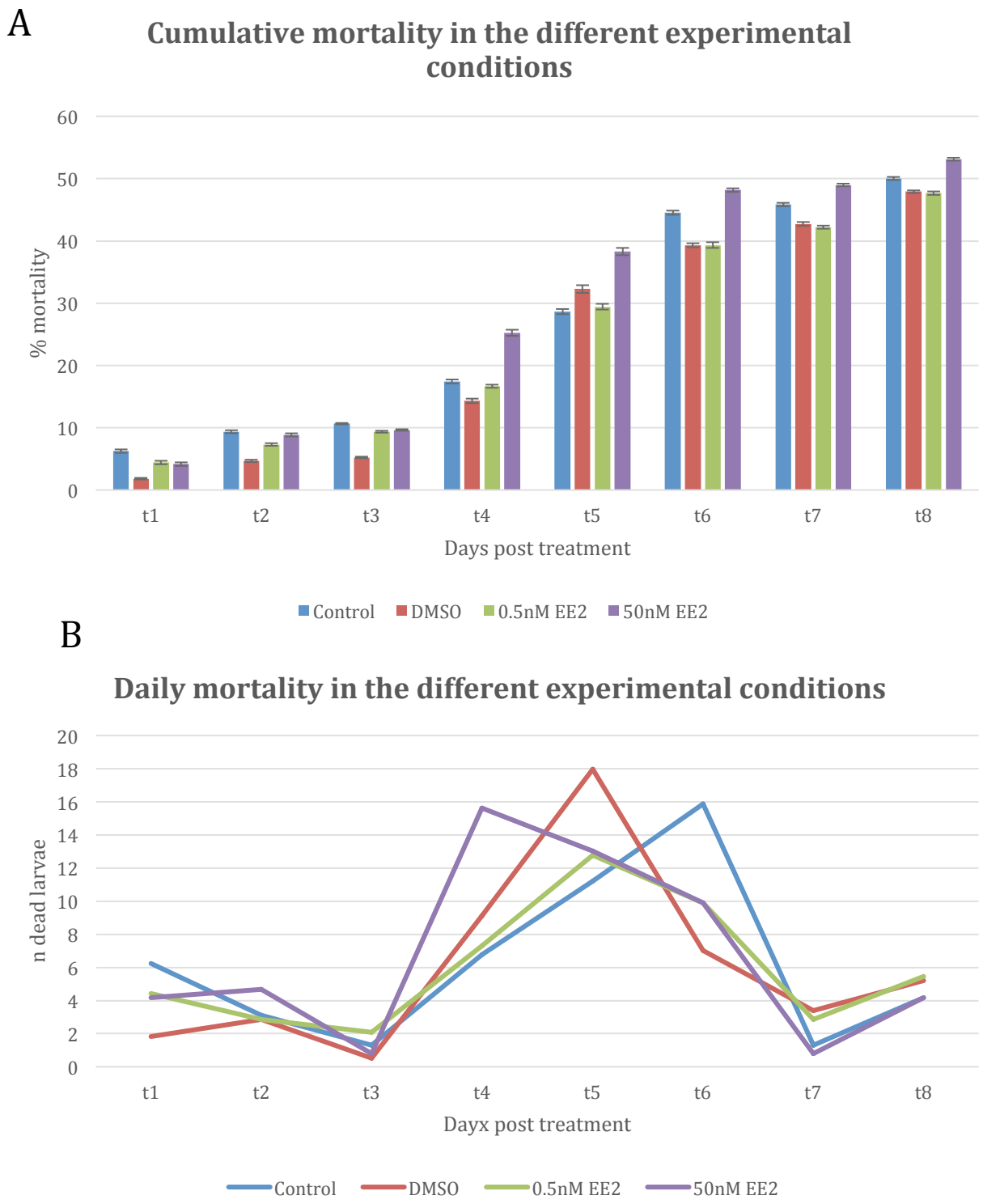


Figure 2 : Fish mortality during experimental time. A: Cumulative mortality in the different conditions. B: mortality records each day in different condition, each day during experimental time.

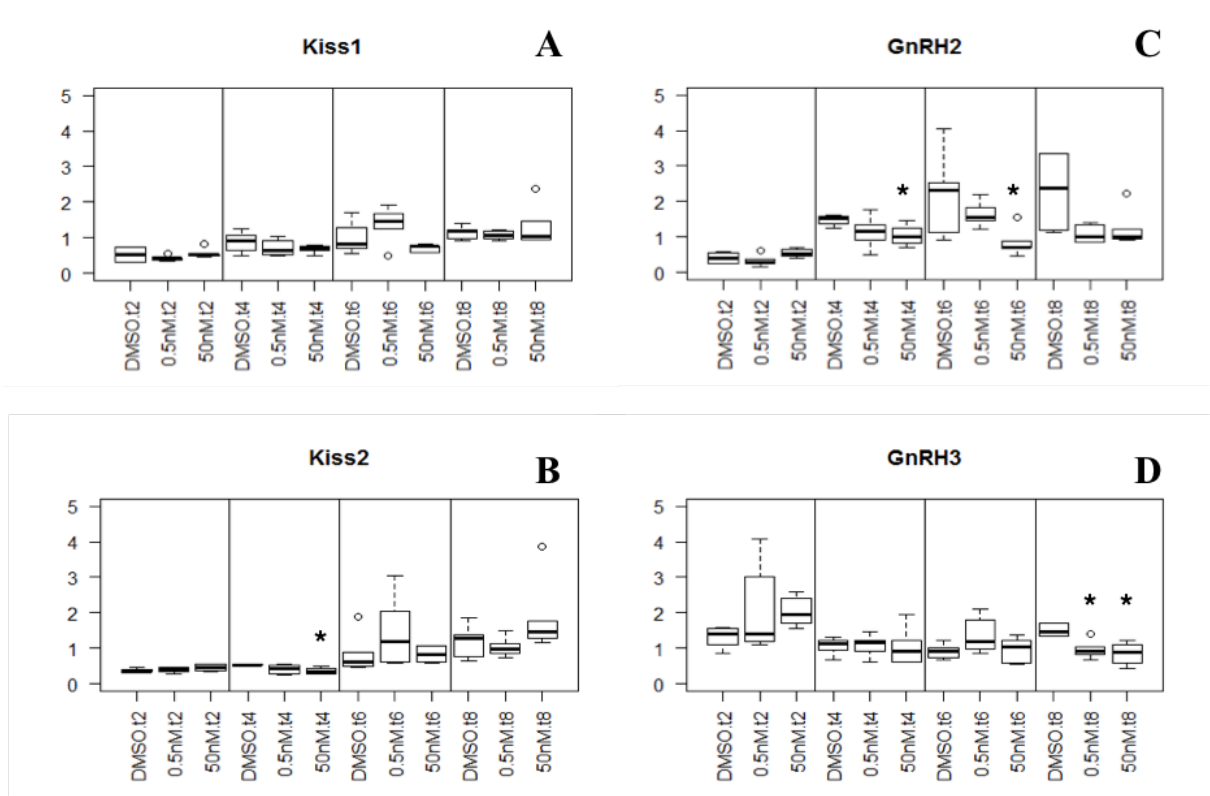


Figure 3: Gene expression profiles of *kiss1*, *kiss2*, *gnrh2*, and *gnrh3* after exposure to DMSO, 0.5nM, or 50nM of EE2. A and B : *kiss1* and *kiss2* mRNA levels measured in whole larvae. C and D : *gnrh2*, and *gnrh3* mRNA levels measured in whole larvae. Quantitative RT-PCR values were normalized against the ribosomal protein L13 expression. * $p<0.05$ compared to solvent control (DMSO).

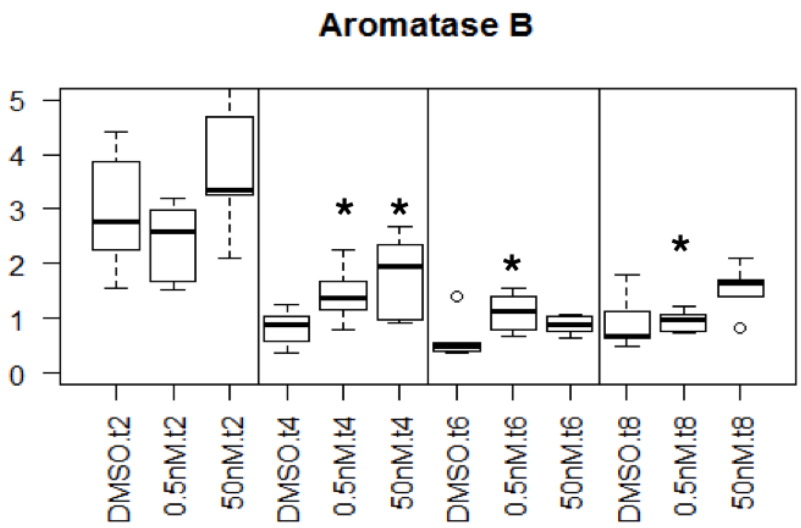


Figure 4 : Gene expression profiles of *cyp19a1b* (Aromatase B) after exposure to DMSO, 0.5nM, or 50nM of EE2. Quantitative RT-PCR values were normalized against the ribosomal protein L13 expression. * $p<0.05$ compared to solvent control (DMSO).

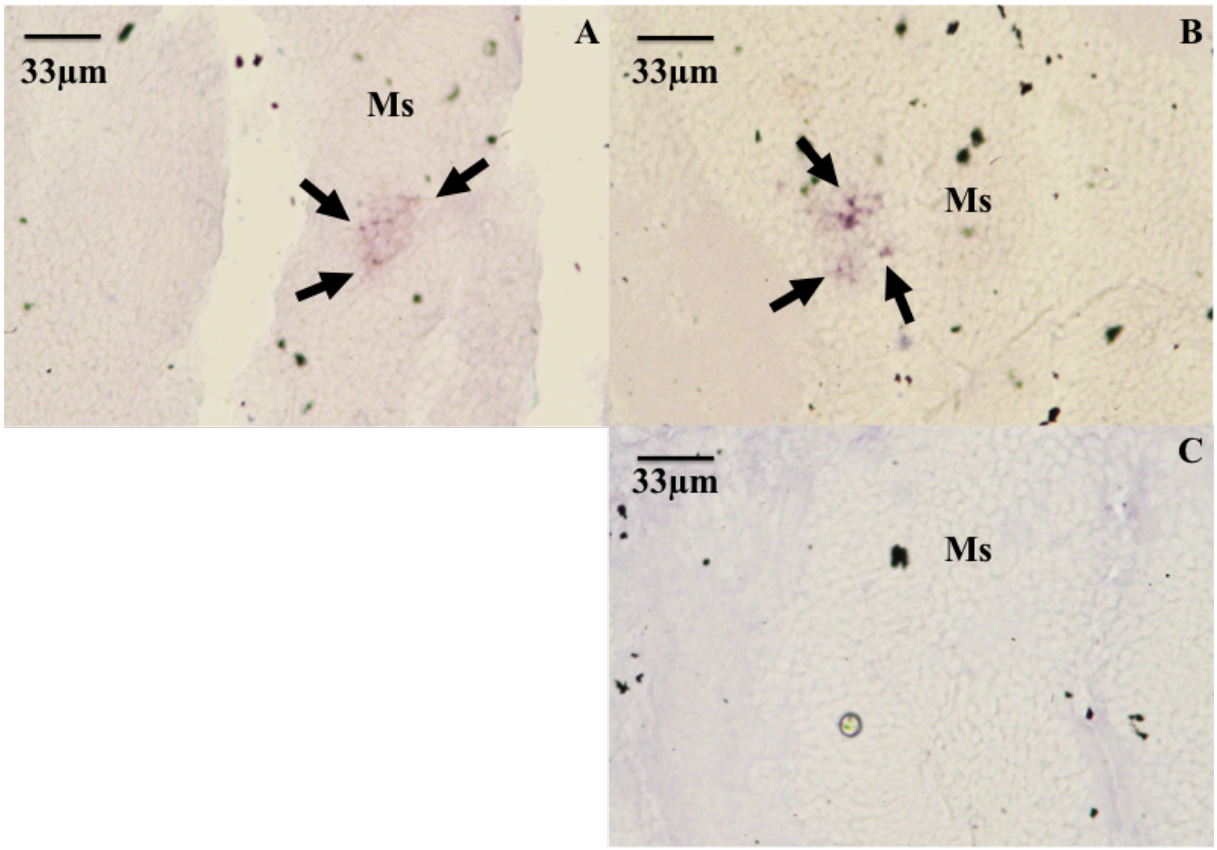


Figure 5 : *In situ* hybridization detection of GnRH2 expressing neurons in 6dph sea bass larvae (sagittal sections). A: GnRH2 expressing cells (black arrows) in the brain of 6dph fish exposed to DMSO. B: GnRH2 expressing cells (black arrows) in the brain of 6dph fish exposed to 0.5nM of EE2. C: Slices of the mesencephalic area in the brain of 6dph fish exposed to 0.5nM of EE2, where no dying cells were localized (negative control).

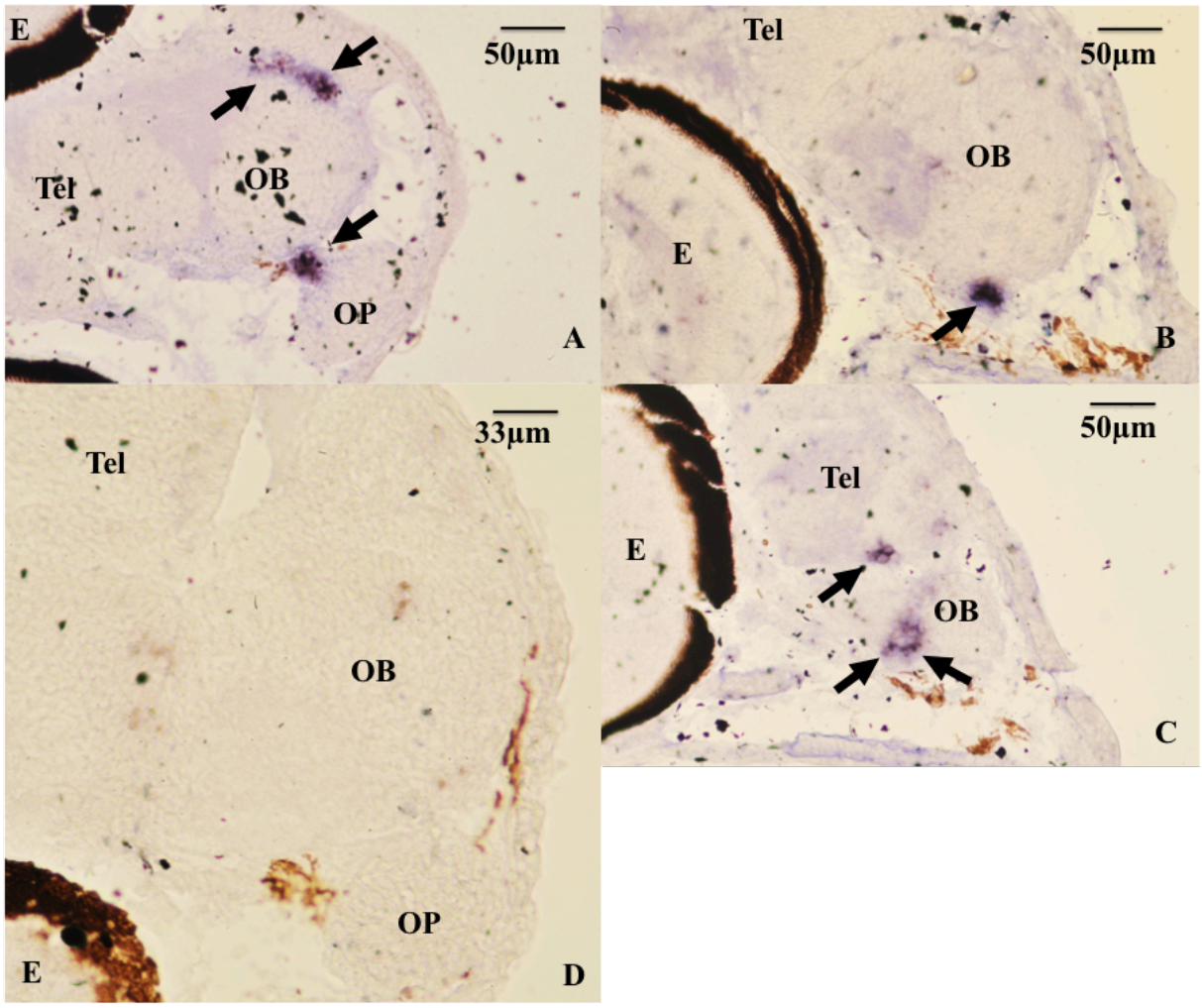


Figure 6 : *In situ* hybridization detection of GnRH3 expressing neurons in 6dph sea bass larvae. A: GnRH3 expressing cells (black arrows) in the brain of 6dph fish exposed to DMSO (coronal plane). B: GnRH3 expressing cells (black arrows) in the brain of 6dph fish exposed to 0.5nM of EE (sagittal plane). C: GnRH3 expressing cells (black arrows) in the brain of 6dph fish exposed to 50nM of EE (sagittal plane). D : sagittal section of 6dph larval brain exposed to 0.5nM of EE2 and treated with sense probe (negative controle).

Discussion générale

4. Discussion

Ce travail de thèse s'inscrit dans une problématique générale qui est l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction des poissons téléostéens.

L'augmentation des activités anthropiques a mené à la libération dans l'environnement de molécules qui peuvent avoir des conséquences sur la physiologie des organismes, notamment aquatiques (pour revue : Adeel et al., 2017). Parmi l'ensemble des molécules, certaines sont qualifiées de perturbateurs endocriniens, et ce en relation avec leur capacité d'interagir avec les fonctions endocriniennes des organismes. Parmi les fonctions impactées, la fonction de reproduction a été l'une des plus étudiées (Guillette et al., 2000 ; Jobling et al., 2002 ; Gerbron et al., 2014).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la mise en place de l'axe gonadotrope au cours du développement larvaire. Chez les vertébrés, les acteurs cérébraux de l'axe gonadotrope (Kisspeptines et GnRH) se mettent en place précocement. Cela a été rapporté dans quelques études dont le nombre reste jusqu'à présent limité (Pour revue : Abraham et al., 2009 ; Sandvik et al., 2014). Par ailleurs, l'exposition aux xénoestrogènes au cours du développement peut avoir des effets sur l'ontogenèse de ces différents acteurs, comme cela a été montré chez le médaka (*Oryzias latipes*) et chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), où l'exposition à l'EE2 perturbe la mise en place des gonades (Pour revue : Aris et al., 2014). D'autre part, chez le mené à tête de boule (*Pimephales promelas*), il a été observé que l'exposition à l'EE2 des œufs embryonés conduit à de multiples malformations chez les larves, suggérant ainsi l'impact des œstrogénomimétiques sur le développement des larves (Lange et al., 2001). Plus récemment, Vosges et ses collaborateurs (2010) ont rapporté que l'EE2 modifiait la localisation des neurones à GnRH3 durant l'ontogenèse du poisson-zèbre. C'est dans cette optique que s'intègrent nos travaux, en étudiant d'une part l'ontogenèse des acteurs cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope, et d'autre part en évaluant l'impact de l'EE2 sur la mise en place et l'expression de ces acteurs.

Ce travail de thèse s'est organisé autour de deux thématiques complémentaires. La première partie est une approche fondamentale, dont le but a été de décrire la mise en place de différents 'acteurs' cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope durant le développement larvaire du bar européen. Nous nous sommes donc focalisés, au niveau cérébral, sur l'ontogenèse des systèmes à GnRHs et à kisspeptines (Article 1) qui sont décrits comme les

principaux acteurs contrôlant la fonction de reproduction chez les vertébrés (Kah et al., 2007 ; De Roux et al., 2003 ; Seminara et al., 2003). Au niveau hypophysaire, notre travail s'est intéressé à l'ontogenèse des cellules gonadotropes (Article 2).

Ce premier travail constitue un préalable à une seconde partie s'intéressant à l'évaluation de potentielles perturbations de l'ontogenèse des systèmes précédemment cités par un xénoestrogène modèle, le 17α-éthynilestradiol (Article 3).

Pour cela, nous avons développé des techniques d'hybridation *in situ* (ISH) permettant la description de la localisation spatiale des cellules d'intérêt. En outre, la technique de PCR quantitative a été utilisée afin de suivre la dynamique d'expression des gènes *kiss1, kiss2, gnrh1, gnrh2 et gnrh3* au cours du développement larvaire du bar européen, sous l'influence ou non de stress.

Dans cette dernière partie, les différents résultats seront replacés dans un contexte plus global de régulation et de perturbation de l'axe gonadotrope par des molécules œstrogénomimétiques chez les téléostéens en comparant nos résultats obtenus sur le bar européen avec ceux obtenus chez d'autres espèces.

4.1. Ontogenèse des acteurs cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope

4.1.1. Ontogenèse des systèmes à GnRH

Chez les vertébrés, la GnRH est un décapeptide découvert dans les années 1970 comme le facteur principal contrôlant la reproduction (Amoss et al., 1971 ; Matsuo et al., 1971 ; Schally et al., 1971). Les neurones à GnRH ont été localisés au niveau de l'aire pré-optique et de l'éminence médiane dans l'hypothalamus (Barry et Dubois, 1974). Au cours du développement embryonnaire, les neurones à GnRH vont migrer depuis les placodes olfactives jusqu'à l'aire pré-optique, comme cela a été montré chez des médaka transgéniques, où la majorité des neurones à GnRH localisés dans l'hypothalamus migrent depuis les placodes olfactives vers l'aire pré-optique dans l'hypothalamus (Okubo et al., 2006 ; Takahashi et al., 2016). L'absence de migration de ces neurones est à l'origine du syndrome de Kallman, regroupant différents symptômes tels que l'absence de développement des caractères sexuels secondaires, l'infertilité, mais également une anosmie (absence

d'odorat). A ce jour, il a été décrit chez différentes espèces de vertébrés 18 variants de GnRH, dont 9 sont spécifiques aux téléostéens (Chang et Pemberton, 2018).

Chaque espèce de téléostéens possède deux ou trois gènes paralogues codant pour GnRH : *gnrh1*, *gnrh2* et/ou *gnrh3* (Kah et al., 2007). Par exemple, chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), deux gènes ont été décrits, codant chacun pour une GnRH (GnRH2 et GnRH3). Chez cette espèce, la GnRH3 a été décrite comme ayant une action hypophysiotrope (Kah et al., 2007). Chez d'autres espèces, comme le bar européen, il a été rapporté la présence de trois GnRH. Chez les espèces possédant les trois GnRH, c'est la GnRH1 qui a un rôle hypophysiotrope et qui régule l'activité des cellules gonadotropes au niveau de l'hypophyse (Zmora et al., 2002 ; Kah et al., 2007).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pris le parti de combiner la mesure des niveaux d'expression des trois différents gènes *gnrh* (*gnrh1*, *gnrh2*, *gnrh3*) avec la description neuroanatomique de la localisation de leurs messagers au cours du développement larvaire du bar européen, de manière à obtenir une vue à la fois quantitative et qualitative de la mise en place de ces systèmes (Fig. 12).

Nous avons montré que, dès 4 jours post éclosion, les gènes que nous avons ciblés (*gnrh1*, *gnrh2*, *gnrh3*) sont exprimés (Fig. 12A). Cette expression précoce, avec une prédominance des ARNm codant pour GnRH2 et GnRH3, a déjà été observée chez d'autres téléostéens (*Sparus aurata* : Wong et al., 2004 ; *Rachycentron canadum* : Mohamed et al., 2007). Chez ces espèces, qui possèdent également trois GnRH et où la GnRH1 est plus faiblement exprimée que les deux autres formes au cours du développement, les auteurs suggèrent un rôle plus important des GnRH2 et GnRH3 au cours du développement larvaire. Cependant, cette dominance d'expression n'est pas retrouvée chez tous les téléostéens. Par exemple, chez le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*), *gnrh3* est le gène le plus exprimé, mais *gnrh1* et *gnrh2* présentent, quant à eux, des niveaux équivalents d'expression (Selvaraj et al., 2015).

Les données collectées montrent deux profils d'expression différents au cours des premiers mois de développement, avec une tendance à l'augmentation d'expression pour la *gnrh1* alors que l'expression des deux autres gènes *gnrh2* et *gnrh3* diminue (Fig. 12A). De précédentes études ont rapporté que l'expression des GnRH au cours du développement larvaire diffère entre les téléostéens. En effet, ces tendances ont été observées au cours du développement du maquereau espagnol et du poisson-zèbre (Selvaraj et al., 2015 ; Kitahashi et al., 2009). À l'inverse, chez la dorade (*Sparus aurata*), l'expression des trois GnRH

augmente au cours du développement larvaire (Wong et al., 2004). Chez le cobia (*Rachycentron canadum*), il existe un pic d'expression des trois formes de GnRH à 6 jours post éclosion (Mohamed et al., 2007).

Nous avons également, par hybridation *in situ,* localisé les neurones exprimant la GnRH2 et la GnRH3 (Fig. 12B). En revanche, les cellules exprimant la GnRH1 n'ont pas pu être détectées pendant la période étudiée (les 60 premiers jours de vie larvaire). Une précédente étude réalisée par Gonzales-Martinez et al (2002b) s'était également intéressée à la description neuroanatomique des 3 systèmes à GnRH chez le bar européen. Dans cette étude, les auteurs avaient déjà suivi leur développement chez le bar, et notre travail montre des similitudes mais aussi des divergences avec leurs observations.

Notre travail rapporte que dès 4 jours les neurones à GnRH2 sont localisés au niveau du mésencéphale. Nous montrons aussi que les neurones à GnRH3 sont localisés précocement au niveau des placodes olfactives et qu'au cours du développement, plusieurs populations isolées de neurone à GnRH3 sont présentes le long du trajet du *nervus terminalis,* depuis le bulbe olfactif jusqu'à l'aire pré-optique.

Néanmoins, nous avons pu relever quelques divergences par rapport à ce qui avait été décrit par Gonzales-Martinez et ses collaborateurs (2002b). En effet et contrairement à eux, nous observons à 4 et 10 jours post éclosion une seconde population de neurones à GnRH2 au niveau du rhombencéphale (Fig. 12B). Néanmoins, nos résultats concordent pourtant avec l'étude de Wong et collaborateur (2004) car ils ont décrit ce profil chez la dorade ainsi que chez le bar européen. Ces résultats suggèrent que cette seconde population n'est présente que transitoirement. L'évolution de cette population reste cependant inconnue. Ainsi, dans de futures recherches, il serait pertinent de suivre cette population afin de savoir si elle disparaît ou si elle migre vers la population exprimée dans le mésencéphale.

Dans notre étude, nous localisons les neurones à GnRH3 dès 4 jours post éclosion au niveau des placodes olfactives (Fig. 12B), à la même période que la GnRH2, soit trois jours avant la localisation faite par Gonzales-Martinez (2002b). Chez les téléostéens où la localisation de ces neurones a été réalisée, les différentes études s'accordent sur l'apparition des neurones à GnRH3 après les neurones à GnRH2, comme ce qui a été décrit chez le bar par Gonzales-Martinez (2002b) (*Sparus aurata* : Wong et al., 2004 ; *Oryzias latipes* : Okubo et al., 2006 ; Takahashi et al., 2016 ; *Danio rerio* : Wu et al., 2006 ; *Morone saxatilis* hybride : Yashuvi et al., 2006). L'apparition plus précoce des neurones à GnRH3 comparée à ce qui a été décrit chez d'autre téléostéens est peut-être due aux conditions d'élevage. La température,

en particulier, exerce un impact fort sur le développement des téléostéens (Houde et al., 1989). Néanmoins, nous avons détecté ces neurones à tous les points de prélèvement et nous avons pu suivre leur évolution. Nous avons montré que ces neurones sont ensuite retrouvés à 10 et 20 jours post éclosion au niveau des bulbes olfactifs. Puis, à 30 jours post éclosion, les neurones à GnRH3 pénètrent dans le télencéphale. A 50 jours post éclosion, plusieurs petites populations sont détectées au niveau des bulbes olfactifs, de la partie ventrale du télencéphale et dans l'aire pré-optique. Cette description est similaire à celle faite par Gonzales-Martinez (2002b) ainsi que celles faites chez d'autres téléostéens (*Oncorhyncus masou* : Amano et al., 2002 ; *Sparus aurata* : Wong et al., 2004 ; *Danio rerio* : Abraham et al., 2008).

En ce qui concerne les neurones à GnRH1, nous n'avons pas pu les localiser, en dépit de nos multiples tentatives avec différentes sondes et différentes techniques de révélation des anticorps. Dans son étude, Gonzales-Martinez décrit l'apparition des neurones à GnRH1 dans les bulbes olfactifs, bien après les autres GnRH, à partir de 30 jours post éclosion. Cette localisation plus tardive a également été rapportée chez d'autres téléostéens (*Haplochromis burtoni* : White and Fernald, 1998 ; *Sparus aurata* : Wong et al., 2004 ; *Oryzias latipes*: Okubo et al., 2006; *Morone saxatilis* hybride: Yashuvi et al., 2006).

Les différences observées entre notre étude et Gonzales-Martinez et al. (2002b) et celles observées chez les autres téléostéens peuvent être dues à plusieurs facteurs comme les conditions d'élevage. Dans de nombreuses études, les animaux sont directement achetés auprès d'écloseries, où les paramètres d'élevages (salinité, température, alimentation, enrichissement, densité de population) ne sont pas connus et peuvent varier d'un élevage à l'autre. Or, ces paramètres peuvent influer sur le développement cérébral des vertébrés. Il a été rapporté chez les oiseaux et les mammifères que les facteurs abiotiques tels que la photopériode ou la température sont capables de modifier l'expression des GnRHs. Par exemple, chez le poulet, l'augmentation de la photopériode induit une augmentation du nombre de neurones à GnRH1 (Kuenzel and Golden 2006) et chez le hamster, la température est capable de moduler l'expression de la GnRH (Kawamoto et al., 2000). Cela a également été observé chez le pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), où une augmentation de la photopériode provoque une augmentation de l'expression de la GnRH (Miranda et al., 2009). Les différences observées peuvent également être dues à la méthode de détection des sondes. Dans notre cas, nous avons utilisé des anticorps Anti-DIG, couplés à une phosphatase alors que Gonzales-Martinez a utilisé des sondes radioactives, dont la détection est plus sensible.
La moindre sensibilité du système Anti-DIG pourrait également expliquée le fait que nous n'ayons pas observé la présence de GnRH1 en ISH, alors que nous avons tout de même pu

détecter l'expression de *gnrh1*, sur des larves de même stade, son expression en RT-qPCR. Enfin, l'origine des géniteurs pourrait également concourir à une explication.

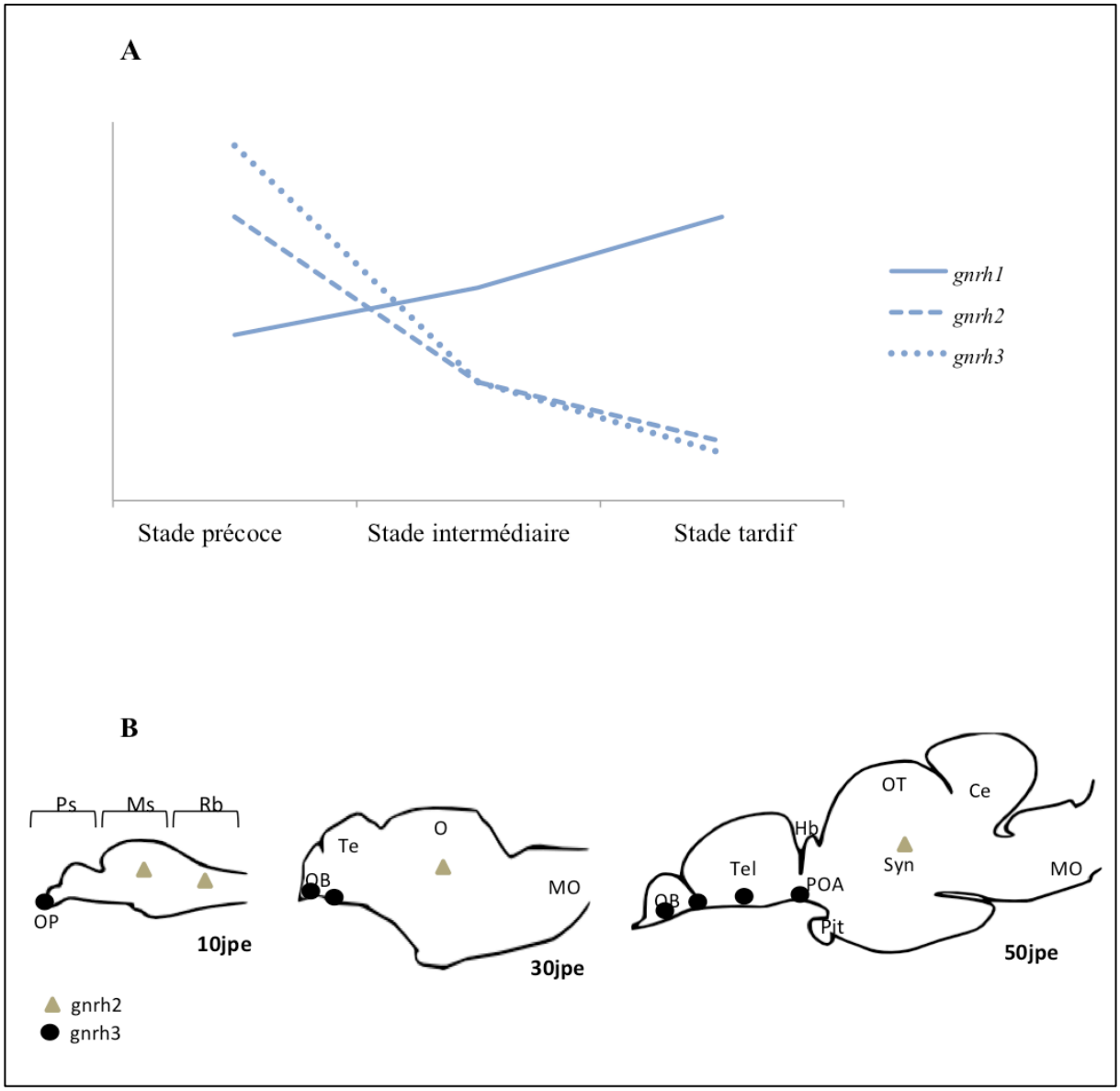


Figure 12 : Représentation schématique du profil d'expression des trois *gnrh* (A) et distribution des cellules à GnRH (B) au cours du développement larvaire du bar européen. A : Tendance d'expression des gènes *gnrh1*, *gnrh2* et *gnrh3* représentée durant les phases précoce, intermédiaire et tardive de développement larvaire du bar européen. B : Distribution des neurones à GnRH2 et à GnRH3 au niveau cérébral chez la larve de bar européen. Abréviations : Ce, Cervelet ; Hb, Habenula; MO, Moelle allongée ; Ms, Mésencéphale ; OB, Bulbe olfactif ; OP, Placode olfactive ; OT, Tectum optique ; Pit, Hypophyse ; POA, Aire pré-optique ; Ps, Prosencéphale ; Rb, Rhombencéphale ; Syn, Synencéphale; Tel, Télencéphale (Schéma cérébral modifié de Gonzalez-Martinez et al, 2002b).

Une récente étude a montré qu'il existe des différences génétiques entre les populations de bar européen d'Atlantique et de Méditerranée. Ces différentes architectures génétiques seraient impliquées dans le déterminisme sexuel (Faggion et al., 2018). La GnRH1 est très fortement impliquée dans la reproduction chez l'adulte et il est possible que, chez la larve, elle ait un rôle dans la différenciation sexuelle via son action sur la libération des gonadotropines au niveau de l'hypophyse. On peut supposer que ce gène est intrinsèquement exprimé différemment entre les populations méditerranéennes et les populations de bar présentes en Atlantique.

4.1.2. Ontogenèse des systèmes à kisspeptine

La kisspeptine (KISS1) a été découverte chez les mammifères à la fin des années 1990 et a été initialement décrite comme anti-métastatique (Lee et al., 1996). Son implication dans le contrôle de la fonction de reproduction a été découverte quelques années plus tard suite aux études menées chez l'Homme et chez la souris présentant un hypogonadisme hypogonadotrope isolé. Ce syndrome est dû à une absence de migration des neurones à GnRH1 depuis les placodes olfactives au cours de l'embryogenèse. Or, dans les années 2000, il a été montré que cette absence de migration était due à l'absence du récepteur GPR54 ou Kiss1R (De Roux et al., 2003 ; Seminara et al., 2003). Dès lors, de nombreuses études menées chez les vertébrés ont rapporté l'implication de kisspeptine dans l'initiation de la puberté et ont apporté de nouvelles connaissances sur sa régulation (Pour revue : Oakley et al., 2009 ; Pinilla et al., 2012 ; Tena-Sempere et al., 2012 ; Mechaly et al., 2013).

Chez les téléostéens, à l'instar des GnRH, plusieurs gènes codant pour différentes kisspeptines ont été décrits. La première description a été faite chez le poisson-zèbre et chez le médaka, où deux gènes codant pour deux kisspeptines (*kiss1* et *kiss2*) ont été décrits (Kanda et al., 2008 ; Kitahashi et al., 2009). Tout comme pour les GnRH, le nombre de kisspeptines varie chez les téléostéens et quelques espèces, comme le fugu (*Takifugu rubripes*), le tétrodon (*Tetraodon nigroviridis*) ou l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), ne possèdent que la Kiss2 (Pour revue : Mechaly et al., 2013).

Chez les mammifères, le système 'kisspeptine' fait intervenir deux acteurs : KISS1 et KISS1R. En revanche, chez les autres vertébrés, le système est plus complexe et peut faire intervenir plus de deux acteurs : jusqu'à 3 gènes à kisspeptine (*kiss 1, kiss2* et *kiss3*) chez le xénope ou le cœlacanthe et jusqu'a 4 gènes kissr (*kissr-1*, *kissr-2*, *kissr-3* et *kissr-4*) chez le cœlacanthe et le lépisosté (Pasquier et al., 2012a). Par ailleurs, le récepteur KISS1R a été,

chez l'Homme et le rat, détecté dans de nombreux tissus (cerveau, hypophyse, pancréas, foie, moelle épinière) ce qui suggère des rôles additionnels aux kisspeptines (Kotani et al., 2001). Parmi ces potentiels rôles, il a été observé chez le médaka et le poisson-zèbre que les kisspeptines intervenaient dans le régionalisation de l'encéphale et la formation de l'œil (Wu et al., 2006 ; Hodne et al., 2013)

Dans notre étude, nous avons mesuré l'expression génique de *kiss1* et *kiss2* au cours du développement larvaire (Fig. 13A). Les résultats obtenus décrivent des profils d'expression différents pour les deux gènes à savoir une diminution de l'expression de *kiss1* et une augmentation de l'expression de *kiss2* au cours de la période étudiée. Plus précisément, après une période où les niveaux restent stables, l'expression de *kiss1* diminue à partir de 20 jours post éclosion, et l'expression de *kiss2* augmente a partir de 40 jours post éclosion (Fig. 13A).

L'expression des kisspeptines a également été décrite chez certains téléostéens dès la première semaine de vie ainsi que l'évolution de leurs expression durant la période larvaire. Chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) il existe de deux pics d'expression de *kiss2* au cours de la 2ème et de la 13ème semaine post éclosion. En revanche, cette étude n'a pas mesuré l'expression de *kiss1* (*Oreochromis niloticus* : Park et al., 2012). Les auteurs de cette étude suggèrent que Kiss2 est alors impliqué dans les processus de différentiation sexuelle (à 2 semaines post éclosion) et de puberté (à 13 semaines post éclosion). Chez *Sebastes melanops*, où seul Kiss1 a été caractérisé, il a été rapporté que l'expression de *kiss1* augmente à partir de 20 jours post éclosion, ce qui correspond chez cette espèce au développement des gonades (Song et al., 2015). Chez le maquereau (*Scomber japonicus*), où les deux formes de kisspeptines ont été décrites et caractérisées, il a été trouvé qu'au cours du développement larvaire, les expressions de *kiss1* et *kiss2* diminuent (Selvaraj et al., 2015). En revanche, chez *Odontesthes bonariensis*, les expressions de *kiss1* et *kiss2* ne varient pas cours des 60 premiers jours de vie (Tovar Bohorquez et al., 2017). Ces différentes études attestent que l'expression des kisspeptines au cours de la période larvaire est différente entre les espèces, mais les auteurs suggèrent l'implication des kisspeptines dans le développement des gonades. Chez le bar européen, la différenciation des gonades débute autours de 150 jours post éclosion, ce qui est bien après la période que nous avons étudiée. Néanmoins, nous avons observé des variations de l'expression des kisspeptines ce qui suggère un rôle, pour le moment inconnu, au cours du développement larvaire.

Par ailleurs, nous avons étudié la dynamique d'apparition des neurones à Kiss1 et Kiss2 au cours du développement larvaire du bar européen (Fig., 13A). A notre connaissance, ce travail n'a été réalisé que chez le rat (Desroziers et al., 2012) et la souris (Kumar et al., 2015). Notre étude constitue donc la première description neuroanatomique de la mise en place des neurones à Kiss chez un téléostéen.

Les cellules exprimant la *kiss1* sont détectées à partir de 50 jours post éclosion dans la région dorsale du diencéphale constituant l'habenula (Fig. 13B). Il semble donc que les neurones à Kiss1 aient pour origine cette aire cérébrale. De précédentes études réalisées chez le poisson-zèbre adulte (Servili et al, 2011) et le bar adulte (Escobar et al, 2013a) décrivent également la présence de neurones exprimant *kiss1* dans l'habenula. Par ailleurs, chez le poisson, des anticorps anti-preprokiss1 ont été développés et ont permis d'observer les projections émises par ces neurones (Servili et al, 2011). Les résultats obtenus montrent que ces neurones projettent vers deux noyaux mésencéphaliques : les noyaux interpédonculaire (IPN) et du raphé. Chez les vertébrés, l'IPN est connu comme étant un centre d'intégration et de relais avec le système limbique, qui est chez les mammifères, impliqué dans diverses fonctions telles que le comportement maternel, l'aversion, le rythme circadien, le sommeil ou encore le contrôle des activités motrices (Morley et Murrin, 1989 ; Hikosaka et al., 2008). Le rôle chez les téléostéens est pour le moment incertain, en revanche, cette région contient des neurones produisant de la sérotonine qui, comme nous le verrons dans les sections suivantes, joue un rôle sur la sécrétion des GnRH (*Hydrolagus colliei*, *Heterodontus francisci*, and *Squalus acanthias* : Stuesse et al., 1995).

Dans de futures recherches, il serait intéressant d'étudier les projections des neurones à Kiss1 chez la larve de bar, afin de savoir si ces projections rejoignent également l'IPN et s'ils projettent, à ce stade, vers d'autres aires cérébrales.

De plus, nous avons observé des neurones au niveau de l'habénula, comme ce qui a été décrit chez l'adulte. Or, il serait intéressant de savoir si les neurones à Kiss1 apparaissent et demeurent au niveau de l'habénula, ou bien, s'ils apparaissent au niveau d'une autre zone neurogène puis migrent ensuite vers l'habénula.

Concernant les neurones exprimant *kiss2,* nous les avons détectés plus précocement, dès 4 jours post éclosion, au niveau de la partie caudale du prosencéphale. Au cours du développement cérébral, ces neurones qui deviennent plus nombreux sont toujours détectés dans le prosencéphale mais dans une aire qui s'étend vers la région médiane. Puis, à 50 jours post éclosion, ils sont détectés au niveau du diencéphale, dans la région hypothalamique.

Cette localisation hypothalamique des neurones à Kiss2 a également été observée chez le poisson-zèbre adulte (Servili et al, 2011) et chez le bar européen adulte (Escobar et al, 2013a ; 2013b). Dans ces deux cas, les projections des neurones ont pu être étudiées par immunohistochimie (IHC) révélant des fibres kiss2-positives dans différentes régions cérébrales comprenant le télencéphale ventral, le diencéphale ventral et le mésencéphale (Servili et al, 2011 ; Escobar et al, 2013b).

Nos travaux montrent que les neurones exprimant *kiss2* ont pour origine la partie caudale du prosencéphale et décrivent une organisation qui change quelque peu au cours du développement larvaire du bar européen. Ces changements observés peuvent être le résultat d'une migration active des neurones à Kiss2 ou peuvent être la conséquence des modifications anatomiques de l'encéphale au cours des premiers stades de vie. Il serait intéressant dans de futures études de tester ces différentes hypothèses.

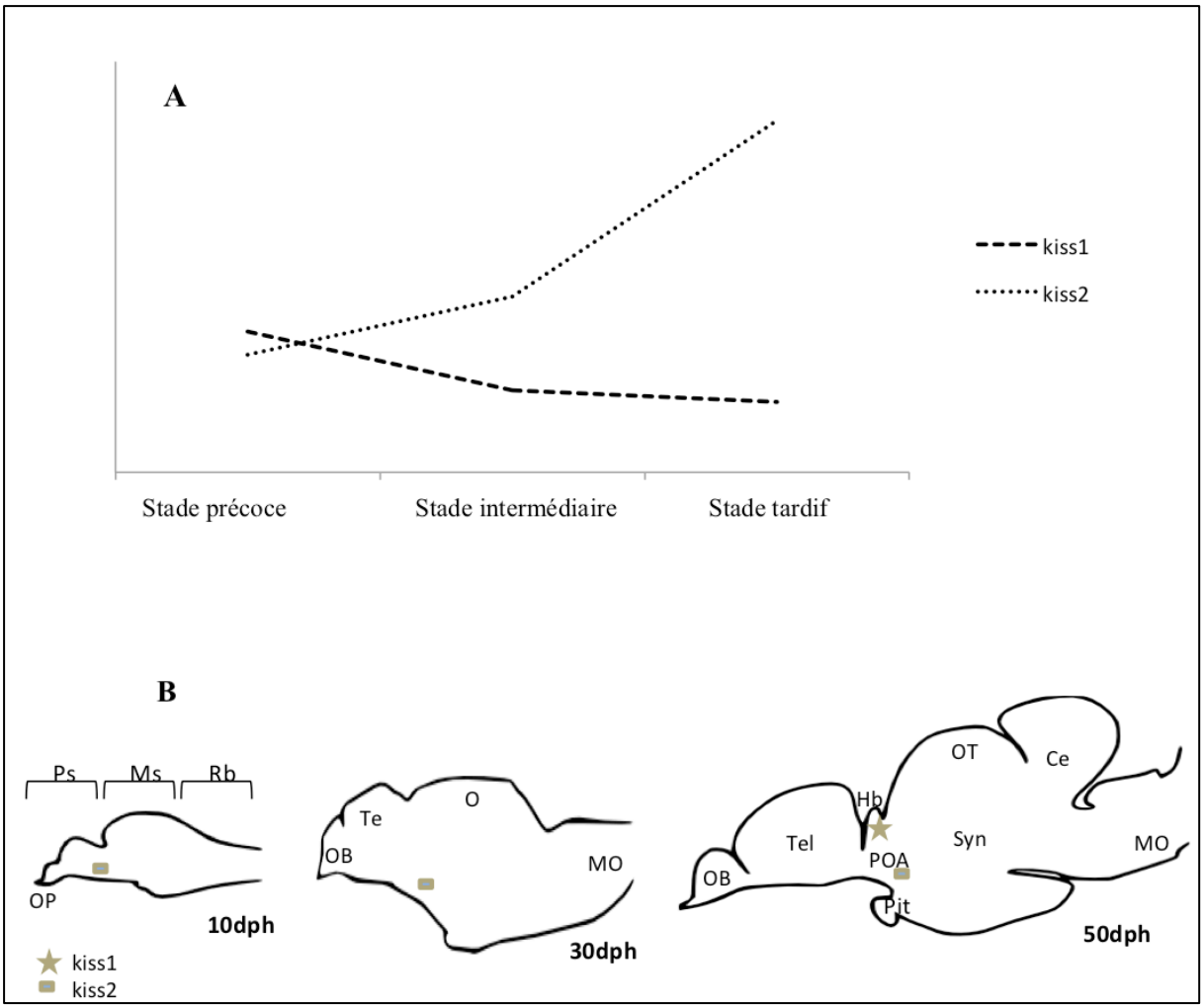


Figure 13 : Représentation schématique du profil d'expression des deux gènes *kiss* (A) et distribution des cellules à kisspeptine (B) au cours du développement larvaire du bar européen. A : Tendance d'expression des gènes *kiss1* et *kiss2* représentée durant les phases précoce, intermédiaire et tardive de développement larvaire du bar européen. B : Distribution des neurones à Kiss1 et à Kiss2 au niveau cérébral chez la larve de bar européen. Abréviations : Ce, Cervelet ; Hb, Habenula; MO, Moelle allongée ; Ms, Mésencéphale ; OB, Bulbe olfactif ; OP, Placode olfactive ; OT, Tectum optique ; Pit, Hypophyse ; POA, Aire pré-optique ; Ps, Prosencéphale ; Rb, Rhombencéphale ; Syn, Synencéphale; Tel, Télencéphale. (Schéma cérébrale modifié de Gonzalez-Martinez et al, 2002b).

4.1.3. Ontogenèse des systèmes à gonadotropines

Les gonadotropines (LH et FSH) sont produites au niveau de l'hypophyse, une glande endocrine située sous l'hypothalamus. L'hypophyse est séparée en deux parties : la neurohypophyse, qui est un tissu nerveux ; et l'adénohypophyse, qui est un tissu glandulaire responsable de la sécrétion de nombreuses hormones dont les gonadotropines. Chez les téléostéens, l'adénohypophyse est divisée est trois parties : la *pars distalis* antérieur, la *pars intermedia* et la *pars distalis* postérieure (Olivereau et Ball., 1964).

Les gonadotropines sont des hormones glycoprotéiques hétérodimériques. La sous-unité α (GTHα : Gonadotropic Hormone) est commune aux deux hormones gonadotropes. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la sous unité β, qui est différente entre les deux gonadotropines (LHβ et FSHβ) et c'est elle qui donne sa spécificité à l'hormone (Papkoff et al., 1967). Chez les téléostéens, contrairement à ce qui a été décrit chez les mammifères, les hormones LH et FSH sont produites par deux populations distinctes. De plus, ces populations sont regroupées en masses spécifiquement localisées, contrairement aux mammifères, chez qui les cellules sont réparties dans toute l'adénohypophyse et mélangées avec les autres types cellulaires (pour revue : Zohar et al., 2010). Chez la plupart des téléostéens, les deux types cellulaires sont localisés dans la partie proximale de la *pars distalis* mais on retrouve les cellules à FSH plus internalisées dans l'hypophyse, et quelques populations de cellules à LH en marge de la *pars intermedia* (Pour revue : Zohar et al., 2010 ; Weltzien et al., 2014).

A ce jour, l'origine des cellules à FSH et à LH reste largement méconnue. Quelques études chez le poisson-zèbre ont montré que très tôt au cours du développement des facteurs de différenciation hypophysaires pouvaient être localisés dans la région antérieure de la plaque neurale (Sbrogna et al., 2003 ; Herzog et al., 2004). On sait cependant que les sous-unités LHβ et FSHβ sont exprimées dès l'éclosion, comme cela a été démontré chez la sole (*Solea senegalensis*) (Guzman et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les gonadotropines pourraient jouer un rôle au cours du développement embryo-larvaire des téléostéens.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'expression des sous-unités *lhβ* et *fshβ* au cours du développement larvaire du bar européen. Dans la même période, nous avons cherché à localiser les cellules productrices de ces sous-unités dans la larve entière par hybridation *in situ*.

Nous avons observé l'expression de *fshβ* et *lhβ* dès 4 jours post éclosion et elles sont également détectées à tous les stades étudiés, ce qui nous a permis de suivre l'évolution de leurs expressions au cours du développement larvaire (Fig. 14). La mesure des niveaux d'expression révèle des profils d'expression différents. Au début de la période larvaire, le niveau de transcrits de la sous-unité *lhβ* reste relativement stable. Puis à partir de 60 jours post éclosion, l'expression de *lhβ* augmente. À l'inverse, le niveau d'expression de la sous-unité *fshβ* diminue dès 10 jours post éclosion. Ces différences d'expression entre les deux sous-unités pourraient suggérer un rôle différent des hormones LH et FSH durant le développement larvaire, où LH interviendrait en fin de phase larvaire, alors que FSH aurait un rôle au début du développement larvaire. Le rôle que peuvent avoir ces hormones durant ce stade de vie reste encore à investiguer.

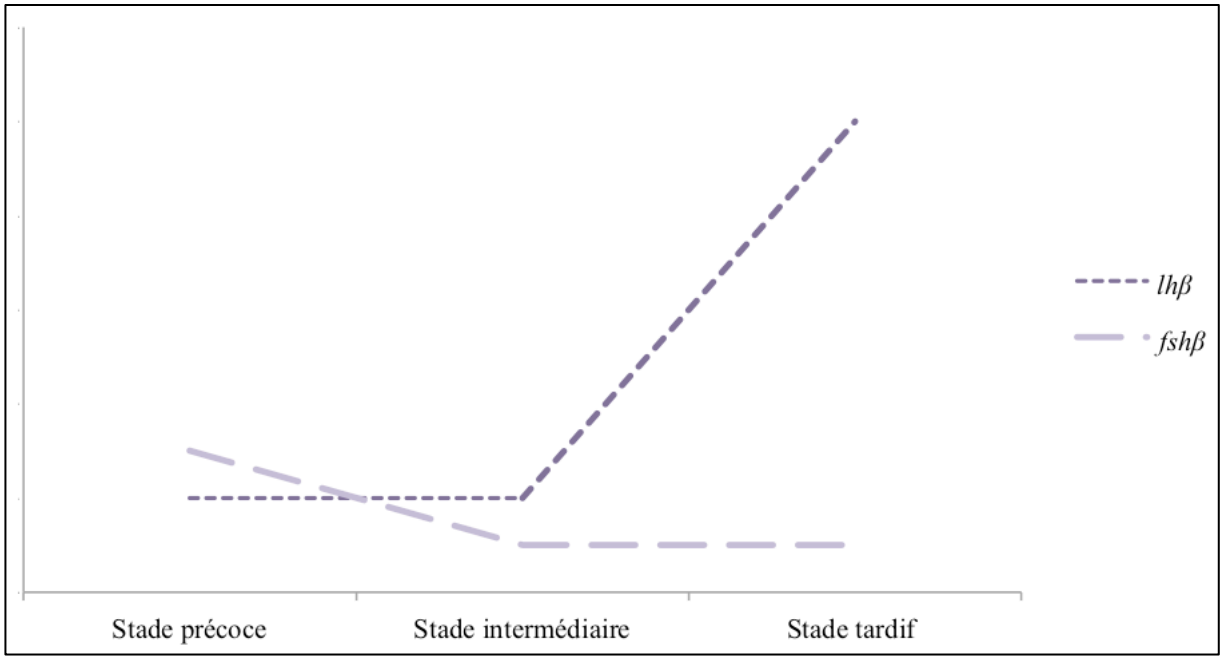


Figure 14 : Représentation schématique du profil d'expression des deux sous-unités *fshβ* et *lhβ* durant les phases précoce, intermédiaire et tardive de développement de la larve de bar européen.

Quelques études rapportent l'expression de *fshβ* et de *lhβ* durant la période larvaire chez les téléostéens. Chez la dorade (*Sparus aurata*), les transcrits codant pour *fshβ* sont détectés dès le premier jour post éclosion, comme ce que nous rapportons, alors que les transcrits de *lhβ* n'ont pas été détectés durant les 36 jours de suivi. Par la suite, quelques pics d'expression de *fshβ* ont été rapportés à 5, 14, et 28 jours post éclosion (Wong et al., 2004). Les auteurs suggèrent que la détection de *fshβ* dès le premier jour indiquerait l'implication de

FSH dans la mise en place de l'axe gonadotrope. Une autre étude menée chez *Solea senegalensis* a montré que l'expression des sous-unités *fshβ, lhβ*, ainsi que *gthα* sont respectivement détectées à partir de 1, 5 et 3 jours post éclosion. L'expression de *fshβ* et de *gthα* atteint un pic à 15 jours (durant la métamorphose) et à 90 jours, peu de temps avant la différenciation des gonades (Guzman et al., 2009). Les auteurs suggèrent que la FSH pourrait être impliquée dans l'initiation de la différenciation des gonades, comme ce qui a été également proposé chez le bar européen, où des niveaux élevés de FSH sont mesurés avant et durant la différenciation des gonades (150-200 jours post éclosion) (Moles et al., 2007). Enfin, chez *Odontesthes bonariensis*, les transcris codant pour *fshβ* et *lhβ* sont détectés dès la première semaine, avec un niveau d'expression plus élevé pour *fshβ* que pour *lhβ* (Shinoda et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs relèvent également une augmentation de l'expression au cours de la différenciation sexuelle.

Or dans notre étude, nous sommes bien avant la différenciation des gonades, mais nous observons tout de même des variations d'expression, suggérant un rôle de ces hormones autre que celui connu dans la fonction de reproduction. Comme proposé chez *S. aurata*, il est possible que, chez le bar européen, l'expression précoce *fshβ* soit reliée à la mise en place de l'axe gonadotrope.

Afin d'aller plus loin dans le rôle des gonadotropines au cours du développement, une première étape consisterait à mesurer l'expression de la sous-unité GTHα, indispensable à la production d'une hormone fonctionnelle, ainsi que l'expression et les localisations des récepteurs.

Parallèlement, nous avons par ISH, au cours de cette période, tenté de localiser les cellules exprimant les sous-unités FSHβ et LHβ. Etonnamment, nous n'avons observé l'expression de ces deux sous-unités qu'au niveau intestinal.

Pourtant, chez les téléostéens, la détection de ces deux sous-unités par immunohistochimie (IHC) a déjà été décrite chez quelques espèces. De manière générale, ces études démontrent que la sous-unité FSHβ est produite plus tôt que la LHβ. Chez la truite arc-en-ciel, la daurade, et *Cichlasoma dimerus* (Cichlidé), la FSHβ apparaît entre 15 et 21 jours après l'éclosion alors que la LHβ n'est détectée qu'au moment de la maturation sexuelle autour de 82 jours après éclosion pour la daurade (*Oncorhynchus mykiss* : Saga et al., 1993 ; Nozaki et al., 1990 ; *C. dimerus* : Pandolfi et al., 2002 ; *Sparus aurata* : García-Ayala et al., 2003). Chez *Xiphophorus maculatus*, les cellules à FSHβ sont localisées, par IHC bien plus précocement, dès 2 jours post éclosion, au niveau de l'hypophyse. Dans cette étude, les

auteurs rapportent également une production plus tardive de la sous-unité LHβ puisque les cellules la produisant ne sont détectées par IHC qu'à partir de 45 jours post éclosion (Magliulo-Cepriano et al., 1994). Cependant, ces études décrivent toutes que, durant le stade larvaire de ces téléostéens, les sous-unités sont localisées au niveau de l'adénohypophyse.

En ce qui concerne l'expression intestinale de ces hormones, quelques rares études réalisées chez les vertébrés rapportent une expression au niveau de l'appareil digestif. Ainsi, chez l'Homme, la FSH a été détectée au niveau de la muqueuse stomacale (Mandrekar et al., 1990). Plus récemment, d'abord chez l'embryon, puis chez la larve de médaka, il a été décrit que des cellules exprimant *lhβ* étaient présentes au niveau de l'intestin, avant que l'hormone ne soit plus qu'exclusivement exprimée dans l'hypophyse à partir de 14 jours post fécondation (Hildahl et al, 2012). Cette expression intestinale a amené les auteurs à suggérer qu'au niveau intestinal la LH pourrait intervenir dans le contrôle de la synthèse de stéroïdes à partir du cholestérol contenu dans le sac vitellin (Weltzien et al., 2014). Dans notre étude, la localisation intestinale se fait bien après la résorption de la vésicule vitelline et on peut donc s'interroger sur le rôle de ces hormones dans l'intestin.

Dans de futures recherches, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur cette expression intestinale des gonadotropines. En premier, il conviendrait de savoir si ces cellules expriment la sous-unité GTHα en la localisant par ISH. Nous pourrions également nous interroger sur la localisation des récepteurs aux gonadotropines à ces stades de développement, que ce soit au niveau intestinal ou au niveau d'autres organes.

Enfin, pendant la période étudiée, nous n'avons pas pu localiser de cellules gonadotropes au niveau hypophysaire. Or lors d'une étude réalisée sur des extraits d'hypophyse de bar européen à partir de 150 jours post éclosion, la FSH pouvait être détectée par ELISA (Moles et al., 2011). Il serait pertinent de pousser les investigations sur la formation de l'hypophyse en mesurant l'expression et/ou en déterminant la localisation de facteurs de différenciation tels que *six1, eya1, sf1* et *pitx1*, qui interviennent dans la différenciation des cellules adénohypophysaires en cellules gonadotropes, ou de *lim3* qui intervient dans la différenciation des cellules gonadotropes en cellules à FSH, chez le poisson-zèbre (pour revue : Weltzien et al., 2013).

4.1.4. Potentielles interactions entre les différents systèmes

Chez les mammifères, les interactions Kiss / GnRH ont fait l'objet de nombreux travaux (pour revue : Oakley et al, 2009). L'expression des récepteurs aux kisspeptines par les neurones à

GnRH a été démontrée chez la souris, par hybridation *in situ*, où 90% de neurones à GnRH1 expriment *kiss1r* (Han et al, 2005). Une situation similaire a été décrite chez le rat où près de 75% des neurones à GnRH1 co-expriment *kiss1r* (Irwig et al, 2004) et chez la brebis avec près de 90% des neurones à GnRH co-exprimant *kiss1r* (Li et al, 2012). De plus, différentes études ont confirmé les effets stimulateurs des kisspeptines sur l'activité des neurones à GnRH (augmentation de la fréquence des potentiels d'action) et la sécrétion de GnRH (pour revue : Oakley et al, 2009 ; Rønnekleiv et Kelly, 2013).

Chez les téléostéens, la situation apparaît comme plus complexe de fait de l'existence d'une diversité de gènes codant pour des récepteurs aux kisspeptines, allant de 1 à 3 gènes en fonction des espèces (Pasquier et al, 2014). La présence de *kissr* dans les neurones à GnRH a été recherchée chez différentes espèces de téléostéens (pour revue : Gopurappilly et al, 2013). Chez le tilapia, en réalisant de la « single-cell PCR » après microdissection laser, il est apparu que les différentes cellules à GnRH (exprimant *gnrh1*, *gnrh2* ou *gnrh3*) co-exprimaient également *kissr2* (Parhar et al, 2004). Chez le poisson-zèbre, l'étude de la localisation des deux types de récepteurs *kiss1r* et *kiss2r* au niveau cérébral a montré que *kiss1r* était exprimé dans la région de l'habenula, région où sont également localisés les neurones à Kiss1 (Servili et al, 2011). Le récepteur *kiss2r* a, quant à lui, une répartition plus large dans le cerveau : il est exprimé au niveau des bulbes olfactifs, du télencéphale, du cortex, de l'hypothalamus, du cervelet et de la moelle épinière (Servili et al, 2011). Parmi ces zones d'expression, le télencéphale ventral et l'aire pré-optique (zones où sont localisés les neurones exprimant la *gnrh3*) contiennent une forte densité en messagers *kiss2r (*Ogawa et al, 2013 ; Servili et al, 2011 ; Steven et al, 2003). Chez le bar européen, la distribution neuroanatomique des récepteurs aux kisspeptines a été déterminée chez l'adulte ; comme chez le poisson-zèbre, *kiss1r* est localisé dans des zones plus restreintes que *kissr2* (Escobar et al, 2013b). Chez le bar, des *kiss1r* ont été détectés au niveau du télencéphale ventral, de l'hypothalamus, de l'habenula et de l'hypophyse. Concernant *kiss2r*, ils sont présents depuis le télencéphale jusqu'au mésencéphale avec de fortes densités de cellules marquées au niveau du télencéphale ventral et de l'aire pré-optique (Escobar et al, 2013b). Dans cette même étude, les auteurs ont recherché de potentielles co-localisations gnrh1 / *kissr1* ou gnrh1 / *kiss2r* à l'aide de doubles marquages IHC et ISH, mais n'en ont observé aucune. Chez le bar européen, les neurones à GnRH1 ne semblent pas posséder de récepteurs aux kisspeptines (Escobar et al, 2013b). Dans cette étude, la co-localisation avec Kissr et GnRH2 ou GnRH3 n'a pas été recherchée, mais des récepteurs Kiss2r sont détectés dans la région synencéphalique où les neurones à GnRH2 sont également retrouvés (Escobar et al, 2013b). Une récente étude indique que la

photopériode peut activer l'axe gonadotrope et augmenter l'expression de *kiss1* et *gnrh2* ainsi que la sécrétion plasmatique de FSH. En plus de montrer que les facteurs abiotiques sont capables d'influencer l'expression de *kiss1* et *gnrh2*, cette étude suggère l'existence d'une voie de l'axe gonadotrope constituée de Kiss1/GnRH2/FSH chez le bar européen (Espigares et al., 2017)

En observant la localisation des neurones à GnRH, à Kisspeptine, ainsi que la localisation des récepteurs Kissr, il a été proposé des interactions préférentielles entre Kiss2 et Gnrh1 (Servili et al, 2011 ; Escobar et al, 2013b). Ces propositions sont appuyées par de récentes études menées chez le bar européen et chez le maquereau espagnol, où des injections intracérébroventriculaire de Kiss2 modifient *in vivo* l'expression de *gnrh1* (*Dicentrarchus labrax* : Espigares et al., 2015 ; *Scomber japonicus* : Ohga et al., 2018). De plus, chez le bar européen, l'injection de Kiss2 induit également la sécrétion de LH, suggérant l'existence d'une voie de régulation incluant Kiss2/GnRH1/LH (Espigares et al., 2015).

Dans notre étude, nous avons observé deux dynamiques de profils d'expression. Alors que l'expression de *kiss1*, *gnrh2*, *gnrh3* et *fshβ* diminue au cours du développement larvaire, l'expression de *kiss2*, *gnrh1* et *lhβ* augmente. Ces différentes études suggèrent des interactions entre les systèmes kisspeptines et GnRH, mais les mécanismes de régulation (directs ou indirects) restent pour le moment mal connus et semblent différer d'une espèce à l'autre. En plus de définir le rôle de ces acteurs au cours de la période larvaire, il serait nécessaire de connaître les interactions entre ces différents acteurs et de déterminer la nature de leurs interactions, qu'elles soient directes ou indirectes. Quelques études suggèrent que, potentiellement, ces interactions existent chez le bar adulte, mais il serait intéressant de savoir si ces interactions sont déjà présentes chez la larve.

4.1.5. Différents acteurs impliqués dans le contrôle de l'axe gonadotrope

Hormis les kisspeptines pour lesquelles les rôles dans le contrôle de l'axe gonadotrope ne sont pas encore clairement établis chez les téléostéens, de nombreux facteurs ont été décrits comme influençant l'expression et la libération des GnRHs (Fig. 15). Ces facteurs pourraient également, chez le bar européen, jouer le rôle de 'relais' dans l'action des kisspeptines, étant donné l'absence de *kissr* au niveau des neurones à GnRH1 (Escobar et al, 2013b).

4.1.5.1. La sérotonine

Chez les téléostéens, la sérotonine est impliquée dans la stimulation de la sécrétion de la GnRH (pour revue : Prasad et al., 2015). Chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) et la dorade japonaise (*Pagrus major*), l'exposition *in vitro* de l'aire pré-optique et de l'hypothalamus à la de sérotonine provoque la sécrétion de GnRH1 (Yu et al., 1991 ; Senthilkumaran et al., 2001). De plus, chez *Micropogonias undulatus,* une étude en IHC a permis de mettre en évidence que les axones des neurones sérotoninergiques étaient en relation avec les neurones à GnRH dans les bulbes olfactifs et l'hypothalamus (Khan et Thomas, 1993). Concernant les récepteurs de la sérotonine (5-HT), trois récepteurs ont pour le moment été caractérisés *in vivo* chez le poisson-zèbre (5-HT1, 5-HT2 et 5-HT7) et un chez *Opsanus beta* (5-HT2), et *in silico* chez de nombreuses autres espèces de téléostéens comme la truite arc-en-ciel et le tilapia (pour revue : Prasad et al., 2015). Chez l'Homme, sept récepteurs ont été décrits (5-HT1 à 5-HT7) et, à ce jour, trois d'entre eux ont également été retrouvés chez les téléostéens (pour revue : Nichols et Nichols, 2008). Il s'agit du récepteur 5-HT2, qui a été localisé par dosage radioimmunologique principalement au niveau du cortex des différents lobes (Pazos et al., 1987), de 5HT-7, qui a été décrit au niveau de l'hippocampe, et de 5-HT1, qui a été trouvé au niveau du cortex entorhinal, impliqué chez les mammifères dans l'olfaction, ainsi qu'au niveau du septum, de l'hippocampe et du gyrus denté (pour revue : Nichols et Nichols, 2008). Chez le poisson-zèbre, où la localisation de ces récepteurs a également été décrite, les récepteurs 5-HT1 sont principalement exprimés dans l'aire pré-optique, alors que les récepteurs 5-HT2 sont présents dans le télencéphale, le diencéphale, le rhombencéphale (Schneider et al., 2012). Chez *O. beta*, les récepteurs de la sérotonine 5-HT2 sont dispersés dans le télencéphale, le diencéphale, le cervelet et l'hypophyse (Mager et al., 2012). Dans leur ensemble, ces données amènent à penser que chez les téléostéens, les neurones à GnRH expriment les récepteurs 5HT, et donc que la sérotonine serait capable d'intervenir directement dans la régulation et la libération de la GnRH. Cependant, pour le moment, la présence de ces récepteurs sur les cellules à GnRH reste encore hypothétique.

4.1.5.2. GABA et Neuropeptide Y

L'acide γ-aminobutyrique (GABA) et le neuropeptide Y (NPY) ont d'abord été décrits chez les téléostéens comme agissant sur la libération des gonadotropines (LH et FSH) (pour

revue : Kah et al., 1993 , Levavi-Sivan et al., 2010). Chez la truite (*Oncorhynchus mykiss*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*) l'exposition *in vitro* de fragments hypophysaires au NPY induit la libération des gonadotropines (*Oncorhynchus mykiss* : Danger et al., 1991 ; Breton et al., 1991 ; *Carassius auratus* : Peng et al., 1990) ainsi que sur l'expression de la GTHα via la stimulation de la GnRH (Gur et al., 2001). Chez le poisson rouge et la truite, l'exposition *in vitro* de tranche hypophysaire au GABA provoque la libération des gonadotropines (*Carassius auratus* : Kah et al., 1992 ; *Oncorhynchus mykiss* : Mananos et al., 1999).

La stimulation par le NPY s'exerce par l'action de récepteurs transmembranaires, dont différents types ont été identifiés chez les vertébrés. Chez le poisson-zèbre, trois récepteurs (Ya, Yb et Yc) ont été clonés (pour revue : Hoyle, 1999), mais le rôle précis de ces récepteurs n'a pour le moment pas été clairement identifié.

À ce jour, trois récepteurs GABA (GABAa, GABAb et GABAc) ont été décrits chez les vertébrés (pour revue : Trudeau et al., 2000). Chez le poisson rouge et chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*), ces trois récepteurs ont été identifiés et l'utilisation d'agonistes du GABA montre que seul le GABAa exerce un rôle dans la libération de LH (pour revue : Trudeau et al., 2000).

Chez le bar européen, les récepteurs aux kisspeptines sont exprimés à la surface des neurones responsables de la production du neuropeptide Y qui sont impliqués dans les régulations des axes endocriniens chez les vertébrés (Escobar et al., 2013b). Concernant les récepteurs GABA, leur présence sur les neurones à GnRH ou à Kisspeptine n'a pour le moment pas été décrite chez les téléostéens. Cependant, chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), Kah et ses collaborateurs (1997) ont mis en évidence la présence de récepteurs aux œstrogènes au niveau des neurones GABAergiques et suggèrent que les œstrogènes pourraient moduler l'activité de GABA et NPY.

4.1.5.3. La dopamine

Chez les téléostéens, deux classes de récepteurs à la dopamine (D1 et D2) ont été décrites (pour revue : Zohar et al., 2010). Sur l'axe gonadotrope, la dopamine exerce un effet inhibiteur qui a été décrit la première fois *in vitro* sur des cellules hypophysaires de poisson rouge (Chang and Peter, 1983). Plus tard, l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes de la dopamine a montré que, chez plusieurs téléostéens (pour revue : Dufour et al., 2005), *in vivo*

et *in vitro*, ce neurotransmetteur agit directement sur la libération des gonadotropines via le récepteurs D2 (*C. auratus* : Chang et al., 1991 ; Peng et al., 1994 ; , *Clarias gariepius* : De Leeuw et al., 1986 ; *Oncorhynchus mykiss* : Saligaut et al., 1992, *Oreochromis niloticus* : Yaron et al., 2003, *Anguilla anguilla* Dufour et al., 1988 ; *Mugil cephalus* : Aizen et al., 2005). De plus, via les récepteurs D1, la dopamine réduit la sécrétion de GnRH, comme cela a été observé chez le poisson rouge ainsi que chez *Astatotilapia burtoni* (*C. auratus* : Yu et al., 1991 ; *A. burtoni* : Bryant et al., 2016).

La dopamine inhibe également, chez le poisson rouge, l'expression de certains facteurs considérés comme stimulateurs de la libération des GnRH comme le GABA (Trudeau, 1997).

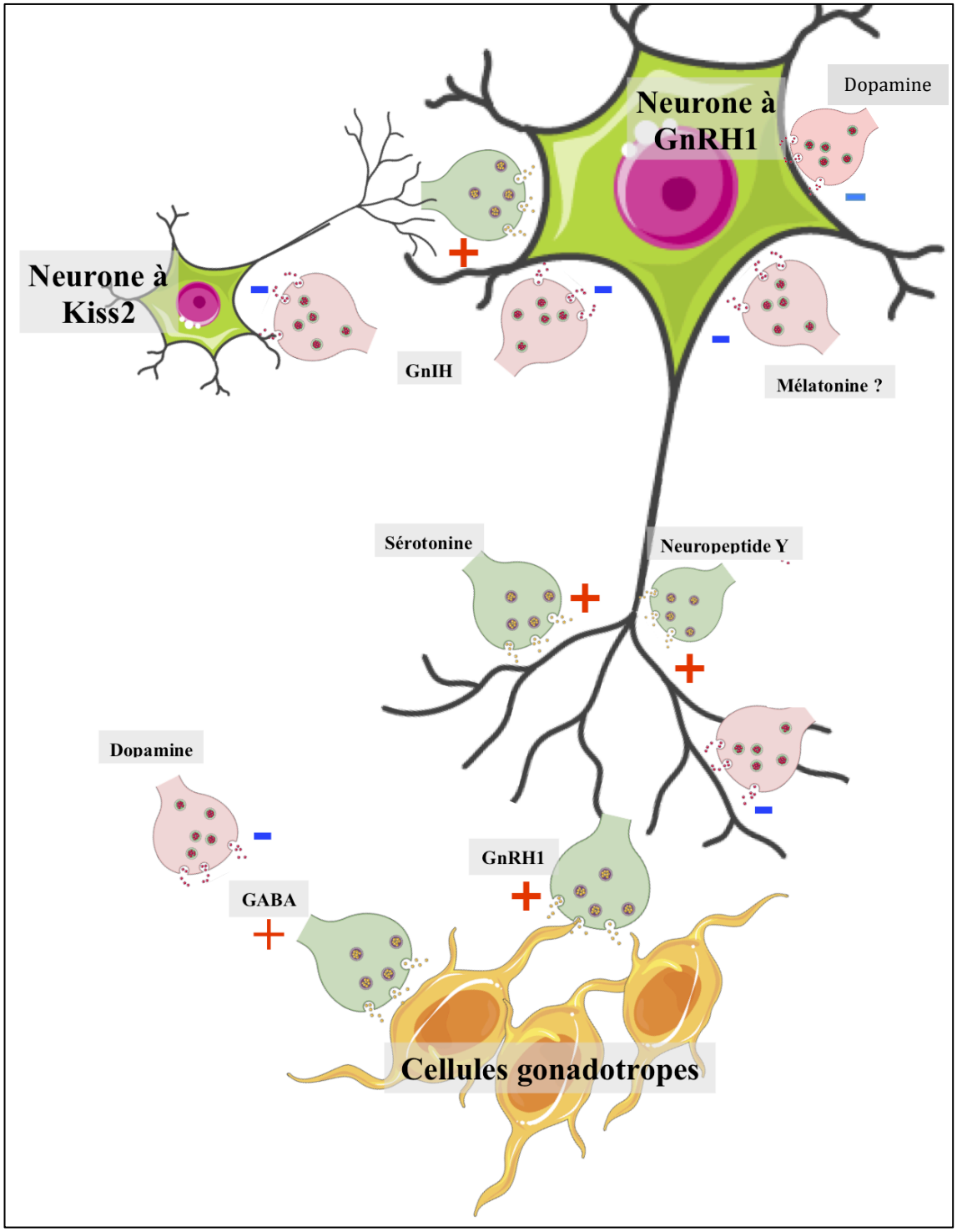


Figure 15 : Représentation schématique de l'action neuroendocrine des différents neuropeptides sur la sécrétion et l'expression de GnRH1 chez les téléostéens. Au centre, le neurone à GnRH1 reçoit différentes projections neuronales, arrivant soit au niveau du corps cellulaire et qui stimulent l'expression de *gnrh1*, soit au niveau de la synapse et qui stimulent la libération de la GnRH1. Les synapses excitatrices sont colorées en roses et celles inhibitrices sont colorées en vertes et leurs effets est indiqué par un « + » rouge (exciteur) ou un « - » bleu (inhibiteur). Les cellules gonadotropes sont également représentées ainsi que les neuropeptides, en plus de la GnRH1 qui stimulent ou inhibent la libération de LH et FSH. Enfin, un neurone à Kiss2 est également représenté avec l'effet des neuropeptides sur son expression ainsi que son effet stimulant l'expression des GnRH. Dans le cas de mélatonine, l'action directe sur les neurones à GnRH n'a jamais été démontrée ce qui laisse supposer l'intervention d'un interneurone (Servili et al., 2013). Abréviations: GABA: acide γ-aminobutyrique ; GnRH : Gonadotropin stimulating

4.1.5.4. La mélatonine

L'influence de la photopériode sur la fonction de reproduction a d'abord été décrite chez les mammifères, puis ensuite, chez les téléostéens (pour revue : Oakley et al., 2009). Par exemple, chez le rat, l'injection intracérébroventriculaire de mélatonine diminue la sécrétion de la GnRH (McMillin et al., 2017)

Chez les téléostéens, quelques études suggèrent que la mélatonine joue un rôle dans la fonction de reproduction. Par exemple, chez le bar européen, l'injection intrapéritonéale de mélatonine provoque l'inhibition de l'expression de *gnrh1*, de *gnrh3* et des récepteurs à la GnRH (Servili et al., 2013). En revanche, l'effet de la mélatonine n'est pas direct, puisque, chez le bar européen, les neurones à GnRH et les cellules exprimant le récepteur à la mélatonine ne sont pas localisés dans les mêmes aires cérébrales. L'action de la mélatonine sur les GnRH emprunterait une voie indirecte qui, comme suggéré par les auteurs, pourrait être les kisspeptines, localisés dans les mêmes zones (Servili et al., 2013).

Cependant, chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), la mélatonine n'influence pas l'expression des *gnrh* (*mgnrh* et *cgnrh-II*), mais agit directement en inhibant l'expression des sous-unité *lhβ* et *fshβ* (Sebert et al., 2008) ce qui suggère que chez l'anguille, la mélatonine agit au niveau hypophysaire soit directement, soit via une autre voie qui pourrait être les kisspeptines ou la dopamine.

Chez le fugu (*Takifugu alboplumbeus*), la durée des jours, mais aussi les rythmes lunaires sont corrélés aux cycles de reproduction. Chez cette espèce, une récente étude a montré que des injections de mélatonine augmentent l'expression de *kiss2* et de *kissr2* (pour revue : Ando et al., 2018)

Néanmoins, les voies qu'emprunte cette régulation par la mélatonine restent inconnues. L'importance de cette hormone dans la régulation de la reproduction nécessite plus d'investigations. Si les kisspeptines sont bien le relais permettant une inhibition de l'axe gonadotrope par la mélatonine, ces voies nécessitent d'être élucidées.

Ces données prouvent également que des facteurs abiotiques entre dans la régulation de l'axe gonadotrope même si jusqu'à présent, la place de ces facteurs dans les systèmes stimulateurs ou inhibiteurs reste floue et que les voies empruntées varient d'une espèce à l'autre.

4.1.5.5. La Gonadotropin Inhibiting Hormone (GnIH)

Mise en évidence au début des années 2000 chez la caille, cette neuro-hormone diminue la libération des gonadotropines directement (Tsutsui et al., 2000) et en inhibant la sécrétion de GnRH (Tsutsui et al., 2010). Par la suite, cette hormone a été caractérisée chez différentes espèces de chordés (amphioxus, lamproie, poisson-zèbre, médaka, crapaud buffle, anole vert (iguane), tortue de Floride, poulet, caille, étourneau, hamster russe, rat, cheval, macaque, Homme) (pour revue : Tsutsui et al., 2018). D'abord identifiée chez la caille, la GnIH active un récepteur couplé aux protéines G qui a été nommé GPR147 (Yin et al., 2005). Ces récepteurs sont présents aux niveaux cérébral et hypophysaire, où la GnIH exerce, chez les tétrapodes, une inhibition sur les neurones à GnRH1, GnRH2 et sur cellules gonadotropes (pour revue : Munoz-Cueto et al., 2017).

C'est chez le poisson rouge que la GnIH a été pour la première fois décrite chez un téléostéen (Sawada et al., 2002). A l'heure actuelle, elle a été identifiée chez 32 autres espèces de téléostéens. En fonction des espèces, il existe entre une et trois GnIH (GnIH-1, GnIH-2, GnIH-3) toutes issues d'un précurseur unique pour les différentes formes (pour revue : Munoz-Cueto et al., 2017). Par exemple, chez le poisson rouge et le mérou à tâches oranges, trois GnIHs ont été identifiés alors qu'une seule forme est présente chez le poisson-zèbre et le tilapia (pour revue : Munoz-Cueto et al., 2017). Chez le bar européen, deux formes de GnIH ont été décrites et leur expression a été mesurée au niveau du diencéphale, comme chez tous les vertébrés étudiés pour le moment, mais également dans les bulbes olfactifs, le mésencéphale, le rhombencéphale, et des tissus périphériques comme les reins, les gonades et l'intestin (Paullada-Salmeron et al., 2016a). Les données concernant les récepteurs sont moins nombreuses chez les téléostéens que chez les tétrapodes. Chez le poisson rouge, l'expression de *gnrih-r* a été décrite par hybridation *in situ* dans l'aire pré-optique ainsi que l'hypothalamus (Qi et al., 2013) suggérant que la GnIH pourrait agir sur les neurones à GnRH. Néanmoins, chez le poisson-zèbre, la GnIH a été décrite comme interagissant avec les neurones à GnRH3 (Spicer et al, 2017), mais aucune co-expression du récepteur au niveau des neurones à GnRH1 et GnRH3 n'a été décrite chez le tilapia (Ogawa et al., 2016).

Chez les téléostéens, l'action de la GnIH n'est pas uniquement inhibitrice, mais peut être stimulatrice en fonction de l'espèce, du sexe, du stade de reproduction ou de la quantité de GnIH distribuée (pour revue : Munoz-Cueto et al., 2017). Alors que chez le Tilapia, la GnIH stimule la libération des gonadotropines (Biran et al., 2014), chez le bar européen, l'injection de GnIH (GnIH-1) intracérébroventriculaire diminue l'expression de *gnrh1* et

gnrh2 ainsi que l'expression des kisspeptines (*kiss1*, *kiss2* et *kiss1r*) (pour revue : Munoz-Cueto et al., 2017). Par ailleurs, l'expression de *gnih* est également influencée par les facteurs abiotiques. Chez le fugu (*Takifugu alboplumbeus)* l'injection de mélatonine, stimule l'expression de *gnih* et de son récepteur (pour revue : Ando et al., 2018). Une récente étude chez le bar européen a montré que l'expression de la GnIH était dépendante de la température. A température élevée (21°C), l'expression de la *gnih* et de son récepteur diminue par rapport au poisson qui sont élevé à 15°C (Paullada-Salmeron et al. 2017). Dans cette même étude, leurs auteurs ont mesuré l'expression de *gnih* et de son récepteur durant la période larvaire et juvénile et ont montré qu'elle variait. Ils décrivent une augmentation durant les trois premières semaines après l'éclosion, suivie d'une diminution puis d'une seconde augmentation à 150 jours post éclosion, au moment de la différenciation sexuelle (Paullada-Salmeron et al. 2017 ; pour revue : Paullada-Salmeron et al., 2019).

Ces différentes études prouvent que la GnIH est un acteur central qui peut influer énormément sur la régulation de l'axe gonadotrope. Par ailleurs, elle est présente durant la période larvaire chez le bar européen.

Dans de futures recherches, il serait intéressant de savoir quels autres facteurs (biotiques ou abiotiques) peuvent influer sur l'expression de la *gnih* ainsi que de localiser les récepteurs de la GnIH dans l'encéphale. Par ailleurs, le rôle de la GnIH au cours de la période larvaire mériterait d'être élucidé. Enfin, d'un point de vue écotoxicologique, il serait pertinent de rechercher un éventuel rôle des œstrogénomimétiques sur l'expression de la *gnih* ou de son récepteur.

4.1.5.6. Les facteurs métaboliques

Chez les mammifères et les téléostéens, quelques études ont établi que les facteurs métaboliques comme la leptine, l'orexine, la nesfatine, la ghréline et la galanine pouvait avoir un rôle soit inhibant, soit stimulant, sur l'axe gonadotrope (Fig. 16).

Chez la souris, 40% des neurones à kisspeptine expriment le récepteur de la leptine (Smith et al., 2005). Chez le rat, le jeûne provoque une diminution de la concentration en leptine dans le sérum ainsi que l'inhibition de l'expression de *kiss1*, *kiss1r* et de *gnrh* (Luo et al., 2016), ce qui a amené les auteurs à supposer que la leptine occupe une place importante dans la régulation de la fonction de reproduction. Chez le bar européen, l'exposition *in vitro* à de la leptine extrait d'hypophyse stimule la libération des gonadotropines (Peyon et al., 2001).

Chez le poisson rouge, l'injection intracérébroventriculaire d'orexine et intrapéritonéale de nesfatine provoque une diminution de l'expression de *gnrh* ainsi que des sous-unités *lhβ* et *fshβ*. Au contraire, l'injection intracérébroventriculaire de ghréline, stimule l'expression de *lhβ* et *fshβ* (pour revue : Shahjahan et al., 2014).

Chez le rat, les récepteurs de la galanine (Gal-R1) ont été localisés au niveau des neurones à GnRH et l'injection de galanine stimule la libération des GnRH (pour revue : Shahjahan et al., 2014). Chez les téléostéens, l'exposition *in vitro* à la galanine d'explants hypophysaires de poisson rouge provoque la libération de LH (pour revue : Shahjahan et al., 2014)

D'autres peptides ont été décrits comme ayant un effet stimulant des gonadotropines. C'est le cas du PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) et de la MCH (Melanin-Concentrating Hormone) qui, comme cela a été montré chez le poisson rouge, stimulent la libération des gonadotropines (pour revue : Shahjahan et al., 2014) (Fig. 16).

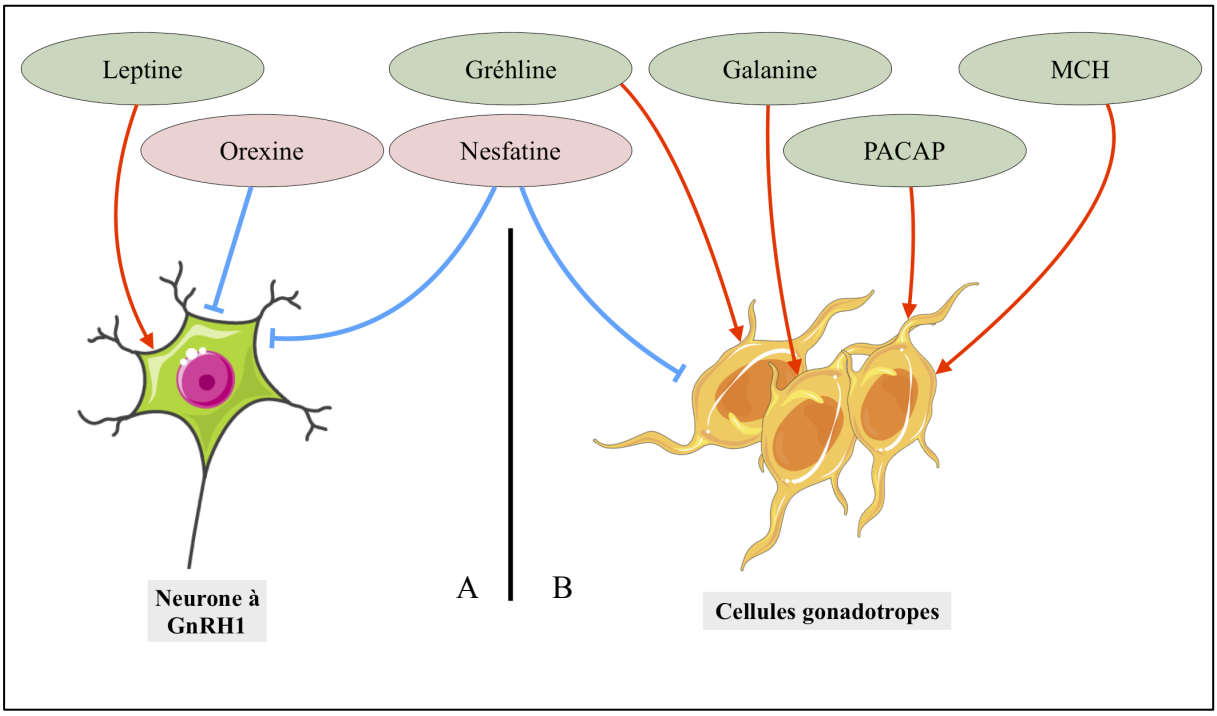


Figure 16 : Représentation schématique des effets des peptides métaboliques sur les neurones à GnRH1 (A) et sur les cellules gonadotropes (B). Les peptides stimulateurs sont colorés en vert et les peptides inhibiteurs sont en rose. Leurs effets sur les différents types cellulaires sont représentés par les flèches rouges (stimulation) et bleues (inhibition). Abréviations : PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide ; MCH : Melanin-Concentrating Hormone.

Ces études suggèrent que les différents peptides métaboliques peuvent influencer l'expression et la libération des acteurs hypothalamo-hypophysaires de l'axe gonadotrope.

Néanmoins, pour beaucoup d'entre eux, les voies d'action au niveau cérébrale restent très mal connues et nécessitent de plus amples investigations.

Il serait également intéressant de rechercher un éventuel rôle des œstrogènes ou des xénoestrogènes sur les sécrétions et *in fine* sur une perturbation de l'axe gonadotrope.

4.1.6. Rôle des kisspeptines et des GnRH au cours des premiers stades de vie

Comme nous l'avons exposé précédemment (Articles 1 et 2), kisspeptines, GnRHs et sous-unités des gonadotropines sont exprimées au cours du développement larvaire chez différentes espèces de téléostéens et cela avant même la mise en place de la fonction de reproduction. Chez certaines espèces de téléostéens, le développement des gonades, la différenciation sexuelle ou la puberté arrivent très tôt après l'éclosion. Par exemple, chez le maquereau espagnol, la différenciation sexuelle débute autour de 40 jours post éclosion (Selvaraj et al., 2015) et chez le poisson-zèbre et le médaka, la maturation sexuelle à lieu aux alentours de 45 jours post fécondation (Kitahashi et al., 2009). Chez *Sebastes schlegeli*, le développement des gonades débute dès 20 jours post éclosion (Song et al., 2015). Chez ces espèces, il est proposé que l'activation de l'ensemble de l'axe gonadotrope est essentielle au déclenchement de la différenciation sexuelle et de la puberté.

En revanche, chez les espèces pour lesquelles les étapes de différenciation sexuelle et de puberté interviennent plus tardivement, comme le bar européen chez qui la différenciation sexuelle intervient entre 150 et 250 jours post éclosion pour les femelles et entre 200 et 250 jours pour les mâles (Blazquez et al, 2009), on peut émettre l'hypothèse de rôles additionnels pour ces acteurs.

Par exemple, les expériences de knockdown (KD) des gènes *gnrh2* et *gnrh3* réalisées chez le poisson-zèbre ont mis en évidence l'implication de ces 2 gènes dans la régionalisation cérébrale et la formation de l'œil (Wu et al., 2006). Chez le médaka, des résultats similaires ont été obtenus, mais dans le cas de KD des gènes *kiss* et *kissr* (Hodne et al., 2013). Ces deux études indiquent des fonctions spécifiques de ces gènes durant la période embryonnaire.

Récemment, la génération de lignées knockout (KO) pour les GnRHs a permis d'aller plus loin dans la compréhension du rôle de ces hormones. Chez le médaka, une lignée d'individu KO pour *gnrh1* a été développée et bien que les animaux étaient viables, les femelles étaient infertiles (Takahashi et al., 2016b) ce qui confirme le rôle de la GnRH dans la fonction de reproduction, mais indique une fonction différente entre mâles et femelles. De plus, deux groupes ont parallèlement développé un lignée KO pour la GnRH3 chez le

poisson-zèbre (Spicer et al., 2016; Liu et al., 2017). Etonnamment, les animaux obtenus se sont développés normalement et ont conservé leur fonction de reproduction, ce qui a amené les auteurs à suggérer un rôle compensateur d'autres neurohormones comme la GnRH2. Pour répondre à cette question, Marvel et ses collaborateurs (2018), ont récemment généré une lignée de poisson-zèbre double KO pour *gnrh2* et *gnrh3*. Les animaux obtenus, qui ne produisaient aucune forme de GnRH, se sont pourtant développés normalement et ont, ici aussi, conservé leur fonction de reproduction. Comme discuté par les auteurs, la différence obtenue entre les générations KD, où des effets sur la régionalisation du cerveau et sur la formation de l'œil ont été observés, et les générations KO, où aucun effet n'a été observé, pourrait être due à un mécanisme de compensation qui s'active chez les individus KO afin d'assurer un développement normal et le maintien de la fonction de reproduction.

D'autres études se sont intéressées aux fonctions 'précoces' des gonadotropines. Chez la sole sénégalaise, Guzman et ses collaborateurs (2009) rapportent une augmentation de l'expression de *fshβ* au cours de la métamorphose (entre 15 et 18 jours post éclosion), les amenant à suggérer une implication de la FSH dans les processus de métamorphose. Un rôle qui a également été suggéré chez les amphibiens où, par IHC, les auteurs décrivent une augmentation dans l'hypophyse du nombre de cellules produisant les différentes sous-unités des gonadotropines (FSHβ et LHβ) au cours de la métamorphose (*Rana catesbeiana* : Tanaka et al., 1991 ; *Rana esculenta* : Pinelli et al., 1996). Plus récemment, l'analyse des profils d'expression chez le xénope (*Xenopus laevis)* a montré une augmentation de l'expression de *lhβ* au cours de la métamorphose, et de *fshβ* après la métamorphose. Ces résultats ont amené les auteurs à proposer pour LH, un rôle dans les processus métamorphiques et pour FSH, un rôle plus tardif dans la maturation sexuelle (Urbatzka et al., 2010).

Enfin, une récente étude utilisant des lignées de poisson-zèbre KO pour LHβ ou FSHβ, a permis de préciser le rôle des gonadotropines chez cette espèce (Zhang et al, 2015). Dans cette étude, les poissons *fshb* -/- obtenus souffrent d'une puberté retardée, mais ensuite, leur reproduction est normale. Chez les animaux *lhb* -/-, les auteurs observent un développement normal jusqu'à la puberté, mais par la suite, les femelles présentent un défaut de maturation des ovocytes et sont infertiles. Chez les organismes doubles mutants (*fshb -/-, lhb -/-*), les auteurs ont relevé qu'après différenciation sexuelle, tous les organismes étaient des mâles (Zhang et al, 2015). Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer un rôle pour la FSH dans le contrôle de la puberté et pour la LH dans le contrôle de la maturation des gamètes (Zhang

et al, 2015). De plus, les données obtenues dans le cas des doubles mutants (*fshb -/-, lhb -/-*) décrivent ici aussi l'implication des GTH dans la différenciation sexuelle du poisson zèbre

Dans notre étude, nous avons observé des variations d'expression des différents gènes impliqués dans le contrôle de l'axe gonadotrope. Au cours du développement larvaire chez le bar européen, nous avons relevé l'augmentation de l'expression de *kiss2, gnrh1*, et *lhβ* et la diminution de l'expression de *kiss1*, *gnrh2*, *gnrh3* et *fshβ*. On suppose que ces acteurs sont régulés, car ils ont une fonction au cours de la période embryo-larvaire.

En ce qui concerne les neuropeptides, du fait de la modification morphologique de l'organisation cérébrale durant la période larvaire et le fait que, chez le bar européen, la différenciation sexuelle a lieu bien plus tard (entre 150-200 et 250 jours post éclosion) (Blazquez et al., 2009), on peut supposer un rôle de ces neuropeptides dans l'organisation cérébrale.

Nous avons aussi mis en évidence la variation d'expression des sous-unités *fshβ* et *lhβ* au cours du développement larvaire. Leur expression bien avant la puberté nous amène a suggérer que ces hormones, si elles sont fonctionnelles, peuvent avoir un rôle autre que la reproduction. Par ailleurs, nous avons décrit par ISH l'expression de ces sous-unités au niveau intestinal, ce qui avait déjà été mis en évidence, pour *lhβ*, chez l'embryon puis la larve de poisson-zèbre (Weltzien et al., 2014). Cette étude suggère que chez la larve de poisson-zèbre, la LH serait impliquée dans la stéroïdogenèse et permettrait la production de prégnénolone à partir du cholestérol contenu dans le sac vitellin (Weltzien et al., 2014). A partir de nos observations, on peut supposer un rôle endocrinien des gonadotropines au niveau intestinal, mais qui reste à déterminer.

4.2. Effets des xénoestrogènes au cours du développement larvaire du bar européen

4.2.1. Œstrogènes et récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes sont principalement connus pour leur rôle dans la reproduction mais ils ont été décrits comme facteur important dans le système cardiovasculaire (Dworatzek and Mahmoodzadeh, 2017), au niveau osseux (Manolagas et al., 2013), du tissus adipeux (Kim et al., 2014) ainsi qu'au sein du système nerveux central (Diotel et al., 2018). Leur rôle dans la reproduction est bien connu et l'implication des œstrogènes dans le développement des

organes sexuels secondaires, la maturation gonadique ainsi que le rétrocontrôle de l'axe gonadotrope est bien décrit (Pour revue : Chedrese et al., 2009).

Les œstrogènes exercent leurs actions sur les cellules cibles via leur liaison à des récepteurs. Ceux-ci sont de deux types : les récepteurs nucléaires (ER) et les récepteurs membranaires (GPER). Les premiers caractérisés sont les ER chez les mammifères (ESR1 ou Erα : Green et al., 1986 ; ESR2 ou ERβ - : Kuiper et al., 1996 ; Mosselman et al., 1996). Chez les téléostéens, le premier ER a été caractérisé chez la truite arc en ciel (ESR1 : Pakdel et al., 1990), puis une seconde forme ESR2 a été identifiée chez l'anguille japonaise (Todo et al., 1996). Par la suite, deux gènes *esr2* (*esr2a* ou *erβ1* et *esr2b* ou *erβ2*) ont été décrits chez différents téléostéens (poisson rouge: Tchoudakova et al., 1999 ; Ma et al., 2000; tambour brésilien: Hawkins et al., 2000; poisson-zèbre: Bardet et al., 2002, Menuet et al., 2002). Concernant les récepteurs membranaires GPER, le premier a été identifié chez les mammifères en 2005 (Revankar et al., 2005, Thomas et al., 2005) puis chez différents téléostéens (tambour brésilien: Pang et al., 2008; poisson-zèbre: Liu et al., 2009, Pang and Thomas, 2009; carpe: Majumder et al., 2015). Enfin, la présence de 2 gènes *gper* (*gperα* et *gperβ*) a été mise en évidence chez l'anguille européenne (Lafont et al, 2016).Le développement de modèles de souris KO pour les ER (ERα et ERβ) a permis de mieux comprendre les rôles de chacun chez cette espèce, à savoir un rôle primordial pour ERα dans la fonction de reproduction, les souris KO pour ce gène étant infertiles ; et un rôle plus « accessoire » pour ERβ avec une diminution de la fertilité chez les KO ERβ (Hamilton et al., 2014). Au contraire, chez le médaka, la production récente d'une lignée d'individu KO pour ERα a montré que les individus, mâles ou femelles, se développaient et se reproduisaient normalement malgré l'absence du récepteur (Tohyama et al., 2017). Les auteurs en déduisent que, chez le médaka, le récepteurs ERα n'est pas indispensable au développement et à la reproduction, contrairement à ce qui a été décrit chez la souris. Cette étude suggère également qu'il existe des différences dans la fonction des ER entre les téléostéens et les mammifères.

4.2.2. Œstrogènes et contrôle cérébral de la reproduction

Chez les mammifères, les œstrogènes vont exercer des rétrocontrôles au niveau cérébral qui fluctuent au cours du cycle reproducteur. En fin de phase folliculaire, les œstrogènes exercent un effet stimulateur induisant le pic pré-ovulatoire de GnRH/LH, en

revanche pendant le reste du cycle, ils vont exercer un effet inhibiteur sur l'expression et la libération de GnRH (pour revue : Radovick et al, 2012).

Chez les téléostéens, comme chez les mammifères, des effets stimulateurs et inhibiteurs des œstrogènes sur l'expression ou la production de GnRH ont été mis en évidence. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Vetillard et al., 2006) et le Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Soga et al., 1998), l'injection d'œstradiol entraine la diminution de l'expression de GnRH. Chez le pagre (*Acanthopagrus schlegeli*), les traitements à l'œstradiol stimulent la libération de GnRH1 au niveau hypophysaire (Lee et al, 2004).

Pourtant, la présence de récepteurs nucléaires aux œstrogènes au niveau des neurones à GnRH n'a pu être démontrée chez les différents mammifères étudiés *in vivo* (pour revue : Radovick et al, 2012) ni chez les téléostéens étudiés (truite arc en ciel : Navas et al., 1995 ; médaka : Zempo et al, 2018) suggérant une action indirecte via des cellules intermédiaires. Néanmoins, un certain nombre de travaux réalisés *in vitro* sur des lignées de neurones exprimant la *gnrh*, indiquent la présence de ER au niveau de ces neurones (pour revue : Radovick et al, 2012). Plusieurs études réalisées chez les mammifères ont rapporté qu'il y avait une réponse rapide des neurones à GnRH en présence d'*œstradiol* malgré l'absence des récepteurs nucléaire aux œstrogènes, ce qui laissait suggéré la présence de GPER (pour revue : Naugle et Gore, 2014). A la fin de années 2000, chez la macaque rhésus, une équipe a mis en évident par IHC, la présence de GPER au niveau de cellules à GnRH1 (Noel et al., 2009). Ensemble, ces résultats montrent que l'activité œstrogéno-induite des neurones à GnRH1, chez les mammifères, est régulée par le GPER. Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible à ce sujet chez les téléostéens.

Chez les vertébrés, comme la souris, l'effet inhibiteur des œstrogènes sur l'expression des kisspeptines a été décrite. Au cours du cycle de reproduction et lors de l'augmentation en *œstradiol* plasmatique, l'expression des *kiss1* va diminuer au niveau du noyau arqué mais va augmenter dans le noyau AVPV (Smith et al., 2005). Suite à une ovariectomie, en l'absence d'œstrogène, l'expression des kisspeptines augmente. Puis, l'injection d'œstrogènes aux animaux ovariectomisés permet un retour à un niveau basal d'expression de *kiss1* (Pour revue : Skorupskaite et al., 2014).

Chez les téléostéens, le rétrocontrôle négatif qu'exercent les kisspeptines a également été rapporté. Par exemple, chez le bar européen, suite à une ovariectomie, l'expression de *kiss2* diminue, alors que l'expression de *kiss1* reste stable malgré la diminution du nombre de

cellules observées (Alvarado et al., 2016). Cette étude suggère que les populations de kisspeptines ne sont pas également sensibles aux œstrogènes. Comme le montre une autre étude chez le médaka, suite à une ovariectomie, le nombre de neurone à *kiss1* diminue, ce qui n'est pas le cas de *kiss2* (Mitani et al., 2010).

Chez les vertébrés, de nombreuses études ont rapporté l'expression des récepteurs Erα et ERβ au niveau de neurones à kisspeptine (Pour revue : Oakley et al., 2009). A titre d'exemple, chez la souris, les neurones à kisspeptine expriment ERα (Roa et al., 2008, Fransceschini et al., 2006).

Chez les téléostéens, la présence des récepteurs aux œstrogènes a également été décrite pour certaines espèces. Ces différentes études montrent que les ERα sont localisés dans l'aire pré-optique et l'hypothalamus alors que les ERβs ont une répartition plus large avec une concentration de ces récepteurs le long des ventricules, du télencéphale et du diencéphale (Coumailleau et al., 2015). Chez le poisson rouge, la capture laser des neurones à Kiss1 et Kiss2 a permis de mettre en évidence l'expression des différents récepteurs aux œstrogènes, avec quelques différences en fonction des populations neuronales : les neurones à Kiss1 exprime préférentiellement ERβ alors que les neurones à Kiss2 expriment ERα et ERβ1 (Wang et al., 2013). Au contraire, chez le bar européen, les neurones à Kiss1 expriment le récepteur ERα alors que les neurones à Kiss2 expriment, comme suggéré par les auteurs, le récepteur ERβ2 (Escobar et al., 2013b). Chez le médaka, l'utilisation de poissons transgéniques a révélé l'absence de ERα dans les neurones à Kiss1 ainsi que Kiss2, suggérant une régulation par les autres types de récepteurs (Zempo et al., 2018).

Cependant, leur localisation précise au niveau cérébral et leur implication dans les rétrocontrôles sont pour le moment inconnus.

Ces différentes études menées chez les vertébrés prouvent que l'activité des neurones à kisspeptine est modulée par les œstrogènes qui assurent un rétrocontrôle de l'axe gonadotrope. Cependant, il existe des différences de localisation ainsi que des types de récepteurs mis en jeu entre les différentes espèces. De plus la description de GPER chez les téléostéens ouvre de nouvelles perspectives de recherche afin de comprendre le rôle de ce récepteur dans la régulation de l'axe gonadotrope.

Qui plus est, par rapport à nos travaux, il serait intéressant de déterminer chez la larve de bar la localisation des différents récepteurs (nucléaires et membranaires) afin de comprendre si les acteurs cérébraux de l'axe gonadotrope (GnRH et Kisspeptines) sont régulés via les œstrogènes.

4.2.3. Effets des xénoestrogènes sur l'axe gonadotrope.

4.2.3.1. Effets des xénoestrogènes sur les systèmes à GnRH

Comme dit précédemment, les œstrogènes sont capables de réguler de nombreuses fonctions en agissant au niveau de différents organes tels que les gonades, le squelette ou le système nerveux (Korach and Wintermantel, 2007 ; Horner, 2009 ; McCarthy, 2008, Pellegrini et al, 2016). Au niveau du système nerveux, on connait leurs rôles dans les rétrocontrôles exercés sur les cellules hypothalamiques de l'axe gonadotrope. Par exemple, en période de maturation sexuelle, l'augmentation du rapport gonado-somatique (GSI) s'accompagne d'une élévation des niveaux plasmatiques de stéroïdes sexuels (œstrogènes et androgènes) et d'une augmentation des niveaux d'expression de la GnRH *(Danio rerio :* Clelland et Peng, 2009 ; *Centropristis striata* : Breton et al., 2015 ; *Dicentrarchus labrax*: Migaud et al., 2012 ; Alvarado et al., 2013). Par ailleurs, il existe un certain nombre de données concernant les rôles des œstrogènes dans la neurogenèse (pour revue : Coumailleau et al, 2015 ; Diotel et al, 2018). Ces régulations exercées par les œstrogènes endogènes ont amené différents auteurs à se questionner quant aux effets des xénoestrogènes sur les organismes (pour revue : Dickerson et Gore, 2007 ; Patisaul, 2013 ; Senthilkumaran, 2015 ; Adeel et al., 2017 ; Drobnis et Nangia, 2017 ; Ismail et al., 2017 ; Rosenfeld et al, 2017 ; Santos et al., 2017).

Comme le montre certaines études menées chez les mammifères et chez les téléostéens, l'exposition fœtale à des perturbateurs endocriniens provoque la désorganisation du système GnRH. Chez le lapin, l'exposition fœtale au viclozolin (fongicide) administré via la nourriture, provoque une diminution du nombre de neurones à GnRH1 dans les crêtes supra-optiques (Bisenius et al., 2006). Chez les téléostéens, particulièrement chez l'embryon de poisson-zèbre, l'exposition par balnéation à l'EE2 provoque l'augmentation du nombre de neurones à GnRH3 (forme hypophysiotrope chez cette espèce) (Vosges et al., 2010).

Dans notre étude, nous avons cherché à évaluer les effets du xénoestrogène EE2 sur l'ontogenèse des différents systèmes à GnRH chez le bar européen. Les résultats de notre travail sur l'ontogenèse de ces systèmes montrent que *gnrh1* (forme hypophysiotrope) est faiblement exprimée et que les neurones sont non observables aux stades étudiés. Pour ces raisons, nous nous sommes focalisés sur les deux autres formes de GnRH dans la mesure où

nous avions précédemment observé par ISH, les neurones à GnRH2 et à GnRH3 au cours du développement larvaire.

En combinant les techniques de PCR quantitative en temps réel et ISH, nous avons pu évaluer les effets de l'exposition à l'EE2 sur les niveaux de transcrits des deux gènes (*gnrh2* et *gnrh3*) et sur l'organisation des cellules les exprimant.

Nos résultats montrent que l'exposition à l'EE2 impacte l'ontogénèse des systèmes GnRH2 et GnRH3. Chez les animaux exposés, une diminution des niveaux de transcrits codant pour GnRH2 a été mesurée, ce qui a été confirmé en ISH par l'absence de détection des cellules exprimant la GnRH2 (Article 3). Pour GnRH3, nous avons également observé une diminution du niveau de transcrits mais les résultats d'ISH montre une perturbation de la migration des neurones à GnRH3 qui pénètre plus précocement dans le télencéphale chez les animaux exposés comparés aux « témoins ». Chez le poisson-zèbre, l'exposition embryonnaire à l'EE2 perturbe également le profil de migration des neurones à GnRH3 (Vosges et al., 2010), ce qui a été confirmé par l'exposition embryonnaire au BPA et BPS (Bisphénol S), des œstrogénomimétiques, qui en plus provoque l'augmentation de l'expression de *gnrh3* (Qiu et al., 2016). De plus, l'utilisation d'antagonistes aux récepteurs aux œstrogènes permet d'éviter la perturbation de la migration de neurones à GnRH3, ce qui suggère que cette voie est œstrogéno-dépendante (Vosges et al., 2012).

Ces données prouvent la sensibilité aux œstrogènes des systèmes à GnRH2 et GnRH3 au cours du développement larvaire de certains téléostéens. Il s'agirait maintenant de savoir si, chez la larve de bar européen, l'ontogenèse des neurones à GnRH2 et GnRH3 est aussi œstrogéno-dépendante. De plus, il serait également intéressant de savoir si ces perturbations perdurent chez les individus à long terme et si elles causent des altérations de la fonction de reproduction. Mais par ailleurs, dans une étude réalisée chez le poisson-zèbre à l'aide de morpholinos, il a été montré que la GnRH2 était impliquée dans la formation de l'œil (Wu et al., 2006). Chez notre espèce, il serait utile de connaitre si l'exposition à un xénoestrogène, induit des malformations au stade larvaire.

Par ailleurs, les effets mesurés sur la transcription de *gnrh2* nous amènent à nous interroger sur l'organisation des récepteurs aux œstrogènes. Chez le bar européen, la distribution neuroanatomique des différents ER a été analysée chez l'adulte (Muriach et al, 2008a, 2008b). Les données montrent la présence de récepteurs ER1 (Muriach et al, 2008a) dans la région cérébrale où sont localisés les neurones à GnRH2 (medial longitudinal

fasciculus) (Gonzalez-Martinez et al, 2001) bien que la co-localisation des ER avec les neurones à GnRH2 n'ait jamais été recherchée. En revanche, aucune donnée concernant la distribution des GPER n'est actuellement disponible chez cette espèce. Il serait intéressant d'approfondir, dans de futurs travaux, la compréhension des mécanismes de régulation de la GnRH2 par les œstrogènes (directe ou indirecte ; via ER ou GPER) (Fig. 17).

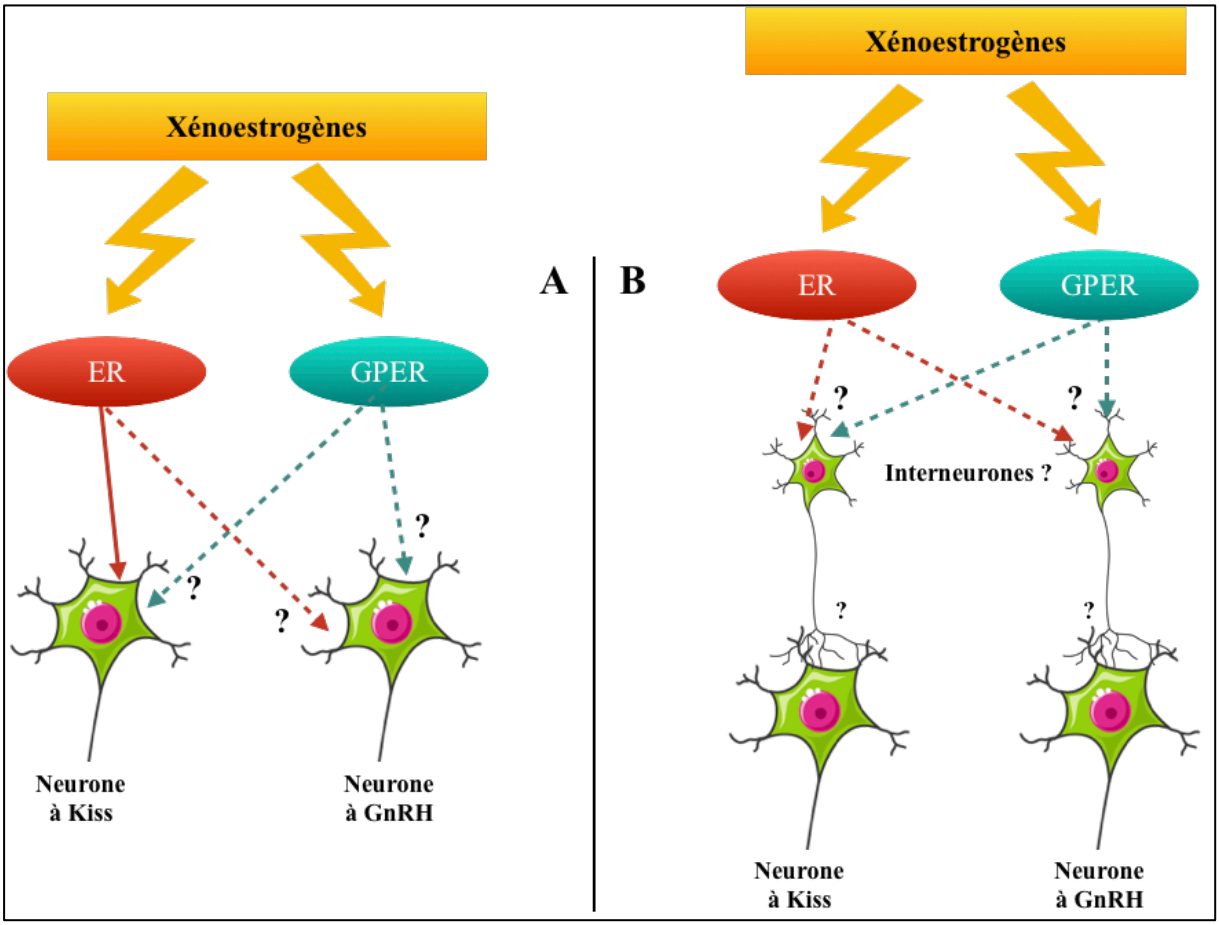


Figure 17 : Représentation schématique des voies d'actions potentielles des xénoestrogènes sur les neurones à kisspeptines (Kiss) et les neurones à GnRH chez les téléostéens. A : Voie hypothétique d'action direct faisant intervenir les récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER) et les récepteurs membranaires aux œstrogènes (GPER). Au niveau des neurones à kisspeptines la présence des récepteurs (ERα, ERβ1 ou ERβ2) a été décrite et est différente en fonction de l'espèce et du type de neurones à Kiss. Au niveau des GnRHs, les ERs et les GPERs (GPERa ou GPERb) n'ont pour le moment pas été co-localisés mais pourrait constituer des voies d'action des xénoestrogènes. B : Voie hypothétique d'action indirect faisant intervenir un interneurone portant les ER et/ou les GPER. En l'absence d'ER ou de GPER sur les neurones à GnRH, l'action des xénoestrogènes pourrait se faire en perturbant l'activité d'interneurones exprimant les ER ou GPER et régulant les neurones à Kiss ou à GnRH. Un effet secondaire à cette perturbation serait la dérégulation de l'activité des neurones à kisspeptines ou à GnRH.
La voie qui a été démontré chez les téléostéens (Wang et al., 2013, Escobar et al., 2013a) est indiqué en « flèche pleine ». Les voies hypothétiques sont marquées en pointillées.

Il s'agirait également de nous interroger sur l'organisation/la distribution des récepteurs aux œstrogènes au cours du développement larvaire. Cela permettrait d'identifier des cibles potentielles aux xénoestrogènes et permettrait de mieux comprendre les modes d'action (Fig. 17). Aujourd'hui, chez les téléostéens, les seules données disponibles sur l'expression des ER et GPER au cours du développement ont été obtenues chez le poisson-zèbre (Pour revue : Diotel et al, 2018).

4.2.3.2. Effets des xénoestrogènes sur les systèmes à kisspeptine

Comme nous l'avons dit précédemment, chez de nombreuses espèces, les œstrogènes sont capables de moduler l'expression des kisspeptines (Mammifères - pour revue : Oakley et al, 2009 ; médaka : Kanda et al, 2008 ; Mitani et al, 2010 ; poisson-zèbre : Servili et al, 2011 ; poisson rouge : Kanda et al, 2012 ; bar européen : Escobar et al., 2013a ; Alvarado et al., 2016).

Dans le cas des neurones à kisspeptines, cette régulation par les œstrogènes peut se faire de façon directe. En effet, chez les mammifères, les neurones à Kiss1 expriment soit ERα, soit ERα et ERβ (Pour revue : Garcia-Galiano et al, 2012). Chez les téléostéens, l'image se complexifie quelque peu du fait de la diversité des neurones à Kiss (Kiss1 et Kiss2) et de la diversité des récepteurs aux œstrogènes (plusieurs ER et plusieurs GPER). Chez le poisson rouge, après capture laser des neurones à Kiss1 et Kiss2, l'expression des différents ER (nommés *era1, era2, erb1* et *erb2*) a été mesurée, ce qui a permis de mettre en évidence que dans cette espèce, une expression de *era1* et *erb1* dans les neurones à Kiss1 de l'habénula ; et une expression de *era1*, *era2* et *erb1* dans les neurones à Kiss2 hypothalamiques (Wang et al., 2013). Chez le bar européen, en réalisant une double ISH, Escobar et ses collaborateurs (2013a) ont mis en évidence une organisation différente ; dans ce cas, les neurones à Kiss1 localisés dans l'habénula n'expriment aucun ER ; en revanche les neurones à Kiss1 hypothalamiques expriment ERα et ERβ2. Enfin, les neurones à Kiss2 hypothalamiques semblent exprimés ERβ2.

La régulation des kisspeptines par les œstrogènes et la présence de récepteurs ER au sein des neurones à kisspeptines en font des cibles potentielles des xénoestrogènes et œstrogénomimétiques (Fig. 17A).

Chez les rongeurs, différentes études ont montré que des expositions à des œstrogénomimétiques de différentes sortes (BPA, PCBs…) en période périnatale pouvaient

perturber l'expression ou l'organisation des neurones à Kiss1 (pour revue : Patisaul, 2013). Chez les téléostéens, il existe peu d'études sur ce sujet. Chez l'embryon de poisson-zèbre exposé aux œstrogénomimétique (BPA et BPS) il a été décrit une surexpression de *kiss1* et de son récepteur (*kiss1r*) aux plus fortes concentrations testées (100 et 1000 ng/L) (Qiu et al., 2016). Une récente étude menée chez le catla (*Catla catla*) mature exposé au BPA, rapporte également l'augmentation de l'expression de *kiss1* ainsi que *kiss2*, dès l'exposition à 10 µg/L (Faheem et al., 2019). Chez *Gobiocypris rarus* adulte, l'exposition à l'EE2 provoque l'augmentation de l'expression de *kiss1* et *kiss2* chez les femelles alors que chez les mâles seul l'expression de *kiss1* est augmentée (uniquement à 1 ng/L). A des concentration plus importante, les auteurs ne rapportent pas de changement significatif dans l'expression de *kiss1* et *kiss2* (Yang et al., 2016).

A l'issue de nos travaux, nous n'avons pas observé de modification de l'expression de *kiss1* et l'expression de *kiss2* diminue uniquement au début du développement larvaire (4 jours post éclosion) et à la plus forte dose testée (50 nM), contrairement à ce qui a été décrit chez les embryons de poisson-zèbre exposés au BPA (Qiu et al., 2016) et chez les adultes *G. rarus* exposé à l'EE2 (Yang et al., 2016). Malheureusement, suite à un problème technique, nous n'avons pas pu observer la répartition des neurones à Kiss2, pourtant observée lors de la description de l'ontogénèse de ces neurones.

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux portant sur l'impact de l'EE2 sur l'expression des kisspeptines au stade larvaire des téléostéens. Dans de futures recherches, il serait intéressant de réitérer les expositions afin d'observer si l'EE2 à un effet sur la mise en place des neurones à Kiss2. Par ailleurs, il serait intéressant de localiser durant les phases précoces l'expression et la localisation des récepteurs aux œstrogènes (ER et GPER). Ces données permettraient de mieux appréhender le mode d'action (direct ou indirect) des xénoestrogènes sur les neurones à Kiss et les neurones à GnRH (Fig. 17).

4.3. Autres sites d'action potentiels des xénoestrogènes

Comme nous l'avons décrit précédemment (section 4.1.5), différents facteurs hypothalamiques interviennent dans le contrôle de l'axe gonadotrope. Parmi ces facteurs, certains sont également soumis à des régulations par les œstrogènes. Ils constituent donc des

cibles potentielles pour les œstrogènomimétiques et pourraient participer aux 'désorganisations' ontogénétiques mises en évidence.

4.3.1. La sérotonine

Chez les mammifères, l'action des œstrogènes sur les neurones à sérotonine a été mise en évidence chez les macaques (Pecins-Thompson et al., 1996), où l'expression de la tryptophane hydroxylase (enzyme limitante dans la synthèse de sérotonine) a été mesurée chez des individus après ovariectomie ou après ovariectomie et supplémentation en œstrogènes. Les résultats obtenus montraient une augmentation des niveaux de transcrits en tryptophane hydroxylase chez les animaux supplémentés. Par ailleurs, il a été montré chez différents mammifères, que les neurones sérotoninergiques exprimaient les récepteurs ERβ (pour revue : Bethea et al, 2002).

Chez les téléostéens également les niveaux de sérotonine sont modulés par les stéroïdes sexuels (Subhedar et al., 1997; Hernandez-Rauda et Aldegunde, 2002 ; Uhlaq et Kishida, 2018). Par ailleurs, chez le poisson-zèbre, la distribution cérébrale des ER et des neurones à sérotonine suggère une forte association même si la co-localisation n'a pas été démontrée (Uhlaq et Kishida, 2018). Enfin, quelques études se sont intéressées aux effets de molécules œstrogénomimétiques sur le système sérotoninergique et la fonction de reproduction (pour revue : Prasad et al, 2015). Chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*). Il semblerait qu'une exposition à un mélange commercial de PCBs (aroclor1254) induit une baisse de l'activité de l'enzyme tryptophane hydroxylase, une baisse des niveaux de sérotonine et une baisse des niveaux de GnRH dans l'aire pré-optique (Khan et Thomas, 2001, 2006).

Ces études montrent que des perturbations du fonctionnement de l'axe gonadotrope peuvent avoir lieu via des voies indirectes à travers le système sérotoninergique.

4.3.2. GABA

Chez les mammifères, il a été montré que la libération de GABA pouvait également être régulée par les œstrogènes (Herbison, 1997 ; pour revue : Handa et al., 2001). Par ailleurs, chez le rat, il a été décrit que les neurones GABAergiques possèdent les récepteurs

aux œstrogènes (Flugge et al., 1986) et que la fixation aux récepteur ERα mobilisait les vésicules de GABA le long de la synapse (pour revue : Almey et al., 2015).

Chez les téléostéens, plusieurs études faites chez le poisson rouge (*C. auratus*) ont montré l'implication de GABA dans la libération des gonadotropines (Zohar et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré chez le poisson rouge, tout comme chez les mammifères, que les œstrogènes régulent la sécrétion de GABA. Il a été montré que des injections de testostérone et de progestérone inhibent la production de GABA alors que l'œstrogène stimule son expression (Trudeau et al., 1993). Cependant, bien que la localisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des neurones GABAergiques n'ai pas encore été démontré, la présence de ERα a été rapporté chez la truite au niveau des neurones produisant la glutamate décarboxylase, enzyme permettant la conversion du L-glutamate en GABA (Zohar et al., 2010).

Enfin, quelques études chez les mammifères et les téléostéens se sont intéressées à la perturbation du GABA. Chez le rat adulte, l'exposition aux phthalates (DEHP) perturbe le fonctionnement de l'axe gonadotrope et provoque une augmentation des taux plasmatiques de LH et FSH (Carbone et al., 2019). Chez les téléostéens, comme cela a été décrit chez la perchaude (*Perca flavescens*), l'exposition au méthylmercure diminue l'expression de la glutamate décarboxylase, ce qui suggère une diminution de GABA (Arini et al., 2016).

Ces études montrent que des perturbations du fonctionnement de l'axe gonadotrope peuvent avoir lieu via des voies indirectes à travers le système GABAergique.

4.3.3. La dopamine

Chez les mammifères, la libération de la dopamine peut être régulée par les œstrogènes. *In vitro*, l'exposition à l'E2 ou à l'EE2 d'explants de *striatum* provoque la libération de dopamine (Becker et al., 1990) et *in vivo,* chez la rate ayant subi une ovariectomie, il a été montré qu'après injection d'E2, à des doses physiologiques, la production de dopamine était stimulée dans le striatum (Pasqualini et al., 1995). Chez les téléostéens, plusieurs études suggèrent que l'activité de la dopamine est régulée par les stéroïdes sexuels (Pour revue : Dufour et al., 2010 ; Zohar et al., 2010). De plus, les récepteurs aux œstrogènes ont pu être co-localisés avec la tyrosine hydroxylase (TH ; enzyme permettant la synthèse de la dopamine) dans l'aire pré-optique de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Linard et al., 1995,1996).

Peu d'études se sont intéressées aux effets des xénoestrogènes sur la dopamine. Toutefois, chez la souris, l'exposition *in utero* au BPA, un œstrogénomimétique, provoque une diminution du nombre de neurones produisant la TH (Rubin et al., 1996). Chez les téléostéens, plus particulièrement chez *Oryzias melastigma*, l'exposition embryonnaire aux BPA halogénés (tetrabromobisphenol A et tetrachlorobisphenol A) augmente la production de 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), qui peut être décarboxylé en dopamine, suggérant une augmentation de la dopamine (Ye et al., 2016). De plus, cette étude montre que le système dopaminergique est désorganisé chez les organismes exposé aux BPA halogénés (Ye et al., 2016).

Ces études montrent que des perturbations du fonctionnement des neurones dopaminergiques peuvent influencer le fonctionnement de l'axe gonadotrope.

Ces différents travaux rapportent que la sécrétion de certains neurotransmetteurs (sérotonine, GABA et dopamine) peut être la cible de xénoestrogènes (Fig. 18). Ces neurotransmetteurs constituent des cibles des xénoestrogènes et il serait intéressant dans de futures recherches d'identifier chez le bar européen ces facteurs ainsi que l'effet des xénoestrogènes sur leur activité.

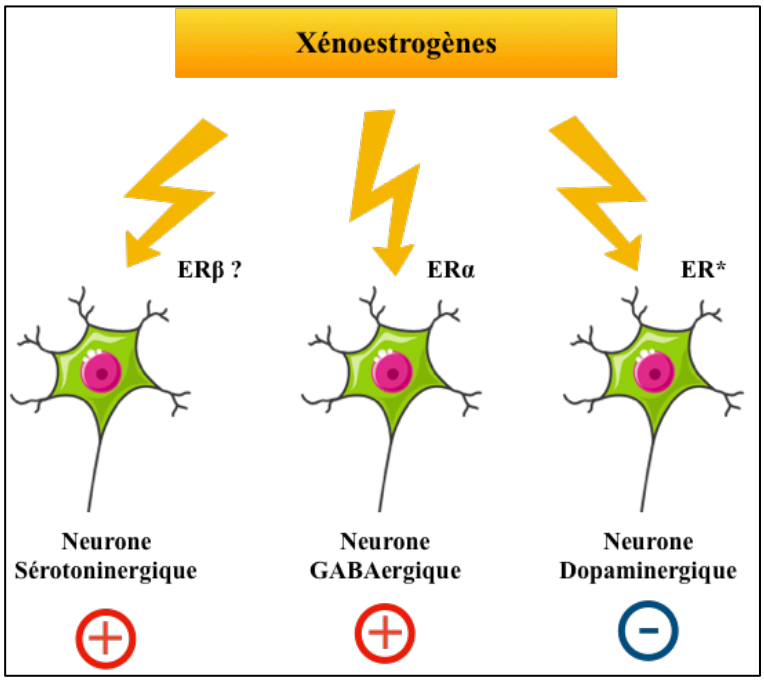


Figure 18 : Représentation schématique des voies d'activation par les xénoestrogènes via les récepteurs aux œstrogènes (ER) des neurones sérotoninergiques, GABAergiques et dopaminergiques. L'effet stimulateur des xénoestrogènes sur l'activité du neurone est représenté par (+) et l'effet inhibiteur est représenté par (-). ER* : type du récepteurs aux œstrogènes non identifié.

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce travail de thèse, notre objectif était d'évaluer les effets de perturbateurs endocriniens oestrogénomimétiques sur l'ontogénèse de l'axe gonadotrope chez le bar européen. Pour atteindre cet objectif principal, il nous a fallu procéder par étapes et apporter des réponses à deux grandes questions :

- Comment se mettent en place les acteurs cérébraux et hypophysaires de l'axe gonadotrope au cours de la phase larvaire ?
- Quel est l'impact des xénoestrogènes sur la mise en place de cet axe durant les phases précoces de la période larvaire ?

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mises en place dans des conditions contrôles en suivant à la fois l'expression des gènes cibles et la distribution neuroanatomique des cellules cibles.

Nos résultats montrent que les acteurs cérébraux (GnRHs et kisspeptines) et hypophysaires (gonadotropines) sont exprimés dès le début du développement larvaire. Puis, au cours de l'ontogénèse, des profils d'expression différents se mettent en place et deux grandes tendances se dégagent : alors que les niveaux de transcrits codant pour *kiss1*, *gnrh2*, *gnrh3* et la sous-unité *fsh*β diminuent au cours du développement larvaire, à l'inverse, ceux codant pour *kiss2, gnrh1* et la sous-unité *lh*β augmentent durant cette période.
Ces résultats montrant l'expression et la régulation de l'expression des acteurs au cours du développement larvaire suggèrent qu'ils jouent un rôle durant cette période même si ceux-ci restent encore à définir.

Au cours de cette même période, les cellules exprimant ces différents acteurs vont s'organiser. Nos résultats montrent que ces cellules apparaissent séquentiellement avec certaines détectées très tôt au niveau cérébral (GnRH2, GnRH3 et kiss2 – 4 jpe) et pour lesquelles les localisations et organisations vont changer au cours du développement larvaire. D'autres cellules sont détectées plus tardivement (kiss1 à partir de 50 jpe) dans une zone cérébrale qui semble être la zone de localisation définitive. Enfin, les cellules exprimant les sous-unités des gonadotropines (lhβ et fshβ) sont détectées à partir de 50 jpe mais de manière surprenante, celles-ci ne sont pas localisées au niveau hypophysaire mais au niveau intestinal.

Les données concernant les neurones à kisspeptines et les cellules à gonadotropines sont, à notre connaissance, inédites et apportent de nouvelles informations chez le bar européen et les téléostéens.

L'ensemble de ces résultats, combinant l'expression et la localisation des cellules, démontre que les différents acteurs neuroendocriniens de l'axe gonadotrope se mettent en place progressivement au cours des premiers stades de vie. Cela rend cette période développementale particulièrement critique, en effet on peut supposer que des perturbations intervenant au cours de ces processus ontogénétiques pourraient « désorganiser » les systèmes et avoir des effets à plus long terme sur le fonctionnement de l'axe reproducteur.

Le second objectif de ce travail de thèse, était d'étudier l'effet d'un perturbateur endocrinien de type oestrogénique (EE2) sur l'expression de ces différents gènes (GnRHs et kisspeptines).

Pour cela, nous avons mis en place un élevage larvaire nous permettant le maintien des larves en bonnes conditions pour les expérimentations durant les stades larvaires précoces (0 à 8 jpe).

Nos résultats d'exposition montrent que durant les premiers stades de vie, l'EE2 perturbe l'ontogénèse des systèmes à GnRH. En effet, la présence de xénœstrogène dans le milieu modifie les niveaux d'expression de *gnrh2* et *gnrh3,* et semble modifier la distribution des neurones.

Ces résultats nécessitent d'être confirmés et complétés par des données à plus long terme couvrant l'ensemble de la période larvaire. Néanmoins, ils apportent de nouvelles données sur les effets des perturbateurs endocriniens œstrogénomimétiques.

Notre étude soulève de nombreuses questions dans le domaine de l'écotoxicologie qui n'ont pas pu être abordées au cours de ce travail mais qui découlent de nos résultats.

Premièrement, il serait utile pour la suite de notre étude, de définir les mécanismes de régulation de ces différents acteurs. La localisation cérébrale des différents récepteurs aux kisspeptines et aux GnRHs constitue une première étape importante dans la compréhension du fonctionnement de ces acteurs au cours du développement larvaire chez le bar européen. Deuxièmement, afin d'évaluer par quelles voies les xénœstrogènes perturbent leur expression et leur localisation, il serait utile d'établir chez la larve de bar européen, la cartographie cérébrale des différents récepteurs aux œstrogènes (nucléaires et membranaires). Sachant que la sélectivité des récepteurs pour les œstrogénomimétiques n'est pas la même pour tous les récepteurs, connaître la localisation de chacun d'eux apparaît comme pertinent afin d'identifier les potentiels types cellulaires perturbés.

Chez les vertébrés, le système à GnRH est régulé finement par de nombreux facteurs, incluant plusieurs neuropeptides et neurotransmetteurs. Dans notre étude nous avons étudié les kisspeptines qui, chez l'adulte augmentent l'expression et la libération de la GnRH, mais il existe d'autres facteurs comme la sérotonine, le GABA, la dopamine, le neuropeptide Y ou encore la GnIH. Il est possible que les xénœstrogènes perturbent l'expression de ces facteurs et *in fine* dérégulent l'axe gonadotrope. Quelques études chez les téléostéens ont déjà démontré la perturbation de l'activité de la sérotonine, du GABA et de la dopamine, après l'exposition à des œstrogénomimétiques. Ainsi, il conviendrait dans de futurs travaux, d'une part d'établir la présence, la localisation et les interactions avec les neurones à GnRH de ces différents acteurs durant le développement larvaire et, d'autre part, d'intégrer ces acteurs lors de l'évaluation des perturbations neuroendocriniennes des œstrogénomimétiques.

Enfin, les conséquences d'une exposition chronique durant la période larvaire et la perturbation des systèmes GnRH et Kisspeptines sur la fonction de reproduction n'ont pas été abordées au cours de ce travail. Il conviendrait, dans une future approche, d'évaluer si la perturbation observée au stade larvaire persiste chez l'adulte et si la reproduction des adultes s'en trouve altérée.

Concernant l'effet des perturbateurs endocriniens, notamment les xénœstrogènes, les champs d'investigation restent vastes, que ce soit sur la diversité des acteurs mis en jeu ou la diversité des composés. En ce sens, il est nécessaire de continuer les recherches dans ce domaine afin d'améliorer la compréhension de l'impact de la pression anthropique sur des zones clés comme l'estuaire ainsi que d'évaluer l'effet « mélange » de ces molécules. Ces recherches permettront de renforcer les connaissances sur l'impact des xénoestrogènes sur la fonction de reproduction des vertébrés et d'évaluer l'impact des perturbateurs endocriniens sur les populations ainsi que sur l'état de santé écologique des systèmes aquatiques.

Références bibliographiques

Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2010. Targeted Gonadotropin-Releasing Hormone-3 Neuron Ablation in Zebrafish: Effects on Neurogenesis, Neuronal Migration, and Reproduction. Endocrinology 151, 332–340. https://doi.org/10.1210/en.2009-0548

Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2009. The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. General and Comparative Endocrinology 164, 151–160. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.01.012

Abraham, E., Palevitch, O., Ijiri, S., Du, S.J., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2008. Early Development of Forebrain Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Neurones and the Role of GnRH as an Autocrine Migration Factor. Journal of Neuroendocrinology 20, 394–405. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01654.x

Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. Environment International 99, 107–119. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010

Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (Mugil cephalus) by removal of dopaminergic inhibition. General and Comparative Endocrinology 142, 212–221. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.01.002

Al Jishi, T., Sergi, C., 2017. Current perspective of diethylstilbestrol (DES) exposure in mothers and offspring. Reproductive Toxicology 71, 71–77. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.009

Almey, A., Milner, T.A., Brake, W.G., 2015. Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. Horm Behav 74, 125–138. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.010

Alvarado, M.V., Carrillo, M., Felip, A., 2013. Expression of kisspeptins and their Receptors, gnrh-1/gnrhr-II-1a and gonadotropin genes in the brain of adult male and female European sea bass during different gonadal stages. General and Comparative Endocrinology 187, 104–116. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.030

Alvarado, M.V., Servili, A., Molés, G., Gueguen, M.M., Carrillo, M., Kah, O., Felip, A., 2016. Actions of sex steroids on kisspeptin expression and other reproduction-related genes in the brain of the teleost fish European sea bass. The Journal of Experimental Biology 219, 3353–3365. https://doi.org/10.1242/jeb.137364

Amano, M., Hyodo, S., Urano, A., Okumoto, N., Kitamura, S., Ikuta, K., Suzuki, Y., Aida, K., 1994. Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17 alpha-methyltestosterone administration in yearling masu salmon, Oncorhynchus masou. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 374–380. https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1136

Amano, M., Okubo, K., Ikuta, K., Kitamura, S., Okuzawa, K., Yamada, H., Aida, K., Yamamori, K., 2002. Ontogenic origin of salmon GnRH neurons in the ventral telencephalon and the preoptic area in masu salmon. General and Comparative Endocrinology 127, 256–262. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00049-7

Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., Guillemin, R., 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 205–210. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(71)80179-1

Ando, H., Shahjahan, Md., Kitahashi, T., 2018. Periodic regulation of expression of genes for kisspeptin, gonadotropin-inhibitory hormone and their receptors in the grass puffer: Implications in seasonal, daily and lunar rhythms of reproduction. General and Comparative Endocrinology 265, 149–153. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.006

Anglade, I., Zandbergen, T., Kah, O., 1993. Origin of the pituitary innervation in the goldfish. Cell Tissue Res. 273, 345–355.

Arai, A.C., 2009. The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. Peptides 30, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.023

Arai, A.C., Xia, Y.-F., Suzuki, E., Kessler, M., Civelli, O., Nothacker, H.-P., 2005. Cancer metastasis-suppressing peptide metastin upregulates excitatory synaptic transmission in hippocampal dentate granule cells. J. Neurophysiol. 94, 3648–3652. https://doi.org/10.1152/jn.00590.2005

Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. Physiol. Rev. 81, 1269–1304. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269

Arini, A., Head, J.A., Murphy, C.A., Carvan, M.J., Goetz, R., Klingler, R.H., Nam, D.-H., Basu, N., 2016. Neuroendocrine biochemical effects in methylmercury-exposed yellow perch. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 187, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.04.001

Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M., 2014. Occurrence of 17α-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. Environment International 69, 104–119. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011

Armstrong, B.M., Lazorchak, J.M., Murphy, C.A., Haring, H.J., Jensen, K.M., Smith, M.E., 2015. Determining the effects of a mixture of an endocrine disrupting compound, 17α-ethinylestradiol, and ammonia on fathead minnow (Pimephales promelas) reproduction. Chemosphere 120, 108–114. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.049

Arnatt, C.K., Zhang, Y., 2013. G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Agonist Dual Binding Mode Analyses Toward Understanding of Its Activation Mechanism: A Comparative Homology Modeling Approach. Molecular Informatics 32, 647–658. https://doi.org/10.1002/minf.201200136

Atkinson, M. and C. Bingman. 1999. The Composition of Several Synthetic Seawater Mixes. March 1999 *Aquarium Frontiers On-line*.

Attisano, L., Wrana, J.L., 1998. Mads and Smads in TGFβ signalling. Current Opinion in Cell Biology 10, 188–194. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80141-5

Barahona-Fernandes, M.H., 1982. Body deformation in hatchery reared European sea bass Dicentrarchus labrax (L). Types, prevalence and effect on fish survival. Journal of Fish Biology 21, 239–249. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb02830.x

Barahona-Fernandes, M.H., Girin, M., Metailler, R., 1977. Experiences de conditionnement d'alevins de bar (Pisces, Dicentrarchus labrax) a differents aliments composes. Aquaculture 10, 53–63. https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90032-1

Bardet, P., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Vanacker, J., 2002. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (Danio rerio). Journal of Molecular Endocrinology 153–163. https://doi.org/10.1677/jme.0.0280153

Barnabé, G., Billard, R., Centre d'aquaculture et d'halieutique, Institut national de la recherche agronomique (Eds.), 1984. L'Aquaculture du bar et des sparidés: INRA, Paris, France.

Barnabe, G., Boulineau-Coatanea, F., Rene, F., 1976. Chronologie de la morphogenese chez le loup ou bar Dicentrarchus labrax (L.) (Pisces, Serranidae) obtenu par reproduction artificielle. Aquaculture 8, 351–363. https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90117-4

Barnabe, G., Le Coz, C., 1987. Large-scale cage rearing of the European sea bass, Dicentrarchus labrax (L.), in tropical waters. Aquaculture 66, 209–221. https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90107-4

Barnabe G. 1973. Compte-rendu sommaire de la campagne 1972-1973 de reproduction contrôlée du loup à Sète. Available from: https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5995/

Barnabe G., T.J.-C., 1972. Experiences de reproduction artificielle de Loup Dicentrarchus labrax (Linne 1758).

Barry, J., Dubois, M.P., 1974. Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LH-RH neurosecretory pathway of the guinea pig during the estrous cycle. Neuroendocrinology 15, 200–208. https://doi.org/10.1159/000122308

Beck, B.H., Fuller, S.A., Peatman, E., McEntire, M.E., Darwish, A., Freeman, D.W., 2012. Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus Morone. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 162, 265–273. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.03.019

Becker, J.B., 1990. Direct effect of 17?-estradiol on striatum: Sex differences in dopamine release. Synapse 5, 157–164. https://doi.org/10.1002/syn.890050211

Bergman, Å., World Health Organization, United Nations Environment Programme, 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. WHO ; UNEP, Genève; Nairobi.

Bertin, A., Inostroza, P.A., Quiñones, R.A., 2009. A theoretical estimation of the concentration of steroid estrogens in effluents released from municipal sewage treatment plants into aquatic

ecosystems of central-southern Chile. Science of The Total Environment 407, 4965–4971. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.05.032
Bethea, C.L., Lu, N.Z., Gundlah, C., Streicher, J.M., 2002. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. Front Neuroendocrinol 23, 41–100. https://doi.org/10.1006/frne.2001.0225
Bilban, M., 2004. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. Journal of Cell Science 117, 1319–1328. https://doi.org/10.1242/jcs.00971
Biran, J., Golan, M., Mizrahi, N., Ogawa, S., Parhar, I.S., Levavi-Sivan, B., 2014. LPXRFa, the piscine ortholog of GnIH, and LPXRF receptor positively regulate gonadotropin secretion in Tilapia (Oreochromis niloticus). Endocrinology 155, 4391–4401. https://doi.org/10.1210/en.2013-2047
Bisenius, E.S., Veeramachaneni, D.N.R., Sammonds, G.E., Tobet, S., 2006. Sex Differences and the Development of the Rabbit Brain: Effects of Vinclozolin. Biol Reprod 75, 469–476. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.052795
Blázquez, M., Navarro-Martín, L., Piferrer, F., 2009. Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 312B, 686–700. https://doi.org/10.1002/jez.b.21286
Bondesson, M., Hao, R., Lin, C.-Y., Williams, C., Gustafsson, J.-Å., 2015. Estrogen receptor signaling during vertebrate development. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1849, 142–151. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.06.005
Borrow, A.P., Handa, R.J., 2017. Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior, in: Vitamins and Hormones. Elsevier, pp. 27–52. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.08.004
Brailoiu, E., Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Mizuo, K., Sklar, L.A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Dun, N.J., 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. J. Endocrinol. 193, 311–321. https://doi.org/10.1677/JOE-07-0017
Brännvall, K., Korhonen, L., Lindholm, D., 2002. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Mol. Cell. Neurosci. 21, 512–520.
Breton, B., Mikolajczyk, T., Popek, W., Bieniarz, K., Epler, P., 1991. Neuropeptide Y stimulates in vivo gonadotropin secretion in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 84, 277–283.
Breton, B., Sambroni, E., 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Gen. Comp. Endocrinol. 101, 155–164. https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0017
Breton, T.S., DiMaggio, M.A., Sower, S.A., Berlinsky, D.L., 2015. Brain aromatase (cyp19a1b) and gonadotropin releasing hormone (gnrh2 and gnrh3) expression during reproductive development and sex change in black sea bass (Centropristis striata). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 181, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.11.020
Bryan GW, Gibbs PE. 1991. Impact of low concentrations of tributyltin (previous termTBT) next term on marine organisms: A review.: Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications Lewis Publishers Inc. pp. 323-361 p.
Bryant, A.S., Greenwood, A.K., Juntti, S.A., Byrne, A.E., Fernald, R.D., 2016. Dopaminergic inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in the cichlid fish Astatotilapia burtoni. J. Exp. Biol. 219, 3861–3865. https://doi.org/10.1242/jeb.147637
Budzinski, H., Forget-Leray, J., Ait-Aissa, S., 2012. Etude de la contamination par les médicaments de l'estuaire de la Seine. Application des capteurs passifs à un meilleur diagnostic de leur présence, flux et impact toxique. (Rapport Seine-Aval 4).
Burzawa-Gerard, E., 1971. [Purification of a pituitary gonadotropic hormone of a teleost fish, the carp (Cyprinus carpio L.)]. Biochimie 53, 545–552.
Cabas, I., Rodenas, M.C., Abellán, E., Meseguer, J., Mulero, V., García-Ayala, A., 2013. Estrogen signaling through the G protein-coupled estrogen receptor regulates granulocyte activation in fish. J. Immunol. 191, 4628–4639. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301613

Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Anderson, P.D., Länge, R., Sumpter, J.P., 2012. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17β-estradiol, estriol, and 17α-ethinylestradiol. Environ. Toxicol. Chem. 31, 1396–1406. https://doi.org/10.1002/etc.1825

Cambré, M., Mareels, G., Corneillie, S., Moons, L., Ollevier, F., Vandesande, F., 1990. Chronological appearance of the different hypophysial hormones in the pituitary of bass larvae (Dicentrarchus labrax) during their early development: An immunocytochemical demonstration. General and Comparative Endocrinology 77, 408–415. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90231-A

Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T.D., Kah, O., Coumailleau, P., 2016. Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. Frontiers in Neuroscience 10. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00112

Carbone, S., Ponzo, O.J., Gobetto, N., Samaniego, Y.A., Reynoso, R., Moguilevsky, J.A., Cutrera, R.A., 2019. Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate on the neuroendocrine regulation of reproduction in adult male rats and its relationship to anxiogenic behavior: Participation of GABAergic system. Hum Exp Toxicol 38, 25–35. https://doi.org/10.1177/0960327118774868

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ 305, 609–613.

Carroll, R.S., Corrigan, A.Z., Gharib, S.D., Vale, W., Chin, W.W., 1989. Inhibin, activin, and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. Mol. Endocrinol. 3, 1969–1976. https://doi.org/10.1210/mend-3-12-1969

Carroll, R.S., Erskine, M.S., Baum, M.J., 1987. Sex difference in the effect of mating on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in a reflex ovulator, the ferret. Endocrinology 121, 1349–1359. https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1349

Cerdá-Reverter, J.M., Muriach, B., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2008. A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (Dicentrarchus labrax): the midbrain and hindbrain. Acta Histochem. 110, 433–450. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.01.001

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2001. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (Dicentrarchus labrax). I. The telencephalon. J. Morphol. 247, 217–228. https://doi.org/10.1002/1097-4687(200103)247:3<217::AID-JMOR1013>3.0.CO;2-U

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2001. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (Dicentrarchus labrax). II. The diencephalon. Journal of Morphology 247, 229–251. https://doi.org/10.1002/1097-4687(200103)247:3<229::AID-JMOR1014>3.0.CO;2-K

Chang, J.P., Pemberton, J.G., 2018. Comparative aspects of GnRH-Stimulated signal transduction in the vertebrate pituitary - Contributions from teleost model systems. Mol. Cell. Endocrinol. 463, 142–167. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.002

Chang, J.P., Peter, R.E., 1983. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, Carassius auratus. Neuroendocrinology 36, 351–357. https://doi.org/10.1159/000123480

Chang, J.P., Van Goor, F., Acharya, S., 1991. Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists and antagonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, Carassius auratus. Neuroendocrinology 54, 202–210. https://doi.org/10.1159/000125877

Chatain, B., 1987. La vessie natatoire chez Dicentrarchus labrax et Sparus auratus. Aquaculture 65, 175–181. https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90261-4

Chedrese, P.J. (Ed.), 2009. Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. Springer US.

Chen, W., Ge, W., 2012. Ontogenic Expression Profiles of Gonadotropins (fshb and lhb) and Growth Hormone (gh) During Sexual Differentiation and Puberty Onset in Female Zebrafish. Biol Reprod 86. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094730

Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A., Herbison, A.E., 2009. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. J. Neuroendocrinol. 21, 673–682. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x

Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. Endocrinology 147, 5817–5825. https://doi.org/10.1210/en.2006-0787

Clelland, E., Peng, C., 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. Molecular and Cellular Endocrinology 312, 42–52. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.009

Clements, R.J., Lawrence, R.C., Blank, J.L., 2009. Effects of intrauterine 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the development and function of the gonadotrophin releasing hormone neuronal system in the male rat. Reprod. Toxicol. 28, 38–45. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.002

Colledge, W. H., 2009. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. Peptides, Kisspeptins 30, 34–41. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.05.006

Colledge, William H., 2009. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. Trends in Endocrinology & Metabolism 20, 115–121. https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.005

Combarnous, Y., 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. Endocr. Rev. 13, 670–691. https://doi.org/10.1210/edrv-13-4-670

Combarnous, Y., Volland-Nail, P., 1997. Les gonadotropines. Editions Quae.

Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J.M., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2009. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. Toxicol In Vitro 23, 1450–1454. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.003

Coumailleau, P., Pellegrini, E., Adrio, F., Diotel, N., Cano-Nicolau, J., Nasri, A., Vaillant, C., Kah, O., 2015. Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. Biochim. Biophys. Acta 1849, 152–162. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.07.002

Counis, R., Laverrière, J.-N., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M.-L., Magre, S., 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. Reprod. Nutr. Dev. 45, 243–254. https://doi.org/10.1051/rnd:2005017

Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. Endocrinology 138, 4613–4621. https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5496

Coves D. 1985. Etat actuel de l'élevage du loup, *Dicentrarchus labrax*, en écloserie. Aquatique revue (3), (27-30).

Cvetković, D., Babwah, A.V., Bhattacharya, M., 2013. Kisspeptin/KISS1R System in Breast Cancer. J Cancer 4, 653–661. https://doi.org/10.7150/jca.7626

Danger, J.-M., Breton, B., Vallarino, M., Fournier, A., Pelletier, G., Vaudry, H., 1991. Neuropeptide-Y in the Trout Brain and Pituitary: Localization, Characterization, and Action on Gonadotropin Release*. Endocrinology 128, 2360–2368. https://doi.org/10.1210/endo-128-5-2360

De Franca, L.R., Bartke, A., Borg, K.E., Cecim, M., Fadden, C.T., Yagi, A., Russell, L.D., 1994. Sertoli cells in testes containing or lacking germ cells: a comparative study of paracrine effects using the W (c-kit) gene mutant mouse model. Anat. Rec. 240, 225–232. https://doi.org/10.1002/ar.1092400209

De Leeuw, R., Van 't Veer, C., Goos, H.J., Van Oordt, P.G., 1988. The dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor binding in the pituitary of the African catfish, Clarias gariepinus. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 408–415.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 10972–10976. https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100

de Winter, J.P., ten Dijke, P., de Vries, C.J.M., van Achterberg, T.A.E., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschueren, K., van den Eijnden-van Raaij, A.J.M., 1996. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. Molecular and Cellular Endocrinology 116, 105–114. https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03705-5

Desroziers, E., Droguerre, M., Bentsen, A.H., Robert, V., Mikkelsen, J.D., Caraty, A., Tillet, Y., Duittoz, A., Franceschini, I., 2012. Embryonic Development of Kisspeptin Neurones in Rat: Kisspeptin in the embryonic rat brain. Journal of Neuroendocrinology 24, 1284–1295. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02333.x

Dickerson, S.M., Gore, A.C., 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. Rev Endocr Metab Disord 8, 143–159. https://doi.org/10.1007/s11154-007-9048-y

Diotel, N., Charlier, T.D., Lefebvre d'Hellencourt, C., Couret, D., Trudeau, V.L., Nicolau, J.C., Meilhac, O., Kah, O., Pellegrini, E., 2018. Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling

within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. Front Neurosci 12, 84. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00084

Diotel, N., Page, Y.L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. Frontiers in Neuroendocrinology 31, 172–192. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003

Doyle, T.K., Haberlin, D., Clohessy, J., Bennison, A., Jessopp, M., 2017. Localised residency and inter-annual fidelity to coastal foraging areas may place sea bass at risk to local depletion. Scientific Reports 7, 45841. https://doi.org/10.1038/srep45841

Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology 55, 1211–1239. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00479-4

Drobnis, E.Z., Nangia, A.K., 2017. Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents. Adv. Exp. Med. Biol. 1034, 13–24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69535-8_3

Dubois, E.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Bogerd, J., Goos, H.J., 2001. Development of three distinct GnRH neuron populations expressing two different GnRH forms in the brain of the African catfish (Clarias gariepinus). J. Comp. Neurol. 437, 308–320.

Dubois, S.L., Acosta-Martínez, M., DeJoseph, M.R., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., Urban, J.H., Levine, J.E., 2015. Positive, But Not Negative Feedback Actions of Estradiol in Adult Female Mice Require Estrogen Receptor α in Kisspeptin Neurons. Endocrinology 156, 1111–1120. https://doi.org/10.1210/en.2014-1851

Dufour, S., Lopez, E., Le Menn, F., Le Belle, N., Baloche, S., Fontaine, Y.A., 1988. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. General and Comparative Endocrinology 70, 20–30. https://doi.org/10.1016/0016-6480(88)90090-1

Dufour, S., Sebert, M.-E., Weltzien, F.-A., Rousseau, K., Pasqualini, C., 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. J. Fish Biol. 76, 129–160. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02499.x

Dufour, S., Weltzien, F.-A., Sebert, M.-E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Pasqualini, C., 2005. Dopaminergic Inhibition of Reproduction in Teleost Fishes: Ecophysiological and Evolutionary Implications. Annals of the New York Academy of Sciences 1040, 9–21. https://doi.org/10.1196/annals.1327.002

Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, Sang D., Choi, H.K., Park, J.-H., Kim, K.W., Inam, E., Kim, Sang Don, 2010. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. Chemosphere 78, 286–293. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.048

Dworatzek, E., Mahmoodzadeh, S., 2017. Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. Pharmacol. Res. 119, 27–35. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.019

Escobar, S., Felip, A., Gueguen, M.-M., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O., Servili, A., 2013a. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Comparative Neurology 521, 933–948. https://doi.org/10.1002/cne.23211

Escobar, S., Servili, A., Espigares, F., Gueguen, M.-M., Brocal, I., Felip, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S., Kah, O., 2013b. Expression of Kisspeptins and Kiss Receptors Suggests a Large Range of Functions for Kisspeptin Systems in the Brain of the European Sea Bass. PLoS ONE 8, e70177. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070177

Espigares, F., Carrillo, M., Gómez, A., Zanuy, S., 2015a. The forebrain-midbrain acts as functional endocrine signaling pathway of Kiss2/Gnrh1 system controlling the gonadotroph activity in the teleost fish European sea bass (Dicentrarchus labrax). Biol. Reprod. 92, 70. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.125138

Espigares, F., Rocha, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S., 2017. Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of kiss1 and gnrh2 neuronal expression. General and Comparative Endocrinology 240, 35–45. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.09.007

Espigares, F., Zanuy, S., Gómez, A., 2015b. Kiss2 as a Regulator of Lh and Fsh Secretion via Paracrine/Autocrine Signaling in the Teleost Fish European Sea Bass (Dicentrarchus labrax)1. Biology of Reproduction 93. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131029

Faheem, M., Jahan, N., Khaliq, S., Lone, K.P., 2019. Modulation of brain kisspeptin expression after bisphenol-A exposure in a teleost fish, Catla catla. Fish Physiology and Biochemistry 45, 33–42. https://doi.org/10.1007/s10695-018-0532-y

Fan, H.G., Wang, D.S., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., 2003. Molecular cloning of the three gonadotropin subunits and early expression of FSHβ during sex differentiation in the nile tilapia, <Emphasis Type="Italic">Oreochromis niloticus</Emphasis>. Fish Physiology and Biochemistry 28, 143–144. https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030502.48938.c0

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gómez, A., 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. Molecular and Cellular Endocrinology 312, 61–71. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.017

Filby, A.L., Aerle, R. van, Duitman, J., Tyler, C.R., 2008. The Kisspeptin/Gonadotropin-Releasing Hormone Pathway and Molecular Signaling of Puberty in Fish1. Biology of Reproduction 78, 278–289. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063420

Fontaine, Y.A., Gerard, E., 1963. [Purification of a gonadotropic factor from the pituitary of a teleost, the carp (Cyprinus carpio L.)]. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 256, 5634–5637.

Franceschini, I., Desroziers, E., 2013. Development and Aging of the Kisspeptin-GPR54 System in the Mammalian Brain: What are the Impacts on Female Reproductive Function? Front Endocrinol (Lausanne) 4, 22. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00022

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. Neuroscience Letters 401, 225–230. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.039

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., Gustafson, E.L., 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 312, 1357–1363. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.066

Gaillard, A.-L., Tay, B.-H., Pérez Sirkin, D.I., Lafont, A.-G., De Flori, C., Vissio, P.G., Mazan, S., Dufour, S., Venkatesh, B., Tostivint, H., 2018. Characterization of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Genes From Cartilaginous Fish: Evolutionary Perspectives. Frontiers in Neuroscience 12. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00607

Garcia Ayala, A., Villaplana, M., Garcia Hernández, M.P., Chaves Pozo, E., Agulleiro, B., 2003. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of Sparus aurata L. (Teleostei). An immunocytochemical study. General and Comparative Endocrinology 134, 72–79. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00198-9

García-Galiano, D., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2012. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. J. Neuroendocrinol. 24, 22–33. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02230.x

Gaspéri, J., Moreau-Guigon, E., Labadie, P., Blanchard, M., Teil, M.J., Tlili, K., Dinh, T.Q., Tran, C., Alliot, F., Desportes, A., others, 2010. Contamination de la Seine par les micropolluants organiques: évolution selon les conditions hydriques et l'urbanisation. Rapp. Act. PIREN-Seine 2010.

Gerbron, M., Geraudie, P., Fernandes, D., Rotchell, J.M., Porte, C., Minier, C., 2014. Evidence of altered fertility in female roach (Rutilus rutilus) from the River Seine (France). Environmental Pollution 191, 58–62. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.015

Girin, M., 1976. La ration alimentaire dans l'élevage larvaire du bar, Dicentrarchus labrax (L.) = The feeding ration in the larval culture of sea bass, Dicentrarchus labrax (L.).

González, A., Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. General and Comparative Endocrinology 132, 223–230. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00086-8

González-Martínez, D., Zmora, N., Mañanos, E., Saligaut, D., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2002a. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides: GnRHs in the Brain and Pituitary of Sea Bass. Journal of Comparative Neurology 446, 95–113. https://doi.org/10.1002/cne.10190

González-Martınez, D., Zmora, N., Saligaut, D., Zanuy, S., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2004. New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (Dicentrarchus labrax). Journal of Chemical Neuroanatomy 28, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.001

González-Martınez, D., Zmora, N., Zanuy, S., Sarasquete C., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2002b. Developmental expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (Dicentrarchus labrax). Journal of Chemical Neuroanatomy 23, 255–267. https://doi.org/10.1016/S0891-0618(02)00004-2

Gonzalez-Martinez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Munoz-Cueto, J.A., Kah, O., 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the european sea bass (Dicentrarchus labrax). The Journal of Comparative Neurology 429, 144–155. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000101)429:1<144::AID-CNE11>3.0.CO;2-B

Gopurappilly, R., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2013. Functional Significance of GnRH and Kisspeptin, and Their Cognate Receptors in Teleost Reproduction. Frontiers in Endocrinology 4. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00024

Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C.A., Selmanoff, M., Chen, T.T., Kah, O., Elizur, A., Zohar, Y., 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (Sparus aurata): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. Biol. Reprod. 55, 636–645. https://doi.org/10.1095/biolreprod55.3.636

Gottsch, M.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. From KISS1 to Kisspeptins: An Historical Perspective and Suggested Nomenclature. Peptides 30, 4–9. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.016

Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., Brand, M., 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. Developmental Biology 295, 263–277. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.040

Gray, P.C., Bilezikjian, L.M., Vale, W., 2001. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. Molecular and Cellular Endocrinology 180, 47–53. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00515-9

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature 320, 134–139. https://doi.org/10.1038/320134a0

Guillette, L.J., Crain, D.A., Gunderson, M.P., Kools, S.A.E., Milnes, M.R., Orlando, E.F., Rooney, A.A., Woodward, A.R., 2000. Alligators and Endocrine Disrupting Contaminants: A Current Perspective. Integr Comp Biol 40, 438–452. https://doi.org/10.1093/icb/40.3.438

Gur, G., Rosenfeld, H., Melamed, P., Meiri, I., Elizur, A., Yaron, Z., 2001. Tilapia glycoprotein hormone a subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation. Molecular and Cellular Endocrinology 12.

Gutiérrez, E., Morales-Nin, B., 1986. Time series analysis of daily growth in Dicentrarchuslabrax L. otoliths. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 103, 163–179. https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90139-5

Guzmán, J.M., Bayarri, M.J., Ramos, J., Zohar, Y., Sarasquete, C., Mañanós, E.L., 2009. Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (Solea senegalensis). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 154, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.623

Haffray, P., C.S. Tsigenopoulos, F. Bonhomme, B. Chatain, A. Magoulas, M. Rye, A. Triantafyllidis and C. Triantaphyllidis. 2007. European sea bass—*Dicentrarchus labrax*. Genimpact final scientific report. pp. 40–46.

Halm, S., Martinez-Rodriguez, G., Rodriguez, L., Prat, F., Mylonas C.C., M., Carrillo, M., Zanuy, S., 2004. Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ERα, ERβ1 and ERβ2) in the European sea bass, Dicentrarchus labrax. Molecular and Cellular Endocrinology 223, 63–75. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.05.009

Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2002. Exposure to exogenous 17beta-oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 60, 285–299.

Hamilton, K.J., Arao, Y., Korach, K.S., 2014. Estrogen hormone physiology: Reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. Reproductive Biology 14, 3–8. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.12.002

Han, S.-K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E., 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J. Neurosci. 25, 11349–11356. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005

Handa, R.J., Hayashi, S., Terasawa, E., Kawata, M., 2001. Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action. CRC Press.

Hauge-Evans, A.C., Richardson, C.C., Milne, H.M., Christie, M.R., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2006. A role for kisspeptin in islet function. Diabetologia 49, 2131–2135. https://doi.org/10.1007/s00125-006-0343-z

Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A., Thomas, P., 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 10751–10756. https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10751

Hazell, G.G.J., Yao, S.T., Roper, J.A., Prossnitz, E.R., O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., 2009. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. Journal of Endocrinology 202, 223–236. https://doi.org/10.1677/JOE-09-0066

Henderson, P.A., Seaby, R.M.H., Somes, J.R., 2011. Community level response to climate change: The long-term study of the fish and crustacean community of the Bristol Channel. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Global change in marine ecosystems 400, 78–89. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.02.028

Herbison, A.E., 1997. Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. Brain Res. Bull. 44, 321–326.

Herbison, A.E., d'Anglemont de Tassigny, X., Doran, J., Colledge, W.H., 2010. Distribution and Postnatal Development of *Gpr54* Gene Expression in Mouse Brain and Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. Endocrinology 151, 312–321. https://doi.org/10.1210/en.2009-0552

Hernandez-Rauda, R., Aldegunde, M., 2002. Effects of acute 17alpha-methyltestosterone, acute 17beta-estradiol, and chronic 17alpha-methyltestosterone on dopamine, norepinephrine and serotonin levels in the pituitary, hypothalamus and telencephalon of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol. 172, 659–667. https://doi.org/10.1007/s00360-002-0282-z

Herzog, W., Sonntag, C., Walderich, B., Odenthal, J., Maischein, H.-M., Hammerschmidt, M., 2004. Genetic Analysis of Adenohypophysis Formation in Zebrafish. Molecular Endocrinology 18, 1185–1195. https://doi.org/10.1210/me.2003-0376

Hiden, U., Bilban, M., Knöfler, M., Desoye, G., 2007. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. Rev Endocr Metab Disord 8, 31–39. https://doi.org/10.1007/s11154-007-9030-8

Hikosaka, O., Sesack, S.R., Lecourtier, L., Shepard, P.D., 2008. Habenula: Crossroad between the Basal Ganglia and the Limbic System. Journal of Neuroscience 28, 11825–11829. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3463-08.2008

Hildahl, J., Sandvik, G.K., Lifjeld, R., Hodne, K., Nagahama, Y., Haug, T.M., Okubo, K., Weltzien, F.A., 2012. Developmental tracing of luteinizing hormone β-subunit gene expression using green fluorescent protein transgenic medaka (*Oryzias latipes*) reveals a putative novel

developmental function. Developmental Dynamics 241, 1665–1677. https://doi.org/10.1002/dvdy.23860
Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (Danio rerio). Environ. Toxicol. 21, 332–337. https://doi.org/10.1002/tox.20203
Hodne, K., Weltzien, F.-A., Oka, Y., Okubo, K., 2013. Expression and Putative Function of Kisspeptins and Their Receptors During Early Development in Medaka. Endocrinology 154, 3437–3446. https://doi.org/10.1210/en.2013-1065
Horner, K.C., 2009. The effect of sex hormones on bone metabolism of the otic capsule – an overview. Hearing Research, Special Issue: Sex Hormones in the Auditory System 252, 56–60. https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.12.004
Houde, E.D., 1989. Comparative growth, mortality and energetic of marine fish larvae: temperature an implied latitudinal effects. Fish. Bull 471–495.
Hoyle, C.H.V., 1999. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. Brain Research 848, 1–25. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01975-7
Hurkadli, K.S., Sheth, A.R., Garde, S.V., Doctor, V.M., Sheth, N.A., 1990. Immunocytochemical localisation of follicle stimulating hormone (FSH) in normal, benign and malignant human prostates. Br J Cancer 61, 225–229.
ICES, 2012. Advice Report European seabass in the Northeast Atlantic (No. 9.4.23)
ICES, 2015. ICES Advice on fishing opportunities, catch, and effort Celtic Seas and Greater North Sea Ecoregions (No. 5.3.43).
ICES. 2018. Report of the Working Group on Celtic Seas Ecoregion (WGCSE), 9–18 May 2018, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2018/ACOM:13. 1887 pp.
IFREMER. FAO Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758). Available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en#tcNA00EA
Iijima, N., Takumi, K., Sawai, N., Ozawa, H., 2011. An immunohistochemical study on the expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody. J. Mol. Neurosci. 43, 146–154. https://doi.org/10.1007/s12031-010-9433-y
Ikeguchi, M., Hirooka, Y., Kaibara, N., 2003. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 129, 531–535. https://doi.org/10.1007/s00432-003-0469-z
Illing, N., Troskie, B.E., Nahorniak, C.S., Hapgood, J.P., Peter, R.E., Millar, R.P., 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (Carassius auratus). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 2526–2531. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2526
Inagaki, T., Smith, N., Lee, E.K., Ramakrishnan, S., 2016. Low dose exposure to Bisphenol A alters development of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons and larval locomotor behavior in Japanese Medaka. Neurotoxicology 52, 188–197. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.003
Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinology 80, 264–272. https://doi.org/10.1159/000083140
Ismail, N.A.H., Wee, S.Y., Aris, A.Z., 2017. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. Chemosphere 188, 375–388. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.150
Jalabert, B., 2005a. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reprod. Nutr. Dev. 45, 261–279. https://doi.org/10.1051/rnd:2005019
Jalabert, B., 2005b. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. Reprod. Nutr. Dev. 45, 261–279. https://doi.org/10.1051/rnd:2005019
Jennings, S., Pawson, M.G., 1992. The origin and recruitment of bass, Dicentrarchus labrax, larvae to nursery areas. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 72, 199–212. https://doi.org/10.1017/S0025315400048888

Jezierska, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiology and Biochemistry 35, 625–640. https://doi.org/10.1007/s10695-008-9284-4

Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 2002. Wild Intersex Roach (Rutilus rutilus) Have Reduced Fertility1. Biology of Reproduction 67, 515–524. https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.515

Johnson, D.W., Katavic, I., 1986. Survival and growth of sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae as influenced by temperature, salinity, and delayed initial feeding. Aquaculture 52, 11–19. https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90102-X

Jolly, C., Rousseau, K., Prézeau, L., Vol, C., Tomkiewicz, J., Dufour, S., Pasqualini, C., 2016. Functional Characterisation of Eel Dopamine D2 Receptors and Involvement in the Direct Inhibition of Pituitary Gonadotrophins. J. Neuroendocrinol. 28. https://doi.org/10.1111/jne.12411

Jr, L.J.G., Gross, T.S., Masson, G.R., Woodwardff, A.R., 1994. Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. Environmental Health Perspectives 102, 9.

Kagawa, H., Kawazoe, I., Tanaka, H., Okuzawa, K., 1998. Immunocytochemical Identification of Two Distinct Gonadotropic Cells (GTH I and GTH II) in the Pituitary of Bluefin Tuna,Thunnus thynnus. General and Comparative Endocrinology 110, 11–18. https://doi.org/10.1006/gcen.1997.7049

Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., de Monbrison, D., 1993. The reproductive brain in fish. Fish Physiology and Biochemistry 11, 85–98. https://doi.org/10.1007/BF00004554

Kah, O., Anglade, I., Linard, B., Pakdel, F., Salbert, G., Bailhache, T., Ducouret, B., Saligaut, C., Le Goff, P., Valotaire, Y., Jégo, P., 1997. Estrogen receptors in the brain-pituitary complex and the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in rainbow trout. Fish Physiology and Biochemistry 17, 53–62. https://doi.org/10.1023/A:1007749715473

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., Lareyre, J.J., 2007a. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. General and Comparative Endocrinology 153, 346–364. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.030

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., Lareyre, J.J., 2007b. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. General and Comparative Endocrinology 153, 346–364. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.030

Kah, O., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Chang, J.P., Dubourg, P., Yu, K.L., Peter, R.E., 1992. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. Neuroendocrinology 55, 396–404. https://doi.org/10.1159/000126150

Kanda, S., 2018. Evolution of the regulatory mechanisms for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrates-hypothesis from a comparative view. Gen. Comp. Endocrinol. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.11.014

Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Oka, Y., 2008. Identification of KiSS-1 Product Kisspeptin and Steroid-Sensitive Sexually Dimorphic Kisspeptin Neurons in Medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology 149, 2467–2476. https://doi.org/10.1210/en.2007-1503

Kanda, S., Karigo, T., Oka, Y., 2012. Steroid Sensitive kiss2 Neurones in the Goldfish: Evolutionary Insights into the Duplicate Kisspeptin Gene-Expressing Neurones: Steroid sensitive kiss2 neurones. Journal of Neuroendocrinology 24, 897–906. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02296.x

Kaprara, A., Huhtaniemi, I.T., 2018. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. Metab. Clin. Exp. 86, 3–17. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018

Kaplan, S.L., Grumbach, M.M., 1976. The ontogenesis of human foetal hormones. II. Luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). Acta Endocrinol. 81, 808–829.

Kaslin, J., Ganz, J., Brand, M., 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 363, 101–122. https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2015

Kauffman, A.S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2007. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. Trends Neurosci. 30, 504–511. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.001

Kauffman, A.S., Smith, J.T., 2013. Kisspeptin signaling in reproductive biology. Springer, New York, NY.

Kavlock, R.J., Daston, G.R., DeRosa, C., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Rolland, R., Sheehan, M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-sponsored Workshop. Environmental Health Perspectives 104, 26.

Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (Danio rerio) juveniles. Aquat. Toxicol. 69, 25–34. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.008

Kelley, D.F., 1988. The importance of estuaries for sea-bass, Dicentrarchus labrax (L.). Journal of Fish Biology 33, 25–33. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05555.x

Khan, I.A., Thomas, P., 2006. PCB congener-specific disruption of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. Mar. Environ. Res. 62 Suppl, S25-28. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.029

Khan, I.A., Thomas, P., 2001. Disruption of neuroendocrine control of luteinizing hormone secretion by aroclor 1254 involves inhibition of hypothalamic tryptophan hydroxylase activity. Biol. Reprod. 64, 955–964. https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.955

Khan, I.A., Thomas, P., 1993. Immunocytochemical localization of serotonin and gonadotropin-releasing hormone in the brain and pituitary gland of the Atlantic croaker Micropogonias undulatus. Gen. Comp. Endocrinol. 91, 167–180. https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1116

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 8897–8901. https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104

Kim, J.H., Cho, H.T., Kim, Y.J., 2014. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. Endocr. J. 61, 1055–1067.

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009a. Cloning and Expression of *kiss2* in the Zebrafish and Medaka. Endocrinology 150, 821–831. https://doi.org/10.1210/en.2008-0940

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009b. Cloning and Expression of kiss2 in the Zebrafish and Medaka. Endocrinology 150, 821–831. https://doi.org/10.1210/en.2008-0940

Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. Nat. Rev. Immunol. 16, 626–638. https://doi.org/10.1038/nri.2016.90

Knobil, E., 1980. The Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle11The studies from the author's laboratory have been generously supported by grants R01 HD03968, P30 HD08610, and 5T32 HD07116 from the National Institutes of Health and by grants from the Ford Foundation., in: Greep, R.O. (Ed.), Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference, Recent Progress in Hormone Research. Academic Press, Boston, pp. 53–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571136-4.50008-5

Korach, K.S., Wintermantel, T. (Eds.), 2007. Tissue-Specific Estrogen Action: Novel Mechanisms, Novel Ligands, Novel Therapies, Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Kortenkamp, A., 2014. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. Current Opinion in Pharmacology 19, 105–111. https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.08.006

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.-M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. Journal of Biological Chemistry 276, 34631–34636. https://doi.org/10.1074/jbc.M104847200

Kouki, T., Kawamura, K., Kikuyama, S., 1998. Developmental studies for identification of the inhibitory center of melanotropes in the toad, Bufo japonicus. Dev. Growth Differ. 40, 651–658.

Kruseman, A.C.N., Linton, ElizabethA., Rees, LesleyH., Lowry, P.J., Besser, G.M., 1982. CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR IMMUNOREACTIVITY IN HUMAN

GASTROINTESTINAL TRACT. The Lancet, Originally published as Volume 2, Issue 8310 320, 1245–1246. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)90105-2

Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 5925–5930. https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925

Kumar, D., Periasamy, V., Freese, M., Voigt, A., Boehm, U., 2015. In Utero Development of Kisspeptin/GnRH Neural Circuitry in Male Mice. Endocrinology 156, 3084–3090. https://doi.org/10.1210/EN.2015-1412

Lafont, A.-G., Rousseau, K., Tomkiewicz, J., Dufour, S., 2016. Three nuclear and two membrane estrogen receptors in basal teleosts, Anguilla sp.: Identification, evolutionary history and differential expression regulation. General and Comparative Endocrinology 235, 177–191. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.11.021

Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushitani, H., Kobayashi, T., Hirai, T., Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2012. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. Aquat. Toxicol. 109, 250–258. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.004

Lange, A., Paull, G.C., Coe, T.S., Katsu, Y., Urushitani, H., Iguchi, T., Tyler, C.R., 2009. Sexual Reprogramming and Estrogenic Sensitization in Wild Fish Exposed to Ethinylestradiol. Environmental Science & Technology 43, 1219–1225. https://doi.org/10.1021/es802661p

Länge, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P., 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (Pimephales promelas). Environ. Toxicol. Chem. 20, 1216–1227.

Länge, Reinhard, Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P., 2001. Effects of the synthetic estrogen 17α-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry 20, 1216–1227. https://doi.org/10.1002/etc.5620200610

Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.-M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., Seminara, S.B., 2007. *Kiss1* $^{-/-}$ Mice Exhibit More Variable Hypogonadism than *Gpr54* $^{-/-}$ Mice. Endocrinology 148, 4927–4936. https://doi.org/10.1210/en.2007-0078

Lapthorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., Isaacs, N.W., 1994a. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature 369, 455–461. https://doi.org/10.1038/369455a0

Lapthorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., Isaacs, N.W., 1994b. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature 369, 455–461. https://doi.org/10.1038/369455a0

Larsson, L.I., 1980. Immunocytochemical characterization of ACTH-like immunoreactivity in cerebral nerves and in endocrine cells of the pituitary and gastrointestinal tract by using region-specific antisera. J Histochem Cytochem. 28, 133–141. https://doi.org/10.1177/28.2.6243680

Le Page, Y., Vosges, M., Servili, A., Brion, F., Kah, O., 2011. Neuroendocrine Effects of Endocrine Disruptors in Teleost Fish. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 14, 370–386. https://doi.org/10.1080/10937404.2011.578558

Lee, J.-H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. JNCI Journal of the National Cancer Institute 88, 1731–1737. https://doi.org/10.1093/jnci/88.23.1731

Lee, J.H., Welch, D.R., 1997. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. Cancer Res. 57, 2384–2387.

Lee, Y.-H., Du, J.-L., Shih, Y.-S., Jeng, S.-R., Sun, L.-T., Chang, C.-F., 2004. In vivo and in vitro sex steroids stimulate seabream gonadotropin-releasing hormone content and release in the protandrous black porgy, Acanthopagrus schlegeli. Gen. Comp. Endocrinol. 139, 12–19. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.010

Legler, J., Zeinstra, L.M., Schuitemaker, F., Lanser, P.H., Bogerd, J., Brouwer, A., Vethaak, A.D., De Voogt, P., Murk, A.J., Van der Burg, B., 2002. Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. Environ. Sci. Technol. 36, 4410–4415.

Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2010. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. Brain Res. 1364, 90–102. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.020

Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J.-A., Lareyre, J.-J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. General and Comparative Endocrinology 135, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.10.007

Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. General and Comparative Endocrinology 165, 412–437. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.019

Li, Q., Roa, A., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2012. Seasonal Variation in the Gonadotropin-Releasing Hormone Response to Kisspeptin in Sheep: Possible Kisspeptin Regulation of the Kisspeptin Receptor. Neuroendocrinology 96, 212–221. https://doi.org/10.1159/000335998

Linard, B., Anglade, I., Corio, M., Navas, J.M., Pakdel, F., Saligaut, C., Kah, O., 1996. Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. Neuroendocrinology 63, 156–165. https://doi.org/10.1159/000126952

Linard, B., Bennani, S., Saligaut, C., 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Gen. Comp. Endocrinol. 99, 192–196. https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1101

Liney, K.E., Jobling, S., Shears, J.A., Simpson, P., Tyler, C.R., 2005. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (Rutilus rutilus) exposed to effluents from wastewater treatment works. Environ. Health Perspect. 113, 1299–1307. https://doi.org/10.1289/ehp.7921

Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., Guillemin, R., 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. Nature 321, 779–782. https://doi.org/10.1038/321779a0

Liu, N.-A., Huang, H., Yang, Z., Herzog, W., Hammerschmidt, M., Lin, S., Melmed, S., 2003. Pituitary Corticotroph Ontogeny and Regulation in Transgenic Zebrafish. Molecular Endocrinology 17, 959–966. https://doi.org/10.1210/me.2002-0392

Liu, X., Zhu, P., Sham, K.W.Y., Yuen, J.M.L., Xie, C., Zhang, Y., Liu, Y., Li, S., Huang, X., Cheng, C.H.K., Lin, H., 2009. Identification of a Membrane Estrogen Receptor in Zebrafish with Homology to Mammalian GPER and Its High Expression in Early Germ Cells of the Testis1. Biology of Reproduction 80, 1253–1261. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070250

Liu, Y., Tang, H., Xie, R., Li, S., Liu, X., Lin, H., Zhang, Y., Cheng, C.H.K., 2017. Genetic Evidence for Multifactorial Control of the Reproductive Axis in Zebrafish. Endocrinology 158, 604–611. https://doi.org/10.1210/en.2016-1540

Luo, Q., Li, W., Li, M., Zhang, X., Zhang, H., 2016. Leptin/leptinR-kisspeptin/kiss1r-GnRH pathway reacting to regulate puberty onset during negative energy balance. Life Sci. 153, 207–212. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.048

Ma, C.H., Dong, K.W., Yu, K.L., 2000. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (Carassius auratus). Biochim. Biophys. Acta 1490, 145–152. https://doi.org/10.1016/s0167-4781(99)00235-3

Mager, E.M., Medeiros, L.R., Lange, A.P., McDonald, M.D., 2012. The toadfish serotonin 2A (5-HT(2A)) receptor: molecular characterization and its potential role in urea excretion. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 163, 319–326. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.013

Magliulo-Cepriano, L., Schreibman, M.P., Blüm, V., 1994. Distribution of Variant Forms of Immunoreactive Gonadotropin-Releasing Hormone and β-Gonadotropins I and II in the Platyfish, Xiphophorus maculatus, from Birth to Sexual Maturity. General and Comparative Endocrinology 94, 135–150. https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1067

Majumder, S., Das, S., Moulik, S.R., Mallick, B., Pal, P., Mukherjee, D., 2015. G-protein coupled estrogen receptor (GPER) inhibits final oocyte maturation in common carp, Cyprinus carpio. General and Comparative Endocrinology 211, 28–38. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.011

Mañanos, E.L., Anglade, I., Chyb, J., Saligaut, C., Breton, B., Kah, O., 1999. Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. Neuroendocrinology 69, 269–280. https://doi.org/10.1159/000054428

Mañanós, E.L., Núñez Rodríguez, J., Le Menn, F., Sanuy, S., Carrillo, M., 1997. Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish, the Mediterranean sea bass (Dicentrarchus labrax). Reprod. Nutr. Dev. 37, 51–61.

Mandrekar, P.S., Sheth, A.R., Doctor, V.M., Zaveri, J.P., Sheth, N.A., 1990. Immunocytochemical localization of follicle stimulating hormone in normal human stomach. The Anatomical Record 227, 334–339. https://doi.org/10.1002/ar.1092270308

Manolagas, S.C., O'Brien, C.A., Almeida, M., 2013. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. Nat Rev Endocrinol 9, 699–712. https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.179

Marečková, K., Chakravarty, M.M., Lawrence, C., Leonard, G., Perusse, D., Perron, M., Pike, B.G., Richer, L., Veillette, S., Pausova, Z., Paus, T., 2015. Identifying craniofacial features associated with prenatal exposure to androgens and testing their relationship with brain development. Brain Struct Funct 220, 3233–3244. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0852-3

Markkula, M., Hämäläinen, T., Loune, E., Huhtaniemi, I., 1995. The follicle-stimulating hormone (FSH) beta- and common alpha-subunits are expressed in mouse testis, as determined in wild-type mice and those transgenic for the FSH beta-subunit/herpes simplex virus thymidine kinase fusion gene. Endocrinology 136, 4769–4775. https://doi.org/10.1210/en.136.11.4769

Marvel, M., Spicer, O.S., Wong, T.-T., Zmora, N., Zohar, Y., 2018. Knockout of the Gnrh genes in zebrafish: effects on reproduction and potential compensation by reproductive and feeding-related neuropeptides. Biol. Reprod. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy078

Marvel, M.M., Spicer, O.S., Wong, T.-T., Zmora, N., Zohar, Y., 2019. Knockout of Gnrh2 in zebrafish (Danio rerio) reveals its roles in regulating feeding behavior and oocyte quality. Gen. Comp. Endocrinol. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.04.002

Matsuda, K., Nakamura, K., Shimakura, S.-I., Miura, T., Kageyama, H., Uchiyama, M., Shioda, S., Ando, H., 2008. Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, Carassius auratus. Horm Behav 54, 83–89. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.01.011

Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A., Schally, A.V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1334–1339. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(71)80019-0

McCarthy, M.M., 2008. Estradiol and the developing brain. Physiol. Rev. 88, 91–124. https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2007

McLachlan, R.I., 2000. The endocrine control of spermatogenesis. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 14, 345–362. https://doi.org/10.1053/beem.2000.0084

McMillin, M., DeMorrow, S., Glaser, S., Venter, J., Kyritsi, K., Zhou, T., Grant, S., Giang, T., Greene, J.F., Wu, N., Jefferson, B., Meng, F., Alpini, G., 2017. Melatonin inhibits hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release and reduces biliary hyperplasia and fibrosis in cholestatic rats. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 313, G410–G418. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00421.2016

Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., Davenport, A.P., 2007. Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. Endocrinology 148, 140–147. https://doi.org/10.1210/en.2006-0818

Mechaly, A.S., Viñas, J., Piferrer, F., 2013. The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes. General and Comparative Endocrinology 188, 258–268. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.04.010

Mechaly, A.S., Viñas, J., Piferrer, F., 2011. Gene structure analysis of kisspeptin-2 (Kiss2) in the Senegalese sole (Solea senegalensis): Characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species. Molecular and Cellular Endocrinology 339, 14–24. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.03.004

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular Characterization of Three Estrogen Receptor Forms in Zebrafish: Binding Characteristics,

Transactivation Properties, and Tissue Distributions1. Biology of Reproduction 66, 1881–1892. https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1881
Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.-M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J. Comp. Neurol. 485, 304–320. https://doi.org/10.1002/cne.20497
Messager, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A.J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proceedings of the National Academy of Sciences 102, 1761–1766. https://doi.org/10.1073/pnas.0409330102
Migaud, H., Ismail, R., Cowan, M., Davie, A., 2012. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (Dicentrarchus labrax). General and Comparative Endocrinology 179, 384–399. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.07.033
Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Sci. Total Environ. 343, 1–34. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.070
Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Tutundjian, R., Bocquené, G., Leboulenger, F., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (Dreissena polymorpha). Environ. Toxicol. Chem. 25, 112–119.
Miranda, L.A., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2001. Immunocytochemical Identification of GtH1 and GtH2 Cells during the Temperature-Sensitive Period for Sex Determination in Pejerrey, Odontesthes bonariensis. General and Comparative Endocrinology 124, 45–52. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7687
Mitani, Y., Kanda, S., Akazome, Y., Zempo, B., Oka, Y., 2010. Hypothalamic Kiss1 but Not Kiss2 Neurons Are Involved in Estrogen Feedback in Medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology 151, 1751–1759. https://doi.org/10.1210/en.2009-1174
Miwa, S., Yan, L., Swanson, P., 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. Biol. Reprod. 50, 629–642. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.629
Miwa, Satoshi, Yan, L., Swanson, P., 1994. Localization of Two Gonadotropin Receptors in the Salmon Gonad by in Vitro Ligand Autoradiography. Biol Reprod 50, 629–642. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.629
Mohamed, J.S., Benninghoff, A.D., Holt, G.J., Khan, I.A., 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. Journal of Molecular Endocrinology 38, 235–244. https://doi.org/10.1677/jme.1.02182
Moles, G., Carrillo, M., Mañanós, E., Mylonas, C.C., Zanuy, S., 2007. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). General and Comparative Endocrinology 150, 75–86. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.07.012
Molés, G., Zanuy, S., Muñoz, I., Crespo, B., Martínez, I., Mañanós, E., Gómez, A., 2011. Receptor Specificity and Functional Comparison of Recombinant Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Gonadotropins (Fsh and Lh) Produced in Different Host Systems1. Biology of Reproduction 84, 1171–1181. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086470
Moncaut, N., Somoza, G., Power, D.M., Canário, A.V.M., 2005. Five gonadotrophin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. J. Mol. Endocrinol. 34, 767–779. https://doi.org/10.1677/jme.1.01757
Morin, J., Brind'Amour, A., Fisson, C., Bacq, N., Boulet, M., Guillerme, D., Berthelé, O., Martin, J., 2015. Peuplements halieutiques en estuaire de Seine et baie de Seine orientale – Distribution et évolution des abondances des principales espèces capturées au chalut à perche lors des campagnes scientifiques réalisées par l'Ifremer entre 1995 et 2010. (Rapport d'étude).
Morley, B.J., Murrin, L.C., 1989. AF64 depletes hypothalamic high-affinity choline uptake and disrupts the circadian rhythm of locomotor activity without altering the density of nicotinic acetylcholine receptors. Brain Res. 504, 238–246. https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91363-2

Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R., 1996. ERI3" identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Letters 5.

Mouriec, K., Lareyre, J.J., Tong, S.K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., Anglade, I., 2009. Early regulation of brain aromatase (cyp19a1b) by estrogen receptors during zebrafish development. Dev. Dyn. 238, 2641–2651. https://doi.org/10.1002/dvdy.22069

Muñoz-Cueto, J.A., Paullada-Salmerón, J.A., Aliaga-Guerrero, M., Cowan, M.E., Parhar, I.S., Ubuka, T., 2017. A Journey through the Gonadotropin-Inhibitory Hormone System of Fish. Frontiers in Endocrinology 8. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00285

Muriach, B., Cerdá-Reverter, J.M., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2008a. Molecular characterization and central distribution of the estradiol receptor alpha (ERalpha) in the sea bass (Dicentrarchus labrax). J. Chem. Neuroanat. 35, 33–48. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.05.010

Muriach, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Cerdá-Reverter, J.M., 2008b. Distribution of estrogen receptor 2 mRNAs (Esr2a and Esr2b) in the brain and pituitary of the sea bass (Dicentrarchus labrax). Brain Res. 1210, 126–141. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.053

Nagler, J.J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D.G., Rexroad, C., 2007. The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ERalpha2 and both ERbeta isoforms. Gene 392, 164–173. https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.030

NAKAMURA M., TAKAHASHI H., 1973. Gonadal sex differentiation in Tilapia mossambica, with special regard to the time of ostrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 24, 1-13.

Nakamura, Y., Aoki, S., Xing, Y., Sasano, H., Rainey, W.E., 2007. Metastin stimulates aldosterone synthesis in human adrenal cells. Reprod Sci 14, 836–845. https://doi.org/10.1177/1933719107307823

Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. Environmental Health Perspectives 112, 1725–1733. https://doi.org/10.1289/ehp.7209

Naugle, M.M., Gore, A.C., 2014. GnRH Neurons of Young and Aged Female Rhesus Monkeys Co-Express GPER but Are Unaffected by Long-Term Hormone Replacement. Neuroendocrinology 100, 334–346. https://doi.org/10.1159/000369820

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2005. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. Endocrinology 146, 1689–1697. https://doi.org/10.1210/en.2004-1353

Navas, J.M., Anglade, I., Bailhache, T., Pakdel, F., Breton, B., Jégo, P., Kah, O., 1995. Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. J. Comp. Neurol. 363, 461–474. https://doi.org/10.1002/cne.903630309

NCBI : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore

Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. General and Comparative Endocrinology 192, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032

Nemeskéri, Á., Sétáló, G., Halász, B., 1988. Ontogenesis of the Three Parts of the Fetal Rat Adenohypophysis. NEN 48, 534–543. https://doi.org/10.1159/000125060

Nestor, C.C., Kelly, M.J., Rønnekleiv, O.K., 2014. Cross-talk between reproduction and energy homeostasis: central impact of estrogens, leptin and kisspeptin signaling. Horm Mol Biol Clin Investig 17, 109–128. https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0050

Netchine, I., Sobrier, M.L., Krude, H., Schnabel, D., Maghnie, M., Marcos, E., Duriez, B., Cacheux, V., Moers, A. v, Goossens, M., Grüters, A., Amselem, S., 2000. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. Nat. Genet. 25, 182–186. https://doi.org/10.1038/76041

Nichols, D.E., Nichols, C.D., 2008. Serotonin receptors. Chem. Rev. 108, 1614–1641. https://doi.org/10.1021/cr078224o

Nocillado, J.N., Zohar, Y., Biran, J., Levavi-Sivan, B., Elizur, A., 2013. Chronic kisspeptin administration stimulated gonadal development in pre-pubertal male yellowtail kingfish (Seriola lalandi; Perciformes) during the breeding and non-breeding season. General and Comparative Endocrinology 191, 168–176. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.005

Noel, S.D., Keen, K.L., Baumann, D.I., Filardo, E.J., Terasawa, E., 2009. Involvement of G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) in Rapid Action of Estrogen in Primate LHRH Neurons. Molecular Endocrinology 23, 349–359. https://doi.org/10.1210/me.2008-0299

Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Dickhoff, W.W., Nakai, Y., Suzuki, K., Kawauchi, H., 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (Salmo gairdneri irideus). General and Comparative Endocrinology 77, 358–367. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90225-B

Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Miyata, K., Nakai, Y., Oota, Y., Suzuki, K., Kawauchi, H., 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. General and Comparative Endocrinology 77, 348–357. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90224-A

Nurulnadia, M.Y., Koyama, J., Uno, S., Kito, A., Kokushi, E., Bacolod, E.T., Ito, K., Chuman, Y., 2014. Accumulation of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the polychaete Paraprionospio sp. from the Yodo River mouth, Osaka Bay, Japan. Environmental Monitoring and Assessment 186, 1453–1463. https://doi.org/10.1007/s10661-013-3466-y

Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin Signaling in the Brain. Endocrine Reviews 30, 713–743. https://doi.org/10.1210/er.2009-0005

Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2001. Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 4TH International Symposium on Fish Endocrinology 129, 441–448. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00374-8

Ogawa, S., Akiyama, G., Kato, S., Soga, T., Sakuma, Y., Parhar, I.S., 2006. Immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone type-III suppresses male reproductive behavior of cichlids. Neurosci. Lett. 403, 201–205. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.02.041

Ogawa, S., Parhar, I.S., 2013. Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts. Gen. Comp. Endocrinol. 181, 169–174. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.023

Ogawa, S., Sivalingam, M., Biran, J., Golan, M., Anthonysamy, R.S., Levavi-Sivan, B., Parhar, I.S., 2016. Distribution of LPXRFa, a gonadotropin-inhibitory hormone ortholog peptide, and LPXRFa receptor in the brain and pituitary of the tilapia: GnIH and GnIHR in the brain and pituitary of tilapia. Journal of Comparative Neurology 524, 2753–2775. https://doi.org/10.1002/cne.23990

Ohga, H., Selvaraj, S., Matsuyama, M., 2018. The Roles of Kisspeptin System in the Reproductive Physiology of Fish With Special Reference to Chub Mackerel Studies as Main Axis. Front Endocrinol (Lausanne) 9, 147. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00147

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature 411, 613–617. https://doi.org/10.1038/35079135

Okubo, K., Ishii, S., Ishida, J., Mitani, H., Naruse, K., Kondo, M., Shima, A., Tanaka, M., Asakawa, S., Shimizu, N., Aida, K., 2003. A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka Oryzias latipes: evolutionary and functional implications. Gene 314, 121–131.

Okubo, K., Sakai, F., Lau, E.L., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Naruse, K., Aida, K., Nagahama, Y., 2006. Forebrain Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Development: Insights from Transgenic Medaka and the Relevance to X-Linked Kallmann Syndrome. Endocrinology 147, 1076–1084. https://doi.org/10.1210/en.2005-0468

Olivereau, M., Ball, J.N., 1964. [CONTRIBUTION TO THE HISTOPHYSIOLOGY OF THE PITUITARY GLAND OF TELEOSTS, PARTICULARLY THOSE OF THE POECILIA SPECIES]. Gen. Comp. Endocrinol. 4, 523–532.

Osugi, T., Daukss, D., Gazda, K., Ubuka, T., Kosugi, T., Nozaki, M., Sower, S.A., Tsutsui, K., 2012. Evolutionary origin of the structure and function of gonadotropin-inhibitory hormone: insights from lampreys. Endocrinology 153, 2362–2374. https://doi.org/10.1210/en.2011-2046

Pakdel, F., Gac, F.L., Goff, P.L., Valotaire, Y., 1990a. Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. Molecular and Cellular Endocrinology 71, 195–204. https://doi.org/10.1016/0303-7207(90)90025-4

Pakdel, F., Gac, F.L., Goff, P.L., Valotaire, Y., 1990b. Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. Molecular and Cellular Endocrinology 71, 195–204. https://doi.org/10.1016/0303-7207(90)90025-4

Palevitch, O., Kight, K., Abraham, E., Wray, S., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2006. Ontogeny of the GnRH systems in zebrafish brain: in situ hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. Cell and Tissue Research 327, 313–322. https://doi.org/10.1007/s00441-006-0279-0

Pandolfi, M., Parhar, I., Ravaglia, M., Meijide, F., Maggese, C., Paz, D., 2002. Ontogeny and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the brain of the cichlid fish Cichlasoma dimerus. Anatomy and Embryology 205, 271–281. https://doi.org/10.1007/s00429-002-0253-x

Pang, Y., Dong, J., Thomas, P., 2008. Estrogen Signaling Characteristics of Atlantic Croaker G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) and Evidence It Is Involved in Maintenance of Oocyte Meiotic Arrest. Endocrinology 149, 3410–3426. https://doi.org/10.1210/en.2007-1663

Pang, Y., Thomas, P., 2009. Involvement of estradiol-17beta and its membrane receptor, G protein coupled receptor 30 (GPR30) in regulation of oocyte maturation in zebrafish, Danio rario. Gen. Comp. Endocrinol. 161, 58–61. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.10.003

Papkoff, H., Mahlmann, L.J., Li, C.H., 1967. Some chemical and physical properties of human pituitary follicle-stimulating hormone. Biochemistry 6, 3976–3982. https://doi.org/10.1021/bi00864a045

Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, Oryzias latipes. Mar. Environ. Res. 50, 181–184.

Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2005. Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 2204–2209. https://doi.org/10.1073/pnas.0409494102

Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2004. Laser-Captured Single Digoxigenin-Labeled Neurons of Gonadotropin-Releasing Hormone Types Reveal a Novel G Protein-Coupled Receptor (Gpr54) during Maturation in Cichlid Fish. Endocrinology 145, 3613–3618. https://doi.org/10.1210/en.2004-0395

Park, J.W., Kim, J.-H., Jin, Y.H., Kwon, J.Y., 2012a. Expression Profiles of Kiss2, GPR54 and GnRH Receptor I mRNAs in the Early Life Stage of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus 16, 9.

Park, J.W., Kim, J.-H., Jin, Y.H., Kwon, J.Y., 2012b. Expression Profiles of Kiss2, GPR54 and GnRH Receptor I mRNAs in the Early Life Stage of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus 16, 9.

Pasqualini, C., Olivier, V., Guibert, B., Frain, O., Leviel, V., 2002. Acute Stimulatory Effect of Estradiol on Striatal Dopamine Synthesis. Journal of Neurochemistry 65, 1651–1657. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041651.x

Pasquier, J., Kamech, N., Lafont, A.-G., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2014. Molecular evolution of GPCRs: Kisspeptin/kisspeptin receptors. J. Mol. Endocrinol. 52, T101-117. https://doi.org/10.1530/JME-13-0224

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Denis, F., Lefranc, B., Dubessy, C., Moreno-Herrera, A., Vaudry, H., Leprince, J., Dufour, S., Rousseau, K., 2017. Eel Kisspeptins: Identification, Functional Activity, and Inhibition on both Pituitary LH and GnRH Receptor Expression. Front Endocrinol (Lausanne) 8, 353. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00353

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Jeng, S.-R., Morini, M., Dirks, R., van den Thillart, G., Tomkiewicz, J., Tostivint, H., Chang, C.-F., Rousseau, K., Dufour, S., 2012a. Multiple Kisspeptin Receptors in Early Osteichthyans Provide New Insights into the Evolution of This Receptor Family. PLoS ONE 7, e48931. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048931

Pasquier, J., Lafont, A.-G., Leprince, J., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, Anguilla anguilla.

General and Comparative Endocrinology 173, 216–225. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.05.019
Pasquier, J., Lafont, A.-G., Tostivint, H., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2012b. Comparative Evolutionary Histories of Kisspeptins and Kisspeptin Receptors in Vertebrates Reveal Both Parallel and Divergent Features. Frontiers in Endocrinology 3. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00173
Patisaul, H.B., 2013. Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the kisspeptin system. Adv. Exp. Med. Biol. 784, 455–479. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6199-9_21
Paullada-Salmerón, J.A., Cowan, M., Aliaga-Guerrero, M., Gómez, A., Zanuy, S., Mañanos, E., Muñoz-Cueto, J.A., 2016a. LPXRFa peptide system in the European sea bass: A molecular and immunohistochemical approach: GnIH System in Sea Bass. Journal of Comparative Neurology 524, 176–198. https://doi.org/10.1002/cne.23833
Paullada-Salmerón, J.A., Cowan, M., Aliaga-Guerrero, M., Morano, F., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A., 2016b. Gonadotropin Inhibitory Hormone Down-Regulates the Brain-Pituitary Reproductive Axis of Male European Sea Bass (Dicentrarchus labrax)1. Biology of Reproduction 94. https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139022
Paullada-Salmerón, J.A., Cowan, M.E., Loentgen, G.H., Aliaga-Guerrero, M., Zanuy, S., Mañanós, E.L., Muñoz-Cueto, J.A., 2019. The gonadotropin-inhibitory hormone system of fish: The case of sea bass (Dicentrarchus labrax). General and Comparative Endocrinology 279, 184–195. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.03.015
Paullada-Salmerón, J.A., Loentgen, G.H., Cowan, M., Aliaga-Guerrero, M., Rendón-Unceta, M.D.C., Muñoz-Cueto, J.A., 2017. Developmental changes and day-night expression of the gonadotropin-inhibitory hormone system in the European sea bass: Effects of rearing temperature. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 206, 54–62. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.01.009
Pecins-Thompson, M., Brown, N.A., Kohama, S.G., Bethea, C.L., 1996. Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques. J. Neurosci. 16, 7021–7029.
Pellegrini, E., Diotel, N., Vaillant-Capitaine, C., Pérez Maria, R., Gueguen, M.-M., Nasri, A., Cano Nicolau, J., Kah, O., 2016. Steroid modulation of neurogenesis: Focus on radial glial cells in zebrafish. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 160, 27–36. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.011
Peng, C., Humphries, S., Peter, R.E., Rivier, J.E., Blomqvist, A.G., Larhammar, D., 1993. Actions of Goldfish Neuropeptide Y on the Secretion of Growth Hormone and Gonadotropin-II in Female Goldfish. General and Comparative Endocrinology 90, 306–317. https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1086
Peng, C., Gallin, W., Peter, R.E., Blomqvist, A.G., Larhammar, D., 1994. Neuropeptide-Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. Endocrinology 134, 1095–1103. https://doi.org/10.1210/endo.134.3.8119148
Pérez-Ruzafa, A., Concepción, M., 2015. Ecology and Distribution of Dicentrarchus labrax (Linnaeus 1758), in: Biology of European Sea Bass. pp. 3–33.
Peyon, P., Zanuy, S., Carrillo, M., 2001. Action of Leptin on In Vitro Luteinizing Hormone Release in the European Sea Bass (Dicentrarchus labrax)1. Biology of Reproduction 65, 1573–1578. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1573
Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., González, A., 2005. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). General and Comparative Endocrinology, 5th International Symposium on Fish Endocrynology 142, 102–110. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.011
Pinelli, C., Fiorentino, M., D'Aniello, B., Tanaka, S., Rastogi, R.K., 1996. Immunohistochemical Demonstration of FSH and LH in the Pituitary of the Developing Frog,Rana esculenta. General and Comparative Endocrinology 104, 189–196. https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0161
Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. Physiological Reviews 92, 1235–1316. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010

Pinto, P.I.S., Estêvão, M.D., Andrade, A., Santos, S., Power, D.M., 2016. Tissue responsiveness to estradiol and genistein in the sea bass liver and scale. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 158, 127–137. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.023

Planas, J.V., Athos, J., Goetz, F.W., Swanson, P., 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. Biol. Reprod. 62, 1262–1269. https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1262

Pogoda, H.-M., von der Hardt, S., Herzog, W., Kramer, C., Schwarz, H., Hammerschmidt, M., 2006. The proneural gene ascl1a is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. Development 133, 1079–1089. https://doi.org/10.1242/dev.02296

Prasad, P., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2015. Role of serotonin in fish reproduction. Frontiers in Neuroscience 9. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00195

Putteeraj, M., Soga, T., Ubuka, T., Parhar, I.S., 2016. A "Timed" Kiss Is Essential for Reproduction: Lessons from Mammalian Studies. Front Endocrinol (Lausanne) 7, 121. https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00121

Qin, C., Xu, L., Yang, Y., He, S., Dai, Y., Zhao, H., Zhou, Z., 2014. Comparison of fecundity and offspring immunity in zebrafish fed Lactobacillus rhamnosus CICC 6141 and Lactobacillus casei BL23. Reproduction 147, 53–64. https://doi.org/10.1530/REP-13-0141

Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L., 2016. Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish. Endocrinology 157, 636–647. https://doi.org/10.1210/en.2015-1785

Quérat, B., Sellouk, A., Salmon, C., 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (Acipenser baeri) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. Biol. Reprod. 63, 222–228. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.222

Radovick, S., Levine, J.E., Wolfe, A., 2012. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. Front Endocrinol (Lausanne) 3, 52. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00052

Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B., Plant, T.M., 2008. Structural Interactions between Kisspeptin and GnRH Neurons in the Mediobasal Hypothalamus of the Male Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) as Revealed by Double Immunofluorescence and Confocal Microscopy. Endocrinology 149, 4387–4395. https://doi.org/10.1210/en.2008-0438

Rather, M.A., Bhat, I.A., Gireesh-Babu, P., Chaudhari, A., Sundaray, J.K., Sharma, R., 2016. Molecular characterization of kisspeptin gene and effect of nano-encapsulted kisspeptin-10 on reproductive maturation in Catla catla. Domest. Anim. Endocrinol. 56, 36–47. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.01.005

Rather, M.A., Bhat, I.A., Rathor, P.K., Gireesh-Babu, P., Chaudhari, A., Kumar, S.J., Sharma, R., 2017. In silico analysis and expression studies of kisspeptin gene in C. catla. J. Biomol. Struct. Dyn. 35, 2485–2496. https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1222970

Reinhart, J., Mertz, L.M., Catt, K.J., 1992. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. J. Biol. Chem. 267, 21281–21284.

Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling 307, 7.

Roa, J., Vigo, E., Castellano, J.M., Gaytan, F., García-Galiano, D., Navarro, V.M., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Ederveen, A.G.H., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2008. Follicle-Stimulating Hormone Responses to Kisspeptin in the Female Rat at the Preovulatory Period: Modulation by Estrogen and Progesterone Receptors. Endocrinology 149, 5783–5790. https://doi.org/10.1210/en.2008-0604

Roblin, C., Bruslé, J., 1983. Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du Loup Dicentrarchus labrax, en conditions d'élevage. Reproduction Nutrition Développement 23, 115–127. https://doi.org/10.1051/rnd:19830110

Roch, G.J., Busby, E.R., Sherwood, N.M., 2014. GnRH receptors and peptides: skating backward. Gen. Comp. Endocrinol. 209, 118–134. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.025

Rocha, A., Gómez, A., Zanuy, S., Cerdá-Reverter, J.M., Carrillo, M., 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. Molecular and Cellular Endocrinology 272, 63–76. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.04.007

Rodenas, M.C., Cabas, I., García-Alcázar, A., Meseguer, J., Mulero, V., García-Ayala, A., 2016. Selective estrogen receptor modulators differentially alter the immune response of gilthead seabream juveniles. Fish & Shellfish Immunology 52, 189–197. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.041

Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. Exposure of juvenile roach (Rutilus rutilus) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. Environ. Sci. Technol. 35, 462–470.

Rønnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 2013. Kisspeptin Excitation of GnRH Neurons, in: Kauffman, A.S., Smith, J.T. (Eds.), Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology. Springer New York, New York, NY, pp. 113–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6199-9_6

Rosenfeld, C.S., Denslow, N.D., Orlando, E.F., Gutierrez-Villagomez, J.M., Trudeau, V.L., 2017. Neuroendocrine disruption of organizational and activational hormone programming in poikilothermic vertebrates. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 20, 276–304. https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1370083

Rubin, B.S., Lenkowski, J.R., Schaeberle, C.M., Vandenberg, L.N., Ronsheim, P.M., Soto, A.M., 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. Endocrinology 147, 3681–3691. https://doi.org/10.1210/en.2006-0189

Saga, T., Oota, Y., Nozaki, M., Swanson, P., 1993. Salmonid Pituitary Gonadotrophs, III. Chronological Appearance of GTH I and Other Adenohypophysial Hormones in the Pituitary of the Developing Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss irideus). General and Comparative Endocrinology 92, 233–241. https://doi.org/10.1006/gcen.1993.1159

Saha, A., Pradhan, A., Sengupta, S., Nayak, M., Samanta, M., Sahoo, L., Giri, S.S., 2016. Molecular characterization of two kiss genes and their expression in rohu (Labeo rohita) during annual reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 191, 135–145. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.10.008

Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Besada, V., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2015. Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin. Sci. Total Environ. 529, 121–130. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.048

Saligaut, C., Garnier, D.-H., Bennani, S., Salbert, G., Bailhache, T., Jego, P., 1992. Effects of estradiol on brain aminergic turnover of the female rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) at the beginning of vitellogenesis. General and Comparative Endocrinology 88, 209–216. https://doi.org/10.1016/0016-6480(92)90252-F

Sambroni, E., Le Gac, F., Breton, B., Lareyre, J.-J., 2007. Functional specificity of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. J. Endocrinol. 195, 213–228. https://doi.org/10.1677/JOE-06-0122

Sánchez-Criado, J.E., de Las Mulas, J.M., Bellido, C., Navarro, V.M., Aguilar, R., Garrido-Gracia, J.C., Malagón, M.M., Tena-Sempere, M., Blanco, A., 2006. Gonadotropin-secreting cells in ovariectomized rats treated with different oestrogen receptor ligands: a modulatory role for ERbeta in the gonadotrope? J. Endocrinol. 188, 167–177. https://doi.org/10.1677/joe.1.06377

Sánchez-Criado, J.E., Trudgen, K., Millán, Y., Blanco, A., Monterde, J., Garrido-Gracia, J.C., Gordon, A., Aguilar, R., de Las Mulas, J.M., Ko, C., 2012. Estrogen receptor (ESR) 2 partially offsets the absence of ESR1 in gonadotropes of pituitary-specific Esr1 knockout female mice. Reproduction 143, 549–558. https://doi.org/10.1530/REP-11-0214

Sand, E., Bergvall, M., Ekblad, E., D'Amato, M., Ohlsson, B., 2013. Expression and distribution of GnRH, LH, and FSH and their receptors in gastrointestinal tract of man and rat. Regulatory Peptides 187, 24–28. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.09.002

Sandvik, G.K., Hodne, K., Haug, T.M., Okubo, K., Weltzien, F.-A., 2014. RFamide Peptides in Early Vertebrate Development. Frontiers in Endocrinology 5. https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00203

Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A.M., 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. Aquat. Toxicol. 191, 141–163. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.005

Santos, D., Matos, M., Coimbra, A.M., 2014. Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. Neurotoxicol Teratol 46, 18–25. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.08.002

Sawada, K., Ukena, K., Satake, H., Iwakoshi, E., Minakata, H., Tsutsui, K., 2002. Novel fish hypothalamic neuropeptide: Cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localization of the mature peptide. European Journal of Biochemistry 269, 6000–6008. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03351.x

Sbrogna, J.L., Barresi, M.J.F., Karlstrom, R.O., 2003. Multiple roles for Hedgehog signaling in zebrafish pituitary development. Developmental Biology 254, 19–35. https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00027-1

Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H., 2007a. Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio. J. Toxicol. Environ. Health Part A 70, 768–779. https://doi.org/10.1080/15287390701236470

Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H., 2007b. Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio. J. Toxicol. Environ. Health Part A 70, 768–779. https://doi.org/10.1080/15287390701236470

Schally, A.V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M., Matsuo, H., Redding, T.W., Debeljuk, L., 1971. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 393–399. https://doi.org/10.1016/0006-291x(71)90766-2

Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R., Fenske, M., 2013. Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. Reprod. Toxicol. 42, 210–223. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.003

Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Belle, N.L., Elie, P., Dufour, S., 2005. Differential Regulation of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Expression during Ovarian Development and under Sexual Steroid Feedback in the European Eel. NEN 81, 107–119. https://doi.org/10.1159/000086404

Schneider, H., Fritzky, L., Williams, J., Heumann, C., Yochum, M., Pattar, K., Noppert, G., Mock, V., Hawley, E., 2012. Cloning and expression of a zebrafish 5-HT(2C) receptor gene. Gene 502, 108–117. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.070

Scholz, S., Gutzeit, H.O., 2000. 17-a-ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (Oryzias latipes). Aquatic Toxicology 11.

Sébert, M.-E., Legros, C., Weltzien, F.-A., Malpaux, B., Chemineau, P., Dufour, S., 2008. Melatonin Activates Brain Dopaminergic Systems in the Eel with an Inhibitory Impact on Reproductive Function. Journal of Neuroendocrinology 20, 917–929. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01744.x

Seeburg, P.H., Adelman, J.P., 1984. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. Nature 311, 666–668. https://doi.org/10.1038/311666a0

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. Ecotoxicol. Environ. Saf. 54, 302–314.

Segner, H., Casanova-Nakayama, A., Kase, R., Tyler, C.R., 2013. Impact of environmental estrogens on Yfish considering the diversity of estrogen signaling. General and Comparative Endocrinology 191, 190–201. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.015

Selvaraj, S., Kitano, H., Fujinaga, Y., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., Matsuyama, M., 2010. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (Scomber japonicus) during different gonadal stages. Gen. Comp. Endocrinol. 169, 28–38. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.011

Selvaraj, S., Kitano, H., Ohga, H., Yamaguchi, A., Matsuyama, M., 2015a. Expression changes of mRNAs encoding kisspeptins and their receptors and gonadotropin-releasing hormones during early development and gonadal sex differentiation periods in the brain of chub mackerel

(Scomber japonicus). General and Comparative Endocrinology 222, 20–32. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.019

Selvaraj, S., Kitano, H., Ohga, H., Yamaguchi, A., Matsuyama, M., 2015b. Expression changes of mRNAs encoding kisspeptins and their receptors and gonadotropin-releasing hormones during early development and gonadal sex differentiation periods in the brain of chub mackerel (Scomber japonicus). General and Comparative Endocrinology 222, 20–32. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.019

Seminara, S.B., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Kuohung, W., Zahn, D., Slaugenhaupt, S.A., Carlton, M.B.L., 2003. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. The New England Journal of Medicine 14.

Senthilkumaran, B., 2015. Pesticide- and sex steroid analogue-induced endocrine disruption differentially targets hypothalamo-hypophyseal-gonadal system during gametogenesis in teleosts - A review. Gen. Comp. Endocrinol. 219, 136–142. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.010

Senthilkumaran, B., Okuzawa, K., Gen, K., Kagawa, H., 2001. Effects of Serotonin, GABA and Neuropeptide Y on Seabream Gonadotropin Releasing Hormone Release In Vitro from Preoptic-Anterior Hypothalamus and Pituitary of Red Seabream, Pagrus major: Seabream gonadotropin-releasing hormone release in vitro. Journal of Neuroendocrinology 13, 395–400. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00645.x

Servili, A., Herrera-Pérez, P., del Carmen Rendón, M., Muñoz-Cueto, J., 2013. Melatonin Inhibits GnRH-1, GnRH-3 and GnRH Receptor Expression in the Brain of the European Sea Bass, Dicentrarchus labrax. International Journal of Molecular Sciences 14, 7603–7616. https://doi.org/10.3390/ijms14047603

Servili, A., Le Page, Y., Leprince, J., Caraty, A., Escobar, S., Parhar, I.S., Seong, J.Y., Vaudry, H., Kah, O., 2011. Organization of Two Independent Kisspeptin Systems Derived from Evolutionary-Ancient Kiss Genes in the Brain of Zebrafish. Endocrinology 152, 1527–1540. https://doi.org/10.1210/en.2010-0948

Servili, A., Lethimonier, C., Lareyre, J.-J., López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A., 2010. The Highly Conserved Gonadotropin-Releasing Hormone-2 Form Acts as a Melatonin-Releasing Factor in the Pineal of a Teleost Fish, the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. Endocrinology 151, 2265–2275. https://doi.org/10.1210/en.2009-1207

Sfakianakis, D.G., Renieri, E., Kentouri, M., Tsatsakis, A.M., 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. Environmental Research 137, 246–255. https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014

Shahjahan, Md., Kitahashi, T., Parhar, I.S., 2014. Central Pathways Integrating Metabolism and Reproduction in Teleosts. Frontiers in Endocrinology 5. https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00036

Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J., Vale, W., 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 2794–2798. https://doi.org/10.1073/pnas.80.9.2794

Shi, Y., Liu, X., Zhu, P., Li, J., Sham, K.W.Y., Cheng, S.H., Li, S., Zhang, Y., Cheng, C.H.K., Lin, H., 2013. G-protein-coupled estrogen receptor 1 is involved in brain development during zebrafish (Danio rerio) embryogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 435, 21–27. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.130

Shi, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, Q., Lu, D., Liu, M., Meng, Z., Cheng, C.H.K., Liu, X., Lin, H., 2010. Molecular Identification of the Kiss2/Kiss1ra System and Its Potential Function During 17Alpha-Methyltestosterone-Induced Sex Reversal in the Orange-Spotted Grouper, Epinephelus coioides1. Biology of Reproduction 83, 63–74. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080044

Shimek R. 2008. The Toxicity of Some Freshly Mixed Artificial Sea Water; A Bad Beginning For A Reef Aquarium by Ronald L. Shimek, Ph.D. - Reefkeeping.com. Available from: http://reefkeeping.com/issues/2003-03/rs/feature/index.php

Shinoda, T., Miranda, L.A., Okuma, K., Hattori, R.S., Fernandino, J.I., Yoshizaki, G., Somoza, G.M., Strüssmann, C.A., 2010. Molecular cloning and expression analysis of *Fshr* and *Lhr* in relation to *Fshb* and *Lhb* subunits during the period of temperature-dependent sex determination in

pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Molecular Reproduction and Development 77, 521–532. https://doi.org/10.1002/mrd.21179

Singh, S.P., Wolfe, A., Ng, Y., DiVall, S.A., Buggs, C., Levine, J.E., Wondisford, F.E., Radovick, S., 2009. Impaired Estrogen Feedback and Infertility in Female Mice with Pituitary-Specific Deletion of Estrogen Receptor Alpha (ESR1)1. Biology of Reproduction 81, 488–496. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075259

Skorupskaite, K., George, J.T., Anderson, R.A., 2014. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. Human Reproduction Update 20, 485–500. https://doi.org/10.1093/humupd/dmu009

Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005. Regulation of *Kiss1* Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. Endocrinology 146, 3686–3692. https://doi.org/10.1210/en.2005-0488

So, W.-K., Kwok, H.-F., Ge, W., 2005. Zebrafish Gonadotropins and Their Receptors: II. Cloning and Characterization of Zebrafish Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Subunits—Their Spatial-Temporal Expression Patterns and Receptor Specificity. Biol Reprod 72, 1382–1396. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038216

Soga, T., Sakuma, Y., Parhar, I.S., 1998. Testosterone differentially regulates expression of GnRH messenger RNAs in the terminal nerve, preoptic and midbrain of male tilapia. Brain Res. Mol. Brain Res. 60, 13–20.

Song, H., He, Y., Ma, L., Zhou, X., Liu, X., Qi, J., Zhang, Q., 2015. Characterisation of kisspeptin system genes in an ovoviviparous teleost: Sebastes schlegeli. General and Comparative Endocrinology 214, 114–125. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.010

Sower, S.A., Freamat, M., Kavanaugh, S.I., 2009. The origins of the vertebrate hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) and hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) endocrine systems: New insights from lampreys. General and Comparative Endocrinology 161, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.11.023

Spicer, O.S., Wong, T.-T., Zmora, N., Zohar, Y., 2016a. Targeted Mutagenesis of the Hypophysiotropic Gnrh3 in Zebrafish (Danio rerio) Reveals No Effects on Reproductive Performance. PLOS ONE 11, e0158141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158141

Spicer, O.S., Wong, T.-T., Zmora, N., Zohar, Y., 2016b. Targeted Mutagenesis of the Hypophysiotropic Gnrh3 in Zebrafish (Danio rerio) Reveals No Effects on Reproductive Performance. PLOS ONE 11, e0158141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158141

Spicer, O.S., Zmora, N., Wong, T.-T., Golan, M., Levavi-Sivan, B., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2017. The gonadotropin-inhibitory hormone (Lpxrfa) system's regulation of reproduction in the brain–pituitary axis of the zebrafish (Danio rerio)†. Biology of Reproduction 96, 1031–1042. https://doi.org/10.1093/biolre/iox032

Stafford, L.J., Xia, C., Ma, W., Cai, Y., Liu, M., 2002. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. Cancer Res. 62, 5399–5404.

Steven, C., Lehnen, N., Kight, K., Ijiri, S., Klenke, U., Harris, W.A., Zohar, Y., 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (Danio rerio): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. Gen. Comp. Endocrinol. 133, 27–37.

Stincic, T.L., Rønnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 2018. Diverse actions of estradiol on anorexigenic and orexigenic hypothalamic arcuate neurons. Hormones and Behavior, SI: Fast effects of steroids 104, 146–155. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.001

Strathmann, M.F., 1987. Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae. University of Washington Press.

Stuesse, S.L., Stuesse, D.C., Cruce, W.L.R., 1995. Raphe nuclei in three cartilaginous fishes,Hydrolagus colliei,Heterodontus francisci, andSqualus acanthias. The Journal of Comparative Neurology 358, 414–427. https://doi.org/10.1002/cne.903580308

Subhedar, N., Cerdá, J., Calman, B.G., Wallace, R.A., 1997. Changes in forebrain and pituitary dopamine and serotonin contents of female Fundulus during its biweekly reproductive cycle. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 118, 577–584. https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00406-9

Suzuki, K., Kawauchi, H., Nagahama, Y., 1988. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. Gen. Comp. Endocrinol. 71, 302–306.

Takahashi, A., Islam, M.S., Abe, H., Okubo, K., Akazome, Y., Kaneko, T., Hioki, H., Oka, Y., 2016a. Morphological analysis of the early development of telencephalic and diencephalic gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in enhanced green fluorescent protein-expressing transgenic medaka lines: Morphological Analysis of Medaka GnRH Neurons. Journal of Comparative Neurology 524, 896–913. https://doi.org/10.1002/cne.23883

Takahashi, A., Kanda, S., Abe, T., Oka, Y., 2016b. Evolution of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Regulation in Vertebrates Revealed by Knockout Medaka. Endocrinology 157, 3994–4002. https://doi.org/10.1210/en.2016-1356

Tanaka, S., Sakai, M., Park, M.K., Kurosumi, K., 1991. Differential appearance of the subunits of glycoprotein hormones (LH, FSH, and TSH) in the pituitary of bullfrog (Rana catesbeiana) larvae during metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol. 84, 318–327.

Tang, H., Liu, Y., Luo, D., Ogawa, S., Yin, Y., Li, S., Zhang, Y., Hu, W., Parhar, I.S., Lin, H., Liu, X., Cheng, C.H.K., 2015. The kiss/kissr Systems Are Dispensable for Zebrafish Reproduction: Evidence From Gene Knockout Studies. Endocrinology 156, 589–599. https://doi.org/10.1210/en.2014-1204

Tappin, A.D., Millward, G.E., 2015. The English Channel: Contamination status of its transitional and coastal waters. Marine Pollution Bulletin, The English Channel and it's catchments: Status and Responses to Contaminants 95, 529–550. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.012

Tchoudakova, A., Pathak, S., Callard, G.V., 1999. Molecular Cloning of an Estrogen Receptor Subtype from the Goldfish, Carassius auratus 13.

Tello, J.A., Wu, S., Rivier, J.E., Sherwood, N.M., 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, synteny and phylogeny. Integr. Comp. Biol. 48, 570–587. https://doi.org/10.1093/icb/icn070

Tena-Sempere, M., Felip, A., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: Lessons from non-mammalian vertebrates. General and Comparative Endocrinology 175, 234–243. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.015

Thomas, P., 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. Gen. Comp. Endocrinol. 175, 367–383. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.032

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. Endocrinology 146, 624–632. https://doi.org/10.1210/en.2004-1064

Thompson, B.M., Harrop, R.T., 1987. The distribution and abundance of bass (Dicentrarchus labrax) eggs and larvae in the English Channel and Southern North Sea. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 67, 263–274. https://doi.org/10.1017/S0025315400026588

Tian, Z., Wang, Y., Zhang, N., Guo, Y., Feng, B., Liu, S., Zhao, M., 2013. Estrogen receptor GPR30 exerts anxiolytic effects by maintaining the balance between GABAergic and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala of ovariectomized mice after stress. Psychoneuroendocrinology 38, 2218–2233. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.04.011

Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P.-A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R.S.T., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F.A.M., Bargelloni, L., Power, D.M., Bonhomme, F., Canario, A.V.M., Reinhardt, R., 2014. European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. Nat Commun 5, 5770. https://doi.org/10.1038/ncomms6770

Todo, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 1996. Molecular cloning and characterization of Japanese eel estrogen receptor cDNA. Molecular and Cellular Endocrinology 119, 37–45. https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03792-6

Tohyama, S., Ogino, Y., Lange, A., Myosho, T., Kobayashi, T., Hirano, Y., Yamada, G., Sato, T., Tatarazako, N., Tyler, C.R., Iguchi, T., Miyagawa, S., 2017. Establishment of estrogen receptor 1 (ESR1)-knockout medaka: ESR1 is dispensable for sexual development and reproduction in medaka, *Oryzias latipes*. Development, Growth & Differentiation 59, 552–561. https://doi.org/10.1111/dgd.12386

Tostivint, H., 2011. Evolution of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene family in relation to vertebrate tetraploidizations. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 575–581. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.017

Tovar Bohórquez, M.O., Mechaly, A.S., Hughes, L.C., Campanella, D., Ortí, G., Canosa, L.F., Somoza, G.M., 2017. Kisspeptin system in pejerrey fish (Odontesthes bonariensis). Characterization and gene expression pattern during early developmental stages. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 204, 146–156. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.014

Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, Carassius auratus. Rev. Reprod. 2, 55–68.

Trudeau, V.L., Murthy, C.K., Habibi, H.R., Sloley, B.D., Peter, R.E., 1993. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. Biol. Reprod. 48, 300–307. https://doi.org/10.1095/biolreprod48.2.300

Trudeau, V.L., Spanswick, D., Fraser, E.J., Larivière, K., Crump, D., Chiu, S., Schulz, R.W., 2000. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish 78, 19.

Tsutsui, K., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., Osugi, T., Seong, J.Y., Vaudry, H., 2010. Discovery and Evolutionary History of GnIH and Kisspeptin: New Key Neuropeptides Controlling Reproduction. Journal of Neuroendocrinology no-no. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02018.x

Tsutsui, K., Osugi, T., Son, Y.L., Ubuka, T., 2018. Review: Structure, function and evolution of GnIH. General and Comparative Endocrinology 264, 48–57. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.024

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., Sharp, P.J., 2000. A Novel Avian Hypothalamic Peptide Inhibiting Gonadotropin Release. Biochemical and Biophysical Research Communications 275, 661–667. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3350

Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R.P., Mellon, P.L., Roberts, J.L., Flanagan, C.A., Dong, K., Gillo, B., Sealfon, S.C., 1992. Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. Mol. Endocrinol. 6, 1163–1169. https://doi.org/10.1210/mend.6.7.1324422

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. Crit. Rev. Toxicol. 28, 319–361. https://doi.org/10.1080/10408449891344236

Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R., 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8282–8286. https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8282

Ulhaq, Z.S., Kishida, M., 2018. Brain Aromatase Modulates Serotonergic Neuron by Regulating Serotonin Levels in Zebrafish Embryos and Larvae. Front Endocrinol (Lausanne) 9, 230. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00230

Urbatzka, R., Lorenz, C., Lutz, I., Kloas, W., 2010. Expression profiles of LHβ, FSHβ and their gonadal receptor mRNAs during sexual differentiation of Xenopus laevis tadpoles. General and Comparative Endocrinology 168, 239–244. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.02.012

Vacher, C., Ferrière, F., Marmignon, M.-H., Pellegrini, E., Saligaut, C., 2002. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 127, 198–206.

Valcarce, D.G., Vuelta, E., Robles, V., Herráez, M.P., 2017. Paternal exposure to environmental 17-alpha-ethinylestradiol concentrations modifies testicular transcription, affecting the sperm transcript content and the offspring performance in zebrafish. Aquatic Toxicology 193, 18–29. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.025

Vassart, G., Pardo, L., Costagliola, S., 2004. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. Trends Biochem. Sci. 29, 119–126. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.01.006

Vetillard, A., Ferriere, F., Jego, P., Bailhache, T., 2006. Regulation of salmon gonadotrophin-releasing hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. J. Neuroendocrinol. 18, 445–453. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01432.x

Veyssière, G., Berger, M., Jean-Faucher, C., De Turckheim, M., Jean, C., 1982. Pituitary and plasma levels of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rabbit fetuses. J. Endocrinol. 92, 381–387.

Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. Aquatic Toxicology 105, 235–245. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.011

Viglino, L., Aboulfadl, K., Mahvelat, A.D., Prévost, M., Sauvé, S., 2008. On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters. J Environ Monit 10, 482–489. https://doi.org/10.1039/b800861b

Vischer, H.F., Bogerd, J., 2003. Cloning and Functional Characterization of a Gonadal Luteinizing Hormone Receptor Complementary DNA from the African Catfish (Clarias gariepinus). Biol Reprod 68, 262–271. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004515

Volkoff, H., Peter, R.E., 1999. Actions of Two Forms of Gonadotropin Releasing Hormone and a GnRH Antagonist on Spawning Behavior of the Goldfish Carassius auratus. General and Comparative Endocrinology 116, 347–355. https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7377

Vosges, M., Kah, O., Hinfray, N., Chadili, E., Le Page, Y., Combarnous, Y., Porcher, J.-M., Brion, F., 2012. 17α-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. Reproductive Toxicology 33, 198–204. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.005

Vosges, M., Le Page, Y., Chung, B., Combarnous, Y., Porcher, J.-M., Kah, O., Brion, F., 2010. 17α-Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. Aquatic Toxicology 99, 479–491. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.06.009

Wagner, S.D., Kurobe, T., Hammock, B.G., Lam, C.H., Wu, G., Vasylieva, N., Gee, S.J., Hammock, B.D., Teh, S.J., 2017. Developmental effects of fipronil on Japanese Medaka (Oryzias latipes) embryos. Chemosphere 166, 511–520. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.069

Wang, Q., Sham, K.W.Y., Ogawa, S., Li, S., Parhar, I.S., Cheng, C.H.K., Liu, X., Lin, H., 2013. Regulation of the two kiss promoters in goldfish (Carassius auratus) by estrogen via different ERα pathways. Molecular and Cellular Endocrinology 375, 130–139. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.023

Wang, S., Zhu, J., Xu, T., 2018. 17β-estradiol (E2) promotes growth and stability of new dendritic spines via estrogen receptor β pathway in intact mouse cortex. Brain Res. Bull. 137, 241–248. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.011

Weltzien, F.-A., Hildahl, J., Hodne, K., Okubo, K., Haug, T.M., 2014. Embryonic development of gonadotrope cells and gonadotropic hormones – Lessons from model fish. Molecular and Cellular Endocrinology, Molecular and Cellular Biology of Gonadotropes: An integrated view with new horizons 385, 18–27. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.016

West, A., Vojta, P.J., Welch, D.R., Weissman, B.E., 1998. Chromosome Localization and Genomic Structure of the KiSS-1 Metastasis Suppressor Gene (KISS1). Genomics 54, 145–148. https://doi.org/10.1006/geno.1998.5566

White, R.B., Eisen, J.A., Kasten, T.L., Fernald, R.D., 1998. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 305–309. https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.305

White, R.B., Fernald, R.D., 1998. Ontogeny of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Gene Expression Reveals a Distinct Origin for GnRH-Containing Neurons in the Midbrain. General and Comparative Endocrinology 112, 322–329. https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7142

Whitlock, K.E., 2005. Origin and development of GnRH neurons. Trends in Endocrinology & Metabolism 16, 145–151. https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.03.005

Whitlock, K.E., Postlethwait, J., Ewer, J., 2019. Neuroendocrinology of reproduction: Is gonadotropin-releasing hormone (GnRH) dispensable? Front Neuroendocrinol 53, 100738. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.02.002

Wierman, M.E., Gharib, S.D., Wang, C., LaRovere, J.M., Badger, T.M., Chin, W.W., 1990. Divergent regulation of gonadotropin subunit mRNA levels by androgens in the female rat. Biol. Reprod. 43, 191–195. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.2.191

Wildt, L., Häusler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., Knobil, E., 1981. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. Endocrinology 109, 376–385. https://doi.org/10.1210/endo-109-2-376

Wolfe, A., Wu, S., 2012. Estrogen receptor-β in the gonadotropin-releasing hormone neuron. Semin. Reprod. Med. 30, 23–31. https://doi.org/10.1055/s-0031-1299594

Wong, T.-T., Gothilf, Y., Zmora, N., Kight, K.E., Meiri, I., Elizur, A., Zohar, Y., 2004. Developmental Expression of Three Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone and Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Gilthead Seabream (Sparus aurata)1. Biology of Reproduction 71, 1026–1035. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028019

Wu, S., Page, L., Sherwood, N.M., 2006a. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish. Molecular and Cellular Endocrinology 257–258, 47–64. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.06.010

Wu, S., Page, L., Sherwood, N.M., 2006b. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish. Molecular and Cellular Endocrinology 257–258, 47–64. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.06.010

Wu, Y., He, Z., Zhang, L., Jiang, H., Zhang, W., 2012. Ontogeny of Immunoreactive Lh and Fsh Cells in Relation to Early Ovarian Differentiation and Development in Protogynous Hermaphroditic Ricefield Eel Monopterus albus. Biol Reprod 86. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095646

Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., Song, H., 2008. Exposure to 17alpha-ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (Danio rerio). Aquat. Toxicol. 88, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.020

Yamamoto, N., Oka, Y., Kawashima, S., 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. Neuroendocrinology 65, 403–412. https://doi.org/10.1159/000127203

Yamamoto, T.O., Matsuda, N., 1963. Effects of estradiol, stilbestrol and some alkyl-carbonyl androstanes upon sex differentiation in the medaka. Orvzias latipes. Gen. Comp. Endocrinol. 3, 101–110.

Yan, H., Ijiri, S., Wu, Q., Kobayashi, T., Li, S., Nakaseko, T., Adachi, S., Nagahama, Y., 2012. Expression Patterns of Gonadotropin Hormones and Their Receptors During Early Sexual Differentiation in Nile Tilapia Oreochromis niloticus. Biol Reprod 87. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.101220

Yan, L., Gong, C., Zhang, X., Zhang, Q., Zhao, M., Wang, C., 2016. Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil. Environmental Toxicology and Pharmacology 48, 39–45. https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.002

Yan, L., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). Biol. Reprod. 47, 418–427. https://doi.org/10.1095/biolreprod47.3.418

Yang, B., Jiang, Q., Chan, T., Ko, W.K.W., Wong, A.O.L., 2010. Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 60–71. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.06.001

Yang, Y., Gao, J., Yuan, C., Zhang, Y., Guan, Y., Wang, Z., 2016. Molecular identification of Kiss/GPR54 and function analysis with mRNA expression profiles exposure to 17α-ethinylestradiol in rare minnow Gobiocypris rarus. Mol. Biol. Rep. 43, 737–749. https://doi.org/10.1007/s11033-016-4014-y

Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B., 2003. Regulation of fish gonadotropins, in: International Review of Cytology. Elsevier, pp. 131–185. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)25004-0

Yashuvi, Y., Klenke, U., Palevitch, O., Abraham, E., Zohar, Y., Gothilf, Y., 2006. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in hybrid striped bass Morone sp.: whole-

mount in situ hybridization analysis. Journal of Fish Biology 69, 20–30. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01074.x

Ye, G., Chen, Y., Wang, H.-O., Ye, T., Lin, Y., Huang, Q., Chi, Y., Dong, S., 2016. Metabolomics approach reveals metabolic disorders and potential biomarkers associated with the developmental toxicity of tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. Sci Rep 6, 35257. https://doi.org/10.1038/srep35257

Yin, H., Ukena, K., Ubuka, T., Tsutsui, K., 2005. A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (Coturnix japonica): identification, expression and binding activity. J. Endocrinol. 184, 257–266. https://doi.org/10.1677/joe.1.05926

Yoon, D.J., Golimbu, M., Schinella, R., Stein, B., Sklar, C.A., David, R., 1987. Immunocytochemical localization of hFSH as an index of Sertoli cell function in the human testis. European Journal of Endocrinology 116, 333–338. https://doi.org/10.1530/acta.0.1160333

Yu, K.L., Peter, R.E., 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 85, 138–146.

Yu, K.L., Peter, R.E., 1990. Dopaminergic regulation of brain gonadotropin-releasing hormone in male goldfish during spawning behavior. Neuroendocrinology 52, 276–283. https://doi.org/10.1159/000125598

Yu, K.L., Rosenblum, P.M., Peter, R.E., 1991. In vitro release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. General and Comparative Endocrinology 81, 256–267. https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90010-4

Zempo, B., Karigo, T., Kanda, S., Akazome, Y., Oka, Y., 2018. Morphological Analysis of the Axonal Projections of EGFP-Labeled Esr1-Expressing Neurons in Transgenic Female Medaka. Endocrinology 159, 1228–1241. https://doi.org/10.1210/en.2017-00873

Zhang, F.P., Markkula, M., Toppari, J., Huhtaniemi, I., 1995. Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis. Endocrinology 136, 2904–2912. https://doi.org/10.1210/en.136.7.2904

Zhang, Z., Zhu, B., Ge, W., 2015. Genetic Analysis of Zebrafish Gonadotropin (FSH and LH) Functions by TALEN-Mediated Gene Disruption. Molecular Endocrinology 29, 76–98. https://doi.org/10.1210/me.2014-1256

Zhao, Y., Lin, M.-C.A., Mock, A., Yang, M., Wayne, N.L., 2014. Kisspeptins Modulate the Biology of Multiple Populations of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons during Embryogenesis and Adulthood in Zebrafish (Danio rerio). PLoS ONE 9, e104330. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104330

Zmora, N., Gonzalez-Martinez, D., Munoz-Cueto, J., Madigou, T., Mananos-Sanchez, E., Doste, S., Zohar, Y., Kah, O., Elizur, A., 2002. The GnRH system in the European sea bass (Dicentrarchus labrax). Journal of Endocrinology 172, 105–116. https://doi.org/10.1677/joe.0.1720105

Zmora, N., Stubblefield, J., Zulperi, Z., Biran, J., Levavi-Sivan, B., Muñoz-Cueto, J.A., Zohar, Y., 2012. Differential and Gonad Stage-Dependent Roles of Kisspeptin1 and Kisspeptin2 in Reproduction in the Modern Teleosts, Morone Species1. Biology of Reproduction 86. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097667

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. General and Comparative Endocrinology 165, 438–455. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017

Communication et travaux

Publications scientifiques

- *Publiée*

Robert A, Rocher B, **Nihoul F**, Monsijon T, Le Foll F, Knigge T. (2014). A convenient device for xenobiotic dosing and hemolymph sampling in Carcinus maenas (Portunidae, Decapoda). Journal of Xenobiotics, volume 4:4903.

- *Soumise*

Nihoul F, Germain A, Jolly S, Duflot A, Danger JM, Aroua S. (Soumise). Ontogeny of brain kisspeptin and GnRH systems in the European sea bass: potential new roles in early development. General and Comparative Endocrinology.

- *En cours*

Nihoul F, Soloperto S, Olivier S, Duflot A, Poret A, Halm-Lemeille MP, Danger JM, Aroua S. Effects of 17α-Ethinylestradiol (EE2) exposure during early life development on Kisspeptins and GnRHs ontogenesis of the European sea bass, Dicentrarchus labrax.

Nihoul F, Germain A, Olivier S, Danger JM, Aroua S. Evolution et caractérisation des cellules à FSHβ et LHβ au cours du développement larvaire du bar européen (Dicentrarchus labrax)

Communications orales

- *Congrès internationaux*

Nihoul F, Germain A, Jolly S, Duflot A, Danger JM, Aroua S. Kisspeptins and GnRHs ontogenesis in the brain of the European sea bass, Dicentrarchus labrax.
29ème édition du CECE (Conference of European Comparative Endocrinologits)
Glasgow, Ecosse. 2018

Nihoul F, Olivier S, Poret A, Halm-Lemeille MP, Danger JM, Aroua S. Effects of ethynilestradiol on the ontogenesis of kisspeptins and GnRHs system in European sea bass.
29ème édition du CECE (Conference of European Comparative Endocrinologits)
Glasgow, Ecosse. 2018

- *Congrès nationaux*

Nihoul F, Germain A, Jolly S, Duflot A, Danger JM, Aroua S. Kisspeptins and GnRHs ontogenesis in the brain of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*
21e journées de l'école doctorale EdNBISE,
Rouen, France. 2018

Posters

Nihoul F, Germain A, Jolly S, Duflot A, Danger JM, Aroua S. Ontogenesis of the gonadotropic axis in *Dicentrarchus labrax*, focus on the brain-pituitary part
Congres BioAqua
Varadero, Cuba. 2018

Nihoul F, Germain A, Jolly S, Duflot A, Danger JM, Aroua S. Ontogenesis of the gonadotropic axis in *Dicentrarchus labrax*, focus on the brain-pituitary part.
28ème édition du CECE (Conference of European Comparative Endocrinologits)
Louvain, Belgique. 2016

Nihoul F, Germain A, Jolly S, Duflot A, Danger JM, Aroua S. Ontogénèse de l'axe neuroendocrinien du contrôle de la reproduction chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*)
ECOBIM : Réseau international en écotoxicologie aquatique.
Le Havre, France. 2016

Nihoul F, Letendre J, Monsinjon T, Chan P, Vaudry D, Köhler HR, Knigge T.
Shell colour polymorphism in the White garden snail, *Theba pisana* (O.F.Müller 1774) is reflected in differential proteomic patterns.
EuPA (European Proteomic Association)
Saint Malo, France. 2013

Résumé

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont une préoccupation majeure de par leurs effets sur les grandes fonctions physiologiques des organismes et particulièrement sur la fonction de reproduction. Chez les vertébrés, la reproduction est sous le contrôle d'un axe neuroendocrinien nommé axe gonadotrope. Celui-ci comprend différents acteurs cérébraux (gonadolibérines et kisspeptines), hypophysaires (gonadotropines) et gonadiques (stéroïdes sexuels) dont la mise en place et le fonctionnement sont régulés finement. Parmi les mécanismes de régulation, les stéroïdes vont jouer un rôle important en effectuant des boucles de rétrocontrôle. Les PE mimant ces stéroïdes sont donc potentiellement capables d'impacter ces régulations. L'objectif de ce travail était d'évaluer les effets d'un xénoœstrogène sur les mises en place des acteurs cérébraux impliqués dans l'axe gonadotrope chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*). Nous avons d'abord décrit l'ontogénèse des systèmes à kisspeptine, à gonadolibérine et à gonadotropine au cours du développement larvaire. Nous avons mis en évidence une régulation différentielle de ces acteurs suggérant un rôle durant ce processus développemental. De plus, nous montrons que le 17α-éthinylestradiol (EE2) est capable de perturber l'ontogenèse des systèmes à GnRH2 et à GnRH3 au cours des stades précoces du développement larvaire.

Ces données constituent une base permettant l'évaluation des effets des PE sur l'ontogénèse des systèmes neuroendocriniens.

Mots clefs : *Dicentrarchus labrax*, Kisspeptines, GnRH, gonadotropines, 17α-ethinylestradiol, perturbation endocrinienne, neurogenèse

Abstract

Endocrine disruptors (EDs) are a major concern because of their effects on the main physiological functions, particularly on the reproductive function. In vertebrates, reproduction is under the control of a neuroendocrine axis called hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. It includes various actors at the brain (gonadotropin releasing hormones (GnRH) and kisspeptins), pituitary (gonadotropic hormones) and gonadal (sex steroids) levels. Their dévelopment and functioning are finely regulated. Among the regulators, steroids play an important role by performing feedback loops. EDs mimicking steroids are therefore potentially able to impact these regulations. The objective of this work was to evaluate the effects of xenoestrogens on the implementation of cerebral actors involved in the HPG axis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). We first described the ontogeny of the kisspeptin, GnRH and gonadotropin systems during larval development. We have highlighted a differential regulation of these actors suggesting a role during this developmental process. In addition, we show that 17α-ethinylestradiol (EE2) is able to disrupt the ontogeny of GnRH2 and GnRH3 systems during the early stages of larval development.

These data provide a basis for evaluation of the EDs effects on the ontogeny of neuroendocrine systems.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, Kisspeptins, GnRH, gonadotropins, 17α-ethinylestradiol, endocrine disruption, neurogenesis