



Perturbation de la rythmicité circadienne : impact sur la fonction reproductive de souris femelles

Thibault Bahougne

► To cite this version:

Thibault Bahougne. Perturbation de la rythmicité circadienne : impact sur la fonction reproductive de souris femelles. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ001 . tel-02927922

HAL Id: tel-02927922

<https://theses.hal.science/tel-02927922>

Submitted on 2 Sep 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.



**UNIVERSITÉ DE
STRASBOURG**



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
S T R A S B O U R G

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives. CNRS UPR 3212

THÈSE présentée par :
Thibault BAHOUGNE
soutenue le : 13 janvier 2020

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

TITRE de la thèse
Perturbation de la rythmicité circadienne :
Impact sur la fonction reproductive de souris
femelles

THÈSE dirigée par :
Dr Valérie SIMONNEAUX

Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Dr Anne DUITTOZ
Dr Nicolas DE ROUX

Université de Tours
Université de Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Dr Etienne CHALLET

Université de Strasbourg

INVITÉS :
Pr Nathalie JEANDIDIDER

Université de Strasbourg

THESE DE DOCTORAT

Discipline :

Sciences de la vie et de la santé – Neurosciences

Perturbation de la rythmicité circadienne : Impact sur la fonction reproductive de souris femelles

Présentée par :

Thibault BAHOUGNE

École doctorale des sciences de la vie et de la santé

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives. CNRS UPR 3212

Université de Strasbourg

Date de défense : le lundi 13 janvier 2020

Directrice de Thèse :

Dr Valérie SIMONNEAUX

Institut des neurosciences cellulaires et Intégratives (UPR CNRS 3212)

Co-Encadrante de Thèse : **Pr Nathalie JEANDIDIER**

Chef de Service d'Endocrinologie, diabétologie du CHRU de Strasbourg

Comité d'évaluation :

Dr Anne DUITTOZ : Rapporteur

Professeur en Physiologie animale à Tours

Département de biologie animale et de génétique UMR Université-CNRS INRA 7247

Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Dr Nicolas DE ROUX : Rapporteur

Professeur en Biochimie-Hormonologie à Paris

Biochimie-Hormonologie CHU Paris - Hôpital Robert Debré

Dr Etienne CHALLET : Examineur

Directeur de recherche à Strasbourg

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

**Le succès c'est d'aller d'échec en échec,
sans perdre son enthousiasme.**

W.C.

Avant-propos	6
Publications	8
Remerciements	11
Abréviations	16
I. Introduction.....	18
II. Physiologie de l'axe reproducteur féminin	19
A. L'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien est rythmique.....	19
B. Les neurones à GnRH	25
C. Les neurones à kisspeptine.....	27
a. Généralités.....	27
b. Neuroanatomie des neurones à Kisspeptine	31
c. Effet de la kisspeptine sur l'axe gonadotrope.....	31
d. Pertinence de Kp chez l'humain.....	35
1. Nouvelles évidences génétiques du rôle de Kp.....	35
2. Kp dans le cerveau humain.....	37
3. Régulation de l'expression de Kp.....	40
4. Le Kp comme nouveau traitement de la fertilité ?.....	41
D. Autres neurotransmetteurs rapportés comme régulant l'activité des neurones à GnRH	46
E. Régulation oestrogénique.....	48
a. Neurones à GnRH	49
b. Neurones à kisspeptine.....	50
c. Neurones à RFRP-3.....	51
d. Hypophyse.....	51
e. Utérus	51
f. Ovaires	52
g. Le système circadien	52
III. Le système circadien.....	52
A. L'horloge moléculaire des NSC.....	53
B. Synchronisation de l'activité circadienne des NSC.....	54
C. Les horloges périphériques	55
D. Importance des horloges circadienne dans le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien.....	55
E. Régulation journalière de l'axe gonadotrope	58
a. Évidence d'un rythme journalier de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien.....	58
b. Liens fonctionnels entre l'horloge circadienne et l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien	58
IV. Le travail posté : effets de la perturbation circadienne sur l'axe reproducteur	63
A. Le travail posté : définition	63
B. Conséquences du travail posté	64
a. Effets métaboliques	65
b. Effets cardiovasculaires.....	65
c. Effets oncologiques	66
d. Effets sur le sommeil.....	66
e. Effets psychologiques	66
C. Conséquence du travail posté sur la fertilité de la femme	67
a. Effets obstétricaux	67

b.	Évaluation de la fertilité chez la femme	67
c.	Étiologies de l'hypofertilité féminine.....	70
d.	Impact du travail posté sur la fertilité.....	71
D.	Modèle de travail posté chez les rongeurs.....	73
E.	Justification du projet de thèse.....	77
V.	Résultats	79
A.	Mise au point d'un modèle de suivi longitudinal de la sécrétion de LH le jour du proestrus sur des individus uniques.....	79
B.	Analyse des effets d'une avance ou d'un retard de phase unique (10h) et d'avance et retard de phases chronique (jusqu'à 9 mois) sur les cycles estriens et le pic préovulatoire de LH	96
C.	Mise au point de l'injection intra-cérébro-ventriculaire de peptides associée au suivi individuel de LH afin de proposer des méthodes de resynchronisation du pic préovulatoire de LH chez des souris soumises à des déphasages.....	119
a.	Introduction	119
b.	Matériel et méthodes	120
c.	Résultats préliminaires par Thibault BAHOUGNE	125
d.	Résultats du projet de master 2 de Mathilda KRETZ.....	127
e.	Discussion et Perspectives.....	136
VI.	Perspectives	138
VII.	Conclusion générale.....	148
	Bibliographies :	149

Avant-propos

Ancien externe de la faculté de Médecine de Bordeaux, j'ai rejoint la faculté de médecine de l'université de Strasbourg pour effectuer mon internat.

Très intéressé par l'endocrinologie et attiré par une carrière hospitalo-universitaire, j'ai eu l'opportunité d'effectuer un stage en inter CHU à l'hôpital de Kremlin Bicêtre dans le service du Pr CHANSON (et du Pr YOUNG) durant mon 7ème semestre, grâce à l'appui du Pr PINGET, du Pr JEANDIDIER et du Pr GOICHOT. Dans ce centre de référence internationalement reconnu, j'ai pu acquérir de solides connaissances sur les pathologies endocriniennes, en particulier hypothalamo-hypophysaires et de la reproduction. J'ai d'ailleurs effectué avec eux mon travail de thèse en médecine sur les adénomes hypophysaires à prolactine chez l'enfant, un travail qui m'a permis de valider mon DES et qui a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism en 2015.

Dans un esprit de continuité, avec l'appui des seniors du pôle M.I.R.N.E.D., j'ai pu ensuite obtenir une « année recherche » dans le laboratoire CRN2M (Centre de Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille), sous la direction des Pr Anne BARLIER et du Pr Alain ENJALBERT. Ce laboratoire est un centre de référence européen dans le domaine de la recherche des pathologies hypophysaires, tant dans le domaine génétique que thérapeutique. Durant un an, j'ai travaillé sur le rôle du récepteur de la somatostatine sst5 dans la réponse aux agonistes somatostatinerigiques dans des tumeurs hypophysaires humaines. De cette collaboration, deux articles ont été écrits « "Super"functional gonadotroph pituitary adenomas: a two-faced gold medal » avec également la participation du Dr JAFFRAIN REA en cours de publication et « Functioning mediastinal paraganglioma associated with a novel germline mutation of von Hippel-Lindau gene » publié dans Journal of Clinical Medicine en 2018. De retour pour finir mon internat dans les Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, j'ai validé mon DES d'Endocrinologie, Diabétologie, et Maladies Métaboliques avec la réalisation d'un mémoire encadré par le Pr BARLIER, puis d'une thèse de médecine encadrée par le Pr CHANSON. Dans la continuité du travail enrichissant mené auprès du Pr BARLIER et avec le soutien du Pr JEANDIDIER, j'ai pris contact avec le Dr Valérie SIMONNEAUX, responsable d'une équipe de recherche à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (UPR CNRS 3212) à Strasbourg. En novembre 2014, grâce à une bourse de la Fondation de Recherche Médicale (FDM20140630371), j'ai débuté à temps plein ma thèse de sciences sur l'impact des perturbations de la rythmicité circadienne sur la fertilité féminine. Durant les 2 premières

années j'ai effectué à temps plein la mise en place d'un protocole fondamental de modèle de souris en déphasage chronique associé à la mise de point de protocole visant à explorer les mécanismes hypothalamiques de régulation de l'axe reproducteur avec la publication d'un premier travail original « Individual evaluation of luteinizing hormone in aged C57BL/6J female mice » publié dans *Geroscience* en octobre 2019, suivi d'un deuxième travail original « Impact of circadian disruption on female mice reproductive function » soumis à *Endocrinology*. Parallèlement, un projet de Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) sur l'impact du travail posté sur l'axe reproducteur féminin a été réalisé en 2016 avec la participation du service de médecine du travail (Pr GONZALEZ) et incluant 6 centres hospitaliers de la région Grand Est. Malgré une très bonne évaluation qui a permis au projet d'être présélectionné, il n'a finalement pas été retenu mais servira de base à une nouvelle demande devant l'intérêt évident en santé publique de cette problématique et la faible quantité de données présente dans la littérature comme le rappelle le rapport de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail de juin 2016 (« Évaluation des risques sanitaires liés au travail de nuit »). En parallèle de mes travaux expérimentaux, j'ai réalisé avec le Dr SIMONNEAUX, trois revues de la littérature dans le domaine de l'axe gonadotrope avec à la fois un versant fondamental mais aussi clinique : dans *Frontier in Neuroendocrinology*, *Molecular and cellular endocrinology* et *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*.

Depuis novembre 2016, je poursuis ma thèse de science en parallèle de ma nomination au poste de CCA – AH puis depuis septembre 2019 comme Praticien Hospitalier Universitaire dans le service du Pr JEANDIDIER avec une implication dans la recherche clinique, dans l'organisation des soins et dans la formation à la fois au lit du malade pour les internes et dans une approche plus théorique pour des étudiants en médecine. A court terme (en 2020), un poste de MCU-PH sera demandé.

Bonne lecture

Thibault BAHOUAGNE

Publications

Publications originales :

- Thèse de sciences :

Individual evaluation of luteinizing hormone in aged C57BL/6 J female mice. **T. Bahougne**, E Angelopoulou, N Jeandidier, V Simonneaux. Geroscience. 2019 Oct 23.

Impact of circadian disruption on female mice reproductive function. **T. Bahougne**, M. Kretz, E. Angelopoulou, N. Jeandidier, and V. Simonneaux. Soumis à Endocrinology en décembre 2019.

- Thèse de médecine :

Macroprolactinomas in children and adolescents: factors associated with the response to treatment in 77 patients. Salenave S, Ancelle D, **Bahougne T**, Raverot G, Kamenický P, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Linglart A, Souchon PF, Nicolino M, Young J, Borson-Chazot F, Delemer B, Chanson P. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Mar.

- Dans le domaine de la diabétologie :

Greffe d'îlots pancréatiques : les indications actuelles. L. Kessler, **T. Bahougne**, P. Baltzinger. Diabétologie pratique. N° 48, Cahier 1, décembre 2014

Combined pancreatic islet-lung transplantation: a novel approach to the treatment of end stage cystic fibrosis. Baltzinger P., **Bahougne T.**, Kessler L. Janvier 2015. Transplant International.

Greffe combinée de poumon et d'îlots pancréatiques : une nouvelle alternative thérapeutique dans la mucoviscidose. Baltzinger P., **Bahougne T.**, Kessler L. Mars 2015. Diabetes & Metabolism.

Agonistes du récepteur du GLP-1 et fonction rénale chez le diabétique de type 2. Meyer L. **Bahougne T.** Mai 2017- Médecine des Maladies Métaboliques.

Association of sleep apnoea syndrome and autonomic neuropathy in type 1 diabetes. Meyer L, Massuyeau M, Canel C, **Bahougne T**, Assemi P, Perrin AE, Wurtz E, Renaud-Picard B, Iamandi C, Kessler R, Kessler L. Diabetes Metab. 2017 Nov 7.

Technologies au service du patient diabétique et du diabétologue. Jeandidier N. **Bahougne T**. et Meyer L. Médecine des Maladies Métaboliques. Mars 2018.

Évolutions récentes dans la prise en charge du diabète: adaptation du patient à la vie professionnelle. N Jeandidier, T **Bahougne**, L Meyer and E Andrès. May 2018. Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement.

Update on research projects in the field of telemedicine in diabetes, with a focus on remote monitoring (telemonitoring) 2.0 projects. E. Andrès, L. Meyer, A.-A. Zulfiqar, M. Hajjam, S. Talha, **T. Bahougne**, S. Ervé, J. Hajjam, J. Doucet, N. Jeandidier, A. Hajjam El Hassani. Medecine des maladies Métaboliques, février 2019.

Telemonitoring in diabetes: evolution of concepts and technologies, with a focus on results of the more recent studies. E. Andrès, L. Meyer, A.A. Zulfiqar, M. Hajjam, S. Talha, **T. Bahougne**, S. Ervé, J. Hajjam, J. Doucet, N. Jeandidier, A. Hajjam El Hassani. J Med Life. 2019 Jul-Sep.

- Dans le domaine de l'endocrinologie :

Dynamic 18F-FDOPA PET Findings After Carbidopa Premedication in 2 Adult Patients With Insulinoma-Related Hyperinsulinemic Hypoglycemia. Imperiale A, **Bahougne T**, Goichot B, Bachellier P, Taïeb D, Namer IJ. Clin Nucl Med. 2015 Aug.

Successful response to pegylated interferon alpha in a patient with recurrent paraganglioma. **Bahougne T**, Imperiale A, Averous G, Chabrier G, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Dali-Youcef N, Libe R, Baudin E, Roy C, Lang H, Kessler L. Endocr Relat Cancer. 2017 Feb.

Exploration biologique de l'axe corticotrope. **Bahougne** T. Reix N. Talbi R, Ortega F., Jeandidier N. Feuilles de biologie, N°341, mars 2018.

Functioning mediastinal paraganglioma associated with a germline mutation of von Hippel-Lindau gene. T **Bahougne**, P Romanet, A Mohamed, T Cuny, A Barlier, P Niccoli. Journal of Clinical Medicine. Mai 2018.

Early 18F-FDOPA PET/CT imaging after carbidopa premedication as a valuable diagnostic option in patients with insulinoma. Leroy-Freschini B, Amodru V, Addeo P, Sebag F, Vix M, Brunaud L, Klein M, **Bahougne** T, Bachellier P, Castinetti F, Goichot B, Chevalier E, Taieb D, Imperiale A. European journal of nuclear medicine and molecular imaging. Janvier 2019

Revue en rapport avec la thèse de science :

A Multi-Oscillatory Circadian System Times Female Reproduction. Simonneaux V, **Bahougne** T. Front Endocrinol (Lausanne). 2015 Oct 20.

The role of kisspeptin and RFRP in the circadian control of female reproduction. Beymer M, Henningsen J, **Bahougne** T, Simonneaux V. Mol Cell Endocrinol. 2016 Jun 27.

Daily rhythms count for female fertility. Simonneaux V., **Bahougne** T. Angelopoulou E. Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism. November 2017

Remerciements

A ma directrice de thèse, Dr Valérie SIMONNEAUX, merci pour votre chaleureux accueil. Merci de m'avoir proposé ce projet qui vous tient à cœur. Merci pour votre gentillesse. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous durant ces 5 années.

Au Mme le Pr Nathalie JEANDIDIER, Professeure d'Endocrinologie au CHRU de Strasbourg, merci pour votre confiance et votre soutien. Merci pour votre écoute et vos conseils depuis mon arrivée à Strasbourg.

A Mlle Mathilda KRETZ, merci pour ton engagement dans ce projet, j'ai pu constater durant ton année de master 2 que tu as su garder le même enthousiasme que tu avais déjà auprès de tes patients.

A Mme Marie-Pierre LARAN-CHICH, Mme Dominique CIOCCA, aux techniciens de l'animalerie (Bruno, Olivier), à Mr Nicolas LETHENET, à Mr Vincent-Joseph POIREL, à Mr Jorge MENDOZA, à Mme Christina SANDU, à Mr Etienne CHALLET et tous ceux que j'oublie de l'INCI, merci pour votre accueil et vos conseils.

Aux étudiants en thèse de l'INCI : Fernando CARAREZ, Hassan AINANI, Nora SALABERRY, Eleni ANGELOPOULOU, Jo HENNINGSEN, Raja TALBI, Clarisse QUIGNON, Bastien LECLERCQ, Marine PARKER, Perrine SPINNHIRN et Sébastien MILESI : merci pour votre gentillesse.

A Mr le Pr Henry GIN et Mr le Pr Antoine TABARIN, Professeurs d'Endocrinologie au CHU de Bordeaux, merci de m'avoir transmis la passion pour votre spécialité durant mon externat ainsi que l'importance de la rigueur indispensable à la pratique médicale.

A Mme le Pr Anne BARLIER, responsable d'équipe à Marseille, dans laquelle j'ai réalisé mon master 2, je tiens à vous remercier de m'avoir initié à la recherche fondamentale. Votre encadrement bienveillant et votre passion, m'ont fait poursuivre dans une voie passionnante que je n'envisageais pas initialement.

A Mr le Pr CHANSON et Pr YOUNG, Professeurs d'Endocrinologie au CHU de Bicêtre, merci de m'avoir accueilli dans votre service. Merci de m'avoir encadré avec sympathie dans mon travail de thèse de médecine et de m'avoir soutenu dès que j'en avais besoin.

A Mme le Dr CAZABAT, médecin endocrinologue, passionnée et passionnante à écouter.

A ma mère, Martine, mes sœurs (Céline, Nadège et Sabine), merci pour votre présence précieuse.

Au Dr LAURET et au Dr TRIOULAIRE, Médecins Généralistes à Lesparre-Médoc, véritables « responsables » de ma vocation. Merci pour votre aide « très » précoc.

A mes Ami(e)s,

De Lesparre-Médoc, de Bordeaux, de Strasbourg, de Paris et de Marseille. Merci pour tous les bons moments que nous avons et que nous passerons ensemble.

A la bande des Carabins de Bordeaux, merci de toujours être là malgré la distance.

A ma meilleure amie, **Béatrice DESNOUS - LE NOIR,** la force ultime. Tu es un exemple.

A Olivier SANGLADE, à **Guillaume BANNWARTH** et tous les autres strasbourgeois, merci pour votre amitié.

A Thierry Lhermitte, parrain de la Fondation de la Recherche Médicale (FRM). Merci, en premier lieu à la FRM de m'avoir permis de débiter cette thèse durant deux années à temps plein. Un temps indispensable à la découverte de monde de l'*in vivo*.

Et merci à Thierry Lhermitte, outre le pari qu'était de réaliser ces remerciements, votre engagement personnel auprès de la FRM vous honore.

A Delphine, ma compagne, ma moitié, ma Loute. Il y a eu un avant et un après notre rencontre. Comme j'aime te le dire, nous nous sommes rencontrés trop tard. Merci pour tes encouragements et ta patience. Avec notre fille Margaux, vous êtes les deux plus belles réussites de ma vie.

Abréviations

APO : Aire préoptique

ARN : Noyau arqué

AVPV : Noyaux périventriculaires antéroventraux

BMAL : Brain and Muscle Arnt-Like

CRY : Cryptochrome

DMH : Hypothalamus dorsomédian

DYN : Dynorphine

ER (α et β) : Récepteurs aux œstrogènes

ERE : Éléments de réponse aux œstrogènes

FSH : Hormone Stimulatrice des Follicules

GnRH : Hormone libérant les gonadotropines

GH : Hormone de croissance

HHI : Hypogonadisme hypogonadotrope isolé

HHG : Axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope

ICV : Intracérébroventriculaire

IV : Intraveineuse

Kp : Kisspeptine

Kiss1/KISS1 : Gène codant pour le neuropeptide kisspeptine chez le rongeur / humain

Kiss1r/KISS1R : Gène codant pour le récepteur de kisspeptine chez le rongeur / humain
(auparavant GPR-54)

KNDy : Neurones à kisspeptine, neurokinine B et dynorphine.

LH : Hormone lutéinisante

NKB : Neurokinine B

NSC : Noyaux supra chiasmatiques de l'hypothalamus

OVX : Ovariectomisées

PeN : Noyaux ventraux périventriculaires

PER : Période

POMC : Neurones à pro-opiomélanocortine

PVN : Noyaux ventraux paraventriculaires

RFRP : Peptide relié aux RFamides

SC : Sous cutané

TSH : Hormone stimulant la thyroïde

aVP : antagoniste de la vasopressine

VIP : Peptide vasoactif intestinal

VP : Vasopressine

VPM : Noyaux ventraux pré mamillaire

VPR : Récepteur de la vasopressine

V1A/B : Sous type du récepteur de la vasopressine

I. Introduction

Les organismes sont naturellement soumis à des variations journalières et saisonnières de leur environnement, auxquelles ils s'adaptent afin d'assurer leur survie et celle de leur descendance. L'activité de reproduction est particulièrement sensible aux variations environnementales de la lumière, de la chaleur et de la disponibilité en nourriture. Chez les mammifères femelles, l'activité de reproduction, et notamment l'ovulation, dépend des cycles journaliers. Ceci a été particulièrement montré chez les rongeurs nocturnes où le pic préovulatoire de l'hormone lutéinisante (LH) a lieu en fin d'après-midi (fin de phase de repos) le jour du proestrus, à une heure qui varie sensiblement selon les espèces (Parkening, Collins, and Smith 1982). Le déclenchement du pic de LH à ce moment précis du jour du cycle estrien implique à la fois l'activité de l'horloge circadienne des noyaux supra chiasmatiques de l'hypothalamus (NSC), synchronisée par l'alternance jour/nuit de la lumière, et l'effet rétroactif positif des œstrogènes produit par les oocytes matures (Bronson and Vom Saal 1979). Chez les femmes également, des études indiquent une plus grande occurrence du pic préovulatoire de LH à la fin de la phase de repos (fin de nuit)(Kerdelhué et al. 2002). L'importance du système circadien dans le phasage du pic LH est moins documentée chez les femmes, néanmoins des études rapportent des effets négatifs d'une perturbation de la rythmicité circadienne sur les cycles menstruels et par conséquent sur la fertilité (Simonneaux & Bahougne 2015, pour revue). Or un nombre croissant de femmes, notamment dans les pays industrialisés (16% des actifs en France en 2013), travaille dans des conditions d'horaires décalés qui sont susceptibles d'altérer leur capacité à procréer (Cordina-Duverger et al. 2018). Pourtant à ce jour, peu de travaux fondamentaux ont évalué l'effet des horaires décalés sur l'axe reproducteur.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail étaient d'étudier les effets d'un décalage de phase unique (mimant un déplacement transméridien ou « jet lag ») ou chronique (mimant le travail en horaires décalés ou « shiftwork ») sur les cycles reproducteurs de souris (C57BL/6J) femelles adultes. Dans ce but j'ai 1) mis au point un modèle de suivi longitudinal (sur plusieurs mois) de la sécrétion de LH le jour du proestrus sur des individus uniques ; 2) analysé les effets d'une avance ou d'un retard de phase unique (10h) sur les cycles estriens et l'occurrence du pic préovulatoire de LH ; 3) analysé les effets d'avance/retard de phases chroniques (jusqu'à 9 mois) sur les cycles estriens, le pic préovulatoire de LH et la fertilité ; 4) mis au point d'injection intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de peptides associée au suivi individuel de LH afin de

proposer des méthodes de resynchronisation du pic préovulatoire de LH chez des souris soumises à des déphasages.

II. Physiologie de l'axe reproducteur féminin

A. L'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien est rythmique

L'activité reproductrice des mammifères femelles s'organise en cycles réguliers (cycles menstruels chez la femme, cycles estriens chez les rongeurs) contrôlés par l'interaction complexe entre le système circadien, des neuropeptides hypothalamiques, les gonadotrophines (LH : Hormone Lutéinisante, et FSH : Hormone Stimulatrice des Follicules sécrétées par les cellules gonadotropes hypophysaires) et les hormones sexuelles stéroïdiennes produites par les ovaires (Figures 1 et 2). L'objectif de ce système de régulation est la production synchrone d'un oocyte mature (lors de l'ovulation) avec un tractus reproducteur réceptif dans lequel un embryon pourra se développer dans des conditions environnementales favorables.

Durant la première partie du cycle reproducteur (phase folliculaire chez la femme, metestrus-diestrus chez les rongeurs), les cellules gonadotropes hypophysaires sécrètent plus de FSH que de LH. Cette relative prépondérance de la sécrétion de FSH en première partie de cycle participe au développement et au recrutement des follicules ovariens. Sous l'effet de la FSH, la croissance des cellules de la granulosa des follicules (follicules antraux recrutés puis follicule(s) dominant(s)) induit une augmentation progressive de la sécrétion de l'hormone stéroïdienne ovarienne, l'œstradiol, et l'augmentation de l'expression des récepteurs à LH au niveau des cellules de la granulosa (Themmen and Huhtaniemi 2000). Durant cette phase précoce, les pulses de LH surviennent avec une fréquence élevée (période de 1 à 2 heures chez la femme, 20 min chez les rongeurs) et avec une amplitude uniforme. La fréquence des pulses de LH tend à augmenter durant la fin de cette phase (Figure 3).

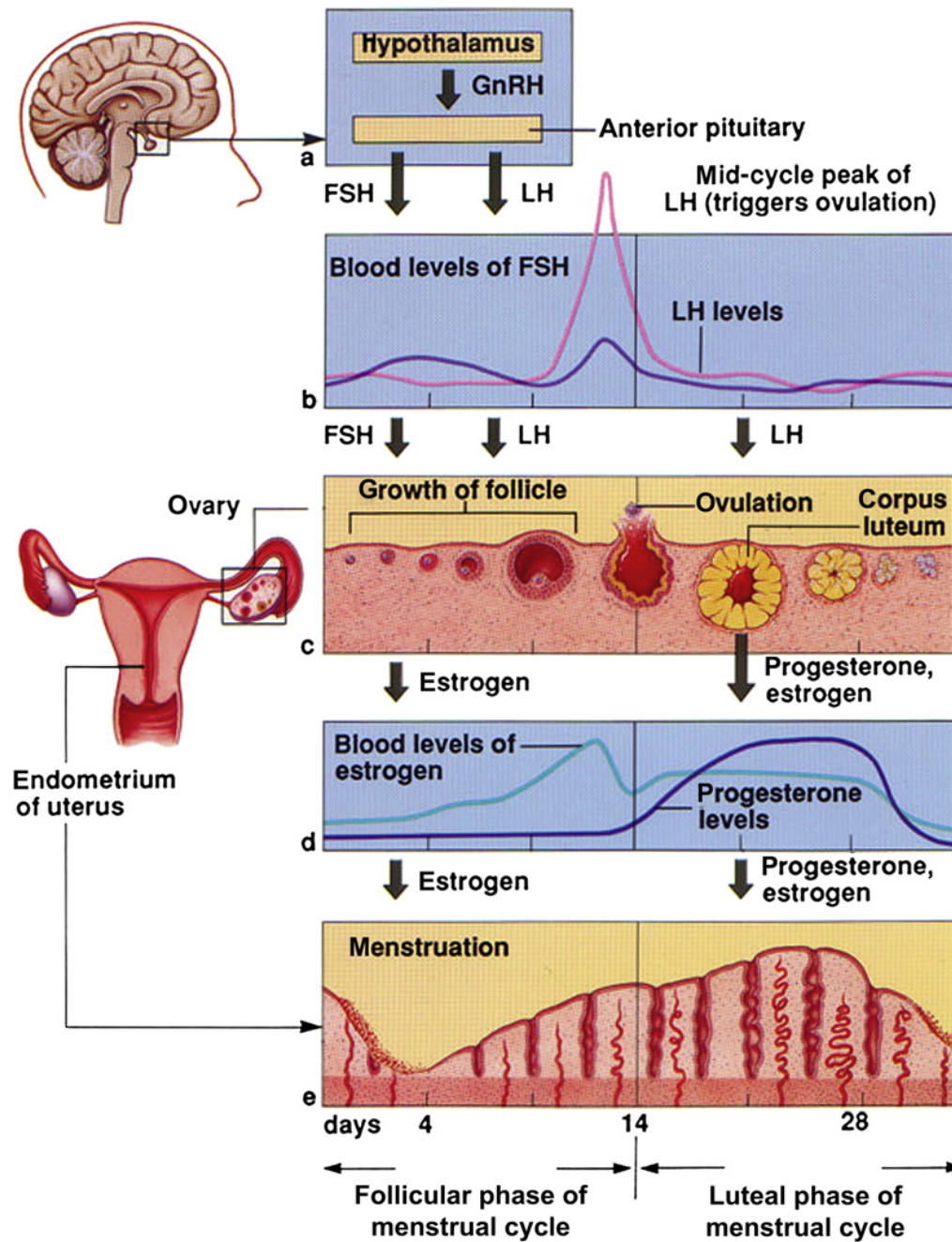


Figure 1 : Le cycle menstruel chez la femme. Changements des taux sériques de LH, de FSH, d'estradiol et de progestérone, des follicules ovariens et de la muqueuse de l'endomètre au cours du cycle menstruel. Selon (Melmed and Kaiser Ursula. 2010).

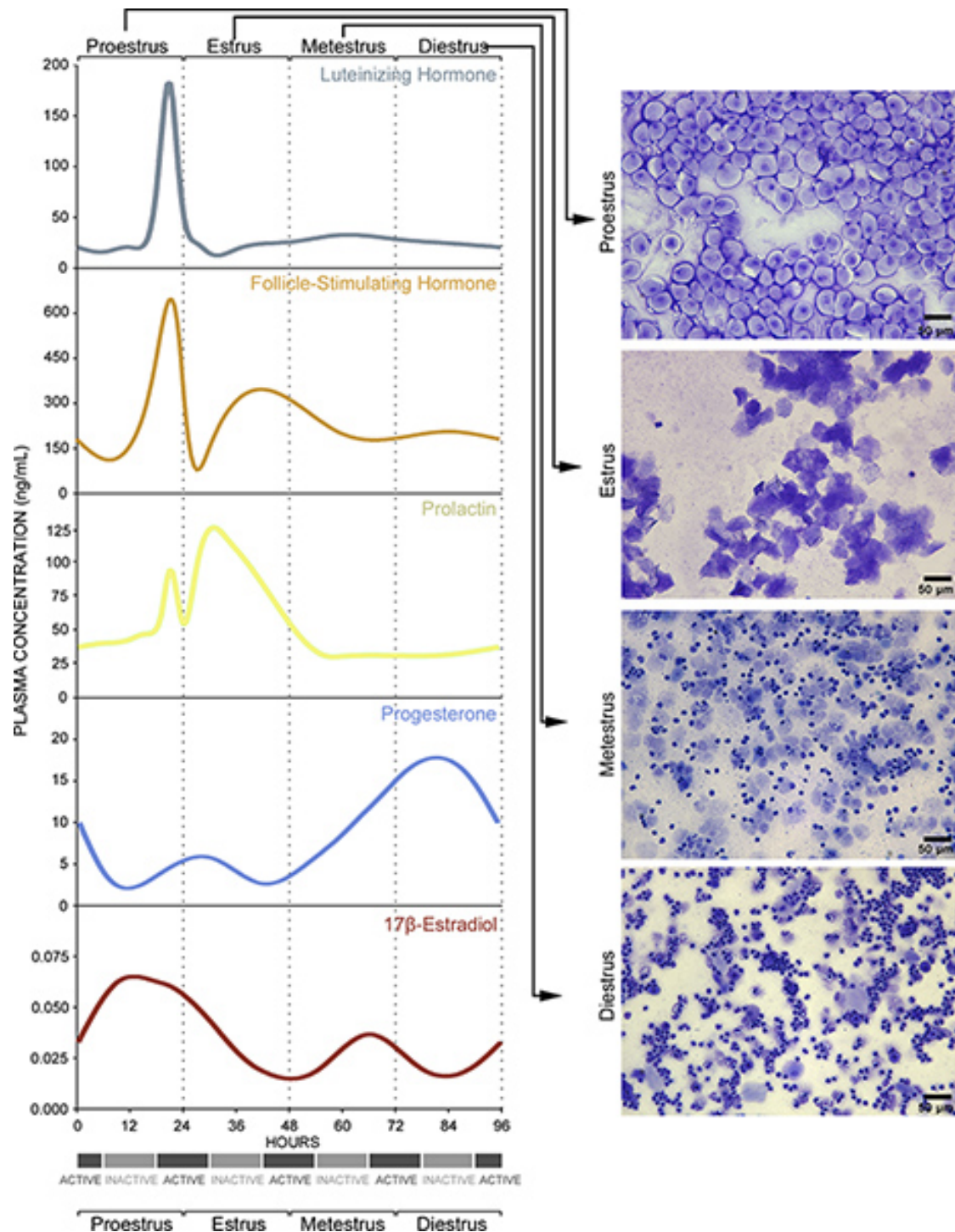


Figure 2: Cycle estrien chez la souris femelle. Changement des concentrations circulantes de LH, FSH, prolactine, progestérone et estradiol au cours des 4 stades estriens (proestrus, estrus, métestrus et diestrus) identifiés par cytologie vaginale. Selon (McLean et al. 2012).

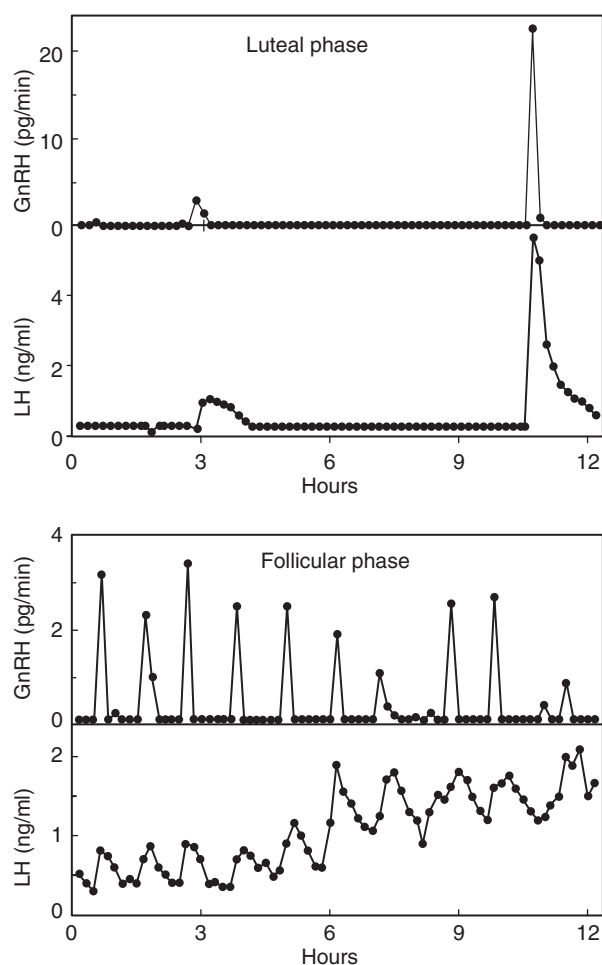


Figure 3: La sécrétion de GnRH et de LH varie au cours du cycle estrien chez la brebis. La sécrétion pulsatile de GnRH et de LH au cours de la phase lutéale tardive (12-13ème jour) et de la phase folliculaire tardive (39–51 h après le retrait de la progestérone). Notez la différence d'échelle de l'axe des ordonnées entre les phases lutéale et folliculaire. D'après (Moenter et al. 1991).

La seconde partie du cycle reproducteur (phase lutéale chez la femme, proestrus - estrus chez la souris) débute avec une augmentation très importante et transitoire de sécrétion de LH (Figures 1 et 2). Le pic de LH a une triple fonction : (1) induction de l'ovulation du/des follicule(s) dominant(s), (2) reprise de la méiose ovocytaire, (3) arrêt de la division des cellules de la granulosa et formation du corps jaune (responsable de la sécrétion de progestérone favorisant l'implantation embryonnaire). L'ovulation survient généralement quelques heures après le pic de LH chez les rongeurs et 9 à 23 heures après le pic de LH chez la femme (Pauerstein et al. 1978)(Spieler 1980). Le pic préovulatoire de LH survient en moyenne tous les 4-5 jours chez les rongeurs, et tous les 28 jours chez la femme. Le moment de l'occurrence du pic de LH est dépendant d'une augmentation du taux circulant d'œstrogène (Christian, Mobley, and Moenter 2005)(Radovick, Levine, and Wolfe 2012) et de signaux journaliers. En effet, le

pic préovulatoire de LH survient spécifiquement à la fin de la période de repos, c'est-à-dire en fin de jour pour les rongeurs nocturnes (Figure 4) et en fin de nuit pour les rongeurs diurnes comme le rat roussard (*Arvicanthis ansorgei*) (McElhinny et al. 1999). Chez la femme également, il a été montré que dans 50 à 80 % des cas le pic de LH survient en fin de période de repos, c'est-à-dire entre 4 et 8 heures du matin (Figure 5) (Cahill et al. 1998) (Kerdelhué et al. 2002).

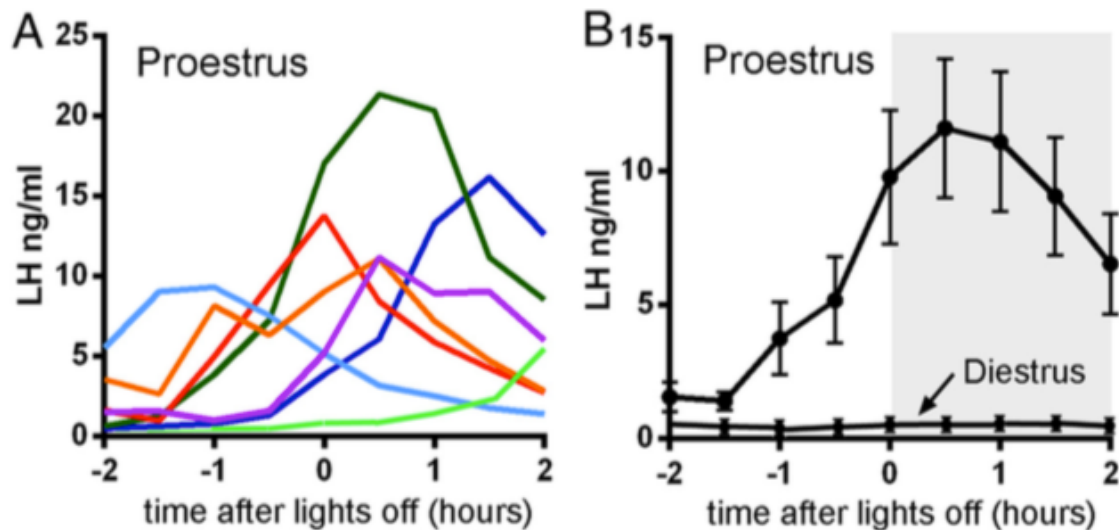


Figure 4 : Profils de sécrétion de LH chez des souris femelles C57BL/6J en proestrus. A, Profils individuels de LH de sept souris individuelles le jour du proestrus, 2 heures avant et 2h après l'extinction de la lumière. Concentrations moyennes (SEM) de LH chez cinq souris en proestrus. Les concentrations circulantes de LH augmentent 1 heure avant l'extinction de la lumière. Les niveaux de chez LH des souris en diestrus, échantillonnées au cours de la même période, ne montrent aucune augmentation à la transition jour/nuit. D'après (Czieselsky et al. 2016).

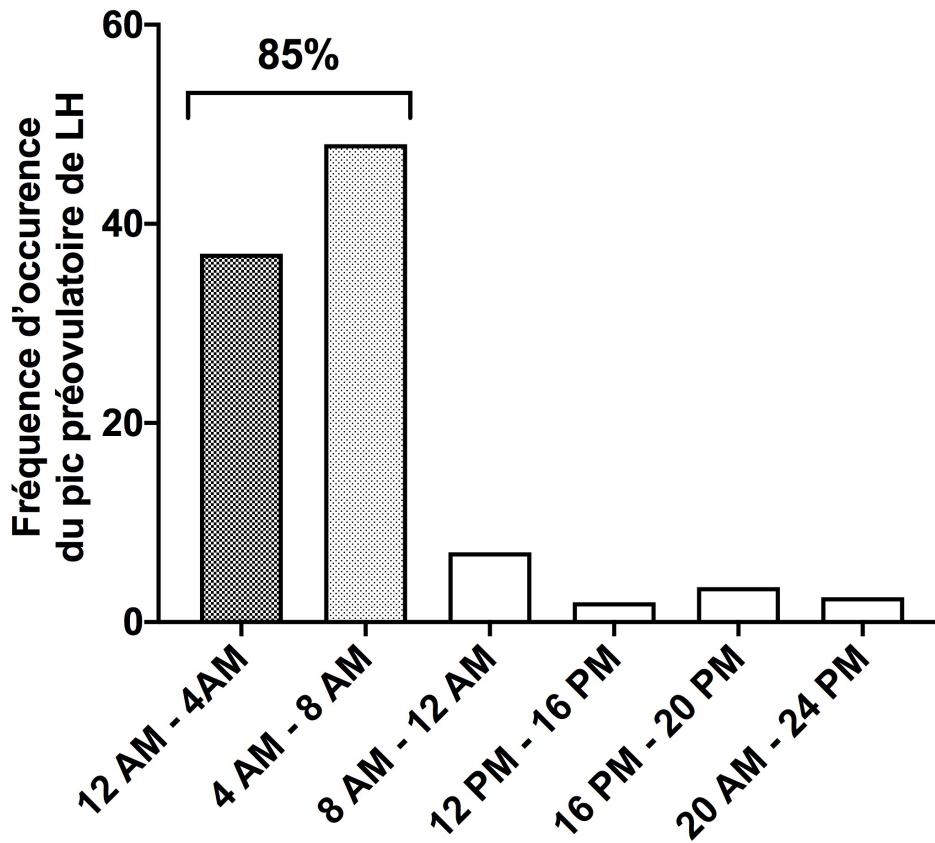


Figure 5 : Fréquence de survenue du pic préovulatoire de LH en fonction de l'heure de la journée chez la femme. Données établies à partir de 155 cycles menstruels (sur 169 cycles observées) (chez 35 femmes consultant pour une infertilité d'origine gynécologiques ou idiopathiques). D'après (Cahill et al. 1998).

Après le pic de LH et jusqu'à la fin du cycle reproducteur, la fréquence des pulses de LH diminue significativement (un pulse toutes les 2 à 6 heures) et la variabilité des amplitudes de ces pulses augmente (Melmed and Kaiser Ursula. 2010)(Figure 6).

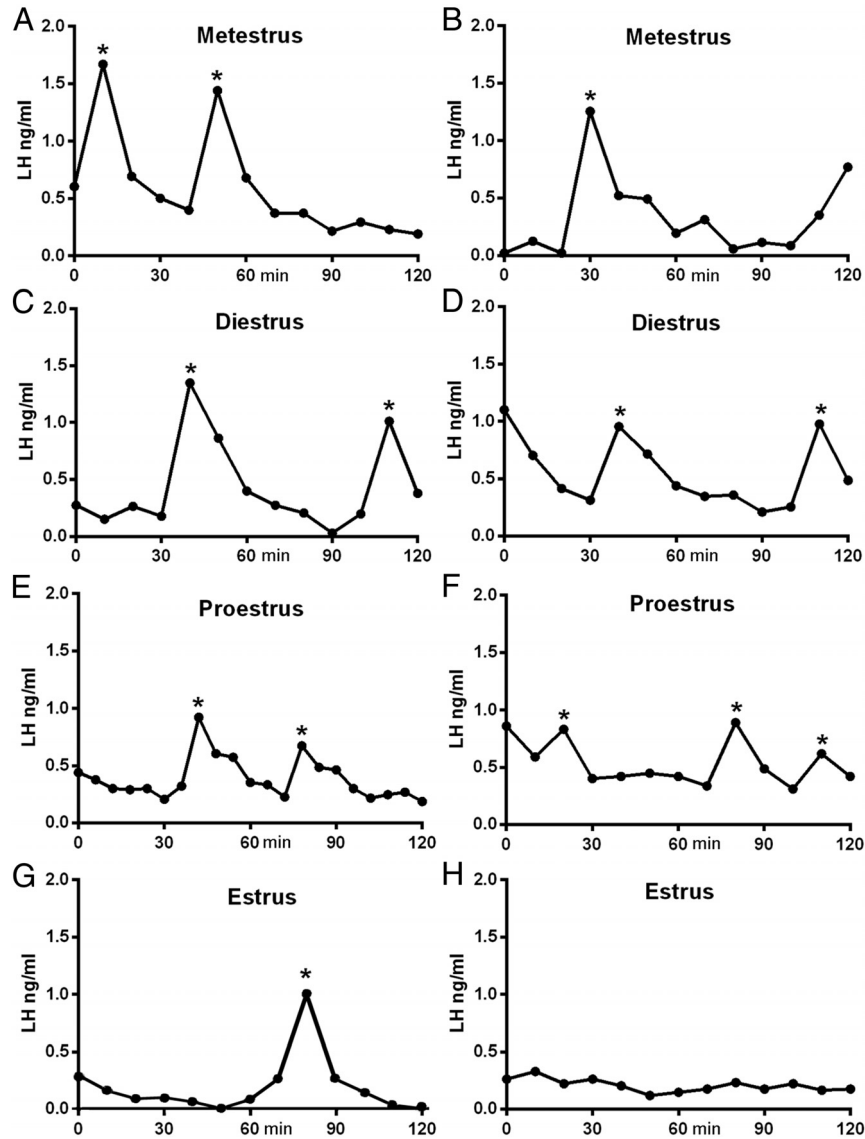


Figure 6 : Profils représentatifs de la sécrétion de LH chez la souris femelle C57BL/6J à différents stades du cycle estrien. Deux exemples sont donnés pour chaque étape A – H. Les impulsions détectées par l'algorithme DynePeak sont indiquées par un astérisque. L'échantillonnage a été réalisé en milieu de journée entre 11h00 et 13h00. D'après (Czieselsky et al. 2016).

B. Les neurones à GnRH

La sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, LH et FSH, est sous le contrôle d'une neurohormone hypothalamique, l'hormone libérant les gonadotrophines (GnRH) synthétisée dans des neurones localisés au niveau de l'aire préoptique (APO) et de l'organum vasculosum laminalis terminalis. Ces neurones projettent vers l'éminence médiane où la GnRH est sécrétée de façon pulsatile directement dans la circulation porte hypophysaire. La GnRH active des

récepteurs spécifiques localisés sur les cellules gonadotropes hypophysaires ce qui induit la synthèse et la libération de LH et de FSH. Les neurones à GnRH sont considérés comme la clef de voûte de l'axe reproducteur, comme l'ont montrées les mutations des gènes codant pour la GnRH (Bouligand et al. 2009) ou de son récepteur (Chevrier, Guimiot, and de Roux 2011). En effet ces mutations sont décrites comme responsables de tableau d'hypogonadisme hypogonadotrope isolé (HHI) congénitaux normosmique avec retard pubertaire et infertilité (Chevrier, Guimiot, and de Roux 2011). La pulsatilité de la libération de GnRH est critique pour induire une sécrétion correcte des gonadotrophines, et il existe une corrélation très étroite entre la pulsatilité de sécrétion de GnRH et la sécrétion de LH et de FSH. L'administration pulsatile de GnRH permet la sécrétion de LH et de FSH tandis que l'administration continue de GnRH induit un blocage réversible de la sécrétion des gonadotrophines (Knobil et al. 1980)(Figure 7). De plus, selon la fréquence des pulses de GnRH, la sécrétion de LH et de FSH sera régulée différemment (Figure 8). Chez des patientes souffrant d'un syndrome de Kallmann, l'administration exogène pulsatile de GnRH (un pulse par heure) est capable de restaurer le pic préovulatoire de LH, l'ovulation et un cycle menstruel normal (Crowley and McArthur 1980)(Chryssikopoulos et al. 1998).

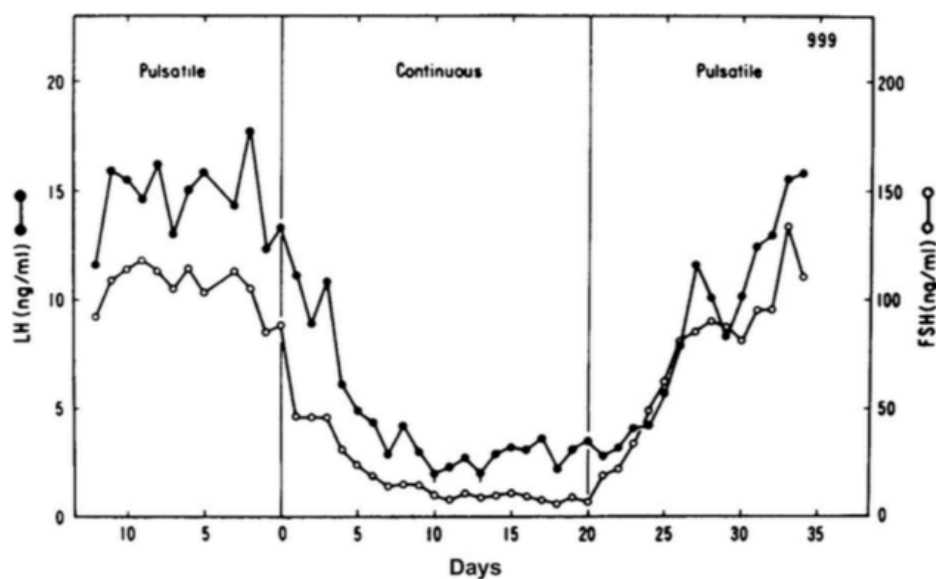


Figure 7 : L'administration pulsatile de GnRH chez le singe rhésus est essentielle pour la sécrétion physiologique de LH et de FSH. D'après (Knobil et al. 1980).

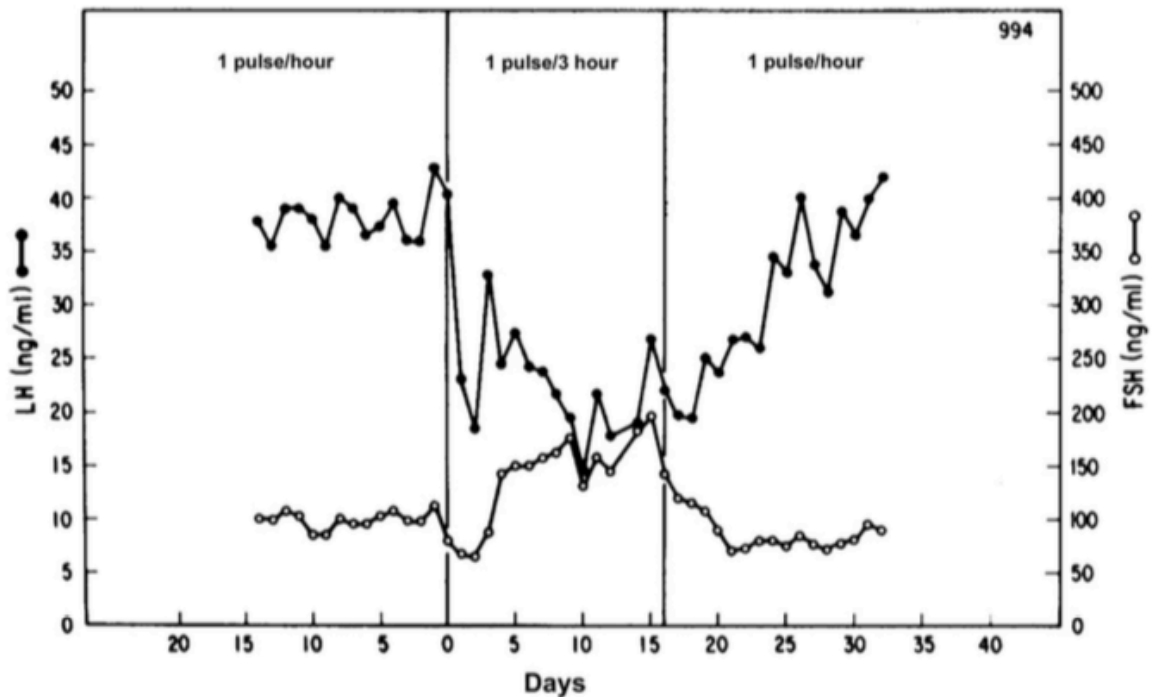


Figure 8 : La fréquence d'administration pulsatile de la GnRH a des effets différents sur la sécrétion des gonadotrophines. Une fréquence d'administration de 1 pulse/heure de la GnRH favorise la sécrétion de LH, tandis qu'une fréquence de 1 pulse/3heures favorise la sécrétion de FSH et diminue la sécrétion de LH. D'après (Knobil et al. 1980).

C. Les neurones à kisspeptine

a. Généralités

De nombreux neurotransmetteurs ont été proposés comme régulant l'activité des neurones à GnRH jusqu'à la découverte d'un puissant activateur de la libération de la GnRH, un neuropeptide appelé kisspeptine (Kp). En 1996, l'équipe du Dr D.R. Welch a découvert un gène localisé au niveau de deux exons du chromosome 1 de la souris, encodant un peptide appelé métastatine à cause de ses propriétés anti-métastatiques sur des cellules issues de mélanome malin (Lee et al. 1996). Ce gène a été nommé *KISS*, en référence au chocolat « KISS » fabriqué dans la région de Hershey où cette équipe était établie.

Cependant, le récepteur de ce peptide, GPR-54 (ou KISS1R) découvert plus tardivement, s'avéra avoir un rôle majeur dans la physiologie reproductrice. En effet en 2003, deux groupes reportent chez l'humain que des mutations inactivatrices sur le gène *GPR-54* sont responsables de tableau d'hypogonadisme hypogonadotrope isolé (HHI) congénitaux normosmique chez

deux familles consanguines (de Roux et al. 2003)(Seminara et al. 2003)(Figure 9). En parallèle un phénotype identique a été rapporté chez des souris présentant une délétion homozygote du gène *GPR-54* (Seminara et al. 2003)(Lapatto et al. 2007)(Figure 10). Depuis, d'autres mutations de *GPR-54* ont été décrites chez l'humain (Brioude et al. 2013)(Francou et al. 2016)(Nalbantoglu et al. 2019)(Moalla et al. 2019). De manière générale, les mutations sur le gène de *GPR-54* seraient responsables de 2% des HHI (Francou et al. 2016).

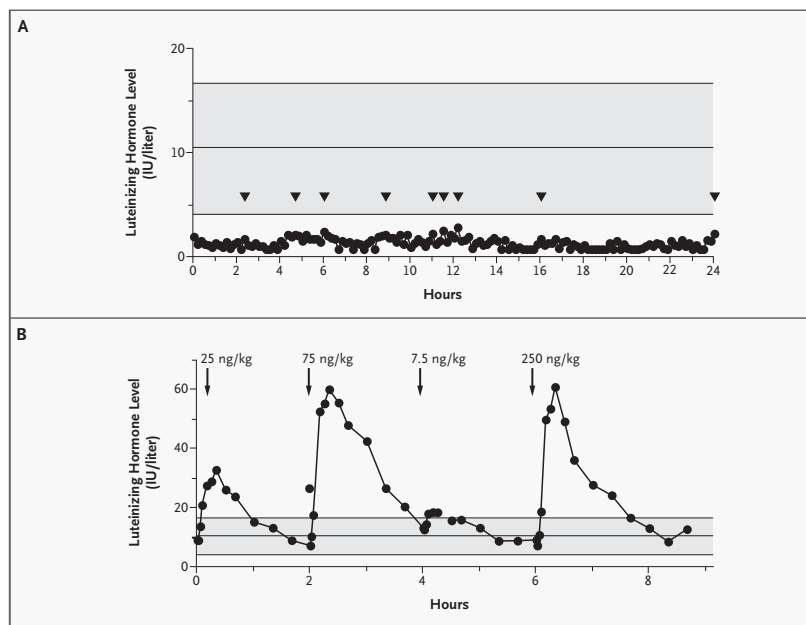


Figure 9 : Phénotype biochimique chez un patient porteur des mutations R331X et X399R de GPR-54. Le graphique A montre la sécrétion de base de LH autour de 2,0 UI/l (mesures à 10 minutes d'intervalle) sur une période de 24 heures. Les flèches représentent des pulses de LH. Le graphique B montre la réponse de la LH suite à l'administration pulsatile exogène de GnRH (administrée à différentes doses, dans un ordre aléatoire). Les zones ombrées des graphiques A et B représentent la concentration moyenne (± 2 déviation standard) de la sécrétion de LH chez 20 hommes normaux. Adapté d'après (Seminara et al. 2003).

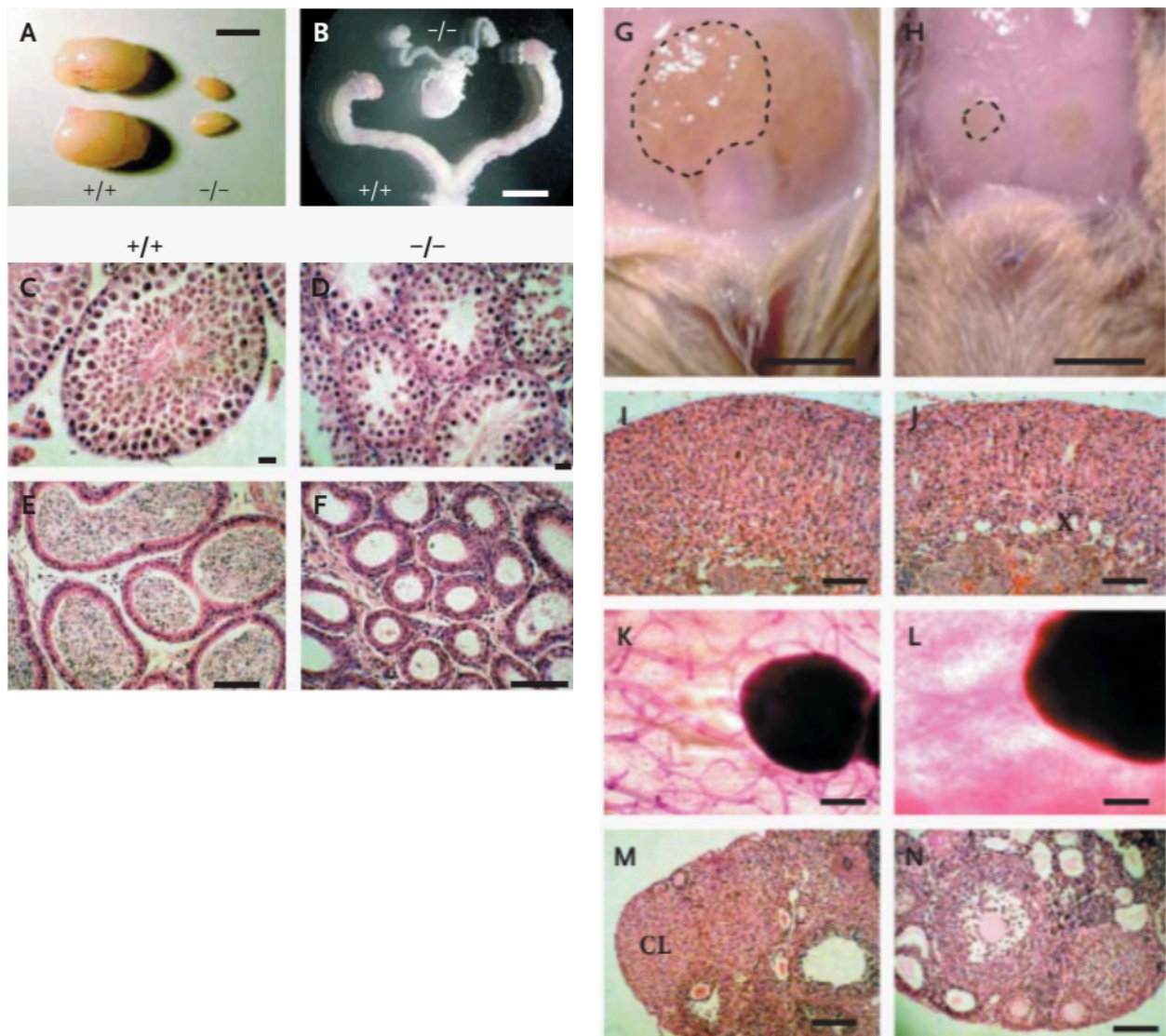


Figure 10 : Anatomie gonadique et caractéristiques sexuelles secondaires de souris sauvages et mutées au niveau du gène *GPR-54*. Les panneaux A et B montrent la réduction de la taille des testicules chez les souris mutantes (-/-) par rapport à des souris sauvages (+/+). Les panneaux C, D, E et F montrent la réduction du nombre de spermatozoïdes dans les tubules séminifères (D) et l'absence de spermatozoïdes dans l'épididyme (F) ; chez les souris mâles mutées (-/-) par rapport aux souris sauvages (C et E). Le panneau H montre un développement réduit de la glande préputiale chez des souris mutées par rapport aux souris sauvages (G). Les panneaux I et J montrent l'absence chez les souris mutées (J) et la présence chez les souris sauvage (I) de la zone prépubère X dans la glande surrénale. Les panneaux K et L montrent une réduction de la formation de canaux mammaires chez les souris mutées (L) par rapport au souris sauvages (K) (la masse sombre est constituée de ganglions lymphatiques). Les panneaux M et N montrent la présence chez les souris sauvages (M) et l'absence chez les souris mutées (N) de follicule de De Graaf et de corps jaunes (CL). Les barres d'échelles sont de 0,5 cm (A, B) ; 50 μm (C, D) ; 100 μm (E, F) ; 1 cm (G, H) ; 20 μm (I, J) ; 0,5 cm (K, L) et 300 μm (M, N) D'après (Seminara et al. 2003).

Le gène *KISS1* encode un propeptide de 145 amino acides, Kp145, lequel est clivé en plusieurs peptides avec différents nombres d'acides aminés, de 54 (Kp 54 anciennement appelé métastine) à 10 acides aminés (Kp10). Ces différents peptides sont caractérisés par la même séquence de 10 acides aminés en position C terminale (Y N W N S F G L R F-NH₂), ce qui leur confère la même activité sur le récepteur KISS1R. La découverte du rôle de KISS1R dans la fonction reproductrice a été une étape importante dans le domaine de la biologie de la reproduction, et actuellement, de nombreuses études indiquent que les Kp sont des régulateurs critiques de la différenciation et de la maturation normale de la fonction reproductrice chez l'ensemble des mammifères, y compris chez l'humain (Pinilla et al. 2012). Dans des modèles de souris *Kiss1*-knockout, un HHI associé à une infertilité est également observé (Lapatto et al. 2007). Cependant une variabilité phénotypique avec une atteinte de l'axe gonadotrope variable est observée entraînant, parfois, des phénotypes moins sévères comparativement aux souris *GPR-54*-knockout. Chez les modèles de souris *GPR-54*-knockout, aucune anomalie de migration des neurones à GnRH n'est observée, l'axe gonadotrope est fonctionnel et stimuable par des injections de GnRH (Messenger et al. 2005)(García-Galiano et al. 2012). Certains sous-groupes de souris *Kiss1*-knockout présentent des cycles estriens mais sans ovulation, malgré la persistance d'un axe gonadotrope fonctionnel (Lapatto et al. 2007)(Chan et al. 2009). Une autre étude, ayant supprimé l'expression de Kp chez des souris, rapporte l'absence d'anomalie de la puberté ou de la fertilité, mais simplement des ovaires de plus petite taille (Mayer and Boehm 2011). Il est possible que dans cette dernière étude, l'ablation du gène *Kiss1* soit incomplète. Chez l'humain, des tableaux d'HHI normosmique ont également été décrits en cas de mutation perte de fonction du gène *Kiss1* (Topaloglu et al. 2012a).

Les données *in vivo* montrant l'effet d'injection de Kp (injectée par voies intraveineux (IV), sous-cutanée (SC) ou ICV ont pour la majorité été obtenues chez des modèles animaux mâles (Tableau 1). Des travaux réalisés chez des souris femelles prépubertaires ont montré une augmentation de la sécrétion de LH après des injections SC de Kp (Matsui et al. 2004). Chez les brebis (avec ou sans OVX avec implants d'œstrogènes), l'infusion continue de Kp par voie SC ou IV induit une sécrétion de LH comparable à celle du pic préovulatoire physiologique (Caraty et al. 2007)(Sébert et al. 2010) ; un effet plus important que celui obtenu suite à des injections uniques (même avec des doses supérieures). A notre connaissance aucune donnée n'existe sur l'effet d'injection de Kp chez des rongeurs femelles adultes le jour du proestrus. L'ensemble de ces données montre, que le système KISS/KISS1R est indispensable pour une maturation complète de la fonction de reproduction.

b. Neuroanatomie des neurones à Kisspeptine

Les neurones à Kp sont localisés au niveau de deux aires hypothalamiques, les noyaux arqués (ARN), et plus rostralement dans l'APO avec une localisation différente selon les espèces tels que les noyaux périventriculaires antéroventraux (AVPV) chez les rongeurs. Chez les rongeurs, les neurones Kp de l'AVPV projettent essentiellement sur les corps cellulaires des neurones à GnRH tandis que les neurones à Kp de l'ARN envoient des projections au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH dans l'éminence médiane (Gottsch et al. 2004)(Clarkson and Herbison 2006)(Clarkson et al. 2009)(Yip et al. 2015). Par ailleurs, les neurones Kp de l'ARN synthétisent deux autres neuropeptides : la neurokinine B (NKB) et la dynorphine (DYN). Il a été proposé que le NKB et la DYN active et inhibe, respectivement, la libération de Kp conférant à ces neurones KNDys de l'ARN un rôle régulateur de la pulsativité de la GnRH (Plant 2019).

De façon notable, les neurones à Kp de l'AVPV présentent un dimorphisme sexuel important, avec 5 à 10 fois plus de neurones à Kp chez les femelles comparativement aux mâles chez les rongeurs (Smith et al. 2005)(Clarkson and Herbison 2006)(Kauffman et al. 2007)(Ansel et al. 2010) et l'humain (Hrabovszky 2014).

c. Effet de la kisspeptine sur l'axe gonadotrope

Le Kp est un puissant stimulateur de la libération de GnRH et donc de la sécrétion des gonadotrophines chez l'ensemble des espèces de mammifère jusque-là explorées (Gottsch et al. 2004)(Navarro et al. 2005)(Dhillon et al. 2005). En effet, l'injection de Kp (périphérique ou centrale) permet une augmentation de la sécrétion des gonadotrophines et de la fréquence des pulses (LH plus que la FSH)(George, Anderson, and Millar 2012a) et ce de façon GnRH-dépendante chez les rats (Navarro, Castellano, et al. 2004)(Matsui et al. 2004), souris (Messenger et al. 2005), hamsters (Revel et al. 2006)(Ansel et al. 2010), ovins (Arreguin-Arevalo et al. 2007), brebis (Caraty et al. 2007) (Figure 11) et singes (Guerriero et al. 2012). Des injections ICV de Kp sont suffisantes pour entraîner une sécrétion de LH chez le rat et chez le singe (Navarro et al. 2005)(Plant, Ramaswamy, and Dipietro 2006). Les injections de Kp doivent être courtes et espacées d'un délai d'au moins 2 heures pour induire une sécrétion de LH car autant chez le rat mâle que chez la souris femelle, les injections répétées de Kp induisent une désensibilisation des KISS1R au niveau des neurones à GnRH (Tovar et al. 2006)(d'Anglemont

de Tassigny et al. 2008). Il y a donc, avec les Kp, le même phénomène de tachyphylaxie que celui induit par des injections continues de GnRH chez des singes rhésus (Knobil et al. 1980). De façon notable, la libération de Kp au niveau de l'éminence médiane chez le singe rhésus est pulsatile (Roseweir et al. 2009) et l'application de Kp de manière pulsatile est capable d'entraîner la sécrétion de LH chez le singe juvénile (Plant 2006). Il a été montré que l'application pulsatile de Kp, au niveau d'explants hypothalamiques de souris, entraîne une activation synchrone de la transcription du gène de la GnRH avec une stimulation robuste de la sécrétion de GnRH (Choe et al. 2013).

Enfin, chez les hamsters mâles (Revel et al. 2006) et femelles (Cázarez-Márquez et al. 2019) ainsi que chez la brebis (Caraty et al. 2007), le puissant effet du Kp est illustré par sa capacité à restaurer une activité de reproduction normale chez des individus gardés en photopériode courte (hamster) ou longue (brebis) inhibitrice. De plus, il a été démontré que l'administration de Kp stimule l'ovulation chez le rat (Matsui et al. 2004), le mouton (Caraty et al. 2007), la musaraigne musquée (Inoue et al. 2011), ou encore dans un contexte d'hyperprolactinémie induite chez la souris (Sonigo et al. 2012).

L'ensemble des données expérimentales sur l'effet d'injection de Kp sur la sécrétion de LH sont données dans le tableau 1.

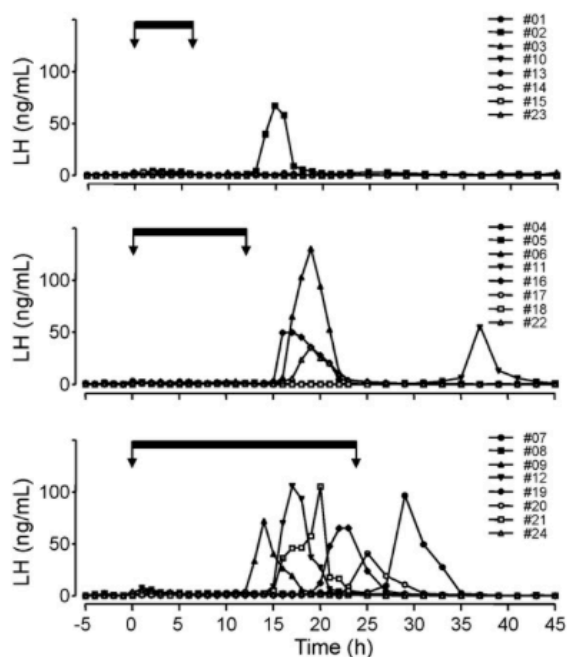
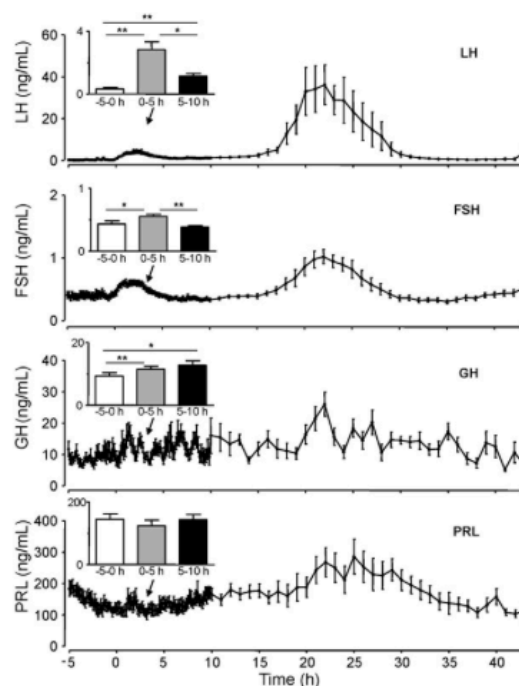
A**B**

Figure 11 : Effet de la kisséptine (Kp) sur la sécrétion des gonadotrophines chez la brebis

A : Profils individuels de sécrétion de la LH chez des brebis en anestrus infusées avec du Kp pendant 6, 12 ou 24h (n = 8 / groupe). La période d'infusion est représentée par les barres noires et les flèches. Le pic préovulatoire de LH s'est produit entre 19 et 34 h après le début de la perfusion de Kp, à l'exception d'une brebis (n° 11), qui a présenté un pic préovulatoire de LH plus tardif (après 43 h).

B : Effet d'une perfusion intraveineuse de Kp sur les concentrations moyennes (± SEM) de LH, d'hormone folliculo-stimulante (FSH), d'hormone de croissance (GH) et de prolactine (PRL) chez 9 brebis ayant eu un pic de préovulatoire de LH. Le début de la perfusion de Kp est indiqué par les flèches. L'infusion de Kp a duré 43 h. Les barres représentent les concentrations moyennes (± SEM) pour 3 périodes successives de 5 h : -5 à 0 h (c'est-à-dire pré-perfusion, barres blanches), 0 à 5 h (barres grises) et 5 à 10 h (barres noires). * P < 0,05 ; ** P < 0,01. D'après (Sébert et al. 2010).

Tableau 1 : Données expérimentales sur l'effet d'injection de Kp sur la sécrétion de LH

Effet d'injection de Kisspeptine sur la LH (1 nmol = 1.3 µg)						
Références	Espèce (n)	Site / voie d'injection	Type de neuropeptide	Dose	Délai de dosage de la LH après injection	Remarques
(Gottsch et al. 2004)	Souris adulte mâle (n=5 par groupe)	ICV	Kp10 Kp54	1 nmol 0.1 fmol 10 fmol 0,1 pmol 10 pmol 0,1 à 5 nmol	30 min	Quel que soit la dose de Kp10 et Kp54, augmentation significative de la LH le plus souvent restant < 5 ng/ml
(Thompson et al. 2004)	Rat male adulte (n>100)	ICV	Kp10	0,1 nmol 0,3 nmol 1 nmol 3 nmol 3 nmol	60 min 10, 20 et 60 min	Augmentation de la sécrétion de LH à partir de 1 nmol avec une moyenne < 10 ng/ml Augmentation significative de la sécrétion de LH à tous les temps (maximum de sécrétion de LH à 60 min, avec une moyenne < 6 ng/ml)
		IP		10, 30 et 100 nmol	20 min	Augmentation de la sécrétion de LH significative à partir de 100 nmol.
(Shahab et al. 2005)	Singe juvénile male (n=3-4)	ICV et IV	hKp 10 (112-121)	100 µg	Toutes les 30 min durant 4h	Augmentation de la sécrétion de LH (ICV et IV) avec un pic à 30 min < 16-20 ng/ml.
(Matsui et al. 2004)	Rat male adulte (n=5)	SC	Métastatine (hKp)	6.7 nmol	0, 1, 2 et 4h	Augmentation de la sécrétion de LH après injection (pic < 40 ng/ml).
	Rat femelle pré pubère (n=5)	SC		6.7 nmol	0, 1, 2 et 4h	Augmentation de la sécrétion de LH 1 et 2h après injection (pic < 40 ng/ml).
(Irwig et al. 2004)	Rat adulte male (n=5)	ICV	Kp54	0,5 nmol	60 min	Augmentation moyenne de la LH < 6 ng/ml
(Messenger et al. 2005)	Souris male adulte (gpr54-/- et sauvage)	IP	mKp 105-119	10 µmol	30 min	Augmentation de la sécrétion de LH chez la souris contrôle (moyenne < 3 ng/ml)
	Brebis acyclique OVX + implants d'E2)	ICV en infusion continue	hKp10	50 nmol sur 4h	Toutes les 10 min durant 10h	Augmentation de la sécrétion de LH (les 2 premières heures) avec des valeurs de LH < 12 ng/ml (effet immédiat). Chez certaines, valeurs de LH < 4 ng/ml.
(Han et al. 2005)	Souris mâle prépubère et adulte (n=6)	ICV	Kp10	10 fmol 0,1 pmol 0,1 nmol	30 min	Variabilité d'effet selon l'âge : Prépubère : effet sur la LH à partir de 0,1 nmol Adulte : effet sur la LH quelque soit la dose avec une moyenne de LH < 6 ng/ml
(Navarro et al. 2005)	Rat mâle adulte (n=10)	ICV	Kp10	0,01 nmol 0,1 nmol 0,5 nmol 1 nmol	15, 30 et 60 min	Augmentation de la sécrétion de LH quelque soit la dose et le temps de mesure
		IV		7,5 nmol	Durant 5 h	Cinétique d'effet après injection IV (prélèvement par 15 min durant 5 heures) avec des pics de LH < 5 ng/ml
(Tovar et al. 2006)	Rat mâle adulte	IV	Kp 10	0.1, 1 et 10 ug 10 ug toutes les 75 min à 4 reprises (durée total 450 min)	Toutes les 15 min durant 3h	Augmentation de la sécrétion de la LH avec un pic à 15 min post injection avec une moyenne < 4 ng/ml Augmentation de la sécrétion de LH à 4 reprises
			hKp10 et Kp54	3 nmol/kg		Augmentation de la sécrétion de LH comparable (moyenne < 5 ng/ml)

Références	Espèce (n)	Site / voie d'injection	Type de neuropeptide	Dose	Délai de dosage de la LH après injection	Remarques
(Caraty et al. 2007)	Brebis adulte acyclique saisonnière	IV	Kp10	1.6 à 100 nmol (1 injection) 6.2 nmol (6 injections) 150 nmol en 1 injection ou en IVL	Durant 5 h Durant 5 h Entre 6 et 10h	Augmentation de la sécrétion de LH fugace de façon dose dépendante (LH < 2 ng/ml) Augmentation de la sécrétion de LH à 6 reprises (< 3 ng/ml) Amplitude comparable (< 3ng/ml), durée de l'augmentation de LH plus longue en cas d'IV lente
(Roa et al. 2009)	Rat femelle	ICV infusion continu	Kp10 (110-119 et 112-121)	7.5 nmol/jour (10 ug/jour) durant 7 jours	ZT 2 (LD14/10) durant 7 jours Cycle estrien non connu.	Augmentation rapide et transitoire de la LH (< 2.5 ng/ml) rapidement suivi d'une normalisation
(Sébert et al. 2010)	Brebis adulte acyclique (n= entre 8 et 11 par groupe)	IV en continu sur 12 à 43h	Kp10	15.2 nmol/h durant 43h (dose cumulée : 0.65 µmol) 15.2 nmol/h durant 6, 12 ou 24h	Toutes les 10 min durant 15h : durant 5h avant l'infusion, puis durant 10h après le début de l'infusion. Puis toutes les heures jusqu'à la fin de l'infusion Toutes les heures durant 28h	Pic de LH dans la suite immédiate de l'infusion (restant < 20 ng/ml) puis 20 h après le début de l'infusion (moyenne de LH à 60 ng/ml). L'occurrence d'un pic de LH dépend de la « durée d'infusion ». Plus la durée d'infusion augmente plus la concentration E2 induite par Kp augmente. Un pic de LH suit entre 19 et 34h après le début de l'infusion. A noter un pic de LH observé à 43h après le début de l'infusion. L'occurrence du pic de LH survient dans 75% des cas si l'infusion dure 24h (12h = 50%, 6h = 12.5%).
(García-Galiano et al. 2012)	Souris adulte mâle GPR-54 ^{-/-} et sauvage n=10	IP	Kp10	7,5 nmol	15 min	Augmentation de la sécrétion de LH pour les GPR-54 ^{+/+} La sécrétion de LH augmente en moyenne de 7 ng/ml.

d. Pertinence de Kp chez l'humain

Même si la découverte du rôle fondamental de KISS1R dans la reproduction a été faite chez l'humain (de Roux et al. 2003) depuis, la plupart des études visant à comprendre le rôle et les mécanismes d'action de Kp dans la reproduction ont été réalisées chez des rongeurs. Ce chapitre rassemble les données de la littérature démontrant le rôle de Kp dans la reproduction humaine.

1. Nouvelles évidences génétiques du rôle de Kp

Depuis les deux études pionnières de 2003 (de Roux et al. 2003)(Seminara et al. 2003), d'autres données génétiques confirment que le Kp joue un rôle clé dans le contrôle de la fonction de reproduction chez l'humain. Les mutations de *KISS1* (Topaloglu et al. 2012b) et *KISS1R* (de Roux et al. 2003)(Seminara et al. 2003)(Semple et al. 2005)(Lanfranco et al. 2005)(Tenenbaum-Rakover et al. 2007)(Teles et al. 2010)(Breuer et al. 2012)(Brioude et al.

2013)(Demirbilek et al. 2015)(Francou et al. 2016) seraient responsables d'environ 2% des cas d'HHI. Des mutations activatrices autant sur *KISS1* (Silveira et al. 2010) que dans *KISS1R* (Teles et al. 2008) ont également été décrites avec pour conséquence un tableau de puberté précoce.

Chez l'humain, une vingtaine de mutations pertes de fonctions sur *KISS1R* ont été décrites. Dans une cohorte de 603 patients suivi pour un HHI normosmique, 10 nouveaux variants ont été identifiés dans *KISS1R*, soit une prévalence de 2% dans cette cohorte (Figure 12). La plupart des patients portaient une mutation de *KISS1R* à l'état biallélique, ceci étant en faveur d'une transmission autosomique récessive (Francou et al. 2016).

A titre d'exemple, une étude a rapporté le cas d'une famille de parents consanguin, avec dans leurs descendance 4 filles âgées de 12 à 30 ans présentant une mutation homozygote du gène *KISS1* avec cliniquement un retard pubertaire associé à un HHI. La plus âgée de cette fratrie présentait une mutation homozygote c.345 C→G de *KISS1*, avec un retard pubertaire complet jusqu'à l'âge de 19 ans. A cet âge un traitement substitutif par œstrogène a été instauré mais aucune donnée sur la fertilité de cette dernière n'est disponible (Topaloglu et al. 2012a).

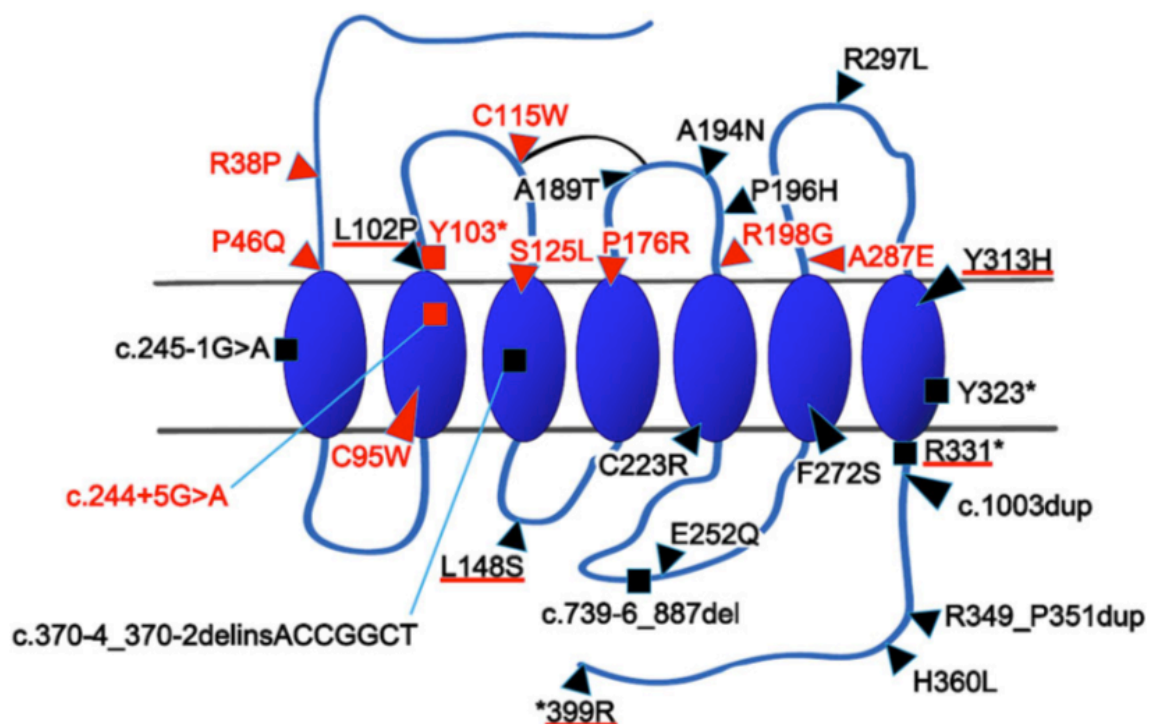


Figure 12 : Schéma du gène *KISS1R* avec des sites de mutation chez des patients souffrant d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital. Les variants nouvellement décrits sont en rouge et les variants déjà publiés par d'autres équipes sont en noir (Francou et al. 2016). Les carrés représentent les mutations non-sens, les triangles représentent les mutations faux-sens. Toutes ces mutations sont indiquées conformément à la nomenclature de la Human Genome Variation Society (HGVS). D'après (Francou et al. 2016).

2. Kp dans le cerveau humain

Sur des échantillons d'autopsie de femmes pré- et post-ménopausiques, des neurones à Kp ont été localisés dans la partie caudale du noyau de l'infundibulum hypothalamique (équivalent de l'ARN chez les rongeurs)(Rometo et al. 2007) et ce groupe de neurones s'étend dans la partie proximale de la tige infundibulaire. Les neurones à Kp co-expriment la NKB et la DYN qui sont également essentiels dans la reproduction humaine. En effet, des mutations inactivatrices sur les gènes codant pour la NKB et son récepteur (NK3R) entraînent un HHI congénital normosmique avec de faibles niveaux de LH et une absence de puberté, malgré des taux de FSH quasi normaux (Topaloglu et al. 2009)(Young et al. 2010). Le cerveau humain n'a pas l'équivalence anatomique de l'AVPV des rongeurs, mais dans la région rostrale de l'hypothalamus, des neurones à Kp sont localisés au niveau des noyaux ventraux périventriculaires (PeN) et dans les subdivisions parvocellulaires antérieures des noyaux paraventriculaires (PVN)(Hrabovszky et al. 2010). Comme chez les rongeurs, les neurones à Kp dans cette zone préoptique présentent un dimorphisme sexuel avec plus de neurones chez les jeunes femmes que chez les hommes (Herbison 2008)(Hrabovszky et al. 2010)(Hrabovszky 2014)(Figure 13). Les populations de neurones à Kp du noyau infundibulaire et de la zone préoptique projettent sur les neurones à GnRH dans l'hypothalamus médiobasal (Hrabovszky 2014)(Figure 14). Chez l'humain, l'ARNm de KISS1R est fortement exprimé dans différentes régions du cerveau (cervelet, cortex cérébral et tronc cérébral), dans l'hypophyse et dans le placenta (Muir et al. 2001).

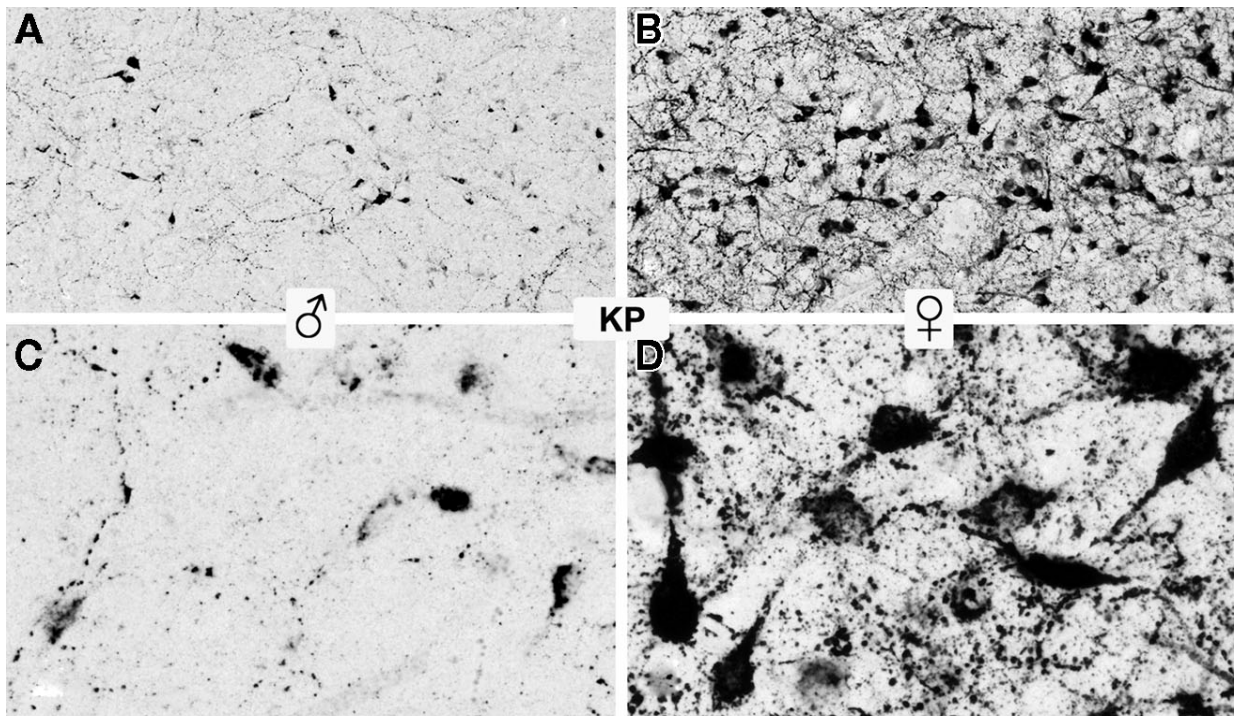


Figure 13 : Dimorphisme sexuel des neurones à kisspeptine dans le noyau infundibulaire hypothalamique de sujets humains âgés. Les microphotographies ont été prises chez un homme de 59 ans (A, C) et une femme de 66 ans (B, D). Les corps cellulaires des neurones à kisspeptine (D) sont plus grands chez les femmes ménopausées que chez les hommes âgés (C). L'hypertrophie neuronale reflète l'absence de rétrocontrôle négatif des œstrogènes chez les femmes ménopausées. Les neurones à kisspeptine montrent également d'autres différences sexuelles importantes. Le nombre de corps cellulaires et la densité de fibres kisspeptinergiques sont beaucoup plus élevés chez les femmes âgées (B) que chez les hommes (A). Échelle bar = 200 μ m en (A, B) et 50 μ m en (C, D). Selon (Hrabovszky et al. 2010).

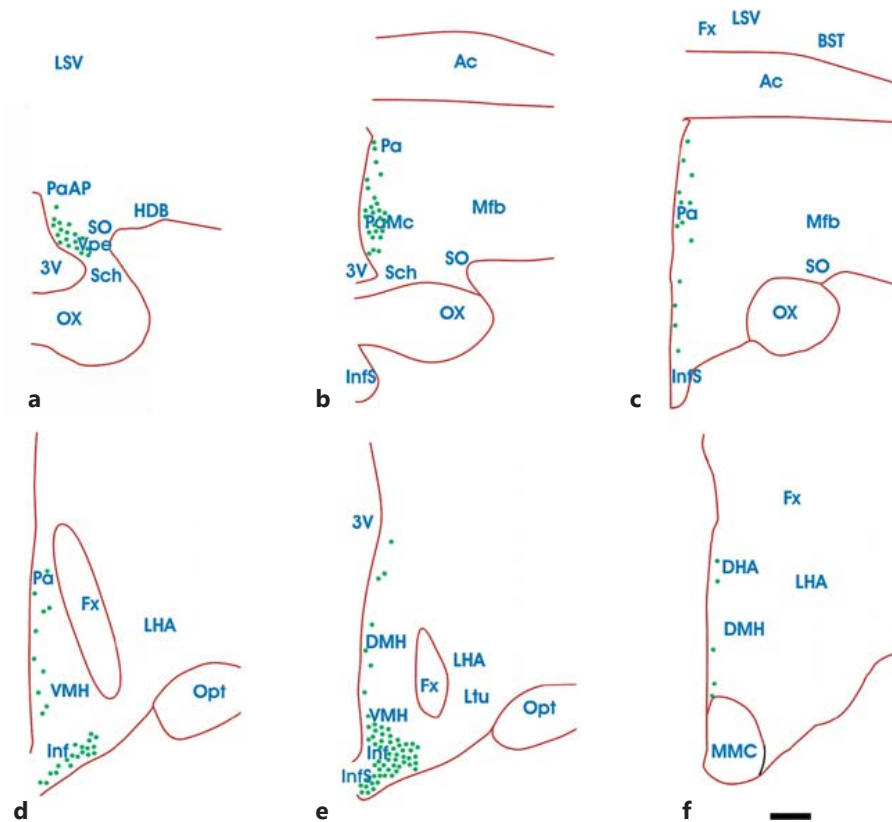


Figure 14 : Distribution topographique des corps cellulaires de neurones à kisspeptine dans l'hypothalamus humain. Des diagrammes schématiques de sections coronales ont été générés à partir de sections représentatives de l'hémi hypothalamus humain. Les points verts correspondent à la distribution des corps cellulaires aux différents niveaux rostro-caudaux (a – f). Les données anatomiques sont combinées d'individus masculins et féminins d'âges variable. Sur le plan rostral (a), un groupe important de neurones Kp faiblement colorés apparaît dans le noyau hypothalamique périventriculaire ventral (Vpe) et dans la subdivision parvocellulaire antérieure du noyau paraventriculaire (PaAP). Derrière ce niveau (b), les neurones à Kp s'accumulent dans la partie magnocellulaire du noyau hypothalamique paraventriculaire (PaMc). Ces deux groupes de cellules sont les plus nombreux chez les jeunes femmes. Les neurones à Kp sont les plus nombreux dans l'infra-caudal et s'étendent dans la partie proximale de l'InfS (e). Les neurones à Kp de cette région sont plus nombreux dans les échantillons de femmes ménopausées.

3V = troisième ventricule cérébral; Ac = commissure antérieure; BST = noyau du lit de la stria terminale; DHA = zone hypothalamique dorsale; DMH = noyau hypothalamique dorsomédial; Fx = fomix; HDB = branche horizontale de la bande diagonale de Broca; LHA = zone hypothalamique latérale; LSV = noyau septal ventrolatéral; Ltu = noyau tubulaire latéral; Mfb = faisceau médial du cerveau antérieur; MMC = partie magnocellulaire du noyau mammaire; Opt = tractus optique; OX = chiasma optique; Pa = noyau hypothalamique para-ventriculaire; Sch = noyau suprachiasmatique; SO = noyau supra-optique; VMH = noyau hypothalamique ventromédial. Barre d'échelle = 2,5 mm. Selon (Hrabovszky 2014).

3. Régulation de l'expression de Kp

Une étude récente a montré qu'il existe une variation significative de l'expression du Kp au cours de la vie chez les hommes et les femmes (Taziaux et al. 2016). Chez l'homme, le nombre de neurones à Kp dans le noyau infundibulaire est significativement plus élevé chez les jeunes enfants au moment de la puberté (âgés de 5 mois à 14 ans) et chez les personnes âgées (58 à 90 ans) comparativement aux jeunes adultes (22 à 44 ans). À tous les âges, les femmes expriment plus de Kp que les hommes (Taziaux et al. 2016). Des données similaires sont observées chez les rongeurs, où l'expression de Kp est plus faible pendant le développement néonatal et pré-pubertaire et atteint son maximum pendant la puberté (Navarro, Fernández-Fernández, et al. 2004)(Clarkson and Herbison 2006). Chez des primates femelles également, l'expression de *KISS-1* et *GPR-54* dans l'hypothalamus augmente au moment de la puberté (Shahab et al. 2005).

Pendant le cycle reproducteur des primates femelles adultes, l'expression de *Kiss1* dans l'APO et l'ARN caudal varie avec un niveau plus élevé pendant la phase folliculaire, juste avant le pic préovulatoire de GnRH/LH, par rapport à la phase lutéale, alors que le nombre de fibres à Kp au contact des neurones à GnRH ne changent pas au cours du cycle menstruel (Smith et al. 2010).

Pendant la grossesse, les taux circulants de Kp augmentent jusqu'à atteindre des valeurs 7 000 fois plus élevées au troisième trimestre, en raison d'une expression accrue de Kp dans les syncytiotrophoblastes placentaires, puis ils reviennent à des niveaux normaux cinq jours après l'accouchement (Horikoshi et al. 2003). Certaines données suggèrent que cette augmentation de Kp est requise pour l'invasion des trophoblastes ainsi que pour l'angiogenèse nécessaire au maintien de la grossesse (Francis et al. 2014). En effet, des saignements précoces (Kavvasoglu et al. 2012), des avortements spontanés (Wu et al. 2014), une altération métabolique telle que le diabète ou l'hypertension artérielle (Cetković et al. 2012) ou des pré-éclampsies (Cartwright and Williams 2012)(Logie et al. 2012)(Armstrong et al. 2009) ont pu être attribués à une diminution du niveau d'expression de KISS et de KISS1R au niveau placentaire. De plus, des données expérimentales récentes démontrent que la signalisation KISS/KISS1R joue un rôle dans l'implantation d'embryons de rongeurs (Calder et al. 2014). Ces données suggèrent que chez des femmes enceintes, des niveaux faibles de Kp pourraient entraîner des complications pouvant être prévenues par des injections de Kp en fin de grossesse.

4. Le Kp comme nouveau traitement de la fertilité ?

L'ovulation est dépendante du pic de LH, lui-même sous le contrôle de la sécrétion pulsatile de GnRH. Chez la femme, il semble que le pic préovulatoire de LH survienne dans un contexte de modification de la réactivité des neurones à GnRH plutôt que d'une augmentation de la fréquence des pulses de GnRH (Hall et al. 1994). Une sécrétion pulsatile de GnRH est une condition préalable essentielle à la cyclicité menstruelle et à l'ovulation chez la femme (Adams et al. 1994). La dérégulation de la sécrétion de GnRH peut entraîner un HH, une infertilité et une perturbation du développement pubertaire. Dans ce contexte, un traitement par pompe libérant de la GnRH de façon pulsatile permet de traiter efficacement les patientes en rétablissant une sécrétion pulsatile de LH suffisante pour induire l'ovulation (Grimes, Taymor, and Thompson 1975)(Santoro, Filicori, and Crowley 1986). Chez de jeunes singes femelles, la sécrétion pulsatile de GnRH a été corrélée à la sécrétion pulsatile de Kp (Keen et al. 2008). Étant donné les nombreuses données expérimentales, notamment chez les rongeurs, démontrant l'effet stimulateur de Kp sur la sécrétion de GnRH et FSH/LH, un traitement pharmacologique de l'infertilité chez l'humain par une stimulation Kpergique en amont de l'axe HHG serait possible, mais les connaissances de son mécanisme d'action et son utilisation doivent être améliorées.

Pharmacocinétique de Kp10 et Kp54

Il existe une littérature de plus en plus documentée sur l'administration de Kp chez les femmes avec utilisation de différentes formes (Kp54 ou Kp10), différentes voies d'administration (IV, SC), différentes modalités d'administration (bolus unique, doses multiples), et encore sur différents types de sujets (volontaires saines, patientes avec hypofertilité). Il est important de noter que le Kp plasmatique de base est indétectable (<2 pmol/l) dans toutes les phases du cycle chez de jeunes femmes saines (Jayasena et al. 2011). Après l'injection SC de Kp10 chez des femmes volontaires, le pic moyen de Kp circulante est observé 10 min après l'injection (Jayasena et al. 2011). Après l'injection SC de Kp54, l'augmentation est plus lente avec un pic moyen observé à 15 min (Dhillon et al. 2007), 45 min (Jayasena et al. 2009) ou encore 60 min après injection (Jayasena, Comninou, Veldhuis, et al. 2013) sans différence entre les différentes phases du cycle (Dhillon et al. 2007). La demi-vie de Kp10 dans le plasma est environ 7 fois plus courte (environ 4 minutes) que celle de Kp54 (environ 27 minutes)(Dhillon et al. 2005)(Jayasena et al. 2011). Après des injections

équimolaires le taux plasmatique de Kp54 est 15 fois plus élevé que celui de Kp10 suggérant une dégradation plus lente de Kp54 que de Kp10 (Jayasena et al. 2011).

Effet différentiel de Kp10 et Kp54 sur la sécrétion de LH et de FSH

La mesure de la pulsatilité de la LH est le « gold standard » indirect pour l'estimation de la pulsatilité de la GnRH, qui est difficilement mesurable. Pendant la phase préovulatoire, une injection IV de Kp10 entraîne une augmentation de LH (et de FSH) sanguine plus rapide comparativement à l'injection de Kp54 (Chan et al. 2012)(Jayasena, Comninou, Nijher, et al. 2013), ce qui est cohérent en regard des cinétiques mesurées pour ces 2 isoformes. Certains auteurs ont supposé que le Kp10 stimule une libération rapide d'un pool de GnRH stocké dans les terminaisons nerveuses au niveau de l'éminence médiane, alors que le Kp54 agirait plus en amont sur les neurones à GnRH pour stimuler la synthèse *de novo* de GnRH (Jayasena, Comninou, Nijher, et al. 2013). Alternativement, il est possible que le Kp54 doive être dégradée en plus petits fragments de Kp avant de devenir biologiquement active. L'injection unique de Kp10 en SC ou en IV au cours de la phase folliculaire a un effet très limité, voire nul, sur la sécrétion de LH comparativement à l'effet observé en cas d'injection au cours de la phase préovulatoire (Jayasena et al. 2011)(George, Anderson, and Millar 2012b)(Chan et al. 2012) ou de la phase lutéale (Chan et al. 2012). Chez les femmes présentant une aménorrhée hypothalamique l'injection de Kp54 entraîne une augmentation de LH 4 fois supérieure comparativement à des femmes en bonne santé en phase folliculaire, mais aucune restauration de la cyclicité menstruelle ni d'induction de l'ovulation n'ont été observées chez ces patientes (Jayasena et al. 2009). Plus récemment, le Kp54 s'est révélée être un traitement efficace et bien toléré pour le déclenchement et la maturation des ovocytes chez les femmes présentant un risque élevé de développer un syndrome d'hyperstimulation ovarienne au cours d'une procédure de fécondation *in vitro* (Jayasena, Abbata, et al. 2014)(Abbata et al. 2015).

Enfin, le Kp10 et le Kp54 semblent stimuler plus fortement et plus rapidement la libération de LH que celle de la FSH chez des femmes en bonne santé (Dhillon et al. 2007)(Jayasena et al. 2011)(George, Anderson, and Millar 2012b)(Dhillon et al. 2005). Cette sélectivité partielle sur les gonadotrophines s'expliquent par l'augmentation de la fréquence de pulses de GnRH, après l'injection de Kp, qui augmenteraient préférentiellement l'expression des sous unités α et β de la LH, alors qu'une fréquence de pulses de GnRH plus faible augmenterait l'expression de la sous unités β de la FSH (Dalkin et al. 1989)(Haisenleder et al. 1991)(Kaiser et al. 1997).

Effet œstrogène-dépendant de Kp sur la sécrétion de LH

L'injection de Kp10 semble donc être plus efficace pour stimuler la sécrétion de LH au cours de la phase où la concentration d'œstrogènes est la plus élevée (Jayasena et al. 2011)(George, Anderson, and Millar 2012b)(Chan et al. 2012)(George, Anderson, and Millar 2012b). Ainsi, chez la femme en bonne santé, le stade préovulatoire semble être le meilleur moment pour induire la sécrétion de LH par du Kp10, avec une augmentation de la sécrétion de LH de 4 fois environ (Jayasena et al. 2011). Comparativement à l'injection de Kp10, l'injection de Kp54 au cours de la phase folliculaire induit une augmentation significative de la sécrétion de LH de 320% (Jayasena et al. 2011). Dans un contexte de taux faible en œstradiol, des doses plus élevées de Kp10 ne permettent pas d'améliorer la stimulation de la sécrétion de LH (Jayasena et al. 2011). Des résultats similaires ont été observés chez le singe femelle rhésus, où l'administration de Kp10 ne permet pas d'augmenter la sécrétion de GnRH chez les animaux ovariectomisés (OVX), tandis que la substitution œstrogénique rétablit la réponse de la GnRH (Guerriero et al. 2012). Le rôle positif des œstrogènes sur l'effet de Kp a également été montré *in vitro* sur un modèle de neurones à GnRH, les cellules GT1-7, où l'expression de Kiss1R est dépendante de l'œstradiol, et où l'augmentation de la GnRH induite par le Kp10 s'observe uniquement sur les cellules traitées à l'œstradiol (Jacobi et al. 2007)(Tonsfeldt et al. 2011). L'œstro-dépendance de la sécrétion de LH paraît moins évidente avec le Kp54 qu'avec le Kp10 car chez la femme en bonne santé une dose de Kp54, 10 fois plus faible que celle de Kp10, est un puissant stimulateur de la sécrétion de LH même pendant la phase folliculaire (Jayasena et al. 2011)(Jayasena, Comninou, Veldhuis, et al. 2013). De façon étonnante, dans un contexte de faible concentration en œstradiol, chez une femme portant une mutation perte de fonction du récepteur NKB, la perfusion durant 12h de Kp10 est capable de restaurer la sécrétion de LH et d'œstrogènes, néanmoins dans une fourchette de valeurs faibles (Young et al. 2013). Chez des jeunes femmes en bonne santé en phase folliculaire, le Kp54 entraîne une augmentation dose-dépendante de la sécrétion et du nombre de pulses de LH ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de progestérone durant la phase lutéale (Dhillon et al. 2007)(Jayasena, Comninou, Nijher, et al. 2013).

L'ensemble de ces données chez l'humain montre l'œstrogène-dépendance de l'effet de Kp sur la sécrétion de LH, même si cela est moins évident pour Kp54 comparativement à Kp10 (Figure 15).

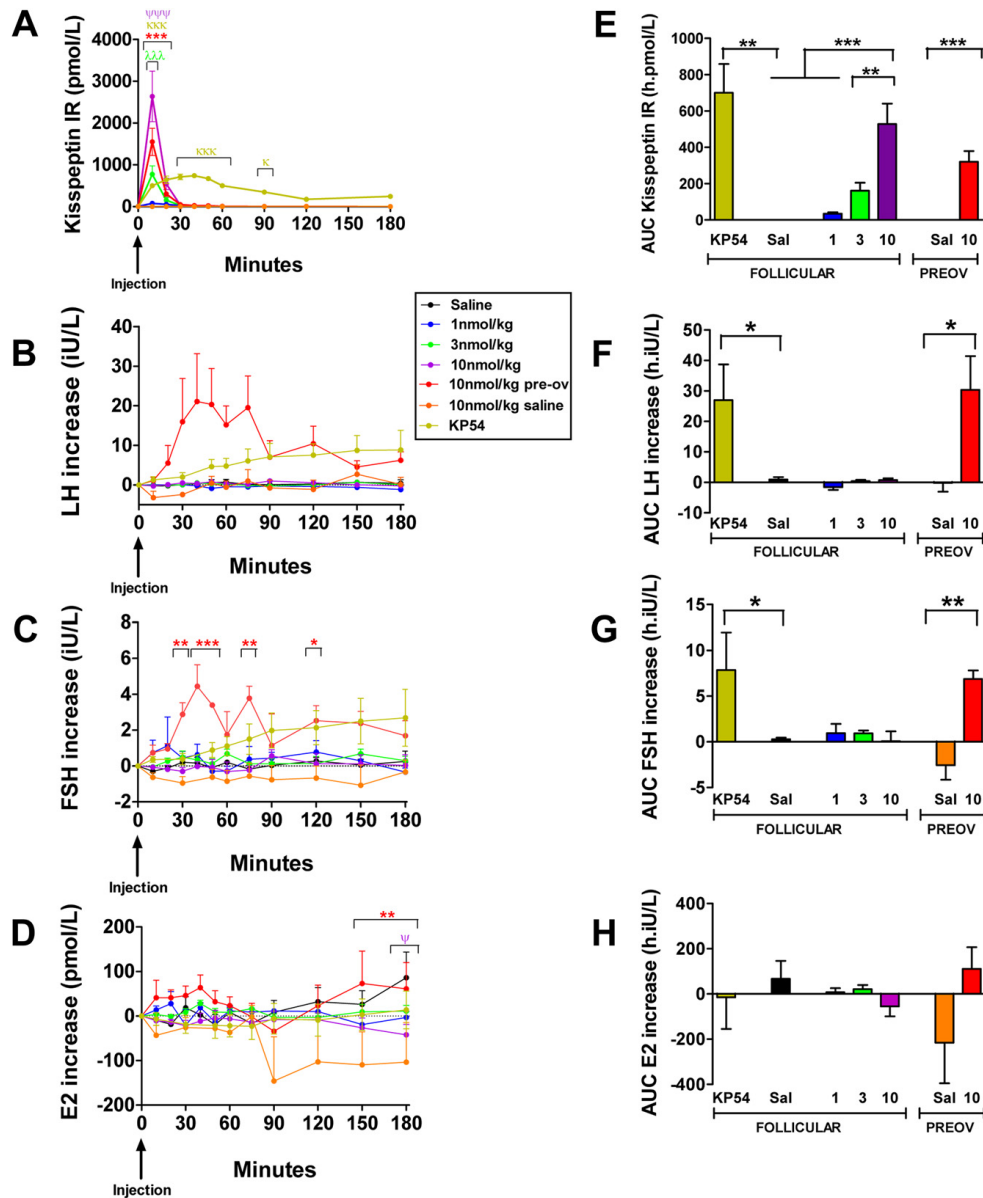


Figure 15 : Taux sérique de Kp et des gonadotrophines après injection intraveineuse de Kp à des femmes volontaires en bonne santé [A-D]. Profils temporels du taux sérique de Kp (A) et des modifications de la LH (B), de la FSH (C) et de l'estradiol (D) sériques pendant 4 h après l'injection d'un bolus intraveineux de solution saline, de différentes concentrations de kisspeptine-10 (Kp10) ou kisspeptine-54 (Kp54) à des femmes volontaires en bonne santé. Pour 10 nmol/kg de Kp10 par rapport à une solution saline : ψ , $\psi\psi$ et $\psi\psi\psi$, $p < 0,05$; pour 3 nmol/kg de Kp10 par rapport à une solution saline : $\lambda\lambda\lambda$ $p < 0,05$. Pour 1 nmol/kg de Kp54 par rapport à une solution saline : κ , $\kappa\kappa$ et $\kappa\kappa\kappa$ $p < 0,05$; pour 10 nmol/kg de Kp10 (Preov) vs solution saline : $*$, $**$ et $***$, $p < 0,05$. [E-H], aire sous la courbe (AUC) pour le kisspeptine plasmatique (E) et les modifications de la LH (F), de la FSH (G) et de l'estradiol (H) sériques pendant 4 h après l'injection d'un bolus intraveineux de solution saline ou de Kp10 à des femmes volontaires en bonne santé. $*$, $**$, et $***$, $p < 0,05$. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. E2, estradiol ; Preov, phase pré-ovulatoire du cycle menstruel. D'après (Jayasena et al. 2011).

Un phénomène de désensibilisation après injection de Kp

Chez des femmes en bonne santé, des injections deux fois par jour de Kp54 durant une semaine entraînent une désensibilisation (ou tachyphylaxie) de l'axe gonadotrope notamment sur la sécrétion de LH qui diminue plus rapidement que la sécrétion de FSH (Jayasena, Comninou, Nijher, et al. 2013). Chez des femmes avec une aménorrhée hypothalamique, une tachyphylaxie apparaît après 3 jours de traitement (Jayasena et al. 2010) mais sans altérer la capacité de GnRH à stimuler la sécrétion de gonadotrophines (Jayasena, Comninou, Nijher, et al. 2013)(Figure 16). Ces observations suggèrent que ce phénomène de désensibilisation ne se produit pas au niveau des cellules gonadotropes mais plutôt au niveau des neurones à GnRH. La tachyphylaxie peut être atténuée en réduisant le rythme d'injection du Kp54 à 2/semaines mais ce traitement n'induit pas de saignement menstruel ni d'ovulation (Jayasena et al. 2010). Ce phénomène de tachyphylaxie pourrait s'expliquer par la libération du stock de GnRH qui, si l'intervalle de temps entre les injections est insuffisant, n'a pas suffisamment de temps pour être restauré par la synthèse *de novo* de GnRH. Une autre hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène de tachyphylaxie serait qu'à une dose élevée, le Kp pourrait avoir un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH ou de LH via une régulation négative sur KISS1R (Jayasena et al. 2009).

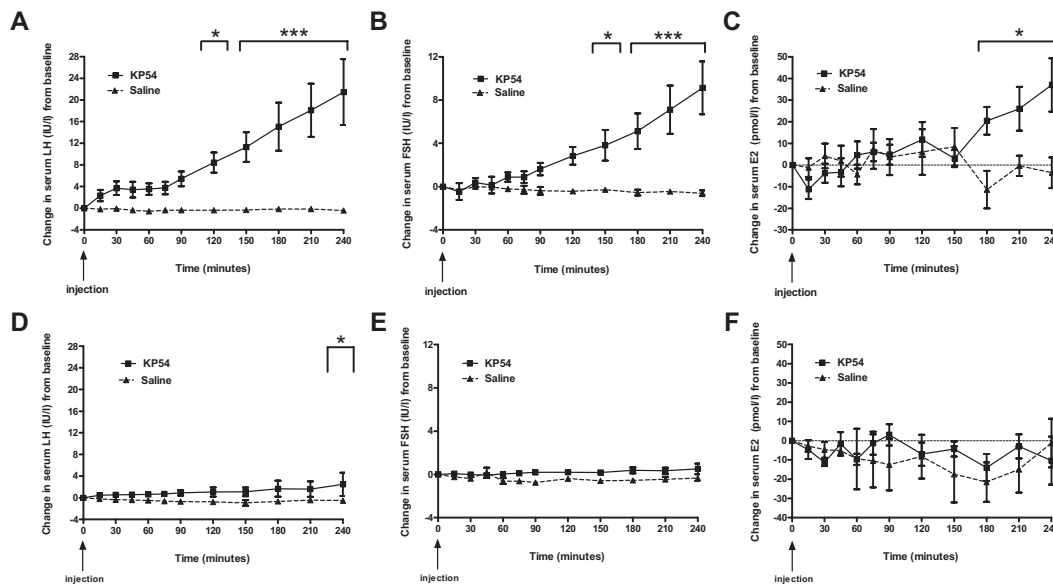


Figure 16 : Effets de la première et de la dernière injection de solution saline ou de Kp54 sur la libération sérique de LH (A, D), FSH (B, E) et estradiol (C, F) chez des femmes en aménorrhée hypothalamique. A-C, après injection d'un bolus de solution saline (n = 5) ou 6,4 nmol/kg de Kp54 (n = 5) le premier jour (début de la période de traitement, 1^{er} jour). D – F, après une injection en bolus de solution saline ou de Kp-54 le dernier jour (fin de la période de traitement, après 2 semaine, dernier jour). Les injections ont été administrées à 0 min. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$. E2, estradiol. D'après (Jayasena et al. 2009).

Conclusion

L'ensemble de ces études a montré que les deux isoformes (Kp10 et Kp54) sont bien tolérées et n'induit pas de modification de la cyclicité menstruelle chez des jeunes femmes en bonne santé (Jayasena, Comninou, Nijher, et al. 2013). Malgré tout, il est important de noter que certaines études animales suggèrent que l'administration de Kp10 peut stimuler l'hormone de croissance (GH), la prolactine et la thyroïdostimuline (TSH) (Kadokawa et al. 2008)(Kadokawa, Suzuki, and Hashizume 2008)(Szawka et al. 2010)(Yang et al. 2010)(Luque et al. 2011)(Ribeiro et al. 2015). De telles observations n'ont pas été rapportées chez des femmes en bonne santé ayant été exposées à une courte période d'injections de Kp54, mais une cohorte plus importante serait nécessaire pour conclure de l'absence d'effets secondaires de Kp (Jayasena, Comninou, et al. 2014). En effet, il a été montré que le Kp peut provoquer une vasoconstriction dans des préparations *ex vivo* d'artères humaines (Mead et al. 2007). Une vasoconstriction induite qui serait en partie impliquée dans le phénomène de bouffée de chaleur à la ménopause (Mittelman-Smith et al. 2012). Cependant, aucun effet de Kp sur la pression artérielle ou la fréquence cardiaque n'a été observé chez l'humain (Dhillon et al. 2007). L'ensemble de ces données suggèrent que l'injection répétée de Kp54 pendant la période folliculaire est le meilleur protocole pour le traitement de l'infertilité en amont des neurones à GnRH. Le Kp permet d'augmenter la pulsativité de la LH et la sécrétion de FSH favorisant ainsi la croissance folliculaire. Après des injections répétées de Kp54, lorsque la concentration en œstrogènes est plus élevée, une injection unique de Kp10 ou Kp54 peut être réalisée pour augmenter significativement la sécrétion de LH et déclencher l'ovulation (Jayasena, Abbara, et al. 2014)(Abbara et al. 2015).

D. Autres neurotransmetteurs rapportés comme régulant l'activité des neurones à GnRH

D'autres neurotransmetteurs ont été rapportés comme étant capables de réguler l'activité des neurones à GnRH, sans pour autant avoir la même efficacité que le Kp. Des fibres GABAergiques et glutamatergiques ont été trouvées à proximité des neurones à GnRH, sur les corps cellulaires au niveau de l'APO et sur les axones au niveau de l'éminence médiane (Eyigor and Jennes 1996)(Kawakami et al. 1998)(Leranth et al. 1985), suggérant un rôle de ces neurotransmetteurs dans la régulation de la sécrétion de GnRH. En effet, le glutamate stimule l'expression du gène *GnRH* et la sécrétion de GnRH durant le pic de LH, alors que des

antagonistes glutaminergiques administrés durant la matinée du proestrus bloquent l'expression du gène *GnRH* et le pic de LH (Donoso et al. 1994)(Ottem, Godwin, and Petersen 2002)(Petersen, Ottem, and Carpenter 2003). Le rôle du GABA sur l'activité des neurones à GnRH reste débattu car des effets autant inhibiteurs que stimulateurs ont été observés en fonction de la présence d'un traitement par œstrogènes, du moment dans le cycle estrien ou de la région hypothalamique étudiée (Watanabe, Fukuda, and Nabekura 2014)(Morello et al. 1992).

Des fibres contenant du neuropeptide Y ont été trouvées en contact avec la majorité des neurones à GnRH qui expriment le récepteur du neuropeptide Y (Xu et al. 2009). Les effets de ce neuropeptide sont également variables car ils dépendent du statut métabolique et reproducteur des animaux, mais la plupart des études décrivent un effet inhibiteur du neuropeptide Y sur les neurones à GnRH (Xu et al. 2009)(Klenke, Constantin, and Wray 2010)(Kiyokawa et al. 2011).

Des études plus récentes, montrent que le peptide lié à la famille (Arg)(Phe)-amide (RFRP-3), un autre neuropeptide appartenant à la même famille des peptides RF-amide que le Kp, régule l'activité des neurones à GnRH (Williams and Kriegsfeld 2012)(Khan and Kauffman 2012)(Simonneaux et al. 2012)(Angelopoulou et al. 2019). Les neurones à RFRP-3 sont principalement situés dans l'hypothalamus dorsomédian (DMH) et projettent vers différentes populations neuronales, notamment les neurones à GnRH et à Kp. Contrairement à Kp, le RFRP-3 est plutôt décrit comme inhibiteur de l'axe reproducteur, même si des effets activateurs ont été rapportés avec une variabilité selon le sexe, l'espèce ou les conditions environnementales (Kriegsfeld et al. 2006)(Ancel et al. 2012)(Ubuka et al. 2012)(Henningsen et al. 2017). Chez les rongeurs femelles, plusieurs études ont montré que le RFRP-3 inhibe des valeurs élevées de LH notamment au moment du pic préovulatoire de LH (Kriegsfeld et al. 2006)(Henningsen et al. 2017)(Ancel, Inglis, and Anderson 2017). De façon intéressante, l'activité des neurones à RFRP-3 est diminuée au moment du pic de LH, possiblement pour lever l'effet inhibiteur du RFRP-3 sur les neurones à GnRH (Gibson et al. 2008)(Henningsen et al. 2017). Cependant, des souris avec une mutation du gène codant pour le GPR-147, le récepteur de RFRP-3, présentent des phénotypes modérés d'altération de l'axe reproducteur (León et al. 2014). Chez l'humain, le RFRP-3 a été identifié dans l'hypothalamus par spectrométrie de masse (Ubuka et al. 2009). Des analyses neuroanatomiques ont localisé des corps cellulaires à RFRP-3 dans le DMH avec des projections axonales sur les neurones à GnRH de l'APO ainsi que vers l'éminence médiane (Ubuka et al. 2009). Finalement, le GPR-147 a été décrit dans l'hypothalamus et l'hypophyse (Ubuka et al. 2009). A ce jour, aucune mutation du

Npyf, le gène codant pour le RFRP3, ni du *gpr-147*, n'a encore été décrite et associée à un phénotype reproducteur chez l'humain. Cependant, des polymorphismes du *Npyf* ont été observés chez des patients avec HHI ou dans des cas de puberté précoce centrale idiopathique. Ces données indiquent que RFRP-3 a un rôle régulateur secondaire dans le développement pubertaire (Lima et al. 2014). Le RFRP-3 peut également jouer un rôle local au niveau de l'ovaire puisque les gènes codant pour RFRP-3 et GPR-147 sont tous deux exprimés dans des cellules de granulosa humaine et que la RFRP-3 est capable de réduire l'accumulation d'AMPc et la synthèse de progestérone induites par les gonadotrophines (Oishi et al. 2012).

E. Régulation oestrogénique

Les œstrogènes produit par les ovaires exercent un rétrocontrôle à la fois négatif et positif sur l'axe reproducteur via la modulation de l'activité des neurones à GnRH et des cellules gonadotropes antéhypophysaires. Durant la première partie du cycle reproducteur, les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif, alors que lorsque les concentrations d'œstrogènes sont les plus élevées (fin de la phase folliculaire chez la femme ou proestrus chez les rongeurs) ce rétrocontrôle devient positif, permettant la synchronisation et l'activation des neurones à GnRH avec libération de GnRH dans le sang porte hypophysaire pour induire le pic préovulatoire de LH (Christian, Mobley, and Moenter 2005). L'effet des œstrogènes est médié par deux récepteurs nucléaires aux estrogènes (ER), ER α et ER β , ayant une longue durée d'action au niveau génomique (White et al. 1987)(Radovick, Levine, and Wolfe 2012). De plus, les œstrogènes peuvent également avoir une action rapide via le récepteur membranaire, GPR30 (Filardo et al. 2000)(Filardo 2002). Les souris Knock-out pour ER α présentent une fertilité très altérée. Les souris knock-out pour ER β conservent une sécrétion de LH mais avec une perturbation de la fertilité avec notamment une diminution de la taille des portées qui est secondaire à une altération de la fonction ovarienne (altération du compte de ovocytes, anomalie du l'ovulation) (Krege et al. 1998)(Tableau 2).

Tableau 2 : Résumé du phénotype de souris femelles mutantes pour les récepteurs aux œstrogènes.**D'après** (Hamilton, Arao, and Korach 2014).

	KO ER α	KO ER β	KO ER $\alpha\beta$
Développement du tractus reproducteur	Normal	Normal	Normal
Fertilité	Infertile	Subfertile	Infertile
Morphologie utérine	Hypoplasique	Normale	Hypoplasique
Réactivité utérine aux œstrogènes	Absente	Présente	Absente
Stéroïdogénèse ovarienne	Élevée	Réduite	Élevée
Folliculogénèse ovarienne	Anovulatoire	Partiellement perturbée	Anovulatoire
Développement de la glande mammaire	Perturbé	Normal	Perturbé
Système neuroendocrine	Perturbé	Normal	Perturbé

a. Neurones à GnRH

Les neurones à GnRH expriment très peu de ER α (Herbison and Theodosis 1992)(Dorling et al. 2003)(Wintermantel et al. 2006), mais expriment le ER β (Hrabovszky et al. 2007)(Wolfe and Wu 2012). L'application d'œstrogènes sur des cultures primaires de neurones à GnRH de singe induit une augmentation rapide de la fréquence des potentiels d'actions (Abe and Terasawa 2005) et une oscillation intracellulaire de calcium (Abe, Keen, and Terasawa 2008). Des effets similaires ont été observés sur des neurones à GnRH de souris (Chu et al. 2009). Cette action rapide des estrogènes pourrait être médiée par GPR30 chez les primates (Noel et al. 2009) et ER β chez les souris (Chu et al. 2009)(Abrahám et al. 2003). Pourtant des souris mutantes avec une délétion sélective d'ER β dans les neurones à GnRH présentent un cycle estrien normal et un rétrocontrôle négatif normal, suggérant l'absence de rôle majeur de ER β dans la régulation des neurones à GnRH (Cheong et al. 2014). Cependant, il a été rapporté que l'expression de Kiss1R au niveau de cellules GT1-7 est œstrogène dépendante, et que le Kp n'induit la sécrétion de GnRH par ces cellules qu'avec un traitement par œstrogènes (Jacobi et al. 2007)(Tonsfeldt et al. 2011). Il a été proposé que les œstrogènes auraient une action précoce sur les neurones à GnRH pour stimuler l'expression de canaux ioniques, ce qui entrainerait en aval une cascade de signalisation favorisant l'excitabilité des neurones à GnRH par les Kiss1R (Bosch, Tonsfeldt, and Rønnekleiv 2013)(Rønnekleiv et al. 2014).

b. Neurones à kisspeptine

Contrairement aux neurones à GnRH, les neurones à Kp expriment une forte densité de ER α , c'est pourquoi ils sont considérés comme la principale cible du rétrocontrôle exercé par les œstrogènes (Gottsch et al. 2004)(Smith et al. 2005)(Clarkson and Herbison 2006)(Revel et al. 2006)(Greives et al. 2007)(d'Anglemont de Tassigny et al. 2008). Chez les rongeurs, il a été montré que le rétrocontrôle exercé par les œstrogènes dépend de la localisation des neurones à Kp, avec un effet stimulateur sur l'expression du gène *Kiss1* et de son récepteur *Kiss1R* au niveau des neurones à Kp de l'AVPV et inhibiteur sur les neurones Kp de l'ARN (Smith et al. 2005)(Adachi et al. 2007)(Gottsch et al. 2009)(Ansel et al. 2010)(Quennell et al. 2010). Chez les mammifères, une régulation différentielle de l'œstradiol est également observée avec un effet stimulateur au niveau de l'APO/PeN et un effet inhibiteur au niveau de l'ARN (Hoffman et al. 2011)(Tomikawa et al. 2010). Pour expliquer cet effet différentiel, il a été proposé que l'activation par ER α de *Kiss1* dans l'AVPV dépend de la stimulation de la voie de signalisation des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), alors que l'inhibition de *Kiss1* dans l'ARN implique des mécanismes indépendants des ERE (Gottsch et al. 2009)(Huijbregts and de Roux 2010).

Des études rapportent que les œstrogènes modulent l'activité journalière des neurones à Kp de l'AVPV. En effet chez les rongeurs, ces neurones présentent une variation journalière de c-FOS, de l'expression de l'ARNm de *Kiss1* et de son peptide au cours du proestrus (ou chez des femelles OVX traitées par œstrogènes) qui est abolie (ou fortement altérée) chez des femelles en diestrus ou OVX (Robertson et al. 2009)(Williams et al. 2011)(Smarr, Gile, and de la Iglesia 2013)(Chassard et al. 2015)(Henningsen et al. 2017). De plus, les œstrogènes augmentent le nombre de contacts entre les neurones à vasopressine (VP) et les neurones à Kp de l'AVPV (Vida et al. 2010), régulent l'expression des récepteurs VP (V1A) dans les neurones à Kp de l'AVPV (Smarr, Gile, and de la Iglesia 2013) et ont une action permissive sur la stimulation des neurones à Kp par la VP (Piet et al. 2015).

L'ensemble de ces observations indiquent qu'un niveau élevé d'œstrogènes est indispensable pour l'activation des neurones à Kp de l'AVPV.

c. Neurones à RFRP-3

L'effet des œstrogènes sur les neurones à RFRP-3 est controversés. Chez les rongeurs femelles, seulement 20% des neurones à RFRP-3 expriment ER α et aucun n'exprime ER β (Molnár et al. 2011). De plus, un traitement chronique par des œstrogènes chez des rongeurs OVX induit une diminution modérée (Molnár et al. 2011)(Poling et al. 2013) voire n'a aucun effet (Quennell et al. 2010)(Henningsen et al. 2017) sur l'expression de *Npvf*.

d. Hypophyse

Les cellules gonadotropes hypophysaires exprimant ER α , il a été suggéré que les œstrogènes exercent un rétrocontrôle direct sur la sécrétion des gonadotrophines (Friend et al. 1994)(Scully et al. 1997). L'administration chronique d'œstrogènes inhibe la sécrétion de gonadotrophines après une stimulation supraphysiologique par du GnRH chez les brebis (Clarke et al. 1989) et chez les femmes (Shaw et al. 2010). L'activation d'ER α au niveau hypophysaire a également été rapportée comme augmentant l'expression de *KISS1* au niveau des cellules gonadotropes alors que l'exposition chronique d'œstrogènes inhibe l'expression de *KISS1R* sur les cellules gonadotropes (Richard et al. 2008). Cependant, un rôle physiologique des œstrogènes sur les cellules gonadotropes est toujours débattu. Une étude a rapporté que des souris présentant une délétion sélective de ER α dans les cellules gonadotropes avaient un niveau élevé de LH et d'œstradiol, associé à un cycle estrien irrégulier cependant ce phénotype était beaucoup moins sévère que celui présenté en cas de délétion complète d'ER α (Singh et al. 2009).

e. Utérus

L'utérus présente une forte expression d'ER α et c'est un site ayant une forte régulation œstrogène-dépendante (Wang et al. 1999)(Hamilton, Arao, and Korach 2014). En effet, les œstrogènes, associés à la progestérone, régulent la différenciation et la croissance utérine qui sont responsables de l'interaction endomètre/embryon au début d'une grossesse (Hamilton, Arao, and Korach 2014). De plus, les œstrogènes agissent sur le rythme circadien de l'utérus en raccourcissant la période d'expression de ses gènes horloges (Nakamura et al. 2008)(Chassard et al. 2015).

f. Ovaires

Les ER α sont essentiels pour la différenciation des cellules de la granulosa, pour la croissance et le développement des follicules et des ovocytes, ainsi que pour la fonction ovulatoire (Tang et al. 2019). L'expression d'ER β dans les ovaires est plus limitée (Hamilton, Arao, and Korach 2014) et leur rôle n'est pas complètement élucidé.

g. Le système circadien

Les œstrogènes sont depuis longtemps suspectés d'avoir un rôle dans la modulation des fonctions circadiennes. Chez les rongeurs, ER α et ER β sont exprimés au niveau des afférences des NSC : la rétine, le tractus rétino-hypothalamique, le tractus hypothalamo-géniculé et les afférences sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé (Bailey and Silver 2014). Chez la souris femelle, la seconde partie de la nuit du proestrus est caractérisée par une augmentation de l'activité locomotrice (Kopp et al. 2006)(Royston et al. 2014). Cet effet est aboli par une OVX et rétablit par un traitement aux œstrogènes. De plus, les œstrogènes permettent d'avancer et de raccourcir la période d'activité locomotrice (Royston et al. 2014). L'œstradiol pourrait agir directement sur l'oscillation des gènes horloges des NSC. En effet, un traitement par œstradiol chez des rates OVX diminue le niveau d'ARNm de gène *Cryptochrome2* (*Cry2*) (Nakamura et al. 2001) et augmente la fréquence de décharge et de dépolarisation des neurones des NSC (Fatehi and Fatehi-Hassanabad 2008). En revanche, d'autres études rapportent qu'un traitement par œstradiol sur des explants de NSC issus de souris dont le promoteur du gène *Period* (*Per2*) est couplé au gène luciférase (*PER2* : *LUCIFERASE*) n'entraîne aucune modification de la période ou de l'amplitude de l'oscillation circadienne (Nakamura et al. 2008)(Chassard et al. 2015). Par conséquent, les estrogènes pourraient altérer l'activité locomotrice via des effets indirects sur l'APO ou le striatum où les récepteurs à la dopamine sont exprimés de manière œstrogène-dépendante (Ogawa et al. 2003)(Krizo and Mintz 2014).

III. Le système circadien

La mise en évidence de système de mesure du temps endogène est possible lorsque les organismes sont totalement isolés de leur environnement. Dans ces conditions, la plupart des

fonctions biologiques présentent des rythmes réguliers d'environ une journée, appelés rythmes circadiens (*circa-dies*). Les rythmes dépendent d'horloges biologiques endogènes dont la principale, chez les mammifères, est localisée dans les NSC. Ces horloges circadiennes ont la capacité d'être synchronisées à un rythme de 24h exactement (rythme journalier) par différents facteurs dont le plus puissant est le rythme journalier de l'intensité lumineuse. Une autre propriété essentielle des horloges circadiennes est leur capacité à transmettre les signaux rythmiques au reste de l'organisme afin d'adapter les fonctions biologiques au cycle journalier de l'environnement. Ce système adaptatif permet d'obtenir des réponses physiologiques et comportementales appropriées au meilleur moment de la journée et participent ainsi à l'homéostasie de notre organisme.

A. L'horloge moléculaire des NSC

Chez les mammifères, la mise en évidence d'une horloge biologique principale dans les NSC provient d'expériences rapportant que la lésion de cette structure chez les rongeurs abolit les rythmes circadiens de l'activité locomotrice (Brown-Grant and Raisman 1977), lesquels étaient restaurés par des implants de NSC exogènes (Lehman et al. 1987)(Ralph et al. 1990). Les NSC sont formés de deux groupes de neurones de part et d'autre du III^{ème} ventricule juste au-dessus du chiasma optique. Chaque neurone du NSC présente une activité circadienne pilotée par un système moléculaire complexe composé d'un ensemble de gènes/protéine « horloge » formant des boucles de transcription-traduction positive et négative se déroulant sur une période d'environ 24h (Lowrey and Takahashi 2011). Chez les mammifères, le cœur de ce système est composé des protéines horloges CLOCK et BMAL1 qui forment des hétérodimères se liant spécifiquement sur un promoteur (E-box) induisant la transcription d'autres gènes horloge comme *Per1/Per2* et *Cry1/Cry2*. Les protéines PER et CRY s'associent également en dimères qui inhibent l'activité transcriptionnelle de CLOCK/BMAL1. Les quantités de protéines PER et CRY sont régulées par des kinases qui vont moduler leur dégradation et par conséquent leur effet inhibiteur sur CLOCK/BMAL1. La réduction des dimères PER/CRY permet d'initier un nouveau cycle de transcription (Lowrey and Takahashi 2011).

Les neurones des NSC expriment différents neuropeptides dont les principaux sont le peptide vasoactif intestinal (VIP) et l'arginine vasopressine (VP). Ils permettent de transférer l'information journalière/circadienne des NSC vers l'organisme.

L'expression du VIP dans la partie ventrolatérale des NSC varie dans des conditions d'alternance de lumière/obscurité mais pas dans une situation d'obscurité constante, ce qui suggère que le VIP n'est pas directement régulé par l'horloge circadienne mais par le cycle lumière/obscurité et qu'il informe ainsi sur l'apparition du signal lumineux (Shinohara et al. 1993). Il est à noter que le rythme quotidien de l'ARNm de VIP chez le rat dépend du sexe, avec un maximum atteint pendant le jour chez les femelles et pendant la nuit chez les mâles (Krajinak et al. 1998). L'expression du gène de la VP dans la partie dorsomédiane des NSC est circadienne, c'est-à-dire directement contrôlée par le dimère CLOCK/BMAL1 (Jin et al. 1999). Ainsi la synthèse et la libération de VP par les NSC présentent un rythme circadien avec une sécrétion de VP par les NSC plus importante en fin de jour comparativement à la fin de la nuit (Gillette and Reppert 1987)(Kalsbeek et al. 1995)(Krajinak et al. 1998).

B. Synchronisation de l'activité circadienne des NSC

L'activité circadienne des NSC est synchronisée à une période de 24 heures par l'alternance du cycle lumière/obscurité. La lumière, perçue par la rétine, est transmise aux NSC par des cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles contenant de la mélanopsine et qui projettent directement vers les NSC (Berson, Dunn, and Takao 2002). Chez les mammifères, le signal lumineux synchroniseur est transmis aux NSC grâce à la libération de glutamate et d'un peptide activant l'adénylate cyclase hypophysaire (PACAP) dont la libération entraîne une modification de la phase de l'horloge moléculaire circadienne, conduisant ainsi à sa synchronisation à une période de 24 heures exactement (Beaulé et al. 2009).

Une désynchronisation chronique du cycle lumière/obscurité, peut induire dans des modèles de rongeur une augmentation de la mortalité (Davidson et al. 2006), une dysrégulation de la réponse inflammatoire (Castanon-Cervantes et al. 2010) ou encore une augmentation de la croissance tumorale (Logan et al. 2012).

Bien que la lumière soit le facteur le plus puissant pour synchroniser l'horloge des NSC, d'autres facteurs « non photiques » peuvent également avoir un rôle régulateur. Ainsi le rythme de prise alimentaire et le rythme de l'exercice physique/repos peuvent participer, dans certaines conditions, à la régulation de l'activité circadienne de l'horloge des NSC.

C. Les horloges périphériques

Après la découverte du rôle fondamental des NSC, il a été démontré que le système circadien est plus complexe qu'initialement compris car de nombreuses autres structures centrales et des organes périphériques contiennent également des horloges circadiennes (Menaker, Murphy, and Sellix 2013). En effet, l'utilisation de rats transgéniques *Per1-luc* (Abe et al. 2002) et de souris transgéniques *Per2 : LUCIFERASE* (Yoo et al. 2004) a été décisive pour démontrer que des structures centrales et périphériques (telles que le cervelet, la rétine, le foie, les poumons, le cœur et les reins expriment des oscillations circadiennes endogènes). La phase et la période de ces horloges périphériques sont différentes de celles de l'horloge centrale des NSC et dépendent de la structure. La robustesse de leurs oscillations endogènes *in vitro* est généralement inférieure à celle des NSC puisque, selon les tissus (et le type de modèle de souris transgéniques), les oscillations durent entre 2 et 20 cycles alors que celles des NSC peuvent durer plusieurs mois. Les oscillations générées par les horloges périphériques sont indépendantes de l'activité NSC car elles persistent chez les animaux portant une lésion des NSC, mais leurs rythmes apparaissent synchronisés par l'horloge centrale. La fonction de ces horloges périphériques est associée à la structure qui la contient. Ainsi, il a été montré que la délétion de *Bmal1* spécifiquement au niveau du pancréas entraîne l'apparition d'un diabète (Marcheva et al. 2010).

D. Importance des horloges circadienne dans le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien

Divers travaux ont démontré que pour être fonctionnel l'axe reproducteur féminin nécessite un système circadien intact.

La lésion des NSC (Brown-Grant and Raisman 1977) ou une déconnection neuronale entre l'APO et les NSC (Wiegand et al. 1980) chez les rates entraînent une altération des cycles estriens et de la sécrétion de LH. De plus, les mutations des gènes *Clock* ou *Bmal1* chez les souris femelles entraînent une irrégularité du cycle estrien et une altération du pic préovulatoire de LH (van der Horst et al. 1999)(Miller et al. 2004)(Chu et al. 2013)(Figure 17).

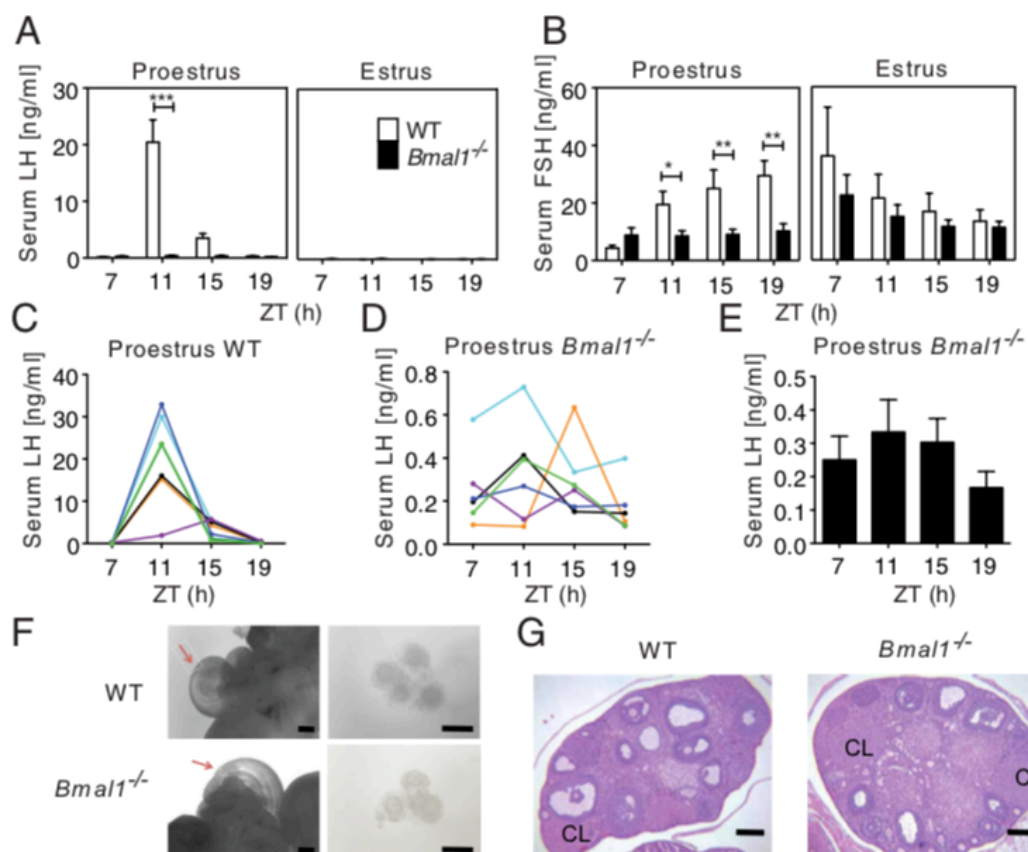


Figure 17 : LH / FSH sérique et ovulation spontanée chez les souris sauvages (WT) ou mutées pour le gène horloge *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-}). A et B : sécrétion de LH (A) et de FSH (B) lors du proestrus et de l'estrus mesurée entre de ZT 7 à 19 chez des souris WT et *Bmal1*^{-/-}; C et D : profils individuels de LH sérique lors du proestrus de femelles WT (C) et *Bmal1*^{-/-} (D) ; E : données moyennes de D ; F : photographies des trompes de Fallope WT et *Bmal1*^{-/-} avec ampoule distendue (flèches) disséquées à ZT 22 sur le proestrus (à gauche) et les complexe cumulus-oophorus récoltés sur ZT 22 ampoule (à droite) ; G : Coloration à l'hématoxyline eosine de sections représentatives d'ovaires chez des souris WT et *Bmal1*^{-/-}. Barres d'échelle : 100 μ m (F) et 200 μ m (G). Les valeurs des histogrammes représentent la moyenne $\pm$ SEM de 7 souris WT et 6 souris KO. En ANOVA : *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. Abréviation : CL = corps jaune. D'après (Chu et al. 2013). ZT = zegeber time.

Les souris *Clock*^{-/-} par exemple présentent des cycles estriens prolongés et irréguliers, une diminution de l'occurrence du pic préovulatoire de LH et un taux plus élevé d'échec de grossesse à terme (Miller et al. 2004). Les souris mutantes pour les gènes *Cry* (1 ou 2) ont un cycle estrien régulier à un jeune âge, mais présentent une sénescence accélérée de l'axe reproducteur avec notamment une apparition précoce de cycles estriens irréguliers (Takasu et al. 2015). De façon intéressante, la régularité des cycles estriens peut être améliorée en exposant ces souris *Cry*^{-/-} à une photopériode journalière proche de leur période endogène (Takasu et al. 2015). De façon notable, le phénotype reproducteur de jeunes souris mutées pour les gènes *Clock*, *Bmal1* ou *Per1/Per2* ressemble à celui des souris de type sauvage plus âgées (plus de 10

mois), avec une augmentation de la longueur et de l'irrégularité des cycles estriens (Pilorz and Steinlechner 2008)(Miller and Takahashi 2013). Ces observations suggèrent que la modification des horloges centrales ou périphériques peut induire une sénescence précoce de l'axe reproducteur (Mereness et al. 2016). En outre, il a été rapporté que les femmes présentant des polymorphismes mononucléotidiques d'ARNTL (*Bmal1*) avaient plus de fausses couches et un taux de grossesse inférieur à celles n'ayant pas ce polymorphisme (Kovanen et al. 2010). Il est maintenant bien établi que le déclenchement du pic préovulatoire de LH, chez les rongeurs femelles dépend d'un signal journalier initié par les NSC (Christian, Mobley, and Moenter 2005). Cependant, bien que ce signal se produise chaque jour, il n'est efficace pour induire le pic préovulatoire de LH que lorsque la sécrétion d'œstrogènes par les follicules ovariens matures atteint un seuil critique c'est-à-dire au moment du proestrus. L'occurrence du signal quotidien émis par les NSC peut être démasquée chez les souris OVX implantées avec une capsule oestrogénique produisant des concentrations d'œstrogènes constantes et semblables à celles du proestrus. En effet, dans ce cas, le pic préovulatoire de LH se produit chaque jour à l'interface lumière/obscurité (Legan, Coon, and Karsch 1975)(Christian, Mobley, and Moenter 2005)(Figure 18).

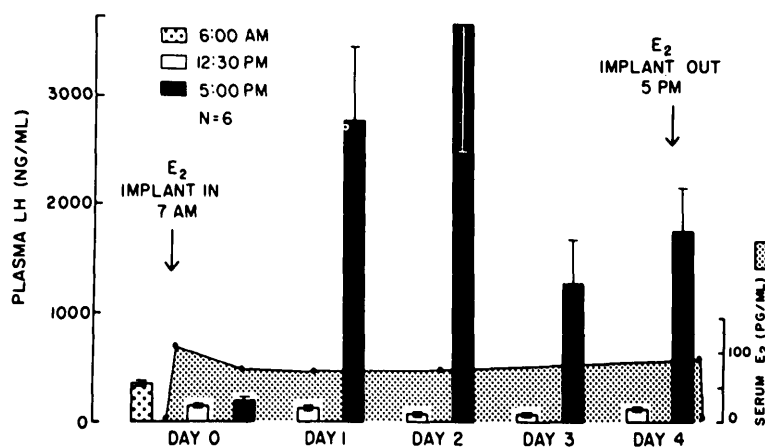


Figure 18 : Induction du pic préovulatoire de LH pendant 4 jours consécutifs après insertion de capsules contenant de l'estradiol (J0) chez des rates ovariectomisées. Les implants sont laissés en place pendant 4 jours. Chaque histogramme représente la concentration plasmatique moyenne $\pm$ SEM de LH chez 6 rats. La zone pointillée représente les concentrations en estradiol dans des pools de sérum provenant d'un groupe distinct de 6 rats traités de la même manière. D'après (Legan, Coon, and Karsch 1975).

Bien que les NSC aient un rôle crucial dans la régulation rythmique de l'axe reproducteur, de plus en plus d'études suggèrent que des horloges périphériques localisées dans des structures et

des organes de l'axe gonadotrope pourraient également jouer un rôle dans la synchronisation de la reproduction chez les mammifères femelles. Ainsi l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien est un axe multi-oscillatoire fonctionnel. En effet, les neurones à Kp (Chassard et al. 2015), les neurones à GnRH (Russo et al. 2015), les cellules gonadotropes de l'hypophyse (Chu et al. 2013), l'utérus (Uchikawa et al. 2011) et les ovaires (Sellix and Menaker 2010) expriment des gènes horloges avec des oscillations circadiennes endogènes.

E. Régulation journalière de l'axe gonadotrope

a. Évidence d'un rythme journalier de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien

Le système reproducteur féminin présente une composante journalière. En effet, le pic préovulatoire de LH survient spécifiquement à la fin de la période de repos, c'est-à-dire en fin de journée pour les espèces nocturnes comme la souris ou le rat (Miller et al. 2004)(Czieselsky et al. 2016)(Figure 4) et à la fin de la nuit pour les espèces diurnes comme le rat roussard (McElhinny et al. 1999) ou encore la femme (Figure 5). Ainsi, chez la femme, le pic de LH survient dans 50 à 80 % des cas entre 4 et 8 heures du matin, c'est-à-dire à la fin de la période de repos (Figure 5)(Cahill et al. 1998)(Kerdelhué et al. 2002).

b. Liens fonctionnels entre l'horloge circadienne et l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien

Des études neuroanatomiques et physiologiques ont mis en évidence deux sorties neurales des NSC pouvant transmettre des informations journalières à l'axe reproducteur : la VP et le VIP.

Dès 1999, des expériences ont permis de mettre en évidence un rôle critique de la VP sur le pic préovulatoire de LH. L'administration ICV de VP chez des rates, ayant subi une lésion des NSC, et une OVX avec implants d'œstrogènes, induit un pic préovulatoire de LH (Palm et al. 1999)(Palm et al. 2001). A l'inverse le traitement par un antagoniste des récepteurs de la VP (V1A et V1B) chez un rongeurs femelle intacte entraîne une diminution du pic préovulatoire de LH (Funabashi et al. 1999)(Miller et al. 2006)(Tableau 3).

Ces travaux indiquent que la VP dont la sécrétion est maximale entre 6 à 12h après le début du jour (Kalsbeek et al. 1995) est un acteur essentiel dans la cascade de signalisation qui conduit à la décharge hormonale de LH en fin de phase de repos provoquant l'ovulation. Chez les rongeurs, il est maintenant bien établi que la signalisation VPergique des NSC est intégrée au niveau des neurones à Kp situés dans l'AVPV/PeN. En effet des neurones à Kp reçoivent des projections VPergiques monosynaptiques provenant des NSC (Vida et al. 2010). De plus, les neurones à Kp expriment le récepteur V1A et ils sont spécifiquement activés par la VP (Williams et al. 2011)(Piet et al. 2015). De façon intéressante, l'innervation VPergique et l'activation par la VP des neurones à Kp dépend des concentrations circulantes d'œstrogènes (Williams et al. 2011)(Piet et al. 2015). Par ailleurs, l'activation de l'axe reproducteur par la VP chez le rongeur femelle n'est possible qu'à la transition entre la fin de la période de repos et le début de la période d'activité et ceci de façon dépendante des œstrogènes (Williams et al. 2011). Cependant cette fenêtre temporelle ne dépendrait pas de l'action de la VP sur les neurones à Kp, mais de l'activation de Kp (induite par la VP) sur les neurone à GnRH (Williams et al. 2011).

Il est important de noter qu'un effet stimulateur de la VP sur la sécrétion de LH n'a été observé que dans des modèles d'animaux en hypogonadisme induit avec une réponse qui n'est pas systématique. En effet, la VP n'induit une sécrétion de LH que dans 30 à 60% des cas (Palm et al. 2001)(Miller et al. 2006). De même, l'effet inhibiteur d'un antagoniste des V1A sur la sécrétion de LH n'a été montré que sur un modèle d'hypogonadisme induit (souris femelles mutées pour *Clock*) avec une injection mixte VP + antagoniste de la VP (aVP)(Miller et al. 2006). Seule l'utilisation d'un mélange d'antagoniste des deux récepteurs V1A+V1B a montré un effet inhibiteur sur la sécrétion de LH sur un axe hypothalamo-hypophyso-ovarien intact (Funabashi et al. 1999). L'ensemble des études *in vivo* sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résumé de la littérature sur l'effet d'injection de vasopressine ou d'antagoniste vasopressinergique sur la sécrétion de LH chez des rongeurs femelles.

Référence	Espèce (n)	Site / voie d'injection	Type de neuropeptide	Dose	Délai de dosage de la LH après injection	Remarques
(Funabashi et al. 1999)	Rat femelle adulte (n=6 par groupe)	ICV	Antagoniste V1A et V1B	1 µg à ZT 8 le jour du proestrus	ZT6, 7, 8, 8.3, 8.6, 9, 10 jusqu'à 16 (Extinction lumière à ZT 14, LD14/10)	Diminution de 50% de la sécrétion de LH lors du pic Pas de décalage dans le temps du pic de LH
(Palm et al. 1999)	Rat femelle adulte avec lésion SCN (+ OVX + implant E2)	ICV infusion continue par microdialyse	VP	50 ng/µl ZT 6 à 14.5	De ZT 7.5 à 15.5 de façon horaire	Réponse sur la sécrétion de LH dépendante de l'importance de la lésion En cas de petite lésion, pic moyen de LH à 14.6 ng/ml à ZT 10.5
(Palm et al. 2001)	Rat femelle (+ OVX + implant E2) (n= 8 à 36)	ICV infusion continu	VP Antagoniste V1A	50 ng/µl ZT 7.5 à ZT 12.5 ou ZT 0 à 5 10 ou 25 ng/µl ZT 4 à 7 et ZT 0 à 5	Prélèvements horaires durant 8 à 10h	Augmentation de la sécrétion de LH si infusion entre ZT 7.5 et 12.5 (pas entre ZT0-5). Pas d'effet sur la sécrétion de LH Pas de différence au niveau du ZT du pic de LH
(Miller et al. 2006)	Souris femelle adulte mutante pour le gène Clock (n=13 à 19) Souris femelle sauvage	ICV	Antagoniste V1A et VP Antagoniste V1A	AntaVP : 50 ng/2µl VP : 3 ng/2µl ZT 11 le jour du proestrus ZT6 et ZT11	ZT 13.5 (LD 12/12, avec extinction de la lumière à ZT12)	Augmentation significative de la sécrétion de LH dans le groupe VP (moyenne de LH à 7.4 ng/ml), MAIS 11/18 (61%) présentent une stimulation de la LH < 5 ng/ml. Dans le groupe antagoniste VP + VP : pas d'augmentation de la LH Pas de différence significative. Rq : à ZT6, 5/16 (30%) (le texte annonce 19 souris) ont une sécrétion de LH > 10 ng/ml, alors que dans la même équipe, le début du pic de LH est à partir de ZT9 (Miller et al. 2004)

Des fibres VIPergique issues du NSC projettent sur les neurones à GnRH exprimant le récepteur VIP (van der Beek et al. 1993)(Smith, Jiennes, and Wise 2000). De façon intéressante, les afférences VIPergiques sur les neurones à GnRH sont sexuellement dimorphiques, les rats femelles présentant une innervation VIPergique supérieure à celle des mâles (Horvath, Cela, and van der Beek 1998). Conformément à ces observations neuroanatomiques, des études pharmacologiques renforcent l'implication du VIP dans le contrôle du pic préovulatoire de LH. En effet, l'administration d'un antagoniste du VIP ou d'un anticorps VIP atténue l'activation des neurones à GnRH le jour du proestrus (Christian and Moenter 2008) et réduit le pic préovulatoire de LH chez les rats femelles (van der Beek, Swarts, and Wiegant 1999). L'application de VIP sur des tranches d'hypothalamus augmente les potentiels d'action et les concentrations intracellulaires de calcium des neurones à GnRH (Piet et al. 2016).

Finalement il est possible que le message circadien des NSC soit transmis à l'axe reproducteur via les neurones RFRP-3. Chez des rongeurs femelles, les NSC projettent des fibres VPergiques et VIPergiques sur les neurones à RFRP-3 (Russo et al. 2015). L'administration centrale de VIP

supprime l'activité des neurones à RFRP-3 à la fin mais pas au début de la période de repos alors que la VP est sans effet sur les neurones à RFRP-3 (Russo et al. 2015).

En conclusion, l'ensemble de ces études indiquent que l'horloge centrale des NSC utilise essentiellement deux voies neuropeptidergiques VP et VIP pour signaler l'heure du jour vers les neurones à GnRH (VIP), à Kp (VP) et à RFRP-3 (VP et VIP) qui en aval régulent les cycles reproducteurs (Figure 19).

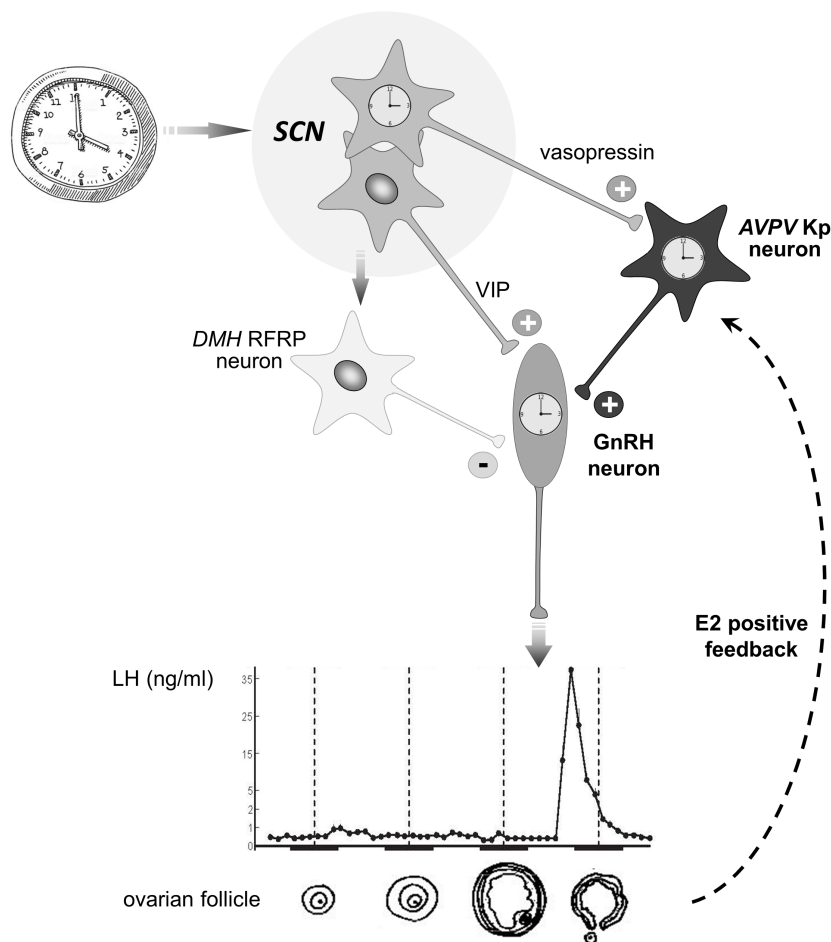


Figure 19 : Représentation schématique de la voie neuroendocrine de l'axe gonadotrope féminin. L'horloge circadienne centrale située dans le noyau suprachiasmatique (NSC) hypothalamique est synchronisée principalement avec le cycle lumière/obscurité et dans une moindre mesure par d'autres signaux temporels (prise alimentaire, sommeil, activité). Deux neuropeptides des NSC transmettent les informations quotidiennes à l'axe reproducteur : la vasopressine (VP) est l'émetteur quotidien le plus important qui régule les neurones à kisspeptine (Kp) des noyaux périventriculaire antérovéntral (AVPV) qui activent fortement les neurones GnRH situés dans l'aire pré-optique (APO); le peptide intestinal vasoactif (VIP) module l'activité des neurones GnRH directement ou indirectement via les neurones de l'hypothalamus dorsomédian (DMH) qui expriment le peptide RFRP. La GnRH libérée active la synthèse et la libération des gonadotrophines LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante) qui régulent à leur tour la maturation de l'ovocyte, la synthèse d'œstrogène et enfin l'ovulation déclenchée par le pic préovulatoire de LH. Tout au long du cycle estrien, l'œstradiol agit sur l'axe gonadotrope, principalement via son récepteur nucléaire α ($ER\alpha$) et dans une moindre mesure via l' $ER\beta$. Les neurones à Kp sont les principales cibles de l'œstradiol avec un effet inhibiteur en cas de concentration faible au niveau des neurones à Kp du noyau arqué et un effet stimulateur en cas de concentration élevée sur les neurones à Kp de l'AVPV. En plus de l'horloge centrale de NSC, des horloges périphériques sont situées au niveau des neurones à Kp de l'AVPV, des neurones à GnRH, des cellules gonadotropes hypophysaires et au niveau des cellules de l'ovaire. D'après (Simonneaux 2018).

IV. Le travail posté : effets de la perturbation circadienne sur l'axe reproducteur

A. Le travail posté : définition

La société moderne nécessite, dans un certain nombre de secteurs, un fonctionnement sur 24 heures, ce qui exige qu'un nombre croissant d'employés travaillent en dehors de la période d'activité naturelle. En 1990, l'Organisation Internationale du Travail a défini le travail posté comme « une méthode d'organisation du temps de travail dans laquelle les travailleurs se succèdent sur le lieu de travail de manière à ce que l'établissement puisse fonctionner plus longtemps que les heures de travail individuels ». Dans un système de travail posté, le temps de travail peut être organisé en 2 ou 3 périodes (ou « shift ») : précoce, tardive et nocturne. Dans un système à 3 « shifts » la période précoce consiste en un travail pendant la matinée et le début d'après-midi ; la période tardive consiste en un travail jusqu'en fin d'après-midi, et la période nocturne consiste en un travail pendant la nuit. Les travailleurs peuvent être affectés à des périodes de travail stables ou des périodes qui varient régulièrement au cours du temps (système de « travail posté »). En réalité le travail posté et le travail de nuit recouvrent une multitude de possibilités : avec différents systèmes horaires appelés 2×9h, 3×8h, 4×8h, 5×8h, 2×12 h, dépendants des choix faits par les entreprises. De plus, le travail posté peut être défini par un nombre variable de périodes, de durées, de structures (continue ou non), d'heures de début et de fin de travail. Une difficulté supplémentaire pour définir le travail posté / de nuit provient de définitions variables au sein même de l'Union Européenne. Ainsi, en France, le travail de nuit est défini comme tout travail effectué entre 21 heure et 6 heure ; en Allemagne, il est défini comme 2 heures du travail quotidien entre 23 heure et 6 heure ; en Italie, comme plus de 7 heures consécutives entre minuit et 5 heure ; en Belgique, entre 20 heure et 6 heure ; ou encore au Royaume Uni, 3 heures du travail quotidien entre 23 heure et 6 heure.

Dans les pays industrialisés, 20 à 30% des hommes et 15 à 20% des femmes travaillent en travail posté / de nuit (Pati, Chandrawanshi, and Reinberg 2001). Aux États-Unis, des études épidémiologiques font état de plus de 15 millions de personnes travaillant en horaire posté (Lawson et al. 2011). En France, en 2012, 15,4 % des salariés (21,5 % d'hommes et 9,3 % de femmes), soit 3,5 millions de personnes, travaillaient la nuit, 8 % de manière occasionnelle et 7,4 % de manière habituelle. Cela correspond à une augmentation d'un million de salariés en

20 ans, celle-ci étant particulièrement importante chez les femmes de moins de 30 ans (Dares Analyses, Ministère du travail, août 2014). Le travail posté de nuit est le plus répandu dans le tertiaire : il concerne 30 % des salariés dans la fonction publique et 42 % dans les entreprises privées de service. Les cinq familles professionnelles les plus concernées par le travail posté de nuit sont les conducteurs de véhicule, les policiers, les militaires, les professionnels de santé et les ouvriers dans les industries de production.

Les salariés en travail posté ont des conditions de travail plus difficiles que les autres salariés. Ils sont soumis à une pression temporelle plus forte, des facteurs de pénibilité physique plus nombreux (Dares Analyses, Ministère du travail, août 2014). C'est pourquoi en France, la loi du 20 décembre 2014 relative à la simplification de la vie des entreprises, a inclu le travail de nuit comme nouveau facteur de pénibilité. Le seuil d'exposition est fixé à une heure de travail entre minuit et 5 heures, et ce pour une durée minimale de 120 nuits par an (ce qui représente 2 nuits par semaine). Lorsqu'un salarié est exposé à des facteurs de pénibilité qui vont au-delà de certains seuils, l'employeur doit établir une fiche individuelle d'exposition. Le salarié bénéficie alors d'un compte personnel de prévention de la pénibilité sur lequel il peut accumuler des points, pour les utilisations suivantes : (1) partir en formation pour accéder à des postes moins ou pas exposés à la pénibilité, (2) bénéficier d'un temps partiel sans perte de salaire, (3) partir plus tôt à la retraite en validant des trimestres de majoration de durée d'assurance vieillesse.

B. Conséquences du travail posté

Le travail posté incluant des heures de nuit (travail posté/de nuit) est un puissant perturbateur circadien, modifiant à la fois l'exposition aux cycles lumière/nuit, la qualité et la quantité de sommeil, le rythme des prises alimentaires et l'activité locomotrice.

Un rapport de l'ANSES de juin 2016 a fait l'analyse des principaux risques sanitaires pour les professionnels exposés à des horaires de travail posté / de nuit. Cette analyse a montré des risques avérés de complications cardiovasculaires et métaboliques (186 études), de troubles du sommeil (105 études), ou encore des risques néoplasiques (24 études). Ce rapport a également alerté sur le manque d'études épidémiologiques portant sur l'effet de ces horaires postés / de nuit sur des pathologies liées aux systèmes reproducteur, digestif et immunitaire (rapport ANSES de juin 2016 (Saisine n° 2011-SA-0088 « horaires atypiques »)).

a. Effets métaboliques

Les complications métaboliques qui peuvent être observées sont une hypertension artérielle (Chen, Lin, and Hsiao 2010), un sur-risque de développer un surpoids ou une obésité (Rosa et al. 1990)(Rosmond, Lapidus, and Björntorp 1996) ou une augmentation du risque d'intolérance au glucose voire de développer un diabète de type II (Hampton et al. 1996)(Ribeiro et al. 1998)(Simon, Weibel, and Brandenberger 2000). Le travail posté peut donc favoriser la survenue d'un syndrome métabolique (Ye et al. 2013). Un lien de causalité entre le travail posté / de nuit et la prise de poids ainsi qu'un indice de masse corporelle élevé est souvent signalé, notamment après 5 ans de travail posté / de nuit (Pan et al. 2011). En effet, une étude rétrospective portant sur 6413 travailleurs postés / de nuit masculins a montré un risque accru de diminution de la tolérance au glucose (même chez les travailleurs ayant un poids corporel normal et stable) par rapport aux travailleurs de jour (Oyama et al. 2012). De même, une méta-analyse récente a montré un risque accru de 1,09 de développer un diabète de type 2 en cas de travail posté / de nuit (Gan et al. 2015).

b. Effets cardiovasculaires

L'analyse de 17 études, réalisées entre 1949 et 1998, a montré une augmentation de 40% du risque de cardiopathie ischémique chez les travailleurs postés / de nuit par rapport aux travailleurs de jour (le risque relatif allait de 0,4 à 3,6 avec la majorité entre 1 et 2)(Bøggild and Knutsson 1999). Dix ans plus tard, une nouvelle analyse, réalisée à partir de 16 études épidémiologiques publiées entre 1972 et 2008, a rapporté une évidence épidémiologique limitée d'une corrélation entre le travail posté / de nuit et la cardiopathie ischémique (Frost, Kolstad, and Bonde 2009). Plus récemment, une importante méta-analyse, réalisées sur 34 études publiées entre 1983 et 2011, et incluant plus de deux millions de personnes, a indiqué que le travail posté / de nuit était associé à une augmentation significative des infarctus du myocarde et des événements coronaires, avec ou sans appariement aux autres facteurs de risque (Vyas et al. 2012). Depuis, quatre autres études épidémiologiques ont montré un risque accru d'événements coronariens et de mortalité par maladie cardiovasculaire après 5 ans de travail posté / de nuit (Carreón et al. 2014)(Hermansson et al. 2015)(Gu et al. 2015)(Park et al. 2015).

c. Effets oncologiques

Depuis une vingtaines d'années, des études épidémiologiques montrent un lien entre le travail posté et le cancer du sein (Schernhammer et al. 2001)(Davis, Mirick, and Stevens 2001)(Hansen 2001)(Schernhammer et al. 2006)(Pesch et al. 2010)(Davis et al. 2012)(Hansen and Lassen 2012)(Bonde et al. 2012)(Grundy et al. 2013)(Rabstein et al. 2013)(Knutsson et al. 2013) conduisant l'International Agency for Research on Cancer (IARC) à classer, en 2007, le travail posté comme agent potentiellement cancérigène chez l'humain (groupe 2A)(IARC 2007).

d. Effets sur le sommeil

Des troubles du sommeil sont également décrits chez des travailleurs en travail posté / de nuit. La durée de sommeil est plus courte d'une heure en moyenne et la période d'endormissement est plus longue (Harlow and Matanoski 1991). Cette altération de la qualité du sommeil est associée à des troubles de la vigilance (Van Reeth 1998) et des troubles anxieux ou dépressifs (Boivin, Tremblay, and James 2007).

e. Effets psychologiques

Le travail posté / de nuit est également associé à un stress chronique avec un impact significatif sur la sécrétion de cortisol (Goichot et al. 1998)(Weibel and Brandenberger 2002)(Oster 2010)(Gumenyuk et al. 2014)(Ulhôa et al. 2015). Ceci est d'autant plus impactant que le cortisol joue un rôle majeur dans la resynchronisation circadienne des horloges centrales et périphériques dans un contexte de décalage horaire chronique (Oster 2010). Le cortisol est une hormone très représentative de la rythmicité circadienne chez l'humain et chez le rongeur car elle présente un pic très marqué à la fin de la période de repos contrôlé par le système circadien. Une altération du cycle lumière/obscurité induit une perturbation de la sécrétion du cortisol chez l'humain ou la corticostérone chez les rongeurs (Goichot et al. 1998)(Weibel and Brandenberger 2002)(Oster 2010)(Gumenyuk et al. 2014)(Ulhôa et al. 2015). Chez l'humain, une altération chronique du cycle lumière/obscurité sera responsable d'une augmentation du taux moyen mensuel de cortisol (Manenschijn et al. 2011). En cas de perturbation chronique du

cycle lumière/obscurité, l'augmentation du taux moyen du cortisol pourrait être un des mécanismes centraux impliqués dans le blocage de l'axe gonadotrope comme cela a été démontré dans un modèle de souris (Luo et al. 2015).

C. Conséquence du travail posté sur la fertilité de la femme

a. Effets obstétricaux

Des études ont montré que le travail posté / de nuit est associé chez les femmes à une augmentation du risque de fausse couche (Cone et al. 1998), d'accouchement prématuré et de poids faible à la naissance (Nurminen 1998)(Mozurkewich et al. 2000)(Scott 2000), et à une diminution du temps d'allaitement maternel (Lakati, Binns, and Stevenson 2002). Au niveau gynécologique, il a été postulé que le travail posté favoriserait l'apparition d'endométriose (Marino et al. 2008). Étant donné l'importance du système circadien dans la régulation de la reproduction féminine, les travailleuses en travail posté / de nuit sont potentiellement exposées à une dysrégulation de leur axe reproducteur et donc à une altération de la fertilité.

b. Évaluation de la fertilité chez la femme

Il existe différents critères pour évaluer la fertilité chez les femmes : la régularité du cycle menstruel, l'échographie ovarienne, la détection du pic de LH, le dosage de progestérone et finalement la grossesse.

1- La régularité du cycle menstruel : le plus utilisé

Le cycle menstruel correspond à la période allant du premier jour des règles jusqu'au premier jour des règles suivantes. Quand il est régulier, le cycle menstruel dure généralement 28 jours mais il peut durer de 21 à 35 jours en étant normal (variation inférieure à 7 jours). Les règles peuvent durer de trois à sept jours. Un cycle est défini comme court lorsqu'il dure moins de 21 jours et longs lorsqu'il dure plus de 35 jours.

La variabilité de la durée des cycles, plutôt que la longueur des cycles *per se* est considérée comme un facteur prédictif de fertilité (Kolstad et al. 1999)(Small et al. 2006)(Brown

2011)(Sasaki et al. 2016). En effet, l'anovulation est plus fréquente lorsque la durée des cycles menstruels dévie des 28 jours attendus (Harlow and Ephross 1995). Lorsque les cycles sont plus longs que 35 jours ou plus courts que 25 jours, la probabilité que le cycle soit anovulatoire est augmentée de 10 à 30% comparativement aux cycles dont la durée est comprise entre 25 et 35 jours. Chez les femmes entre 25 et 39 ans, 7 à 9% des cycles seulement sont physiologiquement anovulatoires (Harlow and Ephross 1995). La variabilité de la longueur du cycle est généralement due à une variation de la durée de la phase folliculaire, qui peut durer de 10 à 23 jours (Harlow and Ephross 1995). A l'inverse, la phase lutéale d'un cycle est relativement constante chez toutes les femmes, avec une durée moyenne de 13 à 14 jours (extrêmes entre 8 et 17 jours).

Dans une étude prospective, 295 femmes âgées de 20 à 35 ans, en couple et désirant une grossesse, ont été suivies durant 6 cycles (Kolstad et al. 1999). Le calendrier de cycles menstruels a montré que les femmes ayant une variabilité de la durée de leurs cycles supérieure à 10 jours avaient une fertilité de 75 % inférieure à celles qui n'avaient pas de variation de leurs cycles menstruels.

De façon notable, la durée du cycle menstruel auto-rapportée est surestimée de 0,7 jour comparativement à la durée mesurée avec la tenue d'un calendrier menstruel (Jukic et al. 2008). De telles différences sont également retrouvées sur le paramètre « régularité menstruelle ». C'est pourquoi la longueur des cycles et la régularité menstruelle doivent être évaluées sur plusieurs cycles à l'aide d'un calendrier menstruel (Jukic et al. 2008)(Smith-DiJulio, Mitchell, and Woods 2005).

En conclusion, la régularité des cycles menstruels peut être un élément utile pour évaluer la fertilité chez une femme mais expose à des biais de recueils. De plus, la régularité des cycles n'est pas strictement corrélée à une ovulation (Harlow and Ephross 1995) et l'analyse des données épidémiologiques utilisant ce paramètre pour étudier la fertilité est biaisée par l'utilisation d'une définition de l'irrégularités très variable (quand elle est définie).

2- L'occurrence d'une grossesse ou le temps de conception : une fertilité certaine

Ce critère d'évaluation a régulièrement été utilisé pour l'évaluation de la fertilité. Il pourra affirmer la fertilité d'une femme en cas de grossesse. Mais dans le cas contraire, il ne permettra pas d'affirmer une diminution de la fertilité chez une femme, mais bien une

diminution de la fertilité d'un couple. De plus ce critère ne peut être utilisé que pour des femmes en couple, avec désir de grossesse, et ayant des rapports réguliers.

3- L'échographie ovarienne : le « gold standard »

La réalisation d'une échographie ovarienne par voie transvaginale au milieu du cycle chez des femmes ayant des cycles réguliers est le meilleur examen permettant de détecter si un cycle est anovulatoire (Ecochard et al. 2001). Ainsi le compte des follicules antraux (CFA) est un bon marqueur de la réserve ovarienne (Iliodromiti, Anderson, and Nelson 2015). Malgré sa fiabilité, l'utilisation de l'échographie diagnostic (chez des femmes ayant un cycle menstruel régulier) reste difficile à mettre en place dans le cadre d'étude clinique.

4- La détection du pic préovulatoire de LH et le dosage de la progestérone sanguine

L'ovulation survient 9 à 23h après l'occurrence du pic de LH (Spieler 1980)(Pauerstein et al. 1978). Puisque la prévalence de l'anovulation peut être variable au sein d'une cohorte de femmes en bonne santé, et difficile à diagnostiquer par échographie transvaginale la mesure des taux de LH et de progestérone est un critère alternatif très utilisé pour le diagnostic d'anovulation. En général, le diagnostic de l'ovulation basé sur le taux sanguin de LH et de progestérone lutéale a tendance à sous-estimer les cycles anovulatoires, comparativement au diagnostic basé sur des mesures de la LH urinaire en milieu de cycle. Ces données sont particulièrement importantes pour la recherche de facteur de risque d'anovulation. La prévalence de l'anovulation pouvant varier de 3,4 à 18,6 % chez des femmes en bonne santé, avec des cycles réguliers, en fonction de l'outil diagnostic utilisé (Lynch et al. 2014). Cette variabilité intrinsèque au test utilisé sera probablement plus importante dans une cohorte de femmes en moins bonne santé.

La progestérone sanguine est un bon marqueur d'ovulation car sa sécrétion par le corps lutéal (ou corps jaune) augmente progressivement suite à l'ovulation afin de préparer l'endomètre pour l'implantation. Le taux de progestérone sanguine dans les jours précédents les règles reflète la qualité du corps jaune (et indirectement l'occurrence de l'ovulation). Ainsi dans les 7 jours précédents les règles chez des femmes ayant un cycle inférieur à 35 jours (par exemple au 21^{ème} jour du cycle d'une femme ayant un cycle menstruel de 28 jours), un taux

sanguin de progestérone supérieur à 5 ng/ml reflète l'existence d'un cycle ovulatoire (Malcolm and Cumming 2003). Cependant afin de contourner le problème des femmes ayant des cycles irréguliers, la mesure de la progestérone peut être répétée toutes les semaines, et la valeur de progestérone à considérer comme prédictive sera celle qui précède les menstruations de 7 jours. Dans une cohorte de 101 patientes avec des cycles réguliers ayant consulté pour une infertilité, lorsqu'une corrélation est recherchée entre la progestérone et une ovulation diagnostiquée par échographie transvaginale, le cutoff de 6 ng/ml de progestérone sanguine durant la phase lutéale (7 jours avec le cycle suivant), présente un sensibilité de 80 % et avec une spécificité de 71% pour la détection de l'ovulation (pour la LH urinaire la sensibilité est de 100% et la spécificité de 25%)(Guermandi et al. 2001). Cependant, certains auteurs suggèrent qu'une concentration de progestérone inférieure à 10 ng/ml en milieu de phase lutéale est associée à un taux de grossesse plus faible comparativement aux femmes ayant une concentration de progestérone supérieure à 10 ng/ml (Hull et al. 1982). Certains auteurs estiment que la seule mesure de la progestérone n'est pas suffisante pour évaluer la qualité de la phase lutéale et la probabilité d'une ovulation (Rosenfeld, Chudow, and Bronson 1980)(Cumming et al. 1985). C'est pourquoi, l'association du critère de concentration de progestérone après ovulation à celui de la LH urinaire permet d'augmenter la probabilité de détecter l'ovulation (Roos et al. 2015). Ainsi, dans une étude comprenant 40 femmes en bonne santé dont la survenue d'une ovulation était objectivée par échographie, 100% d'entre elles présentaient un pic de LH (> 10 mUI/ml) la veille de l'ovulation et un taux de progestérone supérieur à 6 ng/ml entre le 21^{ème} et le 24^{ème} jour du cycle (Guermandi et al. 2001).

c. Étiologies de l'hypofertilité féminine

De multiples facteurs peuvent conduire à une diminution de la fertilité, c'est pourquoi, il est important de recueillir le maximum de facteurs confondants lorsque les causes d'infertilité sont recherchées.

Les facteurs ayant un impact négatif sur la fertilité peuvent être intrinsèques tels que l'âge ou l'origine ethnique (Gordley et al. 2000) ou liés à des pathologies génétiques (de Roux, Carel, and Leger 2016). Différentes pathologies gynécologiques (endométriose, syndrome de ovaires micropolykystique...) peuvent aussi avoir un impact négatif sur la fertilité. Il existe aussi un grand nombre de facteurs extrinsèques tels que le tabac (Harlow and Park 1996)(Sundell,

Milsom, and Andersch 1990), l'alcool (Harlow and Park 1996), l'index de masse corporel (Harlow and Matanoski 1991)(Harlow and Park 1996) et le stress (Gordley et al. 2000)(Messing et al. 1993)(Matsumoto, Tamada, and Konuma 1979)(Shortridge et al. 1995)(Hatch, Figa-Talamanca, and Salerno 1999). Le stress est un facteur décrit comme augmentant le taux de prolactine (Theorell et al. 1993), une hormone connue pour inhiber l'axe gonadotrope. Enfin un environnement de travail néfaste (bruit, vibration, exposition à des solvants organiques)(Messing et al. 1993) peut également participer à une diminution de la fertilité féminine.

d. Impact du travail posté sur la fertilité

Différents travaux ont analysé la relation entre fertilité et travail posté / de nuit en chez des femmes travaillant dans les hôpitaux, les abattoirs et les industries (Olsen 1991)(Miyachi, Nanjo, and Otsuka 1992)(Messing et al. 1992)(Ahlborg, Axelsson, and Bodin 1996)(Spinelli, Figà-Talamanca, and Osborn 1997)(Tuntiseranee et al. 1998)(Hatch, Figa-Talamanca, and Salerno 1999) (Labyak et al. 2002)(Lohstroh et al. 2003)(Zhu et al. 2003)(Chung, Yao, and Wan 2005)(Lawson et al. 2011)(Wan and Chung 2012)(Davis et al. 2012)(Attarchi et al. 2013)(Stocker et al. 2014)(Wang et al. 2016).

Il est important de noter que ces études présentent une grande hétérogénéité sur les modalités de recueil des données et sont le plus souvent rétrospectives (à l'aide de questionnaires, d'appels téléphoniques ou de bases de données...). Il existe également une grande hétérogénéité sur les critères de fertilité étudiés : température corporelle, troubles du cycle, délai pour être enceinte etc. De la même façon, la définition d'un cycle menstruel irrégulier est très variable selon les études. En effet, un cycle menstruel était défini comme régulier s'il dure entre 25 et 35 jours (2 études) et comme irrégulier si la variabilité du cycle est supérieure à 3 jours (2 études) ou supérieure à 7 jours (3 études) et parfois aucun critère n'est donné (4 études). Il est également surprenant de voir dans un groupe de femme « contrôle » travaillant de jour que le pourcentage de cycles menstruels irréguliers atteint 53% (Bracci et al. 2014).

La plupart des études ont décrit un impact négatif du travail posté / de nuit sur la fertilité. En utilisant le critère de la courbe de température corporelle (qui permet de déterminer si le cycle menstruel est monophasique ou biphasique, c'est-à-dire respectant au non la phase lutéale), le travail posté a été associé à un taux plus élevé de cycles courts et de phase lutéale inadaptée (Hatch, Figa-Talamanca, and Salerno 1999). Une plus grande prévalence de troubles menstruels

(cycles courts/ longs/irréguliers) est observée chez les femmes travaillant en horaires postés/de nuit en comparaison à des femmes travaillant en horaires classiques (Miyauchi, Nanjo, and Otsuka 1992)(Messing et al. 1992)(Ahlborg, Axelsson, and Bodin 1996)(Labyak et al. 2002)(Lawson et al. 2011)(Attarchi et al. 2013)(Wan and Chung 2012)(Wang et al. 2016). Ainsi, les études les plus pertinentes, notamment par le nombre de femmes incluses, rapportent des cycles irréguliers dans 12 à 20% des travailleuses en horaires de travail posté contre 7 à 10% des travailleuses en horaire de travail régulier (Labyak et al. 2002)(Attarchi et al. 2013). Dans une grande étude danoise incluant 17 531 femmes en travail de jour et 3907 femmes en travail posté, il a été rapporté que les femmes travaillant en soirée ou durant la nuit avaient un « temps de conception » plus long (avec un odds ratio ajusté de 0,8), comparativement aux femmes travaillant en horaire de jour (Zhu et al. 2003). Cependant les auteurs ont indiqué que la diminution de la fertilité était légère et pouvait être due à une planification de grossesse différente ou à des horaires de travail réduisant la possibilité de contacts sexuels. De rares études ont analysé le profil de sécrétion des gonadotrophines avec des conclusions variables. Ainsi, certaines études ont rapporté que les niveaux de FSH et de LH ne différaient pas entre les travailleuses en horaires posté et ceux en horaires de jour (Miyauchi, Nanjo, and Otsuka 1992)(Attarchi et al. 2013), tandis que d'autres ont montré que les concentrations de gonadotrophines étaient significativement augmentées chez les travailleuses en horaires posté comparativement aux travailleuses en horaires de jour (Davis et al. 2012). De façon paradoxale, dans 3 études, sur des femmes travaillant en horaires posté certaines n'avaient pas de variation des gonadotrophines présentaient des cycle irréguliers, alors que d'autres avaient une augmentation des gonadotrophines avaient des cycles réguliers (Miyauchi, Nanjo, and Otsuka 1992)(Davis et al. 2012)(Attarchi et al. 2013). Des travaux ont montré que la production d'œstrogènes était significativement augmentée en condition d'horaire posté (Bracci et al. 2014)(Gómez-Acebo et al. 2014), probablement en lien avec un allongement de la phase folliculaire (Lohstroh et al. 2003). Les taux de progestérone et d'androgène sont également augmentés avec un retard du pic de production des androgènes (Papantoniou et al. 2015). Finalement, il a été proposé que l'altération de la production nocturne de mélatonine en cas de travail posté pourrait avoir des effets anti-oestrogéniques (Cos et al. 2005)(Alvarez-García et al. 2013). En effet, la concentration urinaire de mélatonine tend à être plus faible avec un retard du pic de production nocturne en cas de travail posté (Miyauchi, Nanjo, and Otsuka 1992)(Davis et al. 2012)(Gómez-Acebo et al. 2014)(Papantoniou et al. 2015). Ainsi, il a été proposé que l'association d'une inhibition de la sécrétion de mélatonine et d'une désynchronisation de la sécrétion des œstrogènes pourrait être impliquée dans les cancers

hormono-dépendants observés chez les travailleuses de nuit (Papantoniou et al. 2015)(Hill et al. 2015).

Certaines études n'ont rapporté aucun trouble du cycle ou de la fertilité chez les femmes en travail posté (Olsen 1991)(Tuntiseranee et al. 1998)(Spinelli, Figà-Talamanca, and Osborn 1997)(Chung, Yao, and Wan 2005)(Stocker et al. 2014). Cependant, une de ces études avait un très faible nombre de femmes incluses avec de façon surprenante 35 % de femmes dans le groupe contrôle présentant des cycles irréguliers (Chung, Yao, and Wan 2005). D'autres études ne rapportent pas de relation significative entre le travail posté et les troubles de la fertilité bien que le délai d'attente avant la grossesse était 2 fois plus long dans le groupe de travail posté comparativement au groupe travaillant durant la journée (Olsen 1991)(Tuntiseranee et al. 1998).

Les effets négatifs du travail posté en cas de grossesse, et notamment sur l'augmentation du risque de fausse couche sont controversés (Axelsson, Ahlborg, and Bodin 1996)(Bonde et al. 2013). Pourtant, des risques obstétricaux ont été observés chez des hôtesse de l'air en « jet lag » (Lauria et al. 2006). Ainsi, de manière consensuelle, il est conseillé aux femmes enceintes d'éviter un travail posté, notamment avec des heures de nuit.

L'ensemble de ces études apporte des informations hétérogènes et parfois contradictoires quant à l'impact du travail posté/de nuit sur la fertilité féminine. Ces différences peuvent être dues à une variabilité de la définition du travail posté, à des différences dans le niveau d'exposition, à la durée et l'âge au moment de l'exposition, à de nombreux facteurs confondants (comme le stress, la fatigue, l'obésité...) ou à encore des limitations méthodologiques (Gold and Tomich 1994)(Weinberg, Baird, and Wilcox 1994).

Devant la grande variabilité des études épidémiologiques et le manque d'études expérimentales chez l'humain, et notamment la femme, il paraît primordial aujourd'hui de développer des modèles animaux d'étude des effets de la perturbation circadienne sur l'axe reproducteur pour évaluer l'effet du travail posté / de nuit sur la fertilité féminine.

D. Modèle de travail posté chez les rongeurs

Le travail posté / de nuit auquel l'humain est soumis est une situation très complexe pour laquelle il est très difficile de concevoir un modèle animal approprié. Une récente revue, a proposé quatre principaux paramètres dont l'altération peut entraîner une désynchronisation

des horloges biologiques : la prise alimentaire, l'activité, le sommeil et l'exposition de nuit à la lumière (Opperhuizen et al. 2015).

A ce jour, seulement trois études ont analysé l'effet d'une modification du cycle lumière/obscurité sur le pic de LH (Moline et al. 1981)(Moline and Albers 1988)(Christian, Mobley, and Moenter 2005) (Tableau 4). Une première étude sur des hamsters sibériens femelles a analysé l'effet d'une avance ou d'un retard de phase unique de 3 heures (Moline and Albers 1988). Quand les hamsters étaient soumis à une avance de phase de 3 heures, réalisée entre 1 à 3 jours avant la période de l'estrus, le pic de LH suivant était désynchronisé par rapport au cycle lumière / obscurité, mais quand les hamsters étaient soumis à un retard de phase de 3 heures, le pic de LH était plus rapidement synchronisé avec la période d'obscurité (Figure 20). Une autre étude réalisée chez des souris transgéniques GnRH-GFP OVX a montré qu'une avance de la phase d'obscurité de 2 heures entraîne une avance du pic préovulatoire de LH (Christian, Mobley, and Moenter 2005). Finalement, une dernière étude, utilisant un paradigme photopériodique, a montré que la modification de la longueur de la photopériode chez des hamsters femelles, entraîne un décalage similaire du pic de LH (qui apparaît avant la phase d'obscurité) et de l'activité locomotrice nocturne (Moline et al. 1981)(Figure 21).

Finalement une dernière étude a analysé l'impact d'une perturbation circadienne appliqués après l'accouplement sur le succès gestationnel des souris (Summa, Vitaterna, and Turek 2012). Cette étude a montré que les souris soumises à une avance de phase chronique après l'accouplement avaient 3 fois moins grossesses portés à terme comparativement à des souris gardées en cycle régulier pendant la gestation.

En conclusion, cette revue de la littérature montre que très peu d'études expérimentales ont été réalisées pour étudier l'impact de perturbations circadiennes sur l'activité de reproduction de mammifère femelles. De plus, les protocoles utilisés analysaient les effets de perturbation mineure avec une avance ou un retard de phase unique, probablement moins perturbateur qu'un déphasage chronique pouvant mimer un travail posté. Dans tous les cas, les quelques études disponibles indiquent qu'un décalage de phase du cycle lumière/obscurité altère le moment du pic de LH et la synchronisation entre les horloges centrales et périphériques. Cependant aucune de ces études n'a analysé les caractéristiques du pic préovulatoire de LH et du cycle estrien chez le même individu soumis ou non à différents types de perturbations circadiennes. Aussi, il est évident que de nouvelles études sur l'animal sont nécessaires afin de mieux comprendre les effets de la disruption circadienne sur l'activité de reproduction des mammifères femelles et sur les mécanismes impliqués dans ces effets

Tableau 4 : Impact d'un décalage de phase sur le pic préovulatoire de LH

Références	(Moline et al. 1981)	(Moline and Albers 1988)	(Christian, Mobley, and Moenter 2005)
Espèces	Hamster doré	Hamster doré	Souris femelle transgénique (GnRH-GFP) OVX
Cycle lumière/obscurité	4 différents : • LD 6/18 • LD 14/10, • LD 18/6, • LD 22/2 Pendant 3 semaines avant les prélèvements sanguins	Cycle LD de 14/10 Avance ou retard de phase de 3h, un, deux ou trois jours avant le proestrus	Cycle LD de 14 /10 Avance de 2h de l'obscurité (16h30 au lieu de 18h30)
Pic de LH	Amplitude du pic de LH plus faible pour les décalages les plus extrême (LD 22/2 and LD 6/18), avec des écarts-types plus importants.	L'amplitude et le décalage du pic de LH dépend de la durée du décalage et de sa cinétique (Avance ou retard de phase).	Début du pic de LH environ 1.5h avant la phase d'obscurité
Principaux résultats	Relation étroite entre le pic de LH et l'activité locomotrice selon la photopériode. Relation entre le pic de LH et le milieu de la période d'obscurité pour les photopériodes supérieures à 14 heures. Mais le pic de LH est d'autant plus décalé par rapport à la transition LD que les jours sont longs.	L'activité locomotrice et le pic de LH se retardent plus rapidement qu'ils ne s'avancent. Une corrélation est observée entre un niveau d'œstradiol élevé et une avance de phase plus rapide.	

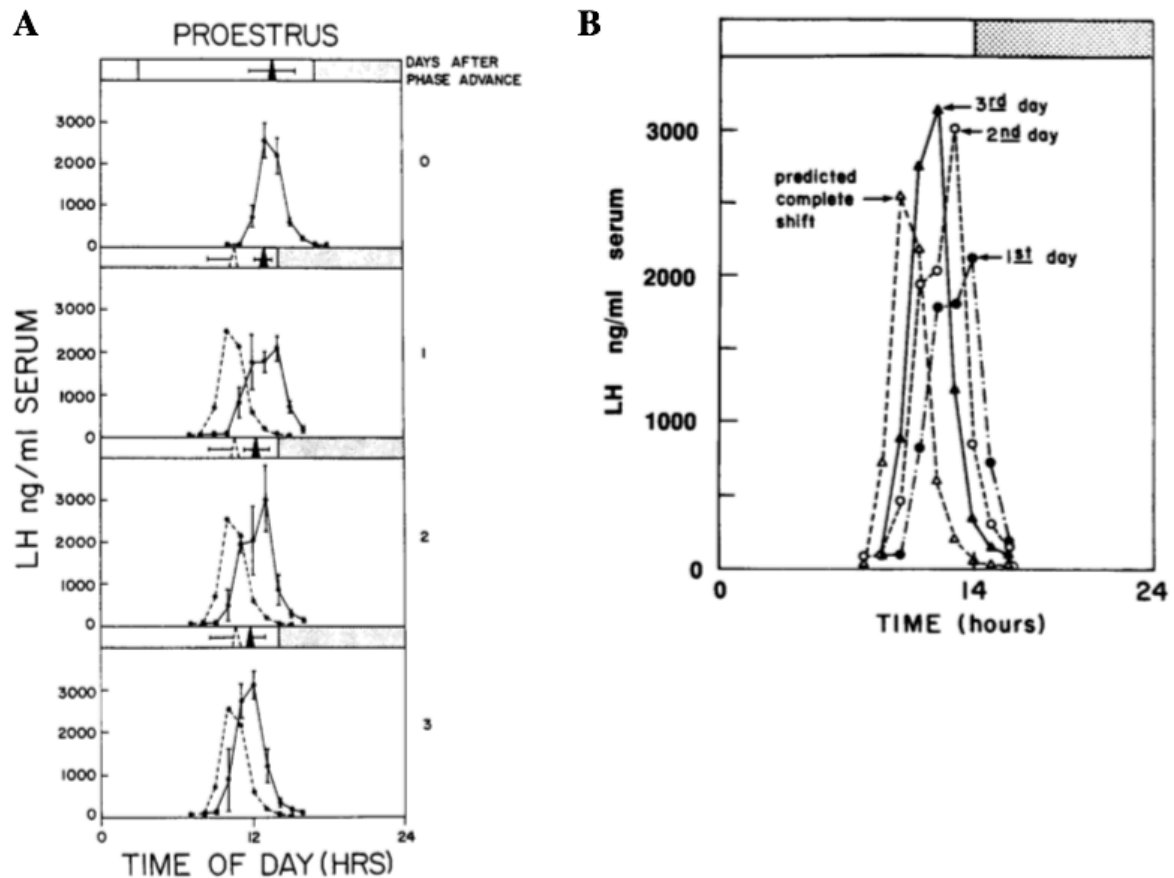


Figure 20. Hamsters femelles exposées à une avance ou à un retard de phase de 3h.

A : Le pic préovulatoire de LH après une avance de phase de 3 heures, 1, 2 ou 3 jours avant le proestrus. Les cercles représentent les concentrations sériques de LH $\pm$ SEM. Les triangles au-dessus des graphiques désignent les points de référence des trois protocoles avant l'avance $\pm$ SEM. En traits pleins : le pic préovulatoire de LH observé après l'avance de phase ; en traits pointillés : le pic préovulatoire prédit après, suivant une avance de phase complète.

B : Le moment de survenue du pic préovulatoire de LH 1, 2 et 3 jours après l'avance de phase. Cercles pleins : provenant d'animaux ayant subi une avance de phase le 2^{ème} jour du diestrus (sang prélevé un jour après l'avance de phase) ; cercles vides : provenant d'animaux ayant subi une avance de phase le 1^{er} jour du diestrus ; triangles pleins : provenant d'animaux ayant subi une avance durant l'estrus ; triangles vides : pic pré ovulatoire prédit. D'après (Moline and Albers 1988)

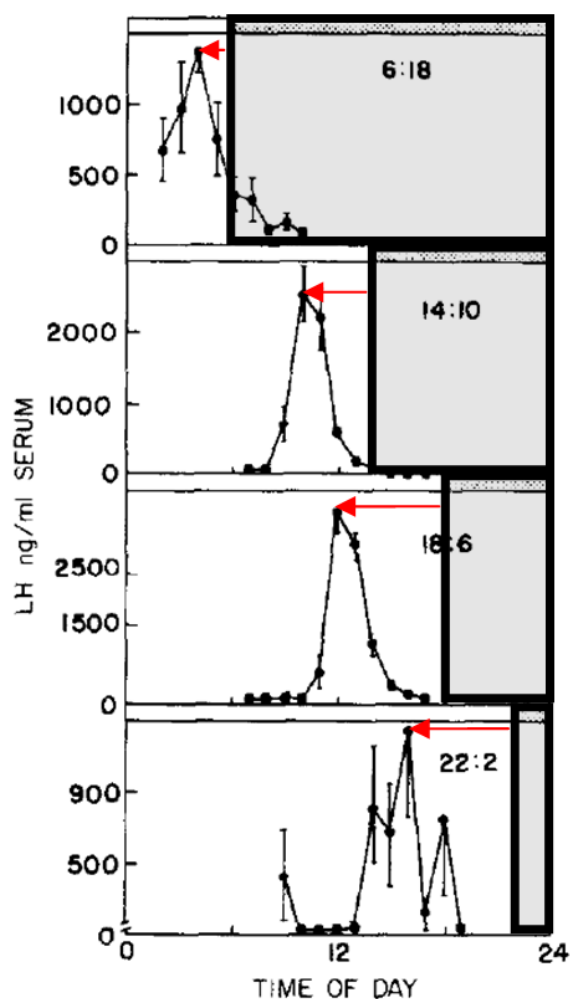


Figure 21 : Profil de sécrétion de LH en fonction de la photopériode chez des hamsters dorés femelles. Trois semaines après adaptation à quatre photopériodes avec des cycles Lumière/obscurité (LD) différents : 6 : 18 ; 14 : 10 ; 18 : 6 et 22 : 2 (n=5 par photopériode). Le pic de LH survient en moyenne $8,3 \pm 0,2$ heures avant le milieu de la période d'obscurité pour les photopériodes LD 14 :10, 18 : 6 et 22 : 2 ; et en moyenne 10,5 heures avant le milieu de la période d'obscurité pour la photopériode LD 6 : 18. D'après (Moline et al. 1981).

E. Justification du projet de thèse

Alors que la reproduction féminine présente une activité particulièrement rythmique, moins de 20 études cliniques font un état des lieux de la relation entre la perturbation circadienne liée au travail posté / de nuit et l'axe reproducteur féminin. Pour la plupart, il s'agit d'études épidémiologiques rétrospectives, comportant un nombre limité de sujets, utilisant des critères d'analyse de l'axe reproducteur féminin très variables, peu fiables, associés à une grande variabilité des méthodologies utilisées.

Étant donné que les femmes en âge de procréer sont de plus en plus nombreuses à travailler en horaires postés incluant la nuit, la question de l'impact d'une telle désynchronisation sur leur axe reproducteur nous semble être un problème majeur de santé publique. Ceci est d'ailleurs décrit dans le récent rapport de l'ANSES de 2016 qui souligne un manque d'études sur les effets sanitaires du travail posté et/ou de nuit sur l'activité de reproduction humaine.

Parallèlement à cette carence de données épidémiologiques cliniques il y a également très peu de données expérimentales chez les animaux. Quelques données sont disponibles sur l'impact d'un décalage de phase sur le cycle estrien (Takasu et al. 2015)(Yoshinaka et al. 2017), sur la sécrétion de LH préovulatoire (Moline and Albers 1988)(Christian, Mobley, and Moenter 2005), sur l'ovulation (Austin 1956)(Alleva et al. 1968) ou encore sur le comportement sexuel (Endo and Watanabe 1989) et la gestation (Varcoe et al. 2011). A notre connaissance aucune donnée n'est disponible sur les effets d'avance et/ou de retard de phase unique ou multiple sur l'occurrence et la synchronisation du pic de LH avec le cycle jour/nuit. Or, comme discuté précédemment, l'occurrence du pic de LH est un critère fort et applicable en expérimentation clinique ou fondamentale permettant d'évaluer la fertilité chez les mammifères femelles. Le développement récent d'un microdosage de la LH chez des rongeurs libres de leurs mouvements constitue un progrès important dans la recherche en biologie de la reproduction, permettant de surveiller la sécrétion horaire de LH de façon individuelle pendant plusieurs cycles consécutifs réduisant ainsi considérablement le nombre d'animaux à utiliser (Steyn et al. 2013).

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail étaient d'étudier les effets d'un décalage de phase unique (mimant un déplacement transmérien ou « jet lag ») ou chronique (mimant le travail en horaires décalés ou « shiftwork ») sur la sécrétion de LH et sur les cycles reproducteurs de souris (C57BL/6J) femelles adultes. Dans ce but, j'ai 1) mis au point le modèle de suivi sur plusieurs mois de la sécrétion de LH le jour du proestrus sur des individus uniques afin d'évaluer les limites de cette approche; 2) analysé les effets d'une avance ou d'un retard de phase unique (10h) sur les cycles estriens et l'occurrence du pic préovulatoire de LH ; 3) analysé les effets d'avance/retard de phases chroniques (jusqu'à 9 mois) sur les cycles estriens et le pic préovulatoire de LH ; 4) mis au point de l'injection ICV de peptides associée au suivi individuel de LH afin de proposer des méthodes de resynchronisation du pic préovulatoire de LH chez des souris soumises à des déphasages.

V. Résultats

A. Mise au point d'un modèle de suivi longitudinal de la sécrétion de LH le jour du proestrus sur des individus uniques

Ce travail est décrit dans un article intitulé « Individual evaluation of luteinizing hormone in aged C57BL/6J female mice » publié dans Geroscience en octobre 2019

Résumé

Chez les mammifères femelles, la sénescence de l'axe reproducteur est un processus complexe impliquant un dysfonctionnement ovarien progressif associé à une altération de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'objectif de cette étude était de réaliser un suivi longitudinal de l'évolution de la sécrétion individuelle de l'hormone lutéinisante (LH) préovulatoire ainsi que celle du cycle estrien chez des souris femelles C57BL/6J à 3, 6, 9 et 12 mois. L'amplitude et le moment de survenu du pic de LH étaient similaires de 3 à 9 mois, mais ces critères étaient modifiés chez des souris âgées de 12 mois avec une diminution significative de plus de 50% de la valeur maximale de la sécrétion de LH associée à un retard de 2h dans l'apparition du pic de LH par rapport aux souris plus jeunes. L'analyse de deux à trois pics successifs de LH à 3, 6, 9 et 12 mois a montré une variabilité intra-individuelle faible et similaire à tous les âges. La longueur et la variabilité intra/inter individuelle du cycle estrien étaient stables avec l'âge. Cette étude montre que les souris femelles dans des conditions environnementales normales présentent une synchronisation et une amplitude du pic de LH stables jusqu'à 9 mois, mais à 12 mois, le pic de LH est retardé avec une amplitude réduite, mais sans modification manifeste des cycles estriens. L'analyse de la sécrétion individuelle de LH préovulatoire et du cycle estrien indique que les souris peuvent être suivies jusqu'à 9 mois pour étudier l'impact de divers paramètres sur l'activité de reproduction de la souris.

Mots clé : *Senescence; Cycle estrien ; Hormone lutéinisante; Rongeurs*

Individual evaluation of luteinizing hormone in aged *C57BL/6J* female mice

Thibault Bahougne^{a, b, *}, Eleni Angelopoulou^a, Nathalie Jeandidier^b, and Valérie Simonneaux^a
Geroscience, in october 2019 (DOI: 10.1007/s11357-019-00104-z)

^a Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, (UPR CNRS 3212) and Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^b Service d'Endocrinologie et Diabète, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

EA: angelopoulou@inci-cnrs.unistra.fr, NJ: nathalie.jeandidier@chru-strasbourg.fr, VS: simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr

***Corresponding author:**

Thibault BAHOUGNE

1 place de l'hôpital, 67000 Strasbourg, France

E-mail: tbahougne@gmail.com

Tel.: 33 (0)3 88 11 66 07

Fax number: 33(0)3 88 11 67 51

Abstract

In female mammals, reproductive senescence is a complex process involving progressive ovarian dysfunction associated with an altered central control of the hypothalamic-pituitary axis. The objective of this study was to compare the longitudinal change in preovulatory luteinizing hormone (LH) secretion as well as estrous cycle in individual C57BL/6J female mice at 3, 6, 9 and 12 months. Amplitude and timing of LH secretion at the surge were similar from 3 to 9 months but were altered in 12-month old mice with a significant decrease of more than 50% of peak LH value and a 2h delay in the occurrence of the LH surge as compared to younger mice. The analysis of two to three successive LH surges at 3, 6, 9 and 12 months showed low and similar intra-individual variability at all ages. The estrous cycle length and intra/inter variability were stable over the age. This study shows that female mice in regular environmental conditions display stable LH surge timing and amplitude up to 9 months, but at 12 months, the LH surge is delayed with a reduced amplitude, however without overt modification in the estrous cycles. Analysis of individual preovulatory LH secretion and estrous cycle indicates that mice can be followed up to 9 months to investigate the detrimental effects of various parameters on mouse reproductive activity.

Keywords: *Aging; Estrous cycle; Luteinizing Hormone; Rodents*

Introduction

Reproductive activity in female mammals displays regular cycles driven by a complex interaction of hypothalamic neuropeptides, pituitary gonadotropins (luteinizing (LH) and follicle stimulating (FSH) hormones), sex steroid hormones and the circadian system (Simonneaux and Bahougne 2015, for review). The final output of this regulatory process is to combine the production of a mature oocyte (ovulation) with a prepared reproductive tract which will ensure embryo development and offspring survival. At the beginning of the reproductive cycle, FSH promotes oocyte maturation associated with a progressive increase in estradiol (E2) production until the occurrence of a massive and transient increase in LH secretion which triggers ovulation (Legan and Karsch 1975; Kerdelhué et al. 2002). The timing of the preovulatory LH surge, and consequent ovulation, is tightly controlled since it requires both elevated circulating E2 and a daily signal (Christian, Mobley, and Moenter 2005) which gates the LH surge at the end of the resting period, thus end of the day in nocturnal species and end of the night in diurnal species, including humans (Kerdelhué et al. 2002; Mahoney et al. 2004). In female rodents, it has been demonstrated that the daily timing of the LH surge is driven by a pathway including the master biological clock localized in the suprachiasmatic nuclei (SCN), the kisspeptin neurons and the GnRH neurons (Simonneaux and Bahougne 2015).

Throughout adult life, a number of events can alter female reproductive capacity. It is therefore critical to perform longitudinal analysis to follow the long-term effect of negative events such as metabolic alteration, stress, circadian disruption or sickness. In rodents, a relevant measurable longitudinal marker of female reproductive activity is the change in vaginal cytology (Nelson et al. 1982; McLean et al. 2012) allowing to measure the length and regularity of the various estrous stages for several weeks or months in a single individual. However, with the recent development of a micro LH assay (Steyn et al. 2013), it is now possible to perform similar individual longitudinal analysis of LH secretion, notably the timing and amplitude of the preovulatory LH surge. Therefore, the objective of this study was to follow individual LH secretion on the day of proestrus in female mice of different ages, 3 to 12 months, in order to follow reproductive robustness throughout the adult life.

Material and methods

Animals

Eight week-old virgin C57BL/6J female mice were obtained from the Charles River laboratory. Upon arrival, mice were placed 3 per cage, quarantined for 2 weeks and then manipulated every day for at least 2 weeks for habituation before experimentation. Mice were

kept until the age of 12 months at 22-25°C with food and water available *ad libitum* on a 12h light / 12h dark schedule, with lights on at zeitgeber time 0 (ZT0) and lights off at ZT12. The health of the mice was followed regularly and their cages and water bottles were changed and autoclaved weekly. All experimental procedures were approved by the local ethical committee (CREMEAS) and the French National Ministry of Education and Research (authorization # 2015021011396804).

Analysis of LH secretion and estrous cycles

LH secretion was followed on the day of proestrus in individual mice belonging to one of the 4 groups of age: 3 months (n=9), 6 months (n=6), 9 months (n=9) or 12 months (n=9). Estrous cycles were followed in post-pubertal mice by vaginal smears performed according to (Nelson et al. 1982). In C57BL/6J female, estrous cycles exhibit a period of 4-5 days and are divided into three phases according to the vaginal cytology: diestrus (D) characterized by leukocytic and nuclei cells with leukocytic predominance, proestrus (P, during which preovulatory LH surge occurs) characterized by oval nucleated epithelial cells with some cornified squamous epithelial cells, and estrus (E) characterized by a predominance of cornified squamous epithelial cells. A fourth stage of metestrus, sometimes described as a transition between the estrus and diestrus phases (Nelson et al. 1982) was not considered here because of the difficulty to objectively assess this phase and was combined with diestrus (because of the leucocytic predominance). Vaginal smears were performed two times every day, between 08h00 and 14h00, during at least 2 consecutive estrous cycles.

A preliminary investigation on 3 month-old mice showed that all LH peak occurred between ZT8 and ZT16, with LH values < 1 ng/ml outside this time window (data not shown). This timing is in agreement with previous studies in rodents (Wise 1982; Akema et al. 1985; Czielesky et al. 2016) and illustrates the synchronization of the LH surge to the light/dark cycle by the master hypothalamic clock (Simonneaux and Bahougne 2015, for review). On the day of proestrus, a 4 µL blood sample withdrawn from the tail tip (< 1 mm) was taken every hour from ZT8 to ZT16, thus 4 hours before and after lights off, at a time when the preovulatory surge is expected. On the following two or three proestrus stages, another series of blood sampling was made at the same time in order to estimate LH secretion reproducibility in the same mouse.

Each blood sample was immediately diluted in 116 µL of PBST (10% of 10X phosphate buffered saline, 0.25% of Tween-20 in milliQ H₂O) and stored at -80°C until LH assay.

LH assay

LH concentration was determined using a highly sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)(Steyn et al. 2013) using anti-bovine LH β as capture antibody (monoclonal antibody, 518B7, NHPP, Torrance, California), rabbit anti-mouse LH as first antibody (polyclonal antibody, Rabbit LH antiserum, AFP240580Rb, NHPP, Torrance, California), goat anti-rabbit IgG as secondary antibody (D048701–2, Dako Cytomation, Polyclonal Goat Anti-Rabbit, Denmark) and mouse LH as standard (mLH, AFP-5306A, NHPP, Torrance, California). Four given concentrations of LH (1, 10, 20 and 30 ng/ml) were used as quality controls. The intra-assay variation was 11% and the inter-assay variation was 13%.

Data analysis

The occurrence of a LH surge was found in about 70-80% of the mouse expected to be on proestrus, whatever the age group, and only the mice with a detected LH secretion (> 4 ng/ml) were included in the analyses. To estimate the effect of age on the timing, amplitude, and reproducibility of the preovulatory LH surge, circulating LH of each mouse (either 3, 6, 9 or 12 months) was followed for up to three consecutive proestrus from ZT8 to ZT16. For each mouse at a given age, the LH values at the 2 to 3 consecutive surges were combined. For each age group, LH values were given either for each individual or as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of 4 to 8 mice of the same age. Further, for each age group, the mean ($\pm$ SEM) ZT of the peak, ZT of the beginning of the surge (estimated by a LH value > 4 ng/ml) and peak amplitude were calculated from each individual values. Intra individual variability of the ZT of the LH peak was calculated for each age group as mean $\pm$ SEM.

To estimate the longitudinal effect of age on the estrous cycle, each mouse was followed for at least two consecutive cycles at 3, 6, 9 or 12 months. For each age, the characteristics (duration and estrus/diestrus ratio) of the first observed estrus cycle were given as the mean $\pm$ SEM. The intra-individual variability was estimated by defining a cycle as irregular when the length of the two consecutive estrous cycles differs by more than one day and was given as the percentage of irregular mice for each group of age.

Statistical analysis and figures were realized using GraphPad Prism 6 (San Diego, USA). Assumptions were taken into account. The D'Agostino and Pearson test was used to check normality. Homoscedasticity was verified with the Bartlett's test. Statistical comparisons were made with an analysis of variance (ANOVA). Newman Keuls post-hoc tests were performed as appropriate to determine specific interactions. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

Results

Evolution of the individual preovulatory LH surge characteristics and estrous cycle with age

Preovulatory LH surges were observed in C57BL/6J mice from 3 up to 12 months with significant differences in phase and amplitude appearing at 12 months (Figure 1). Analysis of LH values at the surge in individual mouse shows that the mean maximal LH peak value decreases from 29.8 ± 5.7 ng/ml at 3 months to 13.3 ± 2.2 ng/ml at 12 months, with the maximal LH peak value at 3 months significantly higher as compared to 12 months ($p < 0.05$, ANOVA test $F(3, 22) = 3.324$). The mean individual ZT of LH peak is similar at 3 (12.7 ± 0.5 h), 6 (12.3 ± 0.5 h) and 9 (12.9 ± 0.4 h) months but is significantly delayed at 12 months (14.4 ± 0.4 h) ($p < 0.05$, ANOVA test $F(3, 22) = 3.961$). In line with this observation, the ZT at which the LH starts to increase over 4 ng/ml is significantly delayed by 1.2 to 2 hours at 12 months as compared to earlier ages ($p < 0.05$, ANOVA test $F(3, 22) = 3.622$).

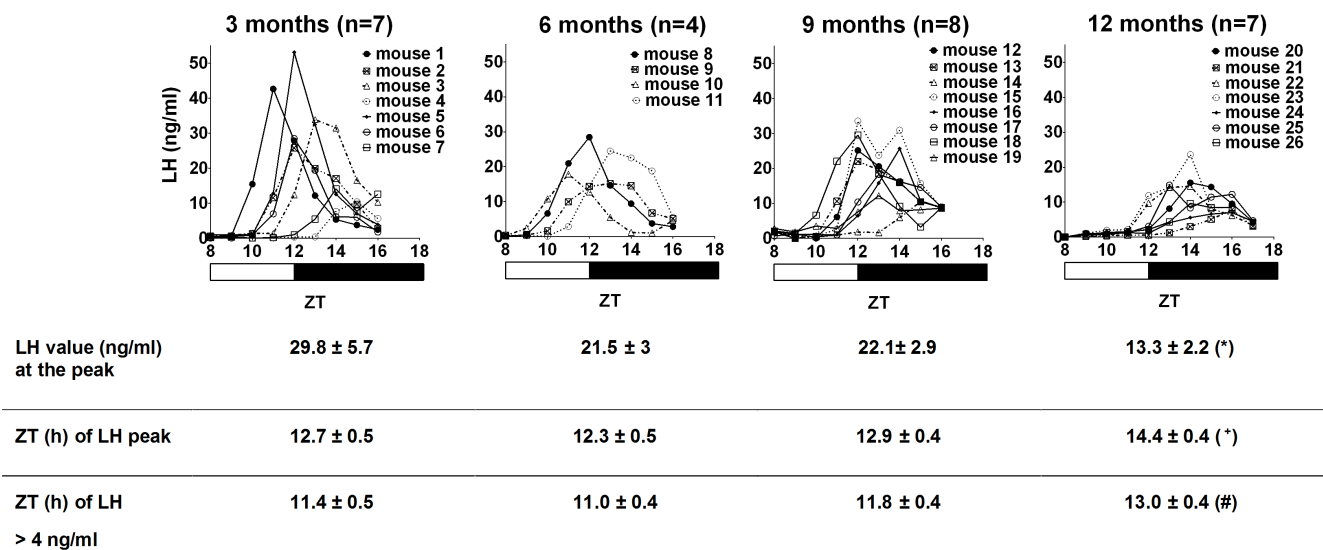


Figure 1: Individual preovulatory LH surge on proestrus days in C57BL/6J female mice at 3 (mouse 1 to 7, n=7), 6 (mouse 8 to 11, n=4), 9 (mouse 12 to 19, n=8) or 12 (mouse 20 to 26, n=7) months. At each age, LH value was measured by ELISA in 4 μ L blood sampled hourly from 4 hours before lights off (ZT 8) up to 4 hours after lights off (ZT 16). Values below the graphs are mean $\pm$ SEM of the 3, 6, 9 and 12-month old female mice. Maximal LH value is significantly higher at 3 months than at 12 months (* $p < 0.05$, 95% CI of difference; 7.743 to 26.08); ZT at the peak is significantly different at 12 months as compared to 3, 6 and 9 months (+ $p < 0.05$, ANOVA test $F(3, 22) = 3.961$); ZT at the starting of the LH surge (LH > 4 ng/ml) is significantly different at 12 months as compared to 3, 6 and 9 months (# $p < 0.05$, ANOVA test $F(3, 22) = 3.622$). ZT: zeitgeber time.

Analysis of the mean $\pm$ SEM of LH values in mice of the same group of age (Figure 2) shows that the maximum LH values at the ZT of the peak are 21.3 ± 7 ng/ml (at ZT12) at 3 months, 19.4 ± 2.9 ng/ml (at ZT12) at 6 months, 17.1 ± 4.2 ng/ml (at ZT12) at 9 months, and 11.5 ± 2.6 ng/ml (at ZT14) at 12 months (with a significant difference between 3 and 12 months ($p < 0.05$), and the ZT of the peak significantly different at 12 months as compared to earlier ages ($p < 0.05$, ANOVA test $F(7, 154) = 16.68$). Notably, the comparative analysis between individual and mean values at different ages, although delivering an overall similar message, shows some differences with higher maximal LH concentration (from 2 to 8 ng/ml) and later ZT of the peak (from 0.4 to 0.9h) when considering individual as compared to mean values. All mice exhibited estrous cycles from 3 up to 12 months. The estrus cycle duration was stable at 3, 6 and 9 months, lasting 4.2 ± 0.1 , 4.3 ± 0.3 and 4.6 ± 0.3 days respectively (with low inter-individual variability: 11, 16, and 16 %, mice displaying irregular cycles, respectively). At 12 months, the mean cycle duration and inter-individual variability appeared higher with a mean duration of 6.6 ± 1.7 days (one mouse having a duration cycle of 15 days) and 40 % mice exhibited irregular cycles. There was no statistical difference however in the estrous cycle duration among the different groups of age. The percentage of mice with an estrus cycle duration of 4-5 days was 94, 91.5, 81.5 and 71.5% at 3, 6, 9 and 12 months respectively. The estrus/diestrus length ratio was stable at 3, 6, 9 months, with values of 1.3 ± 0.2 , 1.1 ± 0.1 , 1.4 ± 0.3 respectively and increased at 2 ± 0.6 at 12 months, yet with no statistical difference among the four groups of ages.

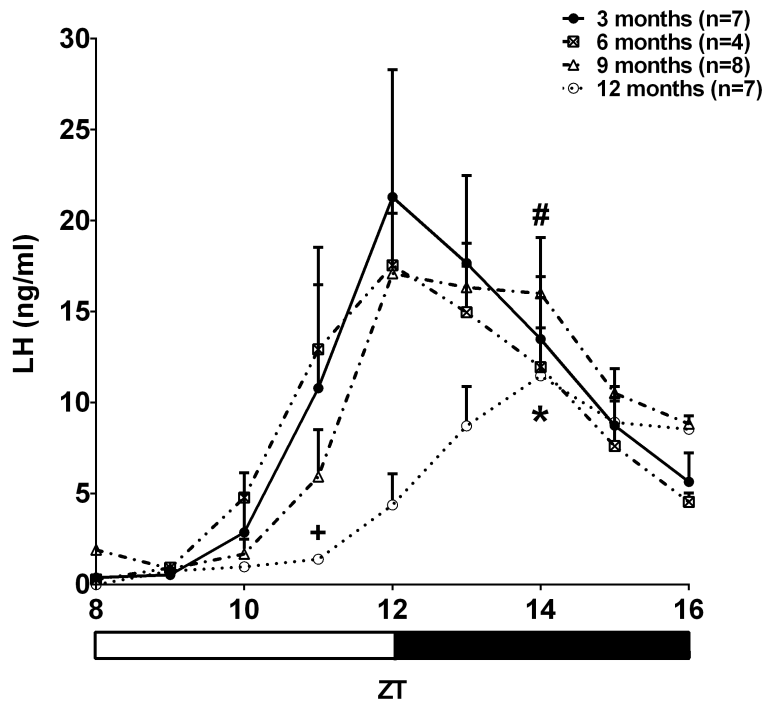


Figure 2: Mean LH secretion at the day of proestrus in 3 to 12 month-old C57BL/6J female mice. At each age, LH value was measured by ELISA in 4 μ L blood sampled hourly from 4 hours before lights off (ZT 8) up to 4 hours after lights off (ZT 16). LH values are given as mean $\pm$ SEM (n = 4 to 8 mice). ZT of LH peak at 12 months is significantly different (* $p < 0.05$, ANOVA test $F(3, 22) = 3.961$) from ZT of LH peak at other ages; LH peak value at 12 months is significantly different (# $p < 0.05$, 95% CI of difference; 7.743 to 26.08) from LH peak value at 3 months; LH value at ZT 11 is significantly lower at 12 months (+ $p < 0.05$, 95% CI of difference; 0.2312 to 18.57) as compared to 3 months. ZT: zeitgeber time.

Intra-individual variability in the preovulatory LH surge and estrous cycle with age

The longitudinal analysis of individual LH secretion over several cycles allows estimating intra-individual variability at different ages. At 3 months, the comparison of consecutive preovulatory LH surges in 3 representative individual mice shows that intra-individual variability in the ZT of the LH peak over 2 or 3 consecutive surges is less than 2 hours with a mean variation of 0.9 ± 0.4 hours (Figure 3A). Notably, the intra-individual variability in the ZT of the LH peak remains low in 6 month-old (1.2 ± 0.6 hours, Figure 3B) and 12 month-old (0.5 ± 0.4 hours, Figure 3C) mice.

In the same line, the intra-individual variability in the estrus cycle length did not show significant difference from 3 to 12 months (0.9 ± 0.8 , 0.4 ± 0.6 , 1 ± 0 , 2.9 ± 3 days, respectively).

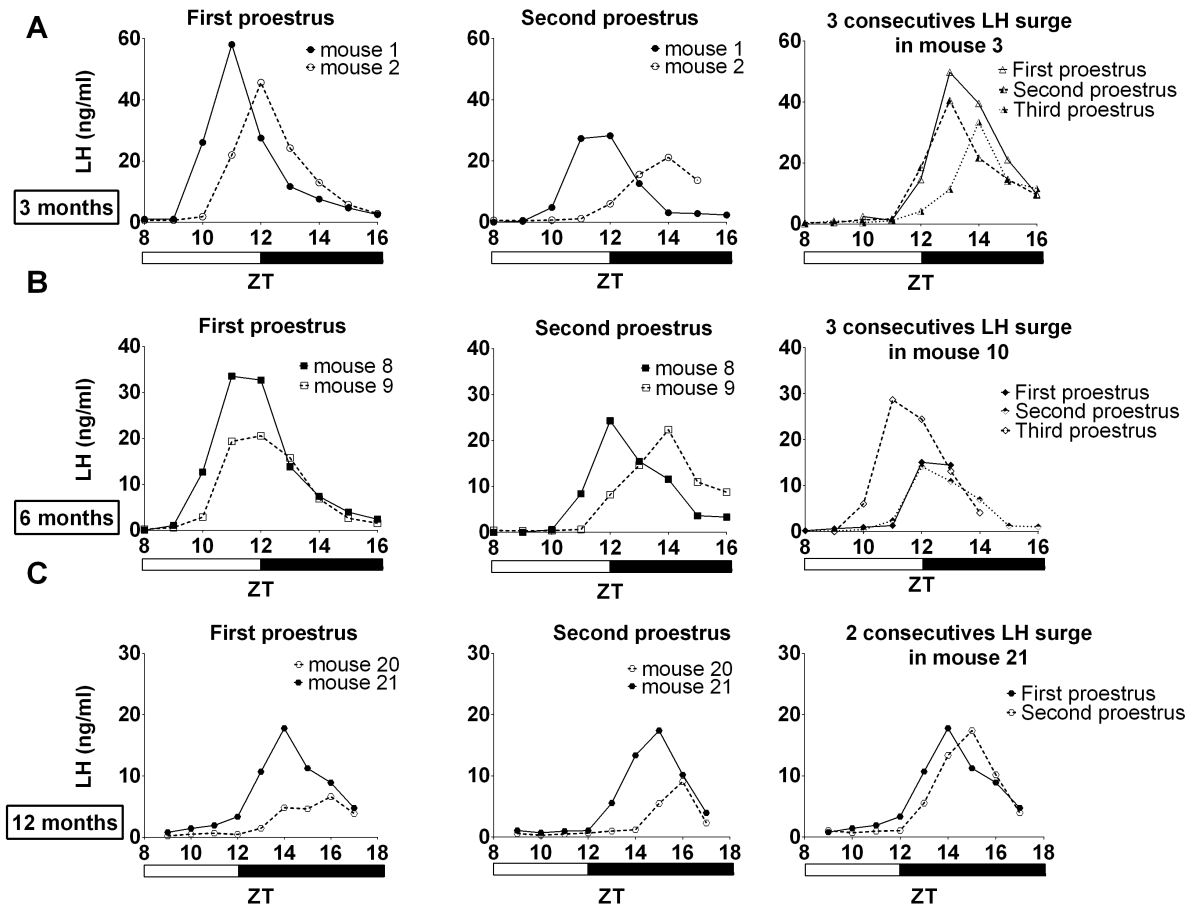


Figure 3: LH secretion over successive preovulatory LH surges in 3 month- (A), 6 month- (B) and 12 month- (C) old C57BL/6J female mice. At each age, LH value was measured by ELISA in 4 μ L blood sampled hourly from 4 hours before lights off (ZT 8) up to 4 hours after lights off (ZT 16). Panel A shows LH secretion in 3 independent 3 month-old mice (mouse #1, mouse #2) at two consecutive proestrus and one mouse (mouse #3) with 3 consecutive superposed LH surges; Panel B shows LH secretion in 3 independent 6 month-old mice (mouse #8, mouse #9) at two consecutive proestrus and one mouse (mouse #10) with 3 consecutive superposed LH surges; Panel C shows LH secretion in 2 independent 12 month-old mice (mouse #20, mouse #21) at two consecutive proestrus and one mouse (mouse #21) with 2 consecutive superposed LH surges. ZT: zeitgeber time.

Discussion

The recent development of a micro-assay for circulating LH in freely moving rodents has been an important advance in reproductive biology research, allowing LH secretion to be monitored every hour (or less) for several consecutive days in a single animal (Steyn et al. 2013). In this study, we took advantage of this method to investigate intra- and inter- variability in the preovulatory LH surge profile in individual C57BL/6J mice of different ages, in addition to cytological estrus cycle analyses. From 3 up to 12 months, mice exhibited regular preovulatory LH surge at the late day/early night transition and normal estrous cycles. In 12 month-old mice however the timing of the LH surge was significantly delayed and its amplitude

significantly reduced when compared to 3 month-old mice, and the estrous cycles tended to become longer and more irregular.

Changes in estrus cycle length and regularity in aging C57BL/6J mice have already been studied (Nelson et al. 1982; Mobbs, Gee, and Finch 1984). Similar to our observation, it was found that from 4 to 11 months, mice exhibited no significant change in the estrus cycle duration (median length < 5 days) with 40 to 60% mice exhibiting regular cycles. Then, from 11 to 14 month, mice displayed a progressive lengthening of cycle duration (50% mice had a mean duration > 5 days) and 40 to 90% mice became irregular and even acyclic (Nelson et al. 1982). Another study reported comparable age-related changes in estrus cycle irregularity with female mice displaying no irregular cycle up to 8 months, and then 39% becoming irregular at 12-13 months and 79% at 16-20 months (Parkening, Collins, and Smith 1982).

From 3 to 9 months, the LH surge occurred with similar amplitude and at the same period around the light/dark transition, indicating that the pathway synchronizing the LH surge is functioning properly. By contrast, at 12 months, although there was a slight but not significant alteration in the estrous cycle length and regularity, the timing of the preovulatory LH surge was significantly delayed by about 2h, and the amplitude reduced by about 50% as compared to earlier stages, suggesting that alteration in the central control of the LH surge is an early ageing signal. Earlier studies on ageing female mice (Parkening, Collins, and Smith 1982) and rats (Wise 1982; Nass et al. 1984; Akema et al. 1985; DePaolo and Chappel 1986; Matt et al. 1998) also reported a reduced LH peak amplitude in middle-age as compared to young female animals (Downs and Wise 2009, for review).

In female rodents, reproductive senescence is a complex process involving progressive ovarian dysfunction (follicular and estrogen decrease) associated with an altered capacity of neuropeptides controlling the hypothalamic-pituitary axis, to respond to estradiol signal (Lederman et al. 2010; Ishii et al. 2013; Kunimura et al. 2017). The reduced secretion of LH at the surge in ageing females does not result from a lower number of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons or GnRH release, nor a reduced pituitary responsiveness to GnRH, but rather is due to a marked decrease in GnRH neuronal activation at the time of the proestrus LH surge, indicating that mechanisms upstream of GnRH neurons are involved in this ageing process (Lloyd, Hoffman, and Wise 1994; Rubin, Lee, and King 1994; Rubin et al. 1995; Downs and Wise 2009; Lederman et al. 2010; Ishii et al. 2013). The decline in the E2-dependent GnRH activation of LH at the surge may involve the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) kisspeptin neurons, now recognized as the E2-dependant drivers of the preovulatory GnRH/LH surge (Smith et al. 2006; Pinilla et al. 2012, for review). Indeed, a parallel decline

in cFos positive kisspeptin neurons and cFos positive GnRH neurons at the time of the GnRH/LH surge has been reported in middle-aged female mice with irregular cycles. Furthermore, in ageing female, AVPV kisspeptin neurons expression of estradiol receptor (ER α) and responsiveness to E2 are significantly reduced (Lederman et al. 2010; Ishii et al. 2013; Zhang et al. 2014), an effect which may further be exacerbated by a natural age-dependant E2 decrease due to follicular depletion (Downs and Wise 2009). By contrast, not significant changes in kisspeptin expression is reported in ageing rodents (Lederman et al. 2010; Ishii et al. 2013; Zhang et al. 2014). Altogether these data suggest that AVPV kisspeptin neurons are likely among the earliest to undergo aging processes and thus participate in initiating the early reproductive decline. In agreement with this hypothesis, kisspeptin infusion has been shown to restore LH surge amplitude in middle-aged female rats (Neal-Perry et al. 2009).

In addition to the reduced amplitude of the LH surge, our temporal resolution of LH monitoring reported that the LH surge timing exhibited a significant 2h phase delay in the 12 month-old female mice. A similar phase delay, although of 1h only, was previously reported in middle-aged female rats (Wise 1982). It is now well established that the main circadian clock of the SCN is necessary for the proper timing of the preovulatory LH surge (Simonneaux and Bahougne 2015, for review). Notably, the daily rhythm in vasoactive intestinal peptide (VIP) in SCN neurons, which convey time of the day signal directly to GnRH neurons, is abolished in middle-aged female rats (Krajnak et al. 1998; Downs and Wise 2009) and this may account for the LH surge phase delay. Contrastingly, the daily rhythm in SCN vasopressin neurons, known to project directly onto AVPV kisspeptin neurons (Vida et al. 2010; Piet et al. 2015), does not appear altered in middle-aged female rats (Krajnak et al. 1998). Finally, because the SCN clock resetting by transmitters like glutamate, N-methyl-D-aspartate or serotonin is reduced in ageing mice (Biello 2009), it is possible that a less synchronized circadian clock is responsible for the LH surge delay in the 12 month-old mice. Whatever the mechanisms involved, it could be interesting to investigate whether the LH surge phase delay is associated with a similar shift in the rhythm of AVPV kisspeptin neuron's activity in middle-aged female rodents.

Cellular senescence is one of the hallmark of aging process and can be defined as an irreversible and stable arrest of the cell cycle causing inflammation through a complex senescence-associated secretory phenotype (SASP)(Perrott et al. 2017; Lawrence et al. 2018). Studies have reported that senescent cells and inflammation are implicated in general age-related dysfunction (Lawrence et al. 2018), including in female reproductive organs (Marquez, Ibana, and Velarde 2017; Shirasuna and Iwata 2017, for reviews). It might be interesting to investigate whether

SASP processes are involved in the age-induced alteration of the central regulation of the preovulatory LH surge.

The analysis of LH secretion in several individual mice over few successive proestrus has shown that all LH surges are gated at the light/dark transition although with some inter-individual variability in the ZT of the LH peak, as already reported in a previous study using similar LH analysis (Czieselsky et al. 2016). In this study, we followed individual mice over up to 3 consecutive proestrus in order to assess the intra-individual stability of the LH surge at different ages. We found low intra-individual variability in the ZT of the peak ($< 2\text{h}$) over successive proestrus LH surges, even in the oldest mice. Therefore, our data indicate that longitudinal analysis using micro LH assay in individual mice can be used over few weeks or months to study long term mechanisms regulating the LH surge timing.

Conclusions

This study has demonstrated that female mice in regular environmental conditions display stable LH surge timing and amplitude up to 9 months, implicating that the regulation or dysregulation of the preovulatory LH surge can be studied over extended longitudinal period of time. However, at 12 months the LH surge shows a 2-hour delay, possibly due to an altered ageing circadian clock, and a reduced amplitude, possibly resulting from a reduced sensitivity of AVPV kisspeptin neurons to E2 and hence a decreased release of AVPV kisspeptin onto GnRH neurons. Interestingly, the aged-related alteration in the preovulatory LH surge precedes overt modification in the estrous cycle which appears not significantly changed up to 12 months-old, thus supporting the current hypothesis that alteration in the central control of the LH surge is an early signal of reproductive ageing in female. Understanding the underlying mechanisms of reproductive senescence is essential because the reproductive status affects health throughout life. Thus, menopause in women is reported to have a negative impact on inflammation, gynecologic cancer, and cardiovascular disease (Shi et al. 2016). Therefore, protocols aiming at maintaining/restoring reproductive activity (Habermehl et al. 2019) may help alleviating the negative impact of reproductive senescence on health.

Funding

TB was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale for his PhD research (FDM20140630371).

Declaration of interest

All authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgements

Authors are very grateful to Dr Matthew Beymer for his scientific training on estrous cycle and LH analyses, to Dr Viviane Pallage and Dr Beatrice Bothorel for their valuable help on statistical analysis, and to Dr A. F. Parlow (National Hormone and Peptide Program, Torrance, California) for contributing valuable reagents.

Author contributions

TB and VS contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Bahougne. The first draft of the manuscript was written by Bahougne and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Akema T, Mitsugi N, Tadokoro Y, Kimura F (1985) Differential Changes in the Mechanisms Controlling Luteinizing Hormone and Prolactin Secretion in Middle-Aged Female Rats. *Endocrinologia Japonica* 32 (1): 153–61. <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.32.153>.
- Biello SM (2009) Circadian Clock Resetting in the Mouse Changes with Age. *Age* (Dordrecht, Netherlands) 31 (4): 293–303. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9102-7>.
- Christian CA, Mobley JL, Moenter SM (2005) Diurnal and Estradiol-Dependent Changes in Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (43): 15682–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504270102>.
- Czieselsky K, Prescott M, Porteous R, Campos P, Clarkson J, Steyn FJ, Campbell RE, Herbison AE (2016) Pulse and Surge Profiles of Luteinizing Hormone Secretion in the Mouse. *Endocrinology* 157 (12): 4794–4802. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1351>.
- DePaolo LV, Chappel SC (1986) Alterations in the Secretion and Production of Follicle-Stimulating Hormone Precede Age-Related Lengthening of Estrous Cycles in Rats. *Endocrinology* 118 (3): 1127–33. <https://doi.org/10.1210/endo-118-3-1127>.
- Downs JL, Wise PM (2009) The Role of the Brain in Female Reproductive Aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299 (1): 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.012>.
- Habermehl TL, Parkinson KC, Hubbard GB, Ikeno Y, Engelmeier JI, Schumacher B, Mason JB (2019) Extension of Longevity and Reduction of Inflammation Is Ovarian-Dependent, but Germ Cell-Independent in Post-Reproductive Female Mice. *GeroScience* 41 (1): 25–38. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0049-4>.
- Ishii MN, Matsumoto K, Matsui H, Seki N, Matsumoto H, Ishikawa K, Chatani F, Watanabe G, Taya K (2013) Reduced Responsiveness of Kisspeptin Neurons to Estrogenic Positive Feedback Associated with Age-Related Disappearance of LH Surge in Middle-Age Female Rats. *General and Comparative Endocrinology* 193 (November): 121–29. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.024>.
- Kerdelhué B, Brown S, Lenoir V, Queenan JT Jr, Jones GS, Scholler R, Jones HW Jr (2002) Timing of Initiation of the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Its Relationship with the Circadian Cortisol Rhythm in the Human. *Neuroendocrinology* 75 (3): 158–63. <https://doi.org/10.1159/000048233>.
- Krajnak K, Kashon ML, Rosewell KL, Wise PM (1998) Aging Alters the Rhythmic Expression of Vasoactive Intestinal Polypeptide mRNA but Not Arginine Vasopressin mRNA in the Suprachiasmatic Nuclei of Female Rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (12): 4767–74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04767.1998>.
- Kunimura Y, Iwata K, Ishigami A, Ozawa H (2017) Age-Related Alterations in Hypothalamic Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Neurons and in Pulsatile LH Release in Female and Male Rats. *Neurobiology of Aging* 50 (February): 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.10.018>.
- Lawrence I, Bene M, Nacarelli T, Azar A, Cohen JZ, Torres C, Johannes G, Sell C (2018) Correlations between Age, Functional Status, and the Senescence-Associated Proteins HMGB2 and P16INK4a. *GeroScience* 40 (2): 193–99. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0015-1>.
- Lederman MA, Lebesgue D, Gonzalez VV, Shu J, Merhi ZO, Etgen AM, Neal-Perry G (2010) Age-Related LH Surge Dysfunction Correlates with Reduced Responsiveness of Hypothalamic Anteroventral Periventricular Nucleus Kisspeptin Neurons to Estradiol Positive Feedback in Middle-Aged Rats. *Neuropharmacology* 58

- (1): 314–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.015>.
- Legan SJ, Karsch FJ (1975) A Daily Signal for the LH Surge in the Rat. *Endocrinology* 96 (1): 57–62. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-57>.
- Lloyd JM, Hoffman GE, Wise PM (1994) Decline in Immediate Early Gene Expression in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons during Proestrus in Regularly Cycling, Middle-Aged Rats. *Endocrinology* 134 (4): 1800–1805. <https://doi.org/10.1210/endo.134.4.8137745>.
- Mahoney MM, Sisk C, Ross HE, Smale L (2004) Circadian Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and the Preovulatory Surge in Luteinizing Hormone in the Diurnal Rodent, *Arvicanthis Niloticus*, and in a Nocturnal Rodent, *Rattus Norvegicus*. *Biology of Reproduction* 70 (4): 1049–54. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021360>.
- Marquez CMD, Ibane JA, Velarde MC (2017) The Female Reproduction and Senescence Nexus. *American Journal of Reproductive Immunology* (New York, N.Y. : 1989) 77 (5): e12646. <https://doi.org/10.1111/aji.12646>.
- Matt DW, Gilson MP, Sales TE, Krieg RJ, Kerbeshian MC, Veldhuis JD, Evans WS (1998) Characterization of Attenuated Proestrous Luteinizing Hormone Surges in Middle-Aged Rats by Deconvolution Analysis. *Biology of Reproduction* 59 (6): 1477–82. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1477>.
- McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA (2012) Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 67 (January): e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>.
- Mobbs CV, Gee DM, Finch CE (1984) Reproductive Senescence in Female C57BL/6J Mice: Ovarian Impairments and Neuroendocrine Impairments That Are Partially Reversible and Delayable by Ovariectomy. *Endocrinology* 115 (5): 1653–62. <https://doi.org/10.1210/endo-115-5-1653>.
- Nass TE, LaPolta PS, Judd HL, Lu JK (1984) Alterations in Ovarian Steroid and Gonadotrophin Secretion Preceding the Cessation of Regular Oestrous Cycles in Ageing Female Rats. *The Journal of Endocrinology* 100 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1000043>.
- Neal-Perry G, Lebesgue D, Lederman M, Shu J, Zeevalk GD, Etgen AM (2009) The Excitatory Peptide Kisspeptin Restores the Luteinizing Hormone Surge and Modulates Amino Acid Neurotransmission in the Medial Preoptic Area of Middle-Aged Rats. *Endocrinology* 150 (8): 3699–3708. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1667>.
- Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE (1982) A Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I. Cycle Frequency, Length and Vaginal Cytology. *Biology of Reproduction* 27 (2): 327–39. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.2.327>.
- Parkening TA, Collins TJ, Smith ER (1982) Plasma and Pituitary Concentrations of LH, FSH, and Prolactin in Aging C57BL/6 Mice at Various Times of the Estrous Cycle. *Neurobiology of Aging* 3 (1): 31–35. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(82\)90058-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(82)90058-6).
- Perrott KM, Wiley CD, Desprez PY, Campisi J (2017) Apigenin Suppresses the Senescence-Associated Secretory Phenotype and Paracrine Effects on Breast Cancer Cells. *GeroScience* 39 (2): 161–73. <https://doi.org/10.1007/s11357-017-9970-1>.
- Piet R, Fraissenon A, Boehm U, Herbison AE (2015) Estrogen Permits Vasopressin Signaling in Preoptic Kisspeptin Neurons in the Female Mouse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (17): 6881–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4587-14.2015>.

- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, 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>.
- Rubin BS, Lee CE, King JC (1994) A Reduced Proportion of Luteinizing Hormone (LH)-Releasing Hormone Neurons Express Fos Protein during the Preovulatory or Steroid-Induced LH Surge in Middle-Aged Rats. *Biology of Reproduction* 51 (6): 1264–72. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.6.1264>.
- Rubin BS, Mitchell S, Lee CE, King JC (1995) Reconstructions of Populations of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Neurons in Young and Middle-Aged Rats Reveal Progressive Increases in Subgroups Expressing Fos Protein on Proestrus and Age-Related Deficits. *Endocrinology* 136 (9): 3823–30. <https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7649089>.
- Shi J, Zhang B, Choi JY, Gao YT, Li H, Lu W, Long J, Kang D, Xiang YB, Wen W, Park SK, Ye X, Noh DY, Zheng Y, Wang Y, Chung S, Lin X, Cai Q, Shu XO (2016) Age at Menarche and Age at Natural Menopause in East Asian Women: A Genome-Wide Association Study. *AGE* 38 (5–6): 513–23. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9939-5>.
- Shirasuna K, Iwata H (2017) Effect of Aging on the Female Reproductive Function. *Contraception and Reproductive Medicine* 2 (1): 23. <https://doi.org/10.1186/s40834-017-0050-9>.
- Simonneaux V, Bahougne T (2015) A Multi-Oscillatory Circadian System Times Female Reproduction. *Frontiers in Endocrinology* 6 (OCT). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00157>.
- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA (2006) Kiss1 Neurons in the Forebrain as Central Processors for Generating the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (25): 6687–94. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1618-06.2006>.
- Steyn FJ, Wan Y, Clarkson J, Veldhuis JD, Herbison AE, Chen C (2013) Development of a Methodology for and Assessment of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Juvenile and Adult Male Mice. *Endocrinology* 154 (12): 4939–45. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1502>.
- Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Caraty A, Coen CW, Liposits Z, Kalló I (2010) Evidence for Suprachiasmatic Vasopressin Neurones Innervating Kisspeptin Neurones in the Rostral Periventricular Area of the Mouse Brain: Regulation by Oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology* 22 (9): 1032–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02045.x>.
- Wise PM (1982) Alterations in Proestrous LH, FSH, and Prolactin Surges in Middle-Aged Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 169 (3): 348–54. <https://doi.org/10.3181/00379727-169-41356>.
- Zhang J, Yang L, Lin N, Pan X, Zhu Y, Chen X (2014) Aging-Related Changes in RP3V Kisspeptin Neurons Predate the Reduced Activation of GnRH Neurons during the Early Reproductive Decline in Female Mice. *Neurobiology of Aging* 35 (3): 655–68. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.038>.

B. Analyse des effets d'une avance ou d'un retard de phase unique (10h) et d'avance et retard de phases chronique (jusqu'à 9 mois) sur les cycles estriens et le pic préovulatoire de LH

Ce travail est soumis pour publication dans *Endocrinology*.

Résumé

Chez les mammifères femelles, la fonction reproductive dépend à la fois d'une horloge biologique synchronisée par le cycle lumière/obscurité et par un équilibre entre le rétrocontrôle négatif et positif des œstrogènes, dont les concentrations varient en fonction de la maturation folliculaire. Chez les femmes, un nombre croissant d'études signalent un impact négatif des environnements chronodisruptifs, comme le travail posté / de nuit, sur la fertilité. L'objectif de cette étude était d'explorer, chez la souris femelle, les effets de déphasage, unique et chronique, du cycle lumière / obscurité sur la longueur et la régularité du cycle estrien et sur le pic préovulatoire de l'hormone lutéinisante (LH), deux paramètres permettant d'explorer la fertilité des mammifères femelles. L'exposition à une avance ou un retard de phase unique de 10h a des effets mineurs sur l'axe reproducteur. Au cours du premier cycle estrien, l'occurrence et le moment de survenu du pic préovulatoire de LH sont modifiés alors que durant le deuxième cycle estrien la durée du cycle est légèrement augmentée. En revanche au cours du troisième cycle estrien, l'occurrence et le moment de survenu du pic préovulatoire de LH ainsi que la longueur du cycle estrien se normalisent. Les souris exposées à un déphasage chronique (avance de phase de 10h durant 3 jours suivis d'un retard de phase de 10h pendant 4 jours) présentent un axe reproducteur très altérée. En effet, le pourcentage d'occurrence du pic préovulatoire de LH est fortement diminué dès le début du déphasage chronique. De plus lorsqu'un pic préovulatoire de LH est observée, l'amplitude est faible avec un moment de survenu ne correspondant pas à l'interphase lumière/obscurité. En conséquence, le succès gestationnel et le nombre de souriceaux sont réduits quand les souris sont exposées avant l'accouplement à un déphasage chronique. De manière surprenante, les souris exposées à un tel déphasage chronique présentent une longueur des cycles estriens peu altéré, ce qui indique que la longueur des cycles estriens est un paramètre moins fiable pour évaluer la fertilité comparativement à la régularité des cycles estriens et surtout à l'occurrence d'un pic préovulatoire de LH. En conclusion, cette étude démontre que des souris femelles exposées à un déphasage chronique ont une forte diminution de l'occurrence du pic pré ovulatoire de LH et donc de leurs fertilités.

Impact of circadian disruption on female mice reproductive function

Thibault Bahougne (T.B.)^{1,2,*}, Mathilda Kretz (M.K.)^{1,2}, Eleni Angelopoulou (E.A.)¹, Nathalie Jeandidier (N.J.)², and Valérie Simonneaux (V.S.)¹

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, (UPR CNRS 3212) and University of Strasbourg, 8, allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg, France

²Service d'Endocrinologie et Diabète, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg

Running title: Circadian disruption of female reproductive cycles

Keys Words: Estrous cycle; *Luteinizing Hormone surge*; Circadian disruption, Shiftwork

*** Corresponding author:**

Thibault BAHOUGNE

1 place de l'hôpital

67000 Strasbourg, France

E-mail: tbahougne@gmail.com

Tel.: 33 (0)3 88 11 58 32

Fax number: 33(0)3 88 11 67 51

Abstract

In female mammals, cycles in reproductive function depend on both a biological clock synchronized to the light/dark cycle, and a balance between the negative and positive feedbacks of estradiol which concentration varies during ovary maturation. In women, studies report that chronodisruptive environments, notably those experienced in shiftwork conditions, may impair fertility and gestational success. The objective of this study was to explore, in female mice, the effects of shifted light/dark cycles on both the robustness of the estrous cycles and the timing of the preovulatory luteinizing hormone (LH) surge, two hallmarks of mammalian reproductive health. Female mice raised in a stable 12h light/12h dark cycle exhibited a regular 4-5 day-long estrous cycle with an LH surge synchronized to the light/dark transition on the day of proestrus. When mice were exposed to a single 10 h-phase advance or 10 h-phase delay, the occurrence and timing of the LH surge were altered at the first post-shift cycle and the duration of the second estrous cycle was slightly increased, but both the estrous cyclicity and LH surge pattern were recovered at the third estrous cycle. By contrast, when mice were exposed to a chronic shift (successive rotations of 10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days), they exhibited a severely impaired reproductive activity. Most mice had no preovulatory LH surge already at the beginning of the chronic shift, and when an increase in LH was observed, the surge was out of phase with a lower amplitude. Furthermore, the gestational success of mice exposed to a chronic shift was reduced since the number of pups was two times lower in shifted as compared to control mice. Surprisingly, mice exposed to such a chronic shift displayed barely altered estrous cycles length, indicating that the monitoring of estrous cyclicity is a parameter less reliable than individual LH secretion to evaluate female fertility. In conclusion, this study reports that female mice exposure to a single-phase shift has minor reproductive effects whereas exposure to chronically disrupted light/dark cycles markedly impairs the preovulatory LH surge occurrence, leading to reduced fertility.

Introduction

Reproductive activity in female mammals displays regular cycles (menstrual cycles in women, estrous cycles in rodents) driven by a complex interaction of the circadian system, hypothalamic neuropeptides, pituitary gonadotropins (LH: luteinizing hormone and FSH: follicle stimulating hormone) and sex steroid hormones produced by the ovaries. The final output of this regulatory process is to combine the production of a mature oocyte (ovulation) with a receptive reproductive tract that will ensure correct embryo development (1)(2 for review). During the first part of the reproductive cycle (follicular phase in women; metestrus-diestrus in rodents), the progressive increase in FSH contributes to the recruitment and development of ovarian follicles leading to a gradual increase in estradiol secretion. The second part of the reproductive cycle (luteal phase in women; proestrus-estrous in rodents) begins with a marked and transient secretion of LH which triggers ovulation a few hours later in rodents, and between 9 to 23 hours later in women. This preovulatory LH surge takes place approximately every 28 days in women and every 4-5 days in female rodents. Additionally, the timing of the LH surge usually arises at the end of the resting period, thus at the late day/early night transition in nocturnal rodents (3)(4)(5) and the late night/early morning transition in diurnal rodents (6) and women (7)(8). Early experimental studies in rodents have demonstrated that a functional circadian system is required for a proper reproductive activity. Thus, neuroanatomical lesion of the suprachiasmatic nuclei (SCN), where the master circadian clock is located (9), or clock gene mutation (10) severely impair estrous cyclicity and fertility.

Nowadays, an increasing number of women work in conditions of disrupted light/dark cycles (almost 20% of female workers in industrial countries) which have overall negative impacts on health (11)(12)(13)(14). Some epidemiological studies have reported that shiftwork condition is associated to irregular menstrual cycles, lower fertility, and an increased risk of miscarriage (1)(15)(16). Yet to date, only few fundamental studies in female rodents have evaluated the effect of circadian disruption on reproductive parameters (17)(18)(19). In this context, the objective of this study was to assess the effects of single-phase shifts (mimicking a transmeridian shift or "jet lag") or chronic shifts (mimicking shiftwork conditions) on the preovulatory LH surge and estrous cycle characteristics in individual adult female mice.

Material and methods

Animals

Eight-week-old virgin C57BL/6J female mice were obtained from the Charles River laboratory. Upon arrival, mice were placed by group of two or three per cage and quarantined for two weeks. Mice were kept at 22°C on a 12 h light/12 h dark (12L/12D) schedule, with lights on at zeitgeber time 0 (ZT0) and lights off at ZT12, and water and food were given *ad libitum* unless otherwise explained. Two weeks before experimentation mice were manipulated and habituated to regular vaginal smear and blood sampling.

Ethical approval

All experimental procedures were approved by the local ethical committee (CREMEAS) and the French National Ministry of Education and Research (authorization # 2015021011396804).

Experimental Protocols

Mice were assigned to different experimental protocols:

Control group (n=9): Mice were kept under stable 12L/12D cycle. After the habituation period, two consecutive estrous cycles were followed, and 4 µl tip tail blood was sampled every hour from ZT8 to ZT16 on the day of proestrus for LH measurement.

Single phase advance (n=9): Mice were kept under stable 12L/12D cycle. After a day of proestrus, light onset was advanced by 10 h and the following estrous cycles were monitored during the next three cycles with 4 µl tip tail blood sampled every hour on the day of proestrus from ZT8 to ZT16 for LH measurement.

Single phase delay (n=9): Mice were kept under stable 12L/12D cycle. After a day of proestrus, light onset was delayed by 10 h and the following estrous cycles were followed for three cycles with 4 µl tip tail blood sampled every hour on the day of proestrus from ZT8 to ZT16 for LH measurement.

Chronic shift (n=9): Mice were kept under stable 12L/12D and were monitored during two consecutive estrous cycles with 4 µl tip tail blood sampled every hour during the second proestrus for LH measurement. The day following the second proestrus, mice were submitted to a 10 h-phase advance for 3 days followed by a 10 h-phase delay for 4 days, and this rotating condition was maintained for up to 9 months. This duration was chosen because we previously reported that both estrous cycle and timing of LH surge are stable up to 9 months in mice (20). During the shift, water was given *ad libitum*, but food was given only during the 12 h dark schedule to help mice re-synchronizing to the new 12L/12D schedule (21). Two consecutive

estrous cycles and LH secretion profiles at proestrus were monitored at different periods: at the beginning of the chronic shift, at the 6th month of chronic shift, then after 9 months just after cessation of the chronic shift.

Fertility assessment after chronic shift (n=28): Female mice were either kept under stable 12L/12D or submitted to a chronic shift as stated above for 4 weeks (n=14 for each condition, with two mice per cage). Thereafter all female mice were kept in a regular stable 12L/12D and one male mouse (n=14, kept under stable 12L/12D from birth) was added in each cage for one week. The mice were not manipulated during the all procedure to avoid the negative impact of stress on fertility. The number of gestation and number of pups per litter were measured in the following weeks.

Monitoring of estrous cycle and LH secretion

Estrous cycles and LH secretion were monitored as explained previously (20). In C57BL/6J female mice kept under a stable 12L/12D schedule, estrous cycles monitored by vaginal smear exhibit a period of 4-5 days divided into three phases according to the vaginal cytology: diestrus characterized by leukocytic and nuclei cells with leukocytic predominance; proestrus (during which the preovulatory LH surge occurs) characterized by oval nucleated epithelial cells with some cornified squamous epithelial cells; and estrus characterized by a predominance of cornified squamous epithelial cells (22). Vaginal smears were performed two times every day, between ZT2 and ZT11, during at least two consecutive estrous cycles. When the preovulatory surge was expected (on proestrus day) a 4 μ L blood sample withdrawn from the tail tip (< 1 mm) was taken hourly from 4 h before (ZT8) to 4 h after (ZT16) the light/dark transition. Each blood sample was immediately diluted in 116 μ L PBST (10% of 10X phosphate buffered saline, 0.25% of Tween-20 and 89.75% of H₂O) and stored at -80°C until LH assay.

LH assay

LH concentration was determined by a highly sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)(23) using anti-bovine LH β as capture antibody (NHPP, Torrance, California), rabbit anti-mouse LH as first antibody (NHPP, Torrance, California), goat anti-rabbit IgG as secondary antibody (Dako Cytomation, Denmark) and mouse LH as standard (NHPP, Torrance, California). Four given concentrations of LH (1, 10, 20 and 30 ng/ml) were used as quality controls. The intra-assay variation was 15% and the inter-assay variation was 12%.

Data analysis

To assess the effect of one shift (advance or delay) on estrous cycle and LH surge, mice were followed during three successive estrous cycles and were compared among each other, and to the control group. To assess the effect of chronic shift on estrous cycle and LH surge, mice were followed longitudinally before, at the beginning, at 6 months and after 9 months just after the cessation of the chronic shift and these three periods were compared to the period before the chronic shift.

For each group, the robustness of the estrous cycles was characterized by different parameters (according to (24)) : the number of acyclic mice defined for those exhibiting one estrous cycle ≥ 10 days (except if this long cycle is followed by one consecutive cycle < 10 days, or if it is associated to an LH surge); the mean duration $\pm$ SEM in days (after exclusion of acyclic mice); the percentage of irregular estrous cycles, with a cycle being defined as irregular when the length of two consecutive cycles differs by more than one day.

The preovulatory LH surge occurrence, timing and amplitude were assessed by measuring individual circulating LH for up to three consecutive proestrus. For each group, the pattern of LH secretion was characterized by different parameters: mean $\pm$ SEM circulating LH values (ng/ml) at different ZT; mean $\pm$ SEM ZT of the peak; mean $\pm$ SEM ZT of the beginning of the surge (estimated by LH value > 4 ng/ml); and mean $\pm$ SEM peak amplitude (when data available).

Statistical analysis was completed using GraphPad Prism 8 (San Diego, USA). Assumptions were taken into account (all assumptions were verified). The D'Agostino and Pearson test was used to check normality. Homoscedasticity was verified with the Bartlett's test. Statistical comparisons were made with an analysis of variance (ANOVA). Newman Keuls post-hoc tests were performed as appropriate to determine specific interactions. If assumptions did not hold, a non-parametric Kruskal Wallis test was performed, and post-hoc comparisons were made with the Dunn test. For occurrence of preovulatory LH surge, statistical comparisons were made with Chi-square test. The significance level was set at $p \leq 0.05$.

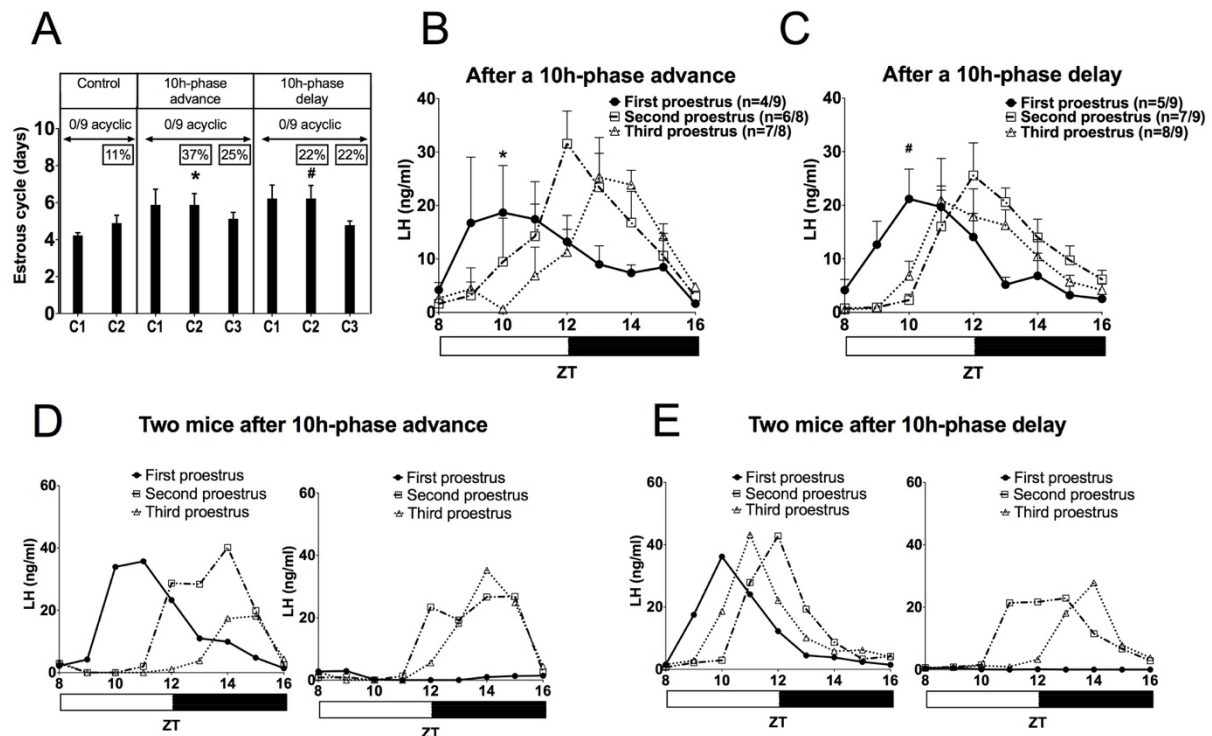
Results

Effect of a single 10 h-phase advance or 10 h-phase delay on estrous cycle and preovulatory LH surge

Mice submitted to a single 10 h-phase advance or delay kept exhibiting estrous cycles although the length of the second estrous cycle after the phase advance (5.9 ± 0.6 days) or delay (6.2 ± 0.7 days) was significantly increased as compared to the control group (4.6 ± 0.2 days) (Figure 1A). The percentage of mice with irregular cycles (intra-individual variability) was higher in the phase advance (37% and 25 % on the second and third cycle) and phase delay (22% on the second and third cycles) groups as compared to the control group (11%) (Figure 1A). None of the mice was found acyclic.

The individual monitoring of LH secretion showed that after the acute shift, a significant number of mice did not exhibit an LH surge at the first cycle (5/9 after advance; 4/9 after delay) and even at the second cycle (2/8 after advance; 2/9 after delay), but at the third cycle, the number of mice exhibiting an LH surge were similar in the control (8/9), phase advance (7/8) and phase delay (8/9) groups (Figures 1B, 1C, Table I). In the phase advance and delay groups, when an LH surge was observed, the first LH surge was significantly earlier (ZT of the LH peak at 10.6 ± 0.9 h for the phase advance group and 10.6 ± 0.4 h for the phase delay group) as compared to the control group (ZT of the LH peak at 13 ± 0.3 h) (Figures 1B and 1C, Table I). Figures 1D and 1E illustrate examples of individual mice monitored after the 10 h-phase advance or delay. Analysis of individual (Figures 2A, B, C) or mean (Figure 2D) LH values shows that mice of the three groups exhibited a comparable LH surge pattern at the second (control) or third (phase advance or delay) proestrus. Overall, at the third proestrus after the single-phase advance or phase delay shift, the preovulatory LH surge characteristics (percentage of occurrence, ZT of the peak and amplitude at the peak) were similar to those of the control group (Table I).

Figure 1: Longitudinal monitoring of estrous cycles and preovulatory LH surges of C57BL/6J female mice kept in a stable 12 light/12h dark cycle (control) or submitted to a single 10 h-phase advance or a single 10 h-phase delay.



A: Longitudinal monitoring of estrous cycles duration and regularity. Estrous cycle duration (black bars) is given as mean number of days $\pm$ SEM ($n=9$ on each groups). Values in square boxes indicate the percentage of mice with irregular cycles. Values above the arrow indicate the number of acyclic mice. In the phase advance group, one mouse was followed just during the first estrus cycle because it was in permanent diestrus during 10 days before an LH surge was observed, followed by a 2 days cornified stage, making experimental period too short to observe two successive estrous cycles. Duration of the second estrous cycle is significantly higher after the phase advance (*, $p=0.019$, Kruskal Wallis / Dunn test) and after the phase delay (#, $p=0.044$, Kruskal Wallis / Dunn test) as compared to the control group.

B & C: Mean LH secretion between ZT8 and ZT16 during the first, second and third proestrus after a 10 h-phase advance (B) or a 10 h-phase delay (C). The ZT of the first preovulatory LH surge peak was significantly earlier as compared to the ZT of the third preovulatory LH surge after the phase advance (*, $p=0.0327$; Newman-Keuls test, ANOVA test $F(2, 12)=4.609$) or the phase delay (#, $p=0.0167$ Newman-Keuls test, ANOVA test $F(2, 17)=5.256$). Only mice exhibiting an LH surge were included.

D & E: Individual LH secretion in representative female mice during the first, second and third proestrus after a 10 h-phase advance (D, two different mice) or a 10 h-phase delay (E, two different mice).

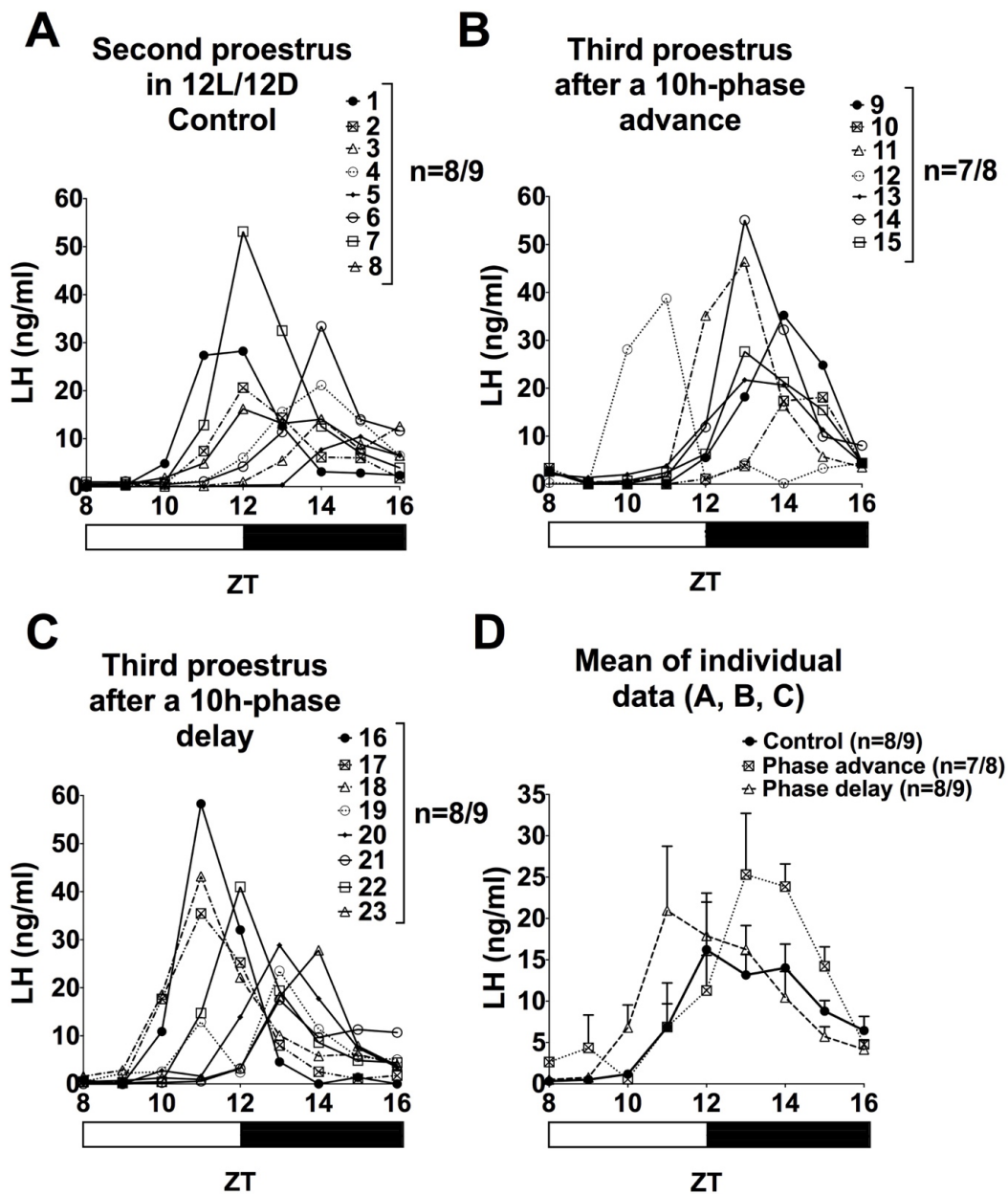
Time is given in ZT (zeitgeber time), with ZT0 as time of light onset and ZT12 as time of light offset; white and black bars under the graphs indicate periods of light and darkness, respectively.

Table I: Characteristics of the preovulatory LH surge in C57BL/6J female mice kept in a stable 12 h light/12 h dark cycle (Control), or during 3 estrous cycles after a 10 h-phase advance (Phase advance) or a 10 h-phase delay (Phase delay).

	Control	Phase advance			Phase delay		
	Second proestrus	First proestrus	Second proestrus	Third proestrus	First proestrus	Second proestrus	Third proestrus
LH surge occurrence (%) (n: number of mice with a surge)	89 (n=8/9)	44 (n=4/9)	75 (n=6/8)	88 (n=7/8)	55 (n=5/9)	78 (n=7/9)	89 (n=8/9)
LH value (ng/ml) at the peak (n: number of mice with a visible peak)	28.3 ± 3.8 (n=6/8)	30.7 ± 9.9 (n=3/4)	42.3 ± 6.3 (n=5/6)	34.7 ± 5 (n=7/7)	28.8 ± 3 (n=5/5)	35.5 ± 3.9 (n=7/7)	34.5 ± 4.6 (n=8/8)
ZT of the peak (n: number of mice with a visible peak)	13 ± 0.4 (n=6/8)	10.6 ± 0.9* (n=3/4)	11.8 ± 0.8 (n=5/6)	13.1 ± 0.5# (n=7/7)	10.6 ± 0.4* (n=5/5)	12.4 ± 0.4 (n=7/7)	12.3 ± 0.4# (n=8/8)
ZT of LH surge onset (LH > 4ng/ml)	11.9 ± 0.4	9.8 ± 1.4	11.2 ± 0.5	11.9 ± 0.6	9.2 ± 0.7	11.4 ± 0.4	11.3 ± 0.5

In the phase advance group, one mouse was followed just during the first estrus cycle because it was in permanent diestrus during 10 days before an LH surge was observed, followed by a 2 days cornified stage making experimental period too short to observe two successive estrous cycles. *: the mean ZT of the LH surge peak was significantly earlier during the first proestrus after the phase advance and after the phase delay as compared to the control group (Newman-Keuls test, $p=0.0082$; ANOVA test $F(2, 11)=7.674$). #: The mean ZT of the third preovulatory LH surge peak was significantly later as compared to the mean ZT of the first preovulatory LH surge after the phase advance ($p=0.0327$; Newman-Keuls test, ANOVA test $F(2, 12)=4.609$) or the phase delay ($p=0.0167$ Newman-Keuls test, ANOVA test $F(2, 17)=5.256$). Only mice exhibiting an LH surge were included. ZT: zeitgeber time.

Figure 2: Individual (A, B, C) and mean (D) LH values at the preovulatory surge in C57BL/6J female mice (A) at their second proestrus in a stable 12h light/12h dark cycle (mouse 1 to 8), (B) at their third proestrus after a 10 h-phase advance (mouse 9 to 15), and (C) at their third proestrus after a 10 h-phase delay (mouse 16 to 23); (D) Mean $\pm$ SEM of individual LH values of panels A, B and C, with no significant difference in the LH surge pattern ($p > 0.05$ Newman-Keuls test). Only mice exhibiting an LH surge are shown. Time is given in ZT (zeitgeber time), with ZT0 as time of light onset and ZT12 as time of light offset; white and black bars under the graphs indicate periods of light and darkness, respectively.

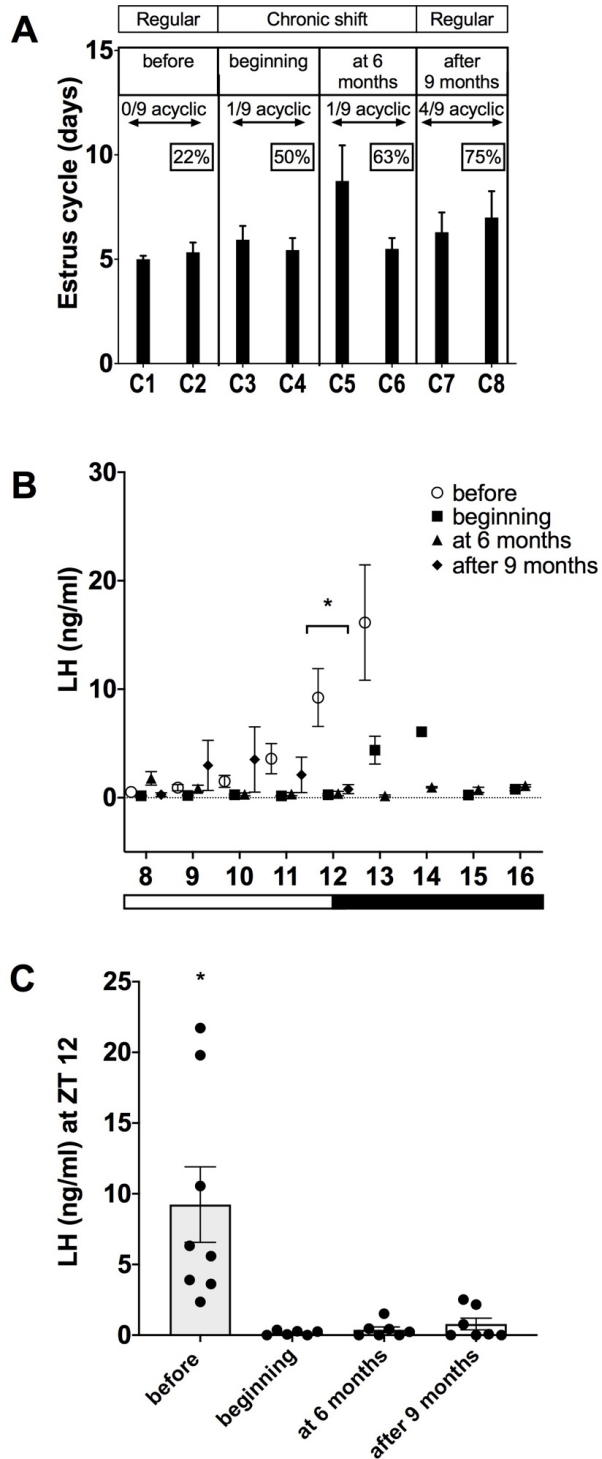


Effect of a chronic shift on estrous cycle and preovulatory LH surge

Nice mice were kept under a stable 12L/12D cycle and then submitted to a chronic shift of 10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days, for up to 9 months. Before the shift, all mice exhibited estrous cycles, but once exposed to a chronic shift, one mouse was found acyclic at the beginning of the shift, another one at 6 months in chronic shift, and then four mice after 9 months of chronic shift (Figure 3A). The mean duration of two consecutive estrous cycles did not change significantly in the cycling mice exposed to various duration of chronic shift (5.9 ± 0.7 and 5.4 ± 0.6 days at the beginning; 8.8 ± 1.7 and 5.5 ± 0.5 days at 6 months; and 6.3 ± 1.0 and 7.0 ± 1.3 days after 9 months of chronic shift) as compared to their estrous cycle duration before the chronic shift (5.1 ± 0.2 days). However, mice under chronic shift displayed an increasing prevalence of irregular cycles (intra-individual variability) with the time in chronic shift (50% at the beginning, 63% at 6 months, and 75% after 9 months), as compared to the 22% irregular cycles before the chronic shift (Figure 3A). Overall, the number of acyclic mice and the number of mice with irregular cycles were significantly increased after 9 months of chronic shift as compare to before the chronic shift ($p < 0.05$, Chi-square test).

The occurrence of a preovulatory LH surge was severely impaired at different stages of the chronic shift as compared to the previous regular 12L/12D cycle. Analysis of the mean LH values at the second proestrus of the different stages revealed a significant alteration of the LH secretion pattern at the beginning, at 6 months, or after 9 months of chronic shift (Figure 3B, Table II). Notably, at the expected time of the LH surge, ZT12, LH values were very low already at the beginning of the chronic shift, at 6 months of chronic shift, but also just after the 9 month-chronic shift had stopped (Figures 3B, C). However, when LH secretion was followed in individual mice, an increase in LH value (> 4 ng/ml) was sometimes observed at various ZT (ZT13 and ZT16 for 2/8 mice on the second proestrus after the beginning of chronic shift; ZT2 for 1/8 mice on the first and second proestrus at 6 months of chronic shift, and ZT10 for 1/5 mice on the second proestrus after 9 months of chronic shift (Table II)).

Figure 3: Longitudinal monitoring of estrous cycles and LH secretion at proestrus in C57BL/6J female mice kept in a stable 12 light/12h dark cycle then exposed to a chronic shift (rotation of 10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days) for up to 9 months. Mice were monitored individually before, at the beginning, at 6 months, and just after the 9 month-shift has stopped.



A: Longitudinal monitoring of estrous cycle duration and regularity. Estrous cycle duration of cyclic mice (black bars) is given as mean number of days $\pm$ SEM (n=5 to 9). Values in square boxes indicate the percentage of mice with irregular cycles. Values above the arrow indicate the number of acyclic mice (at each stage) which were excluded from the analyses. The percentage of mice with irregular cycles and the number of acyclic mice is significantly higher (p=0.0233, Chi-square test) after 9 months of chronic shift as compared to before the chronic shift. C: estrous cycle.

B: Mean LH secretion between ZT8 and ZT16 during the second proestrus of mice monitored at the different stages. LH secretion at ZT12 before the shift is significantly higher to all other time points after the chronic shift (*, p=0.0008, Kruskal Wallis / Dunn test). Time is given in ZT (zeitgeber time) with ZT0 as time of light onset and ZT12 as time of light offset; white and black bar under the graph indicate period of light and darkness, respectively.

C: Individual and mean LH values at ZT12 during the second proestrus of mice monitored at different stages. LH secretion at ZT12 is significantly higher before as compared to any other stages of the chronic shift (*, p=0.0008, Kruskal Wallis / Dunn test).

Table II: LH secretion on the day of proestrus in C57BL/6J female mice kept in a stable 12 h light/12 h dark cycle (group: Before), then exposed to a chronic shift (10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days) and monitored just after the beginning of the chronic shift (group: Beginning), at 6 months under chronic shift (group: At 6 months) or just at the end of the 9 months chronic shift (group: After 9 months)

Chronic shifts	Before	Beginning		At 6 months		After 9 months	
	Second proestrus	First proestrus	Second proestrus	First proestrus	Second proestrus	First proestrus	Second proestrus
LH surge (> 4 ng/ml) occurrence (%) (n: number of mice with a surge)	78 (n=7/9)	0 * (n=0/8)	25 (n=2/8)	12.5 * (n=1/8)	12.5 * (n=1/8)	0* (n=0/5)	20 (n=1/5)
ZT (h) of maximal LH secretion	12.3 $\pm$ 0.2	nd	14.5 $\pm$ 1.5	2	2	nd	10

The acyclic mice (one at the start, one at 6 months, and four after 9 months of chronic shift) were excluded of the analysis.

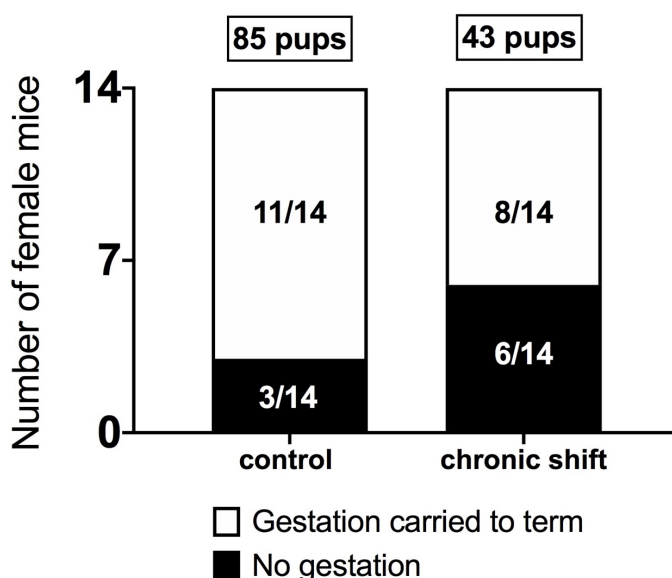
* p<0.05 (Chi-square test) indicate that the occurrence of a preovulatory LH surge is significantly lower as compared to before the chronic shift started.

nd: not detected; ZT: zeitgeber time.

Impact of a chronic shift on female mouse fertility

Female mice of similar age were either kept in regular 12L/12D cycles (control) or exposed for 4 weeks to a chronic shift of 10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days (chronic shift), and then released in the regular 12L/12D cycle together with a male mouse which stayed one week. Mice of the control group displayed a higher rate of gestation (78.6% - 11/14 pregnant mice) as compared to mice of the chronic shift group (57.1% - 8/14 pregnant mice) and delivered larger litter (7.7 ± 0.6 pups per litter, $n=11$) as compared to the shifted mice (5.4 ± 0.8 pups per litter, $n=8$) (Figure 4). Altogether, female mice of the control group gave birth to a higher number of pups (85 pups in total) as compared to female mice of the chronic shift group (43 pups in total). Of note, a majority (7/11) of mice of the control group gave birth 5 days earlier (21 days after male introduction) than the majority (5/8) of mice of the chronic shift group (26 days after male introduction).

Figure 4: Number of gestations carried to term and total number of pups born from control mice kept in a stable 12h light/12h dark cycle and mice exposed for 4 weeks to a chronic shift (rotation of 10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days). Mice were exposed either of the two schedules ($n=14$ per group, 2 mice/cage) for 4 weeks, then all mice were released in a stable 12h light/12h dark cycle together with a male (1 male for 2 mice) for one week. Female mice were then kept undisturbed under the same 12h light/12h dark cycle for up to 40 days. The number of mice that carried (or not) pregnancy to term is indicated in the white (or black) part of the bars ($p > 0.05$, Chi-square test). Values in square boxes indicate the total number of pups.



Discussion

In the last 30 years, the number of shift workers has considerably increased particularly in the women population with 20% women working in shifted daily schedule (11)(13)(15)(16)(25). Epidemiological studies indicate that shiftwork is associated with higher risks of developing cardiovascular, metabolic and gastrointestinal disorders, sleep troubles, various types of cancer, notably breast cancer, and mental disorders including depression and anxiety (13)(26)(27)(28). Strikingly, the impact of shiftwork on human fertility has barely been investigated (15)(16, for review). In women, some studies have reported that shiftwork is associated with more menstrual irregularities, longer time to get pregnant, and higher risks of miscarriage or low newborn weight. In general, no study actually assessed the impact of chronodisruptive conditions on ovarian cycles and timing of the preovulatory LH surge which are considered as robust indicators of fertility in both women and female rodents (29)(30)(31). In order to tackle this issue, this study investigated the effects of acute or chronic phase shifts on both estrous cycles and preovulatory LH surge in adult female mice.

We found that a single 10 h-phase advance or delay of the light/dark cycle induced a temporary increase in the estrous cycle length observed at the second cycle after the shift. However, already at the first cycle after the 10 h-phase advance or delay, only half of the mice exhibited an LH surge and when the LH surge was observed, the ZT of the LH peak was significantly advanced by 2h as compared to control mice kept in a stable 12L/12D cycle. On the third proestrus after the phase shift, the LH surge frequency, and the ZT and amplitude of the LH peak were no more different from the control group. Therefore, a single 10 h-phase shift (whether advance or delay) induces a temporary alteration of the occurrence and ZT of the preovulatory LH surge, with a minor effect on the estrous cycle. Our results are in line with a previous study showing that exposition of female Syrian hamsters to a single 12 h-shift has minor effects on the estrous cycle which was normalized within 2 to 4 days after the shift, thus faster than the locomotor activity rhythm which took 7 days to resynchronize (17). Similarly, another study reported that exposure of young mice (2-6 months) to a moderate shift (3 h-delay of darkness onset for 2 days with a return to the former 12L/12D cycles for 5 days) had no effect on the estrous cycle (31). Interestingly, 82% of middle aged mice (8-12 months) submitted to the same exposition exhibited irregular cycles, indicating that estrous cycle adaptation to shifted schedules is age-dependent (31). To our knowledge, only two studies have investigated the impact of a single phase shift on the preovulatory LH surge in female rodents. An early work reported that when female Syrian hamsters are exposed to a 3 h-phase advance, the LH surge is not fully resynchronized to the new schedule 3 days after, while after a 3 h-phase delay the LH

surge is more rapidly resynchronized to the dark onset (18). Another study showed that exposure of ovariectomized GnRH-GFP mice to a 2 h-phase advance for 5 days leads to an 1.5 h advance of the LH surge (32). Additionally, early studies investigated the impact of acute shifts on the timing of ovulation determined by autopsy. In female rats, ovulation was delayed by 4 h on the fourth day following a 5 h-phase delay, but had no effect after a 5 h-phase advance (33). In female Syrian hamsters, ovulation was reported to take 15-60 days to resynchronize after a 6 h-phase advance (34). Altogether, these data indicate that single shifts have no, or minor, effect on the overt estrous cycles, but lead to a more negative, although temporary, impact on the preovulatory LH surge.

Our study reported that exposition to a chronic rotation of 3 days 10 h-phase advance/4 days 10 h-phase delay has minor impact on estrous cycle regularity and length. Yet, there was a tendency to irregular and longer estrous cycles after 9 months of chronic shift with 4/9 mice becoming acyclic. By contrast, such a chronic exposition strongly impaired the occurrence of the preovulatory LH surge already at the beginning and during all the exposition. Only 2/9 mice exhibited an increase in LH but with much lower amplitude and with an out of phase ZT (different from the expected ZT12/13). We previously demonstrated that female mice maintained under a stable 12L/12D cycle keep their estrous cycle and preovulatory LH surge unchanged for up to 9 months (20). Therefore, the dramatic alteration in the LH surge occurrence and timing observed under chronic shift is not due to ageing. One recent study reported that female mice submitted to 10 h-phase advance/10 h-phase delay shifts with 3, 6 or 12 days of rotation intervals, exhibit a higher rate of irregular estrous cycles as compared to control mice, with the 6 day-rotation interval being the less severe protocol (19). Although representing a different paradigm, the impact of different day lengths has also been investigated on female rodent estrous cycles. Thus, increasing the duration of the day to 28 h (instead of 24 h) increases estrous cycle length (35) while adjusting the daily period to the endogenous circadian rhythm help restoring estrous cycle regularity and fertility in CRY mutant mice (31). To our knowledge, our study is the first one demonstrating the severe impact of a chronic shift on LH secretion. Notably, studies on ageing female mice reported that from 12 months and over, the timing and amplitude of the preovulatory LH surge are impaired (20)(36)(37)(38)(39)(40), thus indicating that exposure to chronodisruptive conditions may induce a premature ageing of the reproductive system, as recently reported in women under shiftwork (41).

Our investigation of the gestational outcome of mice exposed to a chronic shift for 4 weeks showed that shifted mice had a reduced rate of gestation with a two times lower number of pups

as compared to control mice. Further, the shifted mice possibly had a delayed ovulation since a majority of them gave birth 5 days later than the majority of the control mice. Other studies have investigated the effect of chronodisruptive conditions on gestation although with the shifted conditions applied after mating. It was found that a chronic 6 h-phase advance or delay every 5 days during pregnancy decreases the full-term pregnancy success in both conditions with a larger impact of the chronic advance (42). In rat, by contrast, successive 12 h-phase advances and delays during gestation did not alter pregnancy outcome (43).

Altogether our results indicate that single phase shifts have a moderate impact on female reproduction, whereas chronic phase shifts lead to severely impaired preovulatory LH surge, which in turn may reduce fertility and pregnancy success. These observations confirm the requirement of a functional and well-synchronized circadian clock for a proper female reproduction. Recent studies have indicated that the SCN clock forwards the daily signal to the reproductive system directly via a vasoactive intestinal peptidergic input onto the GnRH neurons, or indirectly via a vasopressinergic input onto the preoptic kisspeptin neurons which in turn activate the GnRH-induced LH surge (44, for review). Therefore, further studies should investigate whether shifts in the light/dark cycle alter the SCN clock signaling to the kisspeptin and/or GnRH neurons. Interestingly, mutation of various clock genes induce similar negative impact on estrous cycle regularity, LH surge occurrence, and pregnancy success, especially in middle-aged female mice (10)(31)(45). Further, selective ovary-specific knockout of the clock gene *Bmal1* disrupts ovulation and embryo implantation, pointing to a role for the peripheral secondary circadian clocks in addition to the master SCN clock (46)(47). Notably, an *in vitro* study reported that after a 6 h-phase advance, the ovarian clock resynchronizes more slowly than the SCN clock (48)(49). Therefore, in addition to the shift-induced alteration of the master SCN clock, the misalignment of the peripheral clocks may potentially worsen the reproductive alteration.

Acute or chronic shifts alter a number of other functions, notably glucocorticoid production and metabolic activity, which may indirectly impact reproduction. Thus, acute or chronic shifts alter the peak of glucocorticoid secretion (50)(51) which usually occurs around the same time of the LH surge in both rodents (52) and women (8). In human, one study reported a 2-fold increase in the hair cortisol level of male shiftworkers as compared to daytime workers (53). High glucocorticoid levels are reported to display negative impacts on fertility (54)(55) and glucocorticoid administration induces anestrus and alters the preovulatory GnRH/LH surge in mice through the inhibition of the preoptic kisspeptin neurons (54, for review)(56)(57)(58). One of the major and well-recognized effect of chronic circadian disruption is the increased risk of

developing metabolic syndrome (59)(60) a disease known to impair reproduction (61)(62). This strong interaction between metabolism and reproduction is notably illustrated by the ability of exogenous leptin to rescue puberty and fertility in ob/ob mice (63). In our study however, acute or chronic phase shifts had no impact on mouse body weight (data not shown) suggesting that the observed reproductive alteration is not due to major metabolic change.

In conclusion, our study reports that female mice exposure to a unique shift causes a moderate and temporary shift of the LH surge whereas exposure to a chronic shift induces a severe, rapid, and long-lasting alteration of the preovulatory LH surge leading to a reduce fertility. Notably, the estrous cycles appeared moderately altered, thus indicating that fertility assessment should use LH secretion rather than estrous, and probably menstrual, cycle regularity. Our results, obtained in a rodent model of shiftwork, should prompt us to conduct similar experimental investigations in women exposed to chronodisruptive conditions, notably to chronic shift work.

Authorship: All the authors participated to this article. T.B. and V.S. designed the experiments, T.B. and M.K. performed experimentation, T.B. wrote the draft, and M.K., E.A, N.J. and V.S., corrected and amended the manuscript to reach the final format.

Conflict of interest: Authors have no potential conflicts of interest

Acknowledgements

Thibault Bahougne was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale for his PhD research (FDM20140630371). Mathilda Kretz was supported by the Société Française d'Endocrinologie for her master internship. Authors are very grateful to Dr Matthew Beymer for his scientific training on estrous cycle and LH analyses, to Dr Viviane Pallage and Dr Beatrice Bothorel for their valuable help on statistical analysis.

Bibliography

1. Simonneaux V, Bahougne T. A Multi-Oscillatory Circadian System Times Female Reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2015;6:157.
2. Levine JE. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. Fourth edi. (TM Plant & AJ Zeleznic, ed.); 2015.
3. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975;96(1):219–226.
4. Bronson FH, Vom Saal FS. Control of the preovulatory release of luteinizing hormone by steroids in the mouse. *Endocrinology* 1979;104(5):1247–55.
5. Moline ML, Albers HE, Todd RB, Moore-Ede MC. Light-dark entrainment of proestrous LH surges and circadian locomotor activity in female hamsters. *Horm. Behav.* 1981;15(4):451–8.
6. McElhinny TL, Sisk CL, Holekamp KE, Smale L. A morning surge in plasma luteinizing hormone coincides with elevated Fos expression in gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the diurnal rodent, *Arvicanthus niloticus*. *Biol. Reprod.* 1999;61(4):1115–22.
7. Cahill DJ, Wardle PG, Harlow CR, Hull MG. Onset of the preovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites. *Fertil. Steril.* 1998;70(1):56–9.
8. Kerdelhué B, Brown S, Lenoir V, Queenan JT, Jones GS, Scholler R, Jones HW. Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human. *Neuroendocrinology* 2002;75(3):158–63.
9. Brown-Grant K, Raisman G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 1977;198(1132):279–96.
10. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr. Biol.* 2004;14(15):1367–73.
11. Pati, Chandrawanshi, Reinberg. Shift work: consequences and management. *Curr Sci* 2001;81, 32–52.
12. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB. Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. Groop L, ed. *PLoS Med.* 2011;8(12):e1001141.
13. Boivin DB, Boudreau P. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. *Pathol. Biol.* 2014;62(5):292–301.
14. Cordina-Duverger É, Houot M, Tvardik N, El Yamani M, Pilorget C, Guénel P. Prevalence of night work in France: characterization from a job-exposure matrix. *Bull. épidémiologique Hebd.* 2018;N° 8-9(12 mars 2019):168–174.
15. Gamble KL, Resuehr D, Johnson CH. Shift work and circadian dysregulation of reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2013;4:92.
16. Simonneaux V, Bahougne T, Angelopoulou E. Daily rhythms count for female fertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017;31(5). doi:10.1016/j.beem.2017.10.012.
17. Finkelstein JS, Baum FR, Campbell CS. Entrainment of the female hamster to reversed photoperiod: role of the pineal. *Physiol. Behav.* 1978;21(1):105–11.
18. Moline ML, Albers HE. Response of circadian locomotor activity and the proestrous luteinizing hormone

- surge to phase shifts of the light-dark cycle in the hamster. *Physiol. Behav.* 1988;43(4):435–40.
19. Yoshinaka K, Yamaguchi A, Matsumura R, Node K, Tokuda I, Akashi M. Effect of different light-dark schedules on estrous cycle in mice, and implications for mitigating the adverse impact of night work. *Genes Cells* 2017;22(10):876–884.
 20. Bahougne T, Angelopoulou E, Jeandidier N, Simonneaux V. Individual evaluation of luteinizing hormone in aged C57BL/6 J female mice. *GeroScience* 2019. doi:10.1007/s11357-019-00104-z.
 21. Bartol-Munier I, Gourmelen S, Pevet P, Challet E. Combined effects of high-fat feeding and circadian desynchronization. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2006;30(1):60–7.
 22. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol. Reprod.* 1982;27(2):327–39.
 23. Steyn FJ, Wan Y, Clarkson J, Veldhuis JD, Herbison AE, Chen C. Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology* 2013;154(12):4939–45.
 24. Nelson JF, Goodrick G, Karelus K, Felicio LS. Longitudinal studies of estrous cyclicity in C57BL/6J mice: III. Dietary modulation declines during aging. *Mech. Ageing Dev.* 1989;48(1):73–84.
 25. Opperhuizen, van Kerkhof LWM, Proper KI, Rodenburg W, Kalsbeek A. Rodent models to study the metabolic effects of shiftwork in humans. *Front. Pharmacol.* 2015;6:50.
 26. Vyas M V, Garg AX, Iansavichus A V, Costella J, Donner A, Laugsand LE, Janszky I, Mrkobrada M, Parraga G, Hackam DG. Shift work and vascular events: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2012;345(jul26_1):e4800.
 27. Menegaux F, Truong T, Anger A, Cordina-Duverger E, Lamkarkach F, Arveux P, Kerbrat P, Févotte J, Guénel P. Night work and breast cancer: a population-based case-control study in France (the CECILE study). *Int. J. cancer* 2013;132(4):924–31.
 28. Gan Y, Yang C, Tong X, Sun H, Cong Y, Yin X, Li L, Cao S, Dong X, Gong Y, Shi O, Deng J, Bi H, Lu Z. Shift work and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Occup. Environ. Med.* 2015;72(1):72–78.
 29. Kolstad HA, Bonde JP, Hjøllund NH, Jensen TK, Henriksen TB, Ernst E, Giwercman A, Skakkebaek NE, Olsen J. Menstrual cycle pattern and fertility: a prospective follow-up study of pregnancy and early embryonal loss in 295 couples who were planning their first pregnancy. *Fertil. Steril.* 1999;71(3):490–6.
 30. Guermandi E, Vegetti W, Bianchi MM, Uglietti A, Ragni G, Crosignani P. Reliability of ovulation tests in infertile women. *Obstet. Gynecol.* 2001;97(1):92–6.
 31. Takasu NN, Nakamura TJ, Tokuda IT, Todo T, Block GD, Nakamura W. Recovery from Age-Related Infertility under Environmental Light-Dark Cycles Adjusted to the Intrinsic Circadian Period. *Cell Rep.* 2015;12(9):1407–13.
 32. Christian CA, Mobley JL, Moenter SM. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(43):15682–7.
 33. McCormack CE. Acute effects of altered photoperiods on the onset of ovulation in gonadotropin-treated immature rats. *Endocrinology* 1973;93(2):403–10.
 34. Alleva JJ, Waleski M V, Alleva FR, Umberger EJ. Synchronizing effect of photoperiodicity on ovulation in hamsters. *Endocrinology* 1968;82(6):1227–35.

35. Kaiser IH. Effect of a 28 hour day on ovulation and reproduction in mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1967;99(6):772–84.
36. Wise PM. Alterations in proestrous LH, FSH, and prolactin surges in middle-aged rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1982;169(3):348–54.
37. Nass TE, LaPolt PS, Judd HL, Lu JK. Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. *J. Endocrinol.* 1984;100(1):43–50.
38. Akema T, Mitsugi N, Tadokoro Y, Kimura F. Differential changes in the mechanisms controlling luteinizing hormone and prolactin secretion in middle-aged female rats. *Endocrinol. Jpn.* 1985;32(1):153–161.
39. DePaolo L V, Chappel SC. Alterations in the secretion and production of follicle-stimulating hormone precede age-related lengthening of estrous cycles in rats. *Endocrinology* 1986;118(3):1127–33.
40. Matt DW, Gilson MP, Sales TE, Krieg RJ, Kerbeshian MC, Veldhuis JD, Evans WS. Characterization of attenuated proestrous luteinizing hormone surges in middle-aged rats by deconvolution analysis. *Biol. Reprod.* 1998;59(6):1477–82.
41. Stock D, Knight JA, Raboud J, Cotterchio M, Strohmaier S, Willett W, Eliassen AH, Rosner B, Hankinson SE, Schernhammer E. Rotating night shift work and menopausal age. *Hum. Reprod.* 2019;34(3):539–548.
42. Summa KC, Vitaterna MH, Turek FW. Environmental perturbation of the circadian clock disrupts pregnancy in the mouse. *PLoS One* 2012;7(5):e37668.
43. Varcoe TJ, Wight N, Voultsios A, Salkeld MD, Kennaway DJ. Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat. Yamazaki S, ed. *PLoS One* 2011;6(4):e18504.
44. Simonneaux. A Kiss to drive rhythms in reproduction. *Eur. J. Neurosci.* 2018. doi:10.1111/ejn.14287.
45. Pilorz V, Steinlechner S. Low reproductive success in *Per1* and *Per2* mutant mouse females due to accelerated ageing? *Reproduction* 2008;135(4):559–68.
46. Liu Y, Johnson BP, Shen AL, Wallisser JA, Krentz KJ, Moran SM, Sullivan R, Glover E, Parlow AF, Drinkwater NR, Schuler LA, Bradfield CA. Loss of *BMAL1* in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(39):14295–300.
47. Mereness AL, Murphy ZC, Forrestel AC, Butler S, Ko C, Richards JS, Sellix MT. Conditional Deletion of *Bmal1* in Ovarian Theca Cells Disrupts Ovulation in Female Mice. *Endocrinology* 2016;157(2):913–27.
48. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000;288(5466):682–5.
49. Yoshikawa T, Sellix M, Pezuk P, Menaker M. Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology* 2009;150(9):4338–47.
50. Goichot B, Weibel L, Chapotot F, Gronfier C, Piquard F, Brandenberger G. Effect of the shift of the sleep-wake cycle on three robust endocrine markers of the circadian clock. *Am. J. Physiol.* 1998;275(2 Pt 1):E243–8.
51. Oster. Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. - PubMed - NCBI. *J Clin Invest* 2010;2600–9.
52. Atkinson HC, Waddell BJ. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 1997;138(9):3842–8.

53. Manenschijn L, van Kruysbergen RGPM, de Jong FH, Koper JW, van Rossum EFC. Shift work at young age is associated with elevated long-term cortisol levels and body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(11):E1862-5.
54. Whirledge S, Cidlowski JA. A Role for Glucocorticoids in Stress-Impaired Reproduction: Beyond the Hypothalamus and Pituitary. *Endocrinology* 2013;154(12):4450–4468.
55. Pivonello R, Isidori AM, De Martino MC, Newell-Price J, Biller BMK, Colao A. Complications of Cushing's syndrome: state of the art. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(7):611–629.
56. Takumi K, Iijima N, Higo S, Ozawa H. Immunohistochemical analysis of the colocalization of corticotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in the hypothalamus of female rats. *Neurosci. Lett.* 2012;531(1):40–45.
57. Breen KM, Mellon PL. Influence of stress-induced intermediates on gonadotropin gene expression in gonadotrope cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014;385(1–2):71–77.
58. Luo E, Stephens SBZ, Chaing S, Munaganuru N, Kauffman AS, Breen KM. Corticosterone blocks ovarian cyclicity and the LH surge via decreased kisspeptin neuron activation in female mice. *Endocrinology* 2015;en20151711.
59. Barclay JL, Husse J, Bode B, Naujokat N, Meyer-Kovac J, Schmid SM, Lehnert H, Oster H. Circadian Desynchrony Promotes Metabolic Disruption in a Mouse Model of Shiftwork. *Mistlberger RE, ed. PLoS One* 2012;7(5):e37150.
60. Tucker P, Marquié J-C, Folkard S, Ansiau D, Esquirol Y. Shiftwork and metabolic dysfunction. *Chronobiol. Int.* 2012;29(5):549–55.
61. Norman RJ, Clark AM. Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10(1):55.
62. Clark AM, Thornley B, Tomlinson L, Galletley C, Norman RJ. Weight loss in obese infertile women results in improvement in reproductive outcome for all forms of fertility treatment. *Hum. Reprod.* 1998;13(6):1502–5.
63. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin Treatment Rescues the Sterility of Genetically Obese ob/ob Males. *Endocrinology* 1997;138(3):1190–1193.

C. Mise au point de l'injection intra-cérébro-ventriculaire de peptides associée au suivi individuel de LH afin de proposer des méthodes de resynchronisation du pic préovulatoire de LH chez des souris soumises à des déphasages

L'ensemble des résultats présentés ci-après est issu du travail de Master 2 de Mathilda KRETZ encadrée par le Dr Valérie SIMONNEAUX et Thibault BAHOUAGNE.

a. Introduction

L'occurrence du pic de LH ne dépend pas uniquement d'une concentration élevée d'estradiol mais aussi d'un signal journalier qui permet au pic préovulatoire d'avoir lieu précisément à la transition repos/éveil des mammifères femelles. Il est maintenant établi que cette régulation journalière du pic préovulatoire implique aussi les neurones à Kp de la région POA/AVPV qui présentent une activation robuste au moment du pic de LH (Simonneaux 2018). En effet, le Kp est un puissant stimulateur de la libération de GnRH chez l'ensemble des espèces de mammifère jusque-là explorées (Gottsch et al. 2004)(Navarro et al. 2005)(Dhillon et al. 2005). L'injection de Kp (périphérique ou centrale) permet une augmentation de la sécrétion des gonadotrophines et de la fréquence des pulses LH plus que la FSH (George, Anderson, and Millar 2012a) et ce de façon GnRH-dépendante chez les rats (Navarro, Castellano, et al. 2004)(Matsui et al. 2004), souris (Messenger et al. 2005), hamsters (Revel et al. 2006)(Ansel et al. 2010), ovins (Arreguin-Arevalo et al. 2007), brebis (Caraty et al. 2007) (Figure 10) et singes (Guerriero et al. 2012). De façon étonnante, les données expérimentales analysant l'effet de la Kp sur la sécrétion de LH ont pour la plupart été obtenues chez des mâles. A notre connaissance, il n'existe pas de donnée sur l'effet d'injection ICV de Kp sur la sécrétion de LH le jour du proestrus sur des rongeurs femelles post-pubères.

Le lien fonctionnel entre le signal journalier et l'occurrence du pic préovulatoire de LH pourrait être la population de neurones à VP des NSC qui projettent directement sur les neurones à Kp (Figure 19). En effet, la production de VP varie durant la journée et augmente fortement en milieu/fin d'après-midi (Francé, Kaur, and Glass 2010). Les premières expériences ont rapporté que l'inhibition du signal VPergique par un antagoniste V1A, provoque une réduction du pic de LH avec une oestradiolémie normale (Funabashi et al. 1999) et que l'injection ICV de VP chez des rates avec des NSC lésés, ovariectomisées et supplémentées en œstradiol (Palm et al. 1999)

ou chez des souris mutantes pour le gène *Clock* (Miller et al. 2006) est capable de restaurer un pic de LH. Plus récemment, une étude chez le hamster syrien femelle a suggéré que la VP serait impliquée dans la survenue du pic de LH à la transition jour/nuit via l'activation des neurones à Kp de l'AVPV (Williams et al. 2011). Finalement, une analyse électrophysiologique a montré que l'application de VP sur des tranches d'hypothalamus en culture active les neurones à Kp, un effet perdu chez des souris ovariectomisées mais complètement récupéré lors d'un traitement par œstradiol (Piet et al. 2015).

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer *in vivo* le rôle de la VP dans le phasage journalier du pic préovulatoire de LH par un suivi longitudinal sur de souris femelles individuelles dans le but, à long terme, de pouvoir proposer des pistes thérapeutiques.

b. Matériel et méthodes

Animaux

Les expériences ont été menées chez des souris femelles C57BL/6J sexuellement matures (âgées d'au moins 7 semaines) et vierges, obtenues du laboratoire Charles River. Elles ont été hébergées, par cage de 3 individus, dans l'animalerie du Chronobiotron de l'INCI dans des conditions contrôlées de température (22-25°C) et de luminosité (12 lumière/12 obscurité (12L/12D), avec le moment où la lumière s'allume appelé par convention, Zeitgeber Time 0 (ZT0) et avec la nourriture et l'eau données *ad libitum*. Après leur arrivée, les souris ont été gardées sans être manipulées pendant une semaine d'habituation. Ensuite, elles ont été manipulées quotidiennement au moins deux semaines avant le début des expérimentations. Leurs cages étaient changées et autoclavées hebdomadairement. Les souris ont été identifiées par un marquage au feutre (N50, Pentel Pen) au niveau de la queue. Les procédures expérimentales ont été validées par le comité local d'éthique (CREMEAS) et le ministère de l'Éducation et de la Recherche (numéro d'autorisation 2015021011396804). La santé des souris a été évaluée régulièrement pendant toute la durée des expériences.

Les souris ont été maintenues avec un cycle 12L/12D constant avec ZT0 à 5h du matin. Cette condition a été utilisée pour étudier :

- L'effet de neuropeptides injectés dans l'espace ICV sur la sécrétion de LH chez des souris en proestrus ou diestrus (n= 48 souris).

Suivi du cycle estrien

Le cycle estrien d'une souris femelle C57BL/6J dure 4-5 jours et se caractérise par 4 stades : diestrus, proestrus (jour du pic préovulatoire de LH), œstrus (jour de l'ovulation) et metestrus. Le cycle estrien a pu être déterminé quotidiennement grâce à la réalisation de frottis vaginaux selon la technique décrite par McLean (Nelson et al. 1982)(McLean et al. 2012). Le frottis vaginal est une technique de choix pour déterminer le stade estrien car la muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle et ses modifications cytologiques reflètent les variations cycliques des hormones sexuelles. Les différentes phases du cycle estrien sont caractérisées par une cytologie particulière visible à un grossissement 40x ou 100x au microscope optique.

- Lors du diestrus (D), il est observé une prédominance de cellules leucocytaires et quelques cellules nucléées qui augmentent progressivement en nombre.
- Le proestrus (P) se démarque par la cornification de cellules nucléées, avec une proportion égale entre cellules nucléées et cellules cornées.
- Le début de l'œstrus (E) se caractérise par des cellules nucléées et cornifiées.
- Le métestrus, est une phase de transition entre l'œstrus et le diestrus. Il est difficilement différentiable de l'œstrus, aussi il n'a pas été pris en considération dans cette étude.

Le frottis consiste en un lavage vaginal avec 30 µL de sérum physiologique. Le liquide recueilli est placé sur une lame pour être analysé au microscope optique sans coloration (Olympus BX41). Le ZT de réalisation du frottis est important car le pic de LH a lieu en fin de période lumineuse (vers ZT12) le jour du proestrus ; donc plus le frottis est réalisé autour de ZT12, plus l'analyse cytologique sera précise pour déterminer le proestrus. Aussi il est impossible de conclure de manière formelle face à une cytologie vaginale unique comportant des cellules nucléées et cornifiées : un frottis de la veille est indispensable. C'est pourquoi les souris en diestrus ont eu 2 frottis par jour : vers ZT5 et vers ZT11.

Prélèvements sanguins

Le stade du proestrus se caractérise par une augmentation importante et transitoire de LH vers ZT12. Les prélèvements sanguins effectués pour mesurer la concentration de LH ont été réalisés par une technique non létale de microprélèvements au bout de la queue.

Cette technique consiste à sectionner aux ciseaux moins d'un millimètre du bout de la queue des souris puis à masser la queue pour faire sortir au moins 4 µL de sang qui sont prélevés avec une pipette, puis immédiatement dilués au 1/30^{ème} dans du PBST et congelés à -80°C jusqu'au dosage de LH. Lorsqu'une cinétique est réalisée avec plusieurs points horaires consécutifs un massage doux est réalisé pour lever le coagulum primaire et ainsi rétablir l'afflux de sang pour permettre la répétition du prélèvement sanguin. La production de LH pouvant être perturbée par le stress des souris, il est important d'habituer les souris à ces gestes avant de réaliser les expériences.

Dosage ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La concentration sanguine de LH a été mesurée par une technique d'ELISA mis au point par Steyn (Steyn et al. 2013). Le dosage se fait à l'aide d'une gamme standard de 12 échantillons standards de LH de souris (AFP-5306A, National Hormone and Peptide Program (NHPP)) préparés par dilution en cascade dans du PBST contenant 0.2% d'albumine bovine sérique pour obtenir des concentrations entre 0 et 4 ng/mL. Par ailleurs quatre contrôles internes (1, 10, 20 et 30 ng/ml) sont systématiquement inclus dans les dosages pour en évaluer la reproductibilité.

Le premier jour, les puits (deux plaques de 96 puits) sont recouverts de 50 µL d'un anticorps (AC) de capture anti-bovin LHβ (518B7, NHPP) à une dilution au 1/1000^{ème} dans un tampon de phosphate salin (PBS). Après une nuit à 4°C, la solution d'AC est enlevée et les puits sont remplis de 200 µL d'un tampon de blocage pendant une heure, puis les puits sont lavés avec un tampon de phosphate salin associé à du polysorbate 20 (PBST) 3x3minutes pour éliminer ce qui n'a pas été fixé par l'AC de capture. Ensuite les puits reçoivent, en duplicata, 50 µL de standards de LH, les échantillons de sang dilués puis les quatre contrôles internes, et le tout est incubé sous agitation douce pendant 2 heures. Après un lavage au PBST (3x3minutes), 50 µL de l'AC primaire (AFP240580Rb, NHPP) sont mis dans les puits à une dilution de 1/10000^{ème} dans du tampon de blocage. Les plaques sont laissées 1,5 heure sous agitation à température ambiante puis rincées au PBST. L'étape suivante consiste à recouvrir les puits pendant 1 heure à température ambiante avec 50 µL de l'AC secondaire de chèvre anti-lapin (IgG D048701-2, Dako Cytomation) couplé à la peroxydase de Raifort dilué au 1/2000^{ème} dans un mélange équivalent en PBS et tampon de blocage. Les AC non fixés sont lavés avec trois lavages successifs de 200 µL de PBST. Finalement, le marquage est détecté par un système composé d'o-phénylènediamine-H₂O₂ (OPD, Invitrogen) et d'un tampon de citrate

phosphate qui est appliqué durant 30 minutes à température ambiante sous agitation et à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique consiste en une oxydation du complexe OPD-H₂O₂ par la peroxydase de raifort qui produit un précipité jaune. La réaction est stoppée par l'addition d'acide chlorhydrique (3 M) sous hotte aspirante puis les densités optiques à 492 et 650 nm sont mesurées pour chaque puits grâce à un spectrophotomètre (Thermolab). A partir des densités optiques (DO) obtenues pour chaque valeur de LH standard, une droite d'étalonnage est réalisée selon l'équation $DO=2,3051x+0,0011875$. Ensuite, la moyenne des 2 densités optiques mesurées pour un même échantillon est intégrée à l'équation précédente (à la place de x), ce qui permet d'obtenir un dosage de LH. La variation intra-test était de 30% et la variation inter-test était de 25 %.

Injections intra-cérébro-ventriculaires (ICV)

L'objectif est d'injecter des peptides dans le 4^{ème} ventricule de souris femelles pour en analyser leurs effets sur la sécrétion de LH.

La technique d'injection ICV est celle d'Haley et de McCormick (Haley and McCormick 1957). Tout d'abord, la souris est anesthésiée dans une boîte avec de l'isoflurane gazeux à un débit de 3L/minute, puis l'anesthésie est maintenue en plaçant le museau de la souris dans un masque délivrant de l'isoflurane au même débit. L'injection ICV se fait avec une seringue de 10 µL de type Hamilton avec une butée à 3 mm de la pointe de l'aiguille. Le point d'injection se situe au niveau de la ligne passant en avant des conduits auditifs externes, à 1 mm de part d'autre de la suture sagittale (Figures 22 A et B). Un volume de 2 µL de solution de peptide est injecté pendant 30 secondes, l'aiguille est laissée en place pendant 60 secondes afin de prévenir un phénomène de reflux puis la seringue est retirée délicatement. Il est attendu que la solution injectée dans le 4^{ème} ventricule soit drainée dans l'ensemble de l'espace intracérébral. Après l'injection, les souris sont surveillées jusqu'à leur réveil. Entre chaque injection, la seringue est rincée au sérum physiologique et à l'alcool à 70°. La bonne maîtrise de la technique d'injection a été vérifiée en injectant de l'encre de Chine diluée dans le 4^{ème} ventricule et en constatant sa présence dans le 3^{ème} ventricule (Figure 22 C).

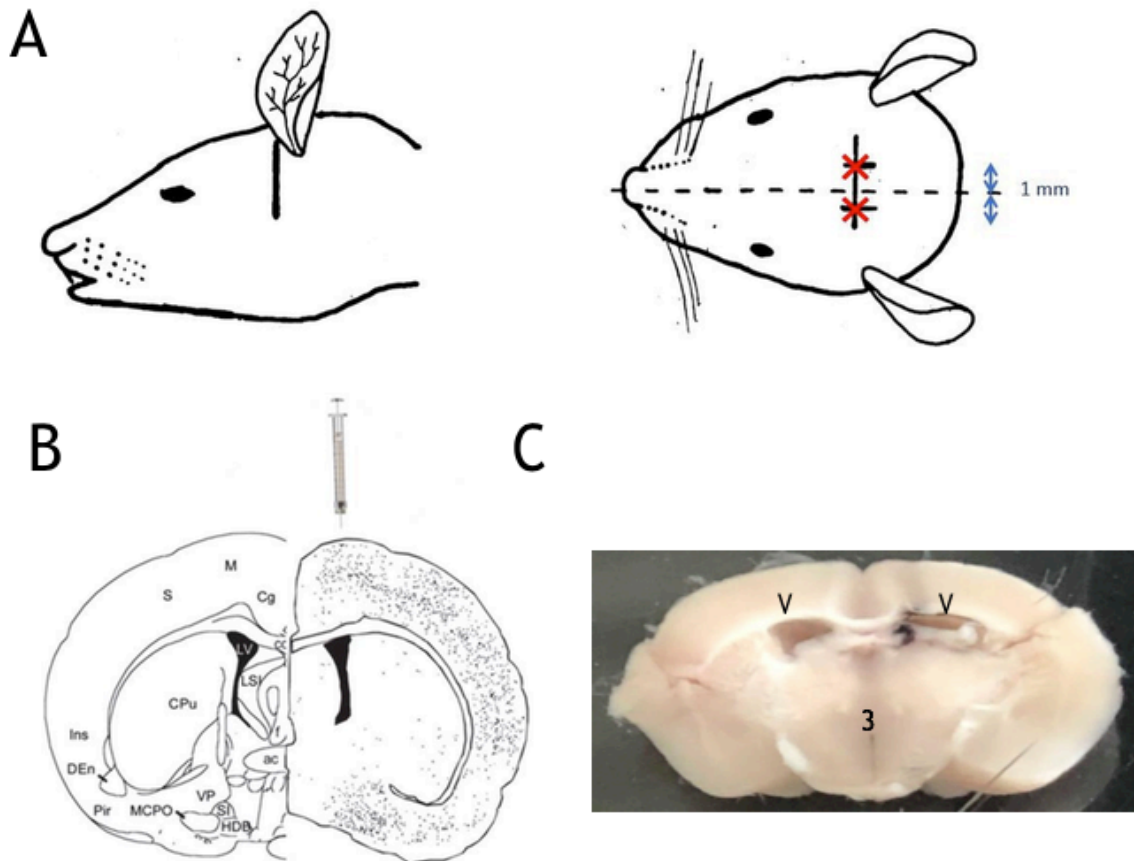


Figure 22 : Topographie des injections intra-cérébro-ventriculaires. (A) Les points d'injection (croix rouges) se situent à 1 mm de part et d'autre de l'axe sagittal céphalique sur la ligne passant en avant des conduits auditifs externes. (B) Coupe frontale de cerveau de souris montrant les ventricules latéraux (LV) dans lesquels est placée la pointe de l'aiguille pour l'injection ICV. (C) Exemple d'une injection ICV avec de l'encre de Chine montrant une coloration dans le LV droit et le troisième ventricule (3V).

Les solutions suivantes ont été injectées :

- Ringer (contrôle) : 2 μ L
- Kp (Calso) diluée dans du Ringer à deux concentrations : 1.3 μ g/2 μ L et 0.13 μ g/2 μ L
- VP (Sigma) diluée dans du Ringer à deux concentrations : 3ng/2 μ L et 100ng/2 μ L
- Antagoniste des récepteurs V1A de la VP (aVP, deamino-Pen¹-O-Me-Tyr²-Arg⁸, Sigma) dilué dans du Ringer à deux concentrations : 50ng/2 μ L et 300ng/2 μ L

Les doses ont été choisies en fonction des données de la littérature pour la Kp (Gottsch et al. 2004)(Thompson et al. 2004), la VP et l'aVP (Miller et al. 2006).

Analyse des données

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8. Le niveau de signification a été fixé à $p \leq 0,05$. Le test de D'Agostino et Pearson a été utilisé pour vérifier la normalité.

La détection d'un pic préovulatoire de LH (estimé par une valeur de LH > 4 ng/ml) chez des souris en proestrus n'est pas systématique, aussi pour chaque groupe expérimental, le pourcentage d'occurrence du pic de LH a été calculé et des comparaisons statistiques entre groupes ont été effectuées avec le test du χ^2 .

Seules les souris où un pic préovulatoire de LH a été détecté le jour du proestrus ont été incluses dans les analyses.

Pour comparer l'effet d'une injection ICV de différents peptides (Kp, VP et aVP) par rapport à celui du contrôle Ringer sur la cinétique du pic préovulatoire endogène de LH, les résultats obtenus pour chaque peptide ont été comparés à ceux du groupe contrôle et la significativité de la différence a été testée avec une analyse de variance (two-way ANOVA) en raison des deux facteurs de variabilité (peptides et ZT). Des tests de Dunnett ont été réalisés de manière appropriée pour déterminer des interactions spécifiques.

c. Résultats préliminaires par Thibault BAHOUGNE

Avant le stage de master réalisé par Mathilda KRETZ, des expériences préliminaires ont été réalisées par Thibault BAHOUGNE pour tester la faisabilité du projet. Les conditions expérimentales sont similaires à celle décrites dans le matériel et méthodes ci-dessus exception faite que les injections ICV ont été réalisées à ZT8 (au lieu de ZT6) et que le groupe contrôle recevait des injections de liquide céphalo-rachidien artificiel (au lieu de Ringer).

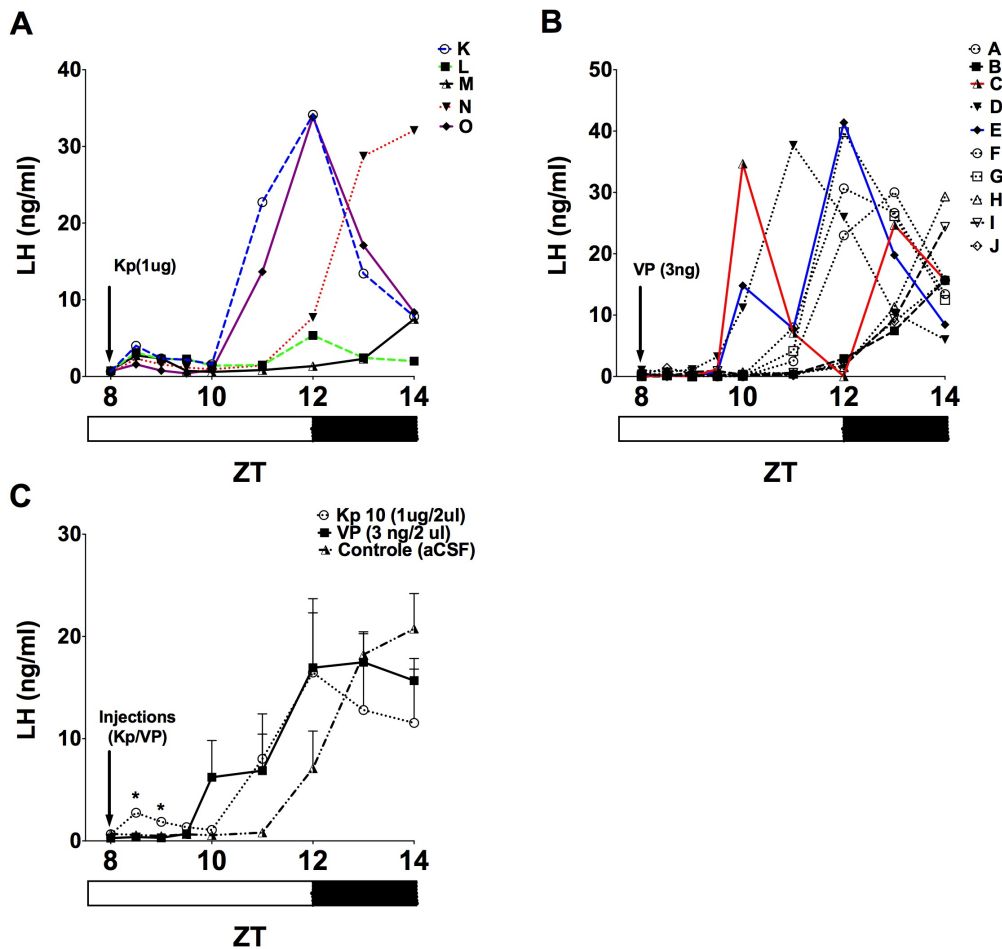


Figure 23 : Sécrétion de LH le jour du proestrus après injection ICV à ZT8, de kisspeptine-10 (Kp), de vasopressine (VP) ou de liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) chez des femelle C57BL/6J. A : sécrétion de LH après injection ICV de Kp à 1 µg/2 µl (profils individuels de 5 souris). B : sécrétion de LH après injection ICV de VP à 3 ng/2 µl (profils individuels de 10 souris). C : sécrétion de LH (moyenne ± SEM) après injection ICV d'aCSF (2 µl, n=3), de Kp (1 µg/2 µl, n=5) et de VP (3 ng/2 µl, n=10) ; dans le groupe Kp, la sécrétion de LH est significativement plus élevée à ZT 8.5 et ZT 9 comparativement à ZT 8 (* p = 0.0008, test ANOVA F (4, 20) = 7.440).

Dans chaque groupe, la sécrétion de LH a été mesurée par ELISA dans 4 µL de sang prélevé toutes les 30 min de ZT8 (avant l'injection ICV) à ZT 10 puis toutes les 60 min jusqu'à ZT 14 (extinction de la lumière à ZT 12). Seules les souris, où un pic pré ovulatoire de LH (estimée par une valeur de LH > 4 ng/ml) a été détecté, sont incluses dans cette analyse. Dans chaque groupe, le pourcentage d'occurrence d'un pic pré-ovulatoire de LH est le suivant (sans différence significative, test Chi²) : Ringer : 3/5 (60 %), Kp 10 : 5/7 (71%), VP : 10/12 (83%). ZT : zeitgeber time avec ZT0 correspondant à l'allumage de la lumière.

Tableau 5 : Analyse individuelle de la sécrétion de LH le jour du proestrus après injection ICV à ZT8, de aCSF, de vasopressine et de kisspeptine chez des femelles C57BL/6J.

	Contrôle (aCSF) (n=3)	Kisspeptine (1 µg/2 µl aCSF) (n= 5)	Vasopressine (3 ng/2 µl aCSF) (n=10)	
		Pic induit par Kp	Pic endogène	
Valeurs	23.6	2.75 ± 0.4	24.4 ± 7.3	36.8 ± 1.5
maximales de LH au pic (ng/ml)	(n=1/3)	(n=5/5)	(n=3/5)	(n=5/10)
ZT du pic de LH	13 (n=1/3)	8.5 (n=5/5)	12.0 ± 0.0 (n=3/5)	11.4 ± 0.3 (n=5/10)
ZT du début du pic de LH	12.6 ± 0.3	8.5	12 ± 0.4	11.4 ± 0.4

Tout d’abord, il semble que l’anesthésie lors de l’injection icv n’a pas d’effet sur l’occurrence du pic préovulatoire de LH chez les souris femelle C57BL/6J âgées de 3 mois. L’injection de Kp entraîne une augmentation de la sécrétion de LH 30 et 60 min après l’injection avec une bonne reproductibilité (100% des ICV de Kp ont induit une augmentation de la sécrétion de LH : Figure 23, tableau 5). Mais l’effet observé est très faible en comparaison des valeurs de LH observées au moment du pic préovulatoire. L’injection de VP tend à avancer le pic préovulatoire de LH, mais une analyse statistique n’a pas pu être faite en comparaison de l’injection d’aCSF où le ZT du pic de LH n’a pu être déterminé que chez une seule souris des trois souris où un pic de LH avait été observé. De plus, les injections ayant été réalisées à ZT8 (soit 4 heures environ avant le pic endogène de LH), nous avons posé comme hypothèse que les injections de VP étaient trop tardives et que l’effet de la VP était potentiellement confondu dans le pic préovulatoire endogène de LH. Ainsi dans les expériences suivantes les injections de peptides ont été réalisées à ZT6 au lieu de ZT8.

d. Résultats du projet de master 2 de Mathilda KRETZ

Effet d’injections ICV de peptides sur la sécrétion de LH

L’objectif est d’observer les effets d’injections ICV de ligands (agoniste et antagoniste) VPergiques sur le pic préovulatoire de LH chez des souris en proestrus.

L'occurrence du pic préovulatoire le jour du proestrus n'est pas systématique chez la femelle C57BL/6J. Même quand le proestrus est bien attesté par un frottis vaginal, le pic de LH est objectivé dans 60-90 % des cas (Czieselsky et al. 2016)(Bahougne et al. 2019). Dans ce travail l'occurrence du pic préovulatoire de LH est compris entre 46 et 83% (sans différence significative, test Chi²) selon les groupes expérimentaux : Ringer (72% sur 22 souris), Kp (75% sur 4 souris), VP (46% sur 15 souris pour 3ng ; 78% sur 9 souris pour 300 ng), antagoniste VP (83% sur 6 souris pour 50 ng ; 60% sur 5 souris à 300 ng et 100% sur 2 souris à 500 ng). Seules les souris où un pic pré ovulatoire de LH a été détecté (estimé par une valeur de LH > 4 ng/ml) sont incluses dans les analyses suivantes.

a) Effets d'injection ICV de Ringer sur le pic endogène de LH : contrôle négatif du protocole d'injection

Des injections de Ringer ont été réalisées afin de vérifier l'absence d'effet négatif du protocole expérimental. Vingt-deux souris en totalité ont reçu une injection ICV de 2 µL de Ringer stérile à ZT6 le jour du proestrus et la LH sanguine a été dosée à différents points horaires entre ZT6 et ZT14. La figure 24 montre que la cinétique de la sécrétion préovulatoire de LH (observée sur 16/24 souris) n'est pas altérée par le protocole d'injection ICV puisque le pic de LH a lieu au moment attendu à ZT12, à l'extinction de la lumière (sans différence comparativement aux données déjà publiées par notre équipe (Bahougne et al. 2019).

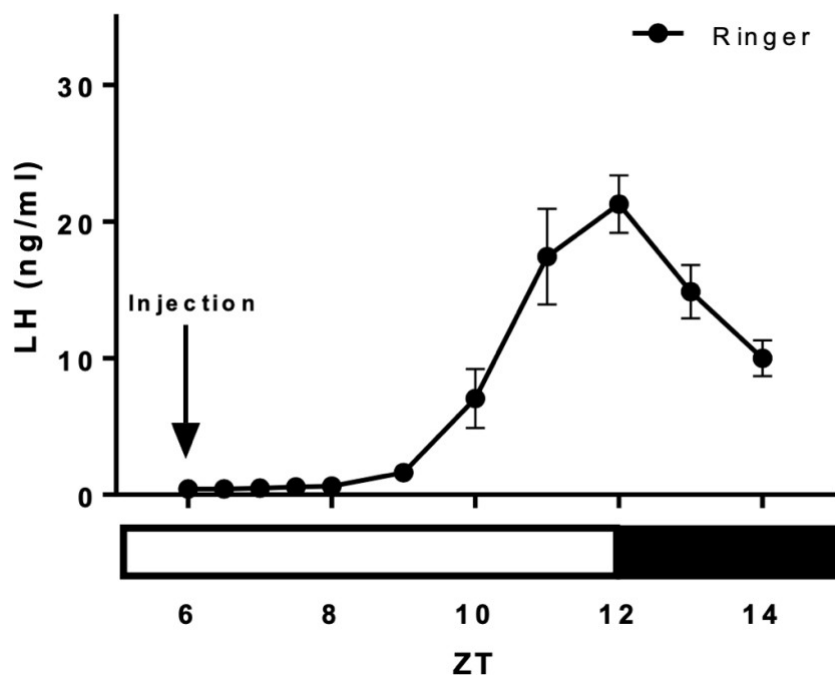


Figure 24 : Profil de sécrétion de LH chez des souris femelles (n=16) après injection intracérébroventriculaire (flèche) de 2 µl de Ringer à ZT6 le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ SEM de 16 souris. ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit ; la barre sous l'axe représente le jour (blanc) et la nuit (noir).

b) Effet d'injection ICV de Kp sur la sécrétion de LH le jour du proestrus : preuve de concept

Des injections de Kp ont été réalisées afin de vérifier la capacité d'un neuropeptide stimulateur à induire la production de LH. La figure 25 montre que l'injection de 1 µg/2 µl de Kp permet une augmentation significative de LH 30 à 90 min après l'injection (Test two-way ANOVA, $p=0,0006$). Le test de Dunnett appliqué met en évidence que la sécrétion de LH suite à l'injection ICV de Kp à 1 µg/2 µl est statistiquement supérieure ($p<0,05$) à ZT 6,5 ; 7 et 7,5 par rapport à ZT6. L'effet semble dose-dépendant car la dose de Kp à 0,1 µg/2 µl n'induit pas d'augmentation significative de LH. Néanmoins, il est important de noter que les concentrations circulantes de LH induites par la Kp (autour de 3 ng/ml maximum) sont très inférieures à celle du pic de LH endogène (autour de 20 ng/ml)

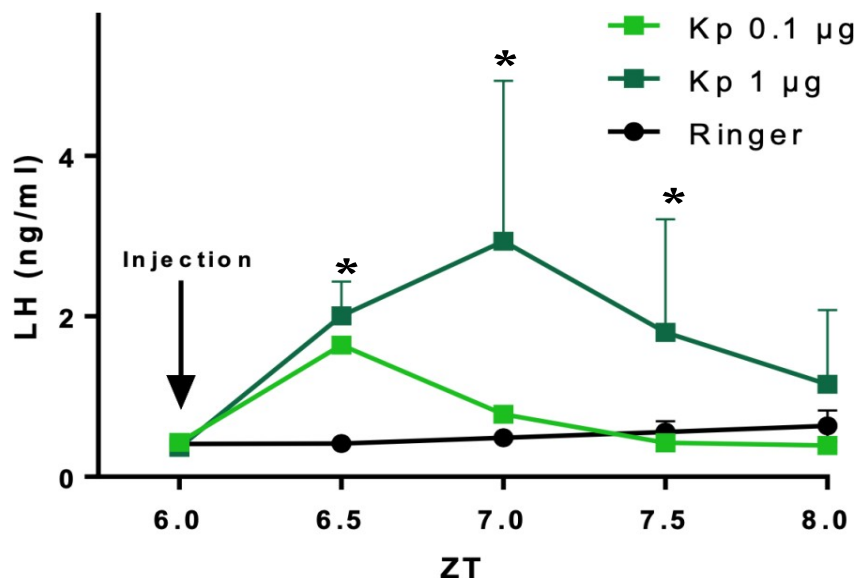


Figure 25 : Profil de sécrétion de LH de ZT6 à ZT8 chez des souris femelles après injection intracérébroventriculaire (flèche) de 2 µl de Ringer (noir), ou de 2 µl de kisspeptine (Kp) aux doses de 1 µg (vert foncé) ou 0,1 µg (vert clair) le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ SEM de 4 souris (Kp 1 µg), 4 souris (Kp 0,1 µg) et 16 souris (Ringer). * indique une différence significative ($p < 0.05$) sur les valeurs de LH à ZT 6,5 ; 7 et 7,5 entre le traitement Kp 1 µg et Ringer (Test two-way ANOVA avec multiple comparaison / test Dunnett). ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit.

c) Injections ICV de ligands VPergiques

L'hypothèse testée est que la VP, messenger journalier issu des NSC induisant l'activation des neurones à Kp le jour du proestrus, joue un rôle sur la cinétique de sécrétion de LH. Pour tester cette hypothèse, l'effet d'injection ICV de VP ou d'un antagoniste VPergiques a été évalué sur la sécrétion de LH.

i. Injection ICV de la VP lors du proestrus

Deux doses de VP, 3 ng/2µL et 100 ng/2µL, ont été injectés le jour proestrus à ZT6. La figure 26 montre que la VP injectée à une dose de 3 ng/2µl décale la courbe vers la gauche, ce qui indique une avance du pic préovulatoire de LH d'environ 1 heure alors que la courbe de la cinétique de LH suite à la dose de 100 ng/2µL est comparable à celle du Ringer.

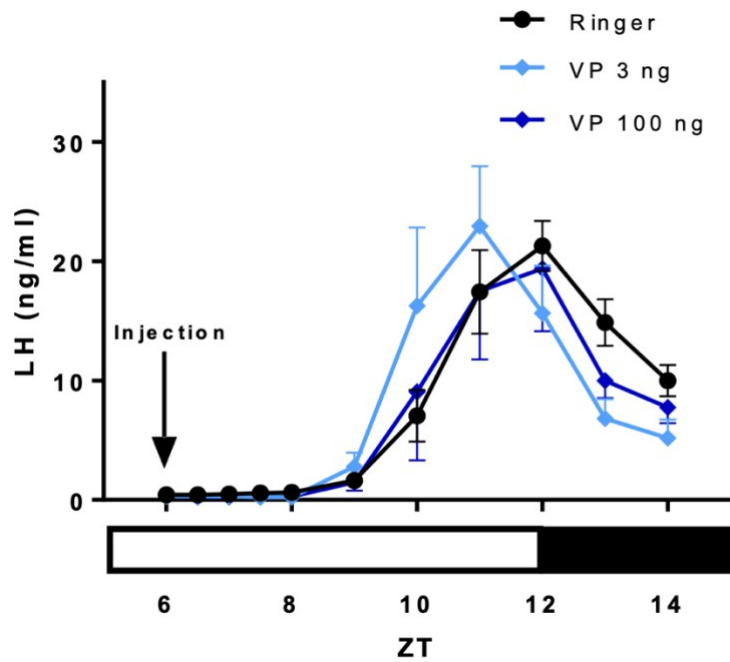


Figure 26 Profil de sécrétion de LH chez des souris femelles après injection intracérébroventriculaire (flèche) de 2 µl de Ringer (noir) ou de vasopressine (VP) aux doses de 3 ng/2µl (bleu clair) ou 100 ng/2µl (bleu foncé) à ZT6 le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ SEM de 7 souris (VP 3 et 100 ng, chacun) et de 16 souris (Ringer). ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit.

ii. Injection ICV de VP lors du diestrus

Lors du diestrus, devant une oestradiolémie faible, il est intéressant de voir si la VP permet de déclencher un pic de LH. La figure 27 montre que l'injection de 3 ng de VP durant la phase de diestrus, n'a aucun effet sur la sécrétion de LH.

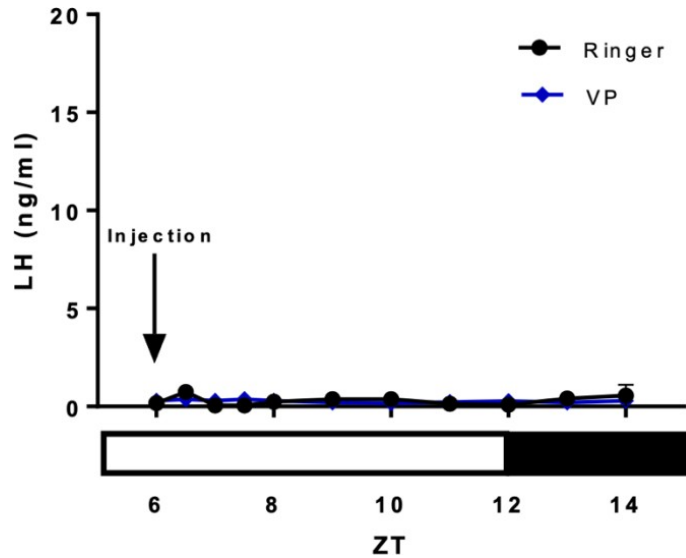


Figure 27 : Profil de sécrétion de LH chez des souris femelles après injection intracérébroventriculaire (flèche) de 2 μ l de Ringer (noir) ou de 3 ng/2 μ l de vasopressine (VP, bleu foncé) à ZT6 le jour du diestrus. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ SEM de 9 souris (VP) et de 2 souris (Ringer). ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit.

iii. Injection ICV d'un antagoniste de la VP

Afin de tester l'hypothèse que le pic préovulatoire de LH est déclenché par l'association entre le signal VPergique journalier et une forte oestradiolémie, l'effet du blocage de la signalisation VPergique sur la sécrétion de LH le jour du proestrus a été analysé. Dans ce but, deux doses d'aVP, 50 ng et 300 ng, ont été injectées à ZT 6. La figure 28 montre que le pic de LH paraît retardé, avec la dose de 300 ng.

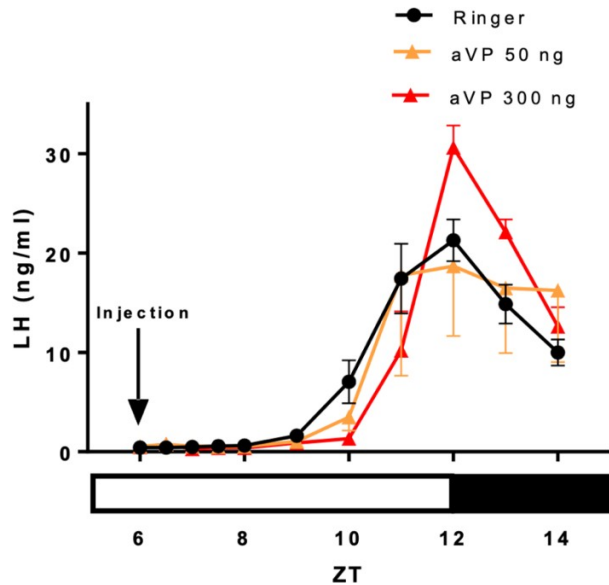


Figure 28 : Profil de sécrétion de LH chez des souris femelles après injection intracérébroventriculaire (flèche) de 2 µl de Ringer (noir) ou d'antagoniste vasopressinergique (aVP) aux doses de 50 ng/2µl (orange) ou 300 ng/2µl (rouge) à ZT6 le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont la moyenne $\pm$ SEM de 5 souris (aVP50 ng), 3 souris (aVP300 ng) et de 16 souris (Ringer). ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit.

iv. Synthèse

Les figures 29 et 30 comparent l'effet d'injections ICV de 3ng VP et 50 ng d'aVP avec le contrôle Ringer. Des femelles C57BL/6J ont reçu une injection ICV de Ringer (en gris), de VP 3 ng (en bleu) et d'aVP 50 ng (en orange) à ZT6 le jour du proestrus. L'analyse statistique (Two-way ANOVA) met en évidence un effet significatif du temps (ZT) ($p < 0,0001$) sur la sécrétion de LH. L'interaction peptide/ZT est à la limite de la significativité ($p = 0,07$), la sécrétion de LH suite à l'injection de VP 3ng est significativement supérieure ($p < 0.05$) à ZT10 et à inférieure à ZT13 en comparaison du Ringer (Test ANOVA avec multiple comparaison / test Dunnett). Ces résultats confortent l'hypothèse que l'injection ICV de 3 ng de VP avance le pic préovulatoire de LH. En revanche, la sécrétion de LH suite à l'injection d'aVP n'est pas significativement différente de celle du Ringer.

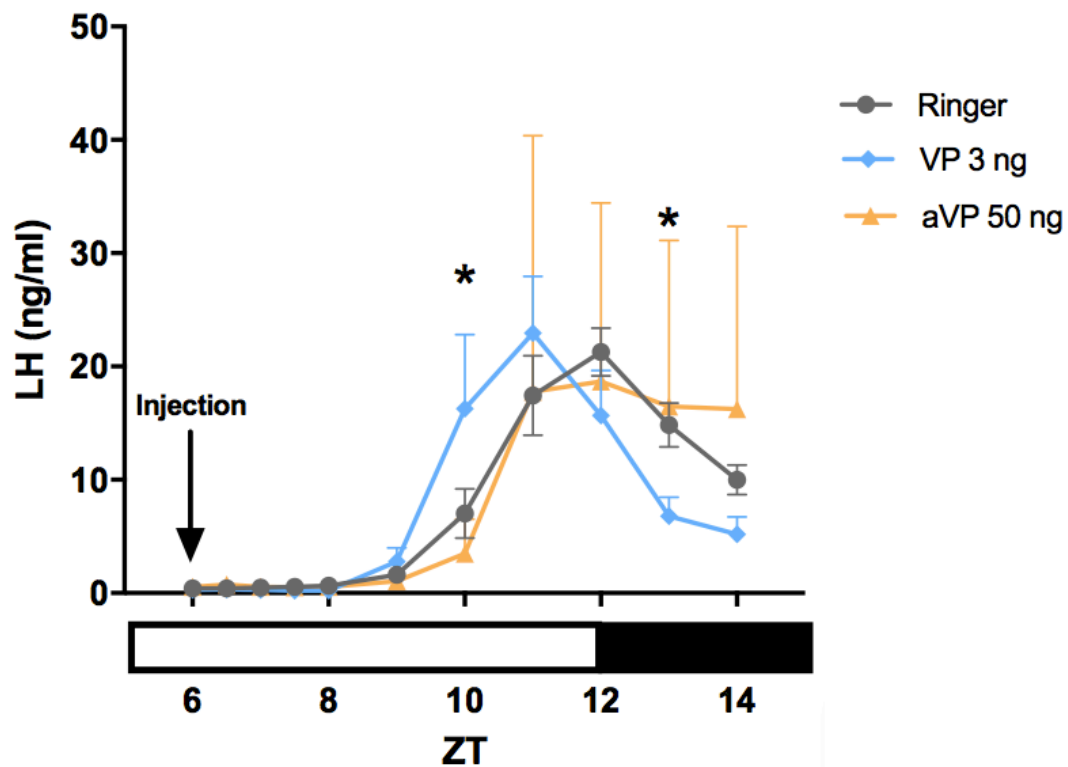


Figure 29 : Effet d'une injection intracérébroventriculaire de vasopressine (VP, 3 ng/2 μ l) et d'antagoniste vasopressinergique (aVP, 50 ng/2 μ l), à ZT6 sur la sécrétion préovulatoire de LH le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont issues des figures 24, 26 et 28 représentent la moyenne de 16 souris (Ringer), 7 souris (VP) et 5 souris (aVP). * indique une différence significative ($p < 0.05$) sur les valeurs de LH à ZT10 et ZT13 entre le traitement VP et Ringer (Test two-way ANOVA avec multiple comparaison / test Dunnett). ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit ; la barre sous l'axe représente le jour (blanc) et la (noir).

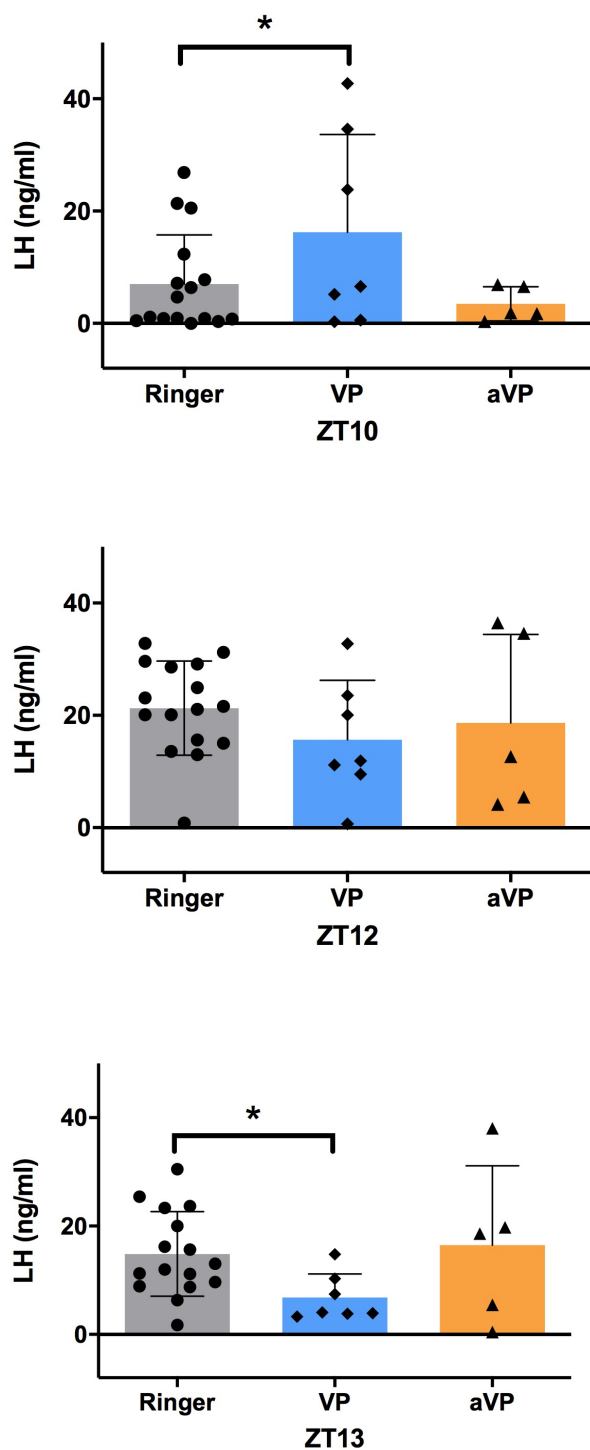


Figure 30 : Moyennes et valeurs individuelles des concentrations de LH à ZT 10, ZT 12 et ZT13 suite à l'injection intracérébroventriculaire de Ringer (barre grise, points noirs), de 3 ng/2 μ l de vasopressine (VP, barre bleue, losanges noirs) ou d'antagoniste vasopressinergique (aVP, barre orange, triangles noirs) à ZT6 le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont issues des figures 24, 26 et 28. * indique une différence significative ($p < 0.05$) sur les valeurs de LH à ZT10 et ZT13 entre le traitement VP et Ringer (Test two-way ANOVA avec multiple comparaison / test Dunnett). ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit.

e. Discussion et Perspectives

Les données de la littérature indiquent que le travail en horaires décalés entraîne une diminution de la fertilité chez les femmes (Simonneaux and Bahougne 2015). Cependant les mécanismes impliqués sont encore méconnus et ne permettent pas de proposer un traitement adapté. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet *in vivo* de la VP, principal neurotransmetteur de l'horloge circadienne agissant sur les neurones à Kp, sur la synchronisation du pic préovulatoire de LH avec le cycle lumière / obscurité chez des souris femelles.

Afin de valider la technique d'injection ICV de peptide sur la sécrétion continue de LH chez des souris femelles en proestrus, l'effet de l'injection de Kp, connu pour activer les neurones à GnRH, a été testé. En effet, la plupart des données expérimentales analysant l'effet d'une injection de Kp par voie IV, SC ou ICV ont, pour la majorité, été réalisées chez des modèles animaux mâles (Tableau 1). A notre connaissance, ce travail est le premier à réaliser des injections ICV de Kp chez des souris femelles post-pubères en proestrus physiologique. Il a pu être observé que l'injection ICV (à ZT 6 ou 8) de Kp entraîne une augmentation de la sécrétion de LH dans l'heure suivant l'injection, mais les valeurs obtenues sont inférieures à celles du pic endogène. Des travaux réalisés chez des rats femelles prépubères ont montré une augmentation de la sécrétion de LH après une injection SC de Kp à des doses 8 fois supérieures à celles utilisées dans notre étude (Matsui et al. 2004). Également chez des rats femelles, des injections ICV continues, à une dose journalière 10 fois supérieure à celles utilisées dans notre étude, n'entraînera qu'une augmentation modeste et transitoire de la sécrétion de LH (Roa et al. 2009). Par ailleurs, des études réalisées chez des brebis avec ou sans OVX + implants d'œstrogène ont montré que l'infusion continue par voie SC ou IV de Kp permet l'obtention d'un « pic physiologique » de LH (Caraty et al. 2007)(Sébert et al. 2010). Ainsi, ces résultats montrant un effet stimulateur de Kp sur la sécrétion de LH sont en accord à ceux décrits par d'autres équipes, essentiellement chez des rongeurs mâles (Matsui et al. 2004)(Shahab et al. 2005)(Thompson et al. 2004). Devant la faible amplitude de la sécrétion de LH induite après des injections de Kp dans notre travail, la question peut donc se poser d'utiliser des doses 8 à 10 fois supérieures dans notre modèle afin d'obtenir un pic de LH plus proche du pic pré ovulatoire de LH endogène. Nos travaux ont montré que l'injection ICV de 3 ng de VP à ZT 6 le jour du proestrus induit une avance d'environ 1h du pic de LH comparativement au groupe

contrôle. L'injection de 50 ng de VP induit une tendance similaire mais non significative, possiblement dû à un nombre trop faible de souris testées, ou à une dose non appropriée de VP. Des travaux précédents ont également analysé l'effet de la VP sur la sécrétion de LH sur des modèles animaux en hypogonadisme central ou périphérique soit chez la rate avec ovariectomie, ou avec des lésions du SCN (Palm et al. 2001), soit chez des souris mutées pour *Clock* (Miller et al. 2006). Ces études ont montré un effet stimulateur de la VP sur la sécrétion de LH mais que dans 30 à 60% des cas. L'injection ICV de 3ng de VP à ZT6 lors du diestrus n'a induit aucun effet sur la sécrétion de LH. Il est possible que l'effet de la VP nécessite un niveau d'oestradiolémie maximale pour entraîner un effet sur la sécrétion de LH. Cette hypothèse est cohérente avec une étude *in vitro* ayant montré que la VP n'est capable d'activer les neurones à Kp que chez les souris en proestrus ou en présence d'un niveau élevé d'estradiol (Piet et al. 2015). L'injection ICV d'un antagoniste VP à ZT6 le jour du proestrus tend à entraîner un retard du pic LH, mais de façon non significative. Cette absence d'effet significatif d'un antagoniste VP est en désaccord avec des travaux précédents ayant rapporté un effet inhibiteur significatif d'un antagoniste VP sur le pic endogène de LH (Funabashi et al. 1999). Cette différence peut être expliquée par le fait que l'équipe de Funabashi a utilisé un antagoniste ciblant les récepteurs V1A et V1B, alors que le nôtre cible uniquement les V1A (exprimés par les neurones à Kp)(Vida et al. 2010) ou par le fait que nous avons injecté l'antagoniste de la VP à une dose supérieure et plus tardivement. Notre effectif est également faible, d'où l'intérêt de reproduire ces manipulations avec un plus grand nombre d'animaux. Une autre équipe a également montré chez des souris femelles mutées pour *Clock* que l'injection combinée d'antagoniste VP et de VP abolit l'effet stimulateur de la VP (Miller et al. 2006).

Ces travaux sont innovants car ils sont les premiers à suivre de façon longitudinale l'effet de différents neuropeptides sur le pic endogène de LH chez souris femelles intactes. Ils confirment l'effet stimulant du Kp sur la sécrétion de LH, bien que l'effet soit mineur, et indiquent que la VP pourrait jouer un rôle dans la synchronisation du pic préovulatoire de LH puisque la VP est capable d'avancer d'une heure le pic de LH. Cet effet synchroniseur de la VP n'a jamais été rapporté et il doit être confirmé en utilisant un nombre plus important d'animaux et en testant des doses et des moments d'injection différents. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier l'effet du VIP, un autre neuropeptide des NSC, sur la cinétique du pic préovulatoire de LH car ce neuropeptide est contenu dans des fibres innervant les neurones à GnRH et les neurones à RFRP-3 (Russo et al. 2015).

VI. Perspectives

Le développement récent de la mesure de la LH sur des micro-prélèvements de sang chez des rongeurs vigiles a été une avancée majeure dans le domaine de la biologie de la reproduction, permettant de suivre la sécrétion de LH toutes les heures (ou moins) de façon répétée chez un même animal (Steyn et al. 2013)(Czieselsky et al. 2016)(Bahougne et al. 2019). Cette technique permet d'étudier la variabilité intra et interindividuelle de la sécrétion préovulatoire de LH chez des rongeurs femelles à différents âges, d'évaluer les effets de différents protocoles de perturbation du système circadien à court ou long terme, d'analyser les mécanismes sous-jacents à ces altérations de la reproduction et de proposer des protocoles de resynchronisation.

Étude longitudinale de la sénescence

Notre travail a montré que l'une des premières altérations de l'axe gonadotrope observée chez la souris C57BL/6J sénescence est la perturbation du pic préovulatoire de LH à compter de 12 mois, alors qu'il n'y a pas encore de perturbation visible de la longueur ou de la régularité du cycle estrien.

Comprendre les mécanismes sous-jacents de la sénescence de l'axe gonadotrope est essentiel car ce dernier affecte la santé des femmes tout au long de leur vie. Ainsi chez les femmes, la ménopause a un impact négatif sur l'inflammation, les cancers gynécologique et les maladies cardiovasculaires (Shi et al. 2016). Par conséquent, des protocoles visant à maintenir / restaurer l'axe gonadotrope (Habermehl et al. 2019) peuvent aider à réduire l'impact négatif de la sénescence de l'axe reproducteur. Afin d'étudier les mécanismes de la sénescence différents axes de recherche pourraient être développés :

- Les effets d'une modification de la photopériode pourraient être analysés. Chez des souris femelles mutées pour les gènes *Cry 1* et *Cry2*, âgées de 8 à 12 mois, une sénescence précoce de l'axe gonadotrope (évalué sur la régularité de l'activité locomotrice) peut être contre balancé par un raccourcissement ou un allongement de la photopériode (Takasu et al. 2015). Une correction des anomalies observées durant la sénescence de l'axe gonadotrope (irrégularité du cycle estrien, décalage du ZT du pic et de l'amplitude du pic de LH) sous tendrait une participation de l'altération de

la rythmicité de l'expression des gènes horloges durant la sénescence de l'axe gonadotrope.

- Au niveau des NSC, le message journalier implique des neurones VPergiques et VIPergiques. Nous avons montré que 1) chez des souris de 3 mois, l'injection ICV de VP entraîne une avance du ZT du pic préovulatoire endogène de LH et que 2) le ZT du pic de LH chez des souris âgées de 12 mois était retardé de 2h. Il serait intéressant d'évaluer si une injection ICV de VP permet de restaurer la synchronisation du pic de LH à ZT12.
- En aval des NSC, l'analyse de l'activité des neurones à Kp de l'AVPV (mesure de l'activité c-FOS) à 6 ou 9 mois versus 12 mois permettrait d'évaluer si le retard de phase du pic de LH est dû à un retard de l'activation des neurones à Kp. Le cas échéant il pourrait être intéressant de réaliser des injections ICV de Kp sur des souris de 12 mois afin d'en évaluer les effets sur le ZT et l'amplitude du pic de LH. Nos résultats seront comparés à une étude similaire réalisée chez des rates OVX avec implant d'œstrogène (Neal-Perry et al. 2009).

Effet de la perturbation circadienne

Notre travail a démontré qu'un déphasage unique entraîne une altération du cycle estrien et diminution de l'occurrence du pic préovulatoire de LH avec toutefois une récupération dès le 3^{ème} cycle estrien, que ce soit lors d'une avance ou d'un retard de phase. En revanche, lorsque le déphasage est répété les capacités d'adaptation diminuent voire sont absentes. En effet, l'occurrence du pic préovulatoire de LH et la fertilité des souris soumises à un déphasage chronique sont très altérées. L'étude de l'activité journalière des neurones à Kp de la région de l'APVP chez des souris désynchronisées permettrait d'évaluer si l'altération du pic de LH est due (au moins en partie) à une désynchronisation de l'activité de ces neurones. Sachant que les neurones à Kp sont activés exactement au moment du pic de LH chez des hamsters syriens femelles, l'étape suivante sera de comparer la cinétique d'activation des neurones à Kp entre des souris en cycle LD stables et des souris en déphasage chronique. Il s'agira de pratiquer un double marquage Kp/c-FOS et de comparer le nombre de neurones à Kp activés (exprimant c-FOS) dans l'AVPV à différents moments de la journée chez des souris soumises à un déphasage chronique ou à un cycle stable. Il est attendu une désynchronisation de l'activation des neurones à Kp coordonnée à celle du pic de LH chez les souris ayant subi un déphasage chronique. Si ce n'est pas le cas, l'analyse pourrait porter sur de l'activité d'autres neurones potentiellement

impliqués dans la synchronisation du pic préovulatoire de LH comme les neurones à GnRH et les neurones à RFRP (Henningsen et al. 2017).

Bien que le chef d'orchestre des rythmes journaliers soit l'horloge centrale située au niveau des NSC, d'autres structures du système reproducteur (neurones à Kp et à GnRH, hypophyse, ovaires, utérus) possèdent aussi une horloge circadienne intrinsèque. Ces horloges propres aux tissus reproductifs sont également nécessaires pour la réussite de l'ovulation, de l'implantation embryonnaire et pour la stéroïdogénèse (Shimizu et al. 2011). Aussi, il serait intéressant de déterminer si le déphasage chronique entraîne aussi une désynchronisation de rythmicité des horloges de ces tissus reproducteurs.

L'étude de la longueur et de la régularité du cycle estrien ainsi que l'occurrence d'un pic préovulatoire de LH ne sont que des marqueurs indirects de fertilité. Quelle que soit l'espèce étudiée, la survenue d'une gestation menée à terme reste le meilleur critère de fertilité. Notre première étude visant à évaluer la fréquence et la taille des portées chez des souris femelles soumises à un déphasage chronique a montré que le nombre de petits est divisé par deux chez les souris en déphasage chronique, sans cependant atteindre une différence significative. De plus, la majorité des gestations menées à terme dans le groupe déphasage chronique étaient 4-5 jours plus tardive dans le groupe contrôle. Ces résultats montrant un succès gestationnel altéré, confirment la perturbation de l'axe gonadotrope observée lors de déphasage chronique. Par contre, nos données suggèrent également que la récupération fonctionnelle de l'axe gonadotrope à un jeune âge est plus rapide entraînant un certain nombre de gestation 7 jours après l'arrêt du déphasage chronique. L'exposition à un male pendant une durée plus courte (4 jours) suite à un déphasage chronique de 4 semaines permettrait d'affiner nos observations d'une fertilité altérée par le déphasage chronique. De plus, nous pourrions étudier la fertilité des souris après différentes périodes de déphasage chronique (4 semaines, 3 mois et 6 mois) et évaluer leur temps de récupération en fonction de la durée du déphasage.

Effet d'injection ICV de neuropeptides sur le pic préovulatoire de LH

Nos résultats montrent que chez des jeunes souris en conditions environnementales stables, les injections ICV de Kp, de VP ou d'aVP ont peu d'effet sur le pic préovulatoire endogène de LH. L'axe HH est fonctionnel et donc probablement moins stimuable. Néanmoins, des études ont rapporté que la Kp ou la VP sont de puissants stimulateurs de l'axe gonadotrope notamment dans un contexte d'hypogonadisme (Messenger et al. 2005)(Palm et al. 1999)(Palm et al. 2001). Dans un contexte d'hypogonadisme lié au déphasage chronique, nous

pourrions effectuer des injections ICV de Kp ou de VP afin d'évaluer leur capacité à resynchroniser le pic préovulatoire de LH.

Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier l'effet d'injection ICV de VIP sur le pic préovulatoire endogène de LH. En effet, le VIP serait inhibiteur des neurones à RFRP-3 et pourrait par ce mécanisme indirect jouer un rôle sur la cinétique du pic préovulatoire de LH (Russo et al. 2015).

Application chez l'humain

Chez l'humain, de nombreuses études font état de complications (cardiologiques/métaboliques (186 études), du sommeil (105 études), carcinologiques (24 études) secondaires au travail posté ou de nuit (Simonneaux and Bahougne 2015 pour revue). En revanche, moins de 20 études font un état des lieux de la relation entre le travail posté et la fertilité féminine. Pour la plupart, il s'agit d'études rétrospectives, comportant un petit nombre de sujets, utilisant des critères d'analyses de fertilité très variables, peu fiables, associés à une très grande variabilité de la pertinence des méthodologies utilisées. En résumé, ces études rapportent une plus grande fréquence de trouble des règles associée à des modifications biologiques de l'axe reproducteur chez les femmes en travail posté. Comme il a été discuté, l'analyse du cycle menstruel ou des analyses biologiques ponctuelle ne sont pas de bon critère d'évaluation de l'occurrence d'une ovulation et donc de fertilité. Étant donné que les femmes en âge de procréer sont de plus en plus nombreuses à travailler en horaires postés incluant la nuit, la question de l'impact négatif d'une telle désynchronisation sur leur fertilité nous semble être un problème majeur de santé publique actuellement non clairement élucidé. En collaboration avec les services d'endocrinologie (Pr JEANDIDIER), de médecine du travail (Pr GONZALEZ), et de médecine légale (Pr RAUL) du CHRU/CHU de Strasbourg, Reims et Nancy et avec le laboratoire CEED à Strasbourg (Dr SIGRIST) nous avons proposé un Protocole de Recherche Clinique (Programme hospitalier de recherche clinique – PHRC) sur la question de la fertilité chez les femmes travaillant en horaire posté de nuit. L'objectif de ce projet était d'analyser de façon prospective la fertilité de la femme travaillant en horaires postés ou non, sur des paramètres cliniques, biologiques et génétiques. La lettre d'intention de demande de financement a été sélectionnée en juillet 2016, mais malheureusement le projet final n'a pas été retenu. Une nouvelle demande (résumée ci-dessous) maintenant renforcée par les résultats fondamentaux de ma thèse de science, sera déposée dans les années à venir.

- **Objectif du projet** : rechercher l'existence d'un impact négatif du travail posté/ de nuit sur l'axe reproducteur féminin. L'occurrence du pic de LH pré ovulatoire sera utilisée comme critère indirect de survenue d'une ovulation.
- **Objectifs secondaires** :
 - Déterminer les mécanismes du trouble de la fertilité associé au travail posté/ de nuit en :
 - Évaluant les caractéristiques du cycle menstruel (corrélation cycle menstruel / occurrence du pic de LH)
 - Étudiant l'expression des gènes horloges
 - Mesurant les sécrétions hormonales mensuelles
 - Établir un état des lieux des conséquences biologiques imputables au travail posté/ de nuit en :
 - Mesurant le stress oxydant
 - Évaluant l'impact métabolique (HbA1c...)
- **Critère d'évaluation principal**
 - L'utilisation de bandelettes urinaires de LH, avec un seuil de sensibilité à 10mUI/mL, réalisées entre J5 et J25 du cycle (J1 = 1er jour des menstruations) permettront de déterminer l'occurrence du pic préovulatoire de LH
 - Hypothèses :
 - Allongement de la phase folliculaire (pic de LH >10 mUI/ml retardé)
 - Anovulation (pas de survenue du pic de LH)
- **Critères d'évaluation secondaire**
 - Évaluer les mécanismes de perturbation de l'axe reproducteur féminin associée au travail posté/de nuit :
 - La régularité des cycles menstruels sera observée sur 6 cycles consécutifs. Un cycle menstruel sera considéré comme régulier si durant 6 cycles menstruels consécutifs les variations de sa durée, mesurée entre le cycle le plus court et le cycle le plus long, restent strictement inférieures à 7 jours.
 - Mesure de la progestérone sanguine et au niveau des cheveux/capillaire
 - Mesure de l'expression de gènes horloges *Per2* et *Bmal1* par Q-PCR dans des prélèvements de la muqueuse buccale effectués à plusieurs moments d'un cycle journalier.
 - Mesure du cortisol mensuel au niveau des cheveux/capillaire

- Établir un état des lieux des conséquences imputables au travail posté :
 - Mesure du stress oxydant
 - Évaluation métabolique (exploration des anomalies lipidique, glycémie, insulínémie, HbA1C)
- **Plan expérimental**
 - Étude multicentrique prospective
 - Comparative de 2 groupes :
 - Groupe 1 : travail de jour, aucun travail de nuit, travail entre 6 et 21h
 - Groupe 2 : travail posté AVEC nuit, au minimum 3 heures, dans la période de nuit (entre 21 et 6h), à raison d'au minimum 5 nuits par mois.
 - Ouverte, non randomisée
- **Critères d'éligibilité**
 - Critères d'inclusions :
 - Femme sans contraception hormonale (ou stérilet cuivre NON hormonal) ou ayant arrêté une contraception depuis plus de 6 mois (et ne souhaitant pas en reprendre durant 6 cycles)
 - Âgée de 18 à 40 ans
 - Horaires postés ou non (avec un poste stable depuis au moins 12 mois et sans interruption supérieure à 5 semaines depuis 12 mois)
 - Longueur des cheveux racine-pointe supérieure à 3 cm
 - Critères de non-inclusion et d'exclusion durant la période de l'étude :
 - Trouble de la fertilité connue
 - Endocrinopathies ou pathologies gynécologiques non traitées pouvant influencer sur les cycles menstruels
 - Antécédent de cancer dans les 5 dernières années
 - Antécédent de pathologie psychiatrique sévère
 - Prise de traitement hormonal
 - Grossesse ou allaitement depuis moins de 3 mois
 - Sujet en période d'exclusion d'une étude précédente
 - Sujet sous sauvegarde de justice, curatelle ou tutelle

- **Déroulement pratique de l'essai**

- **J0 : visite d'inclusion, recherche de critères d'exclusion**

- Information et signature du consentement
- Questionnaire initial (recueil d'informations médicales, information sur le poste de travail...)
- Prélèvement sanguin (ordonnance n°1) lors de la visite :
 - TSH, FT4
 - PRL
 - Béta HCG
 - AMH
 - Mesure du taux de stress oxydant : mesure d'enzymes anti-oxydantes ou pro-oxydantes dans le sang total
 - HbA1C
- Remise d'une ordonnance pour réalisation du bilan sanguin en première partie de cycle, à jeun (ordonnance n° 2)
 - LH/FSH/Estradiol
 - Testostérone totale
 - Insulinémie et glycémie veineuse à jeun
 - EAL (bilan lipidique)

- **J0 + moins d'1 mois : validation de l'inclusion**

- En l'absence de critères d'exclusion
- Examen clinique
- Réalisation de bilans sanguins (ordonnance n° 3)
 - Progestérone sanguine entre le 21 et 24^{ème} jour du cycle ou 7 jours avant les menstruations attendues (le 1^{er} jour du cycle étant la date d'apparition des règles). Le prélèvement sanguin réalisé deux fois, au cours d'un des 3 premiers cycles et au cours d'un des 3 derniers cycles menstruels (entre J0 + moins d'1 mois et J0 + 3 cycles puis entre J0 + 3 cycles et J0 + 6 cycles).
 - Si les cycles sont irréguliers, le dosage de progestérone sera réalisé une fois par semaine après les 15 premiers jours du cycle (donc maximum 3 dosages).

Il ne sera conservé que la mesure de progestérone réalisée durant la semaine précédant la survenue des règles.

- Si cycle inférieur à 21 jours, le dosage de progestérone sera réalisé après les 10 premiers jours du cycle.
- Remise des calendriers menstruels et des bandelettes urinaires (à LH) pour 6 cycles
- J0 + 3 cycles (pas de visite) :
 - Réception du calendrier n°1 et des tests urinaires de LH
 - Réalisation de bilans sanguins (ordonnance n° 3)
 - Réalisation des frottis buccaux (sous-groupe de 40 femmes)
- J0 + 6 cycles (visite de fin d'étude) :
 - Réception du calendrier n°2 et des tests urinaires de LH
 - Prélèvement de cheveux (6 cm) (mesure de la progestérone et du cortisol par cm de cheveux, sachant que la pousse moyenne est de 1 cm par mois)

La question des facteurs confondants

La disruption circadienne, notamment le travail posté / de nuit, a des effets négatifs sur le métabolisme et le stress. Or ses fonctions sont connues pour agir sur l'axe reproducteur. Aussi, il est important de considérer qu'une exposition chronique à des décalages de phase pourrait agir sur l'activité de reproduction via des altérations métaboliques ou du stress.

Effet métabolique dans les modèles animaux

De très nombreuses études ont démontré un sur-risque de développer un surpoids ou une obésité chez l'humain en cas de travail posté / de nuit (Rosa et al. 1990)(Rosmond, Lapidus, and Björntorp 1996). Les fonctions métaboliques et reproductrices sont étroitement liées et il existe des interactions fortes entre ces deux systèmes qui sont indispensables à la survie des espèces. De nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'interactions entre l'axe reproducteur et l'activité métabolique à plusieurs niveaux (organe, hormone, cellule, gène). L'exemple des souris ob/ob, déficientes en leptine, qui ont non seulement un phénotype obèse mais aussi infertile illustre bien cette étroite interaction. En effet, l'administration de leptine

chez ses souris ob/ob, permet d'induire une puberté et de rétablir la fonctionnalité de l'axe reproducteur (Mounzih, Lu, and Chehab 1997). Par ailleurs, le niveau d'expression d'ARNm KISS1 chez les souris ob/ob déficient en leptine est faible, et l'ARNm KISS1 augmente après traitement par leptine (Smith et al. 2006). Puisque la présence de récepteurs à la leptine dans les neurones à Kp (Smith et al. 2006)(Louis et al. 2011) est controversée et qu'ils sont absents dans les neurones à GnRH des intermédiaires ont été recherchés. Ces intermédiaires pourraient être les neurones à neuropeptides Y et à pro-opiomélanocortine (POMC) des noyaux ventraux prémamillaire (VPM). En effet, les neurones à neuropeptide Y projettent sur les neurones à Kp, ils permettraient de faire la relation entre les axes gonadotrope et métabolique. Cependant, une puberté et une fertilité normale sont observées chez des souris avec délétion des récepteurs de leptine au niveau des neurones à Kp hypothalamique (Donato et al. 2011).

Dans ce contexte, nous avons suivi le poids dans nos deux groupes de souris Contrôle (n=9) et déphasage chronique (n=9). Avant et après la période de manipulation les poids des souris de ces deux groupes sont comparables, cependant le poids des souris en déphasage chronique, semble avoir augmenté plus rapidement que celui des souris contrôle (Figure 31) Ces résultats sont préliminaires et aucune analyse statistique n'a été réalisé car les conditions expérimentales de ces 2 groupes n'étaient pas comparable (les manipulations et les prélèvements sanguins ayant été plus nombreux dans le groupe de souris en déphasage chroniques).

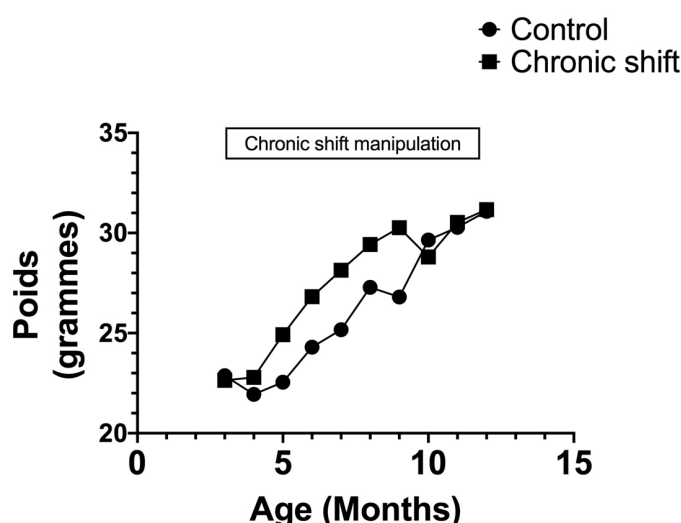


Figure 31 : Évolution du poids dans un groupe contrôle de souris (n=9) soumises à un cycle LD 12/12 stable et un groupe de souris soumises à un déphasage chronique (avance de phase de 10h durant 3 jours, puis retard de phase de 10h durant 4 jours, n=9).

Stress

Le cortisol est une hormone très représentative de la rythmicité circadienne chez l'humain car elle présente un pic très marqué en fin de période de repos / début de période d'activité. L'existence d'un impact du travail posté/de nuit sur le cortisol (chez l'humain) ou la corticostérone (chez les rongeurs) est bien documenté (Goichot et al. 1998)(Weibel and Brandenberger 2002)(Oster 2010)(Gumenyuk et al. 2014)(Ulhôa et al. 2015). Par exemple, chez l'humain, 2 jours consécutifs de changement du cycle lumière/obscurité sont suffisants pour affecter la sécrétion journalière du cortisol circulant (Goichot et al. 1998) et chez des hommes en travail posté chronique (depuis 7 ans) le taux moyen mensuel de cortisol au niveau de cheveux est augmenté de 2 fois comparativement à des travailleurs de jour, cette augmentation étant d'autant importante que les sujets étaient jeunes (Manenschijn et al. 2011). De nombreuses études chez l'humain et chez le rongeur ont montré l'augmentation du taux moyen du cortisol pourrait être un des mécanismes centraux impliqués dans le blocage de l'axe gonadotrope en cas de déphasage chronique via l'inhibition des neurones à Kp de l'AVPV rapporté chez le rongeur femelle (Takumi et al. 2012)(Luo et al. 2015)(Whirledge and Cidlowski 2013)(Figure 32).

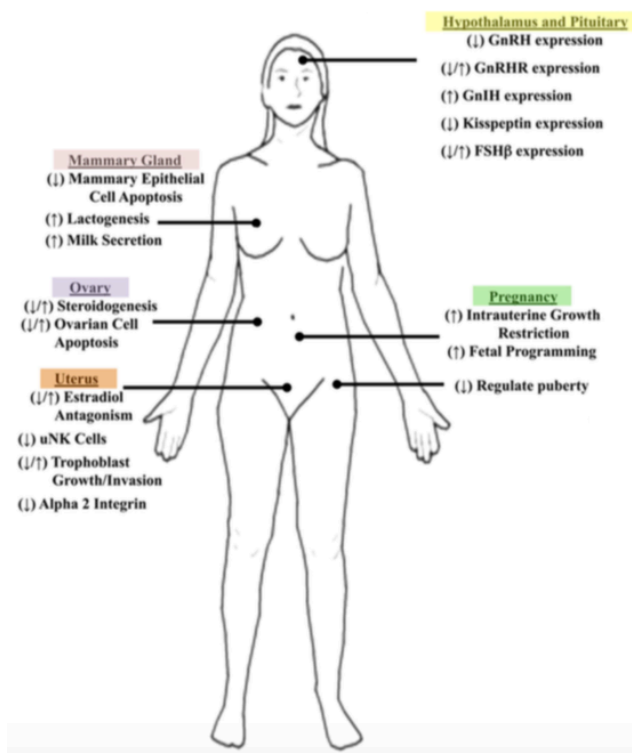


Figure 32 : Le rôle des glucocorticoïdes dans les tissus de l'appareil reproducteur chez l'humain. Le schéma représente plusieurs rôles mis en évidence par les glucocorticoïdes (exposition exogène ou induite par le stress) dans les principaux organes de l'appareil reproducteur. Les glucocorticoïdes induisent des effets à la fois répressifs (flèches vers le bas) et améliorants (flèches vers le haut). D'après (Whirledge and Cidlowski 2013).

Un protocole expérimental pourrait consister à analyser la production de corticostérone dans notre modèle de souris femelle en déphasage chronique. L'analyse de la sécrétion de corticostérone sanguine à l'interface fin de la période d'activité / début de la période de repos associée une mesure de la corticostérone moyenne au niveau du pelage permettrait d'évaluer l'existence de changement de la corticostérone avec l'exposition au décalage chronique comme cela a été montré chez l'humain. Le cas échéant, il serait intéressant de corréler les modifications de la sécrétion du cortisol dans un contexte de déphasage chronique à l'activité des neurones à Kp de l'APVP (via la mesure de cFOS).

VII. Conclusion générale

En conclusion, mes travaux montrent qu'une avance ou un retard de phase unique perturbe peu le cycle reproducteur des souris femelles jeunes tandis qu'un décalage chronique altère fortement à la fois la régularité des cycles estriens, la sécrétion préovulatoire de LH et la fertilité. Ces données fondamentales démontrent un impact négatif de la perturbation chronique des cycles journaliers sur l'axe reproducteur des souris femelles. Les mécanismes impliqués restent encore à déterminer, et sont multifactoriels : (1) altération des horloges centrales et/ou périphériques ; (2) altération de la neurotransmission centrale ; (3) altération de l'activité des neurones à Kp (4) ; effets indirects des anomalies métaboliques ou du stress induits par le décalage chronique.

Une extrapolation de nos données fondamentales chez la femme, notamment dans un contexte de travail posté, est à l'heure actuelle prématurée. Cependant, au vu de nos résultats, une étude prospective chez la femme est indispensable.

Bibliographies :

- Abbara, Ali, Channa N Jayasena, Georgios Christopoulos, Shakunthala Narayanaswamy, Chioma Izzi-Engbeaya, Gurjinder M K Nijher, Alexander N Comminos, et al. 2015. "Efficacy of Kisspeptin-54 to Trigger Oocyte Maturation in Women at High Risk of Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) During In Vitro Fertilization (IVF) Therapy." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (9): 3322–31. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2332>.
- Abe, Keen, and Terasawa. 2008. "Rapid Action of Estrogens on Intracellular Calcium Oscillations in Primate Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-1 Neurons." *Endocrinology* 149 (3): 1155–62. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0942>.
- Abe, Michikazu, Erik D Herzog, Shin Yamazaki, Marty Straume, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki, Michael Menaker, and Gene D Block. 2002. "Circadian Rhythms in Isolated Brain Regions." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (1): 350–56.
- Abe, and Terasawa. 2005. "Firing Pattern and Rapid Modulation of Activity by Estrogen in Primate Luteinizing Hormone Releasing Hormone-1 Neurons." *Endocrinology* 146 (10): 4312–20. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0435>.
- Abrahám, István M, Seong-Kyu Han, Martin G Todman, Kenneth S Korach, and Allan E Herbison. 2003. "Estrogen Receptor Beta Mediates Rapid Estrogen Actions on Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Vivo." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (13): 5771–77.
- Adachi, Sachika, Shunji Yamada, Yoshihiro Takatsu, Hisanori Matsui, Mika Kinoshita, Kenji Takase, Hitomi Sugiura, et al. 2007. "Involvement of Anteroventral Periventricular Metastin/Kisspeptin Neurons in Estrogen Positive Feedback Action on Luteinizing Hormone Release in Female Rats." *The Journal of Reproduction and Development* 53 (2): 367–78.
- Adams, J M, A E Taylor, D A Schoenfeld, W F Crowley, and J E Hall. 1994. "The Midcycle Gonadotropin Surge in Normal Women Occurs in the Face of an Unchanging Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Frequency." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79 (3): 858–64. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.3.7521353>.
- Ahlborg, G, G Axelsson, and L Bodin. 1996. "Shift Work, Nitrous Oxide Exposure and

- Subfertility among Swedish Midwives.” *International Journal of Epidemiology* 25 (4): 783–90.
- Alleva, J J, M V Waleski, F R Alleva, and E J Umberger. 1968. “Synchronizing Effect of Photoperiodicity on Ovulation in Hamsters.” *Endocrinology* 82 (6): 1227–35. <https://doi.org/10.1210/endo-82-6-1227>.
- Alvarez-García, Virginia, Alicia González, Carlos Martínez-Campa, Carolina Alonso-González, and Samuel Cos. 2013. “Melatonin Modulates Aromatase Activity and Expression in Endothelial Cells.” *Oncology Reports* 29 (5): 2058–64. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2314>.
- Ancel, Caroline, Agnete H Bentsen, Marie-Emilie Sébert, Manuel Tena-Sempere, Jens D Mikkelsen, and Valérie Simonneaux. 2012. “Stimulatory Effect of RFRP-3 on the Gonadotrophic Axis in the Male Syrian Hamster: The Exception Proves the Rule.” *Endocrinology* 153 (3): 1352–63. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1622>.
- Ancel, Caroline, Megan A Inglis, and Greg M Anderson. 2017. “Central RFRP-3 Stimulates LH Secretion in Male Mice and Has Cycle Stage–Dependent Inhibitory Effects in Females.” *Endocrinology* 158 (9): 2873–83. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1902>.
- Angelopoulou, Eleni, Clarisse Quignon, Lance J. Kriegsfeld, and Valérie Simonneaux. 2019. “Functional Implications of RFRP-3 in the Central Control of Daily and Seasonal Rhythms in Reproduction.” *Frontiers in Endocrinology* 10 (April): 183. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00183>.
- Ansel, L, M Bolborea, A H Bentsen, P Klosen, J D Mikkelsen, and V Simonneaux. 2010. “Differential Regulation of Kiss1 Expression by Melatonin and Gonadal Hormones in Male and Female Syrian Hamsters.” *Journal of Biological Rhythms* 25 (2): 81–91. <https://doi.org/10.1177/0748730410361918>.
- Armstrong, R Anne, Rebecca M Reynolds, Rosemary Leask, Catherine H Shearing, Andrew A Calder, and Simon C Riley. 2009. “Decreased Serum Levels of Kisspeptin in Early Pregnancy Are Associated with Intra-Uterine Growth Restriction and Pre-Eclampsia.” *Prenatal Diagnosis* 29 (10): 982–85. <https://doi.org/10.1002/pd.2328>.
- Arreguin-Arevalo, J Alejandro, Clay A Lents, Todd A Farmerie, Terry M Nett, and Colin M Clay. 2007. “KiSS-1 Peptide Induces Release of LH by a Direct Effect on the Hypothalamus of Ovariectomized Ewes.” *Animal Reproduction Science* 101 (3–4): 265–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.021>.

- Attarchi, Mirsaeed, Hamidreza Darkhi, Mahshad Khodarahmian, Mandana Dolati, Maryam Kashanian, Mostafa Ghaffari, Elham Mirzamohammadi, and Saber Mohammadi. 2013. "Characteristics of Menstrual Cycle in Shift Workers." *Global Journal of Health Science* 5 (3): 163–72. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v5n3p163>.
- Austin, C R. 1956. "Ovulation, Fertilization, and Early Cleavage in the Hamster (*Mesocricetus Auratus*)." *Journal. Royal Microscopical Society (Great Britain)* 75 (3): 141–54.
- Axelsson, G, G Ahlborg, and L Bodin. 1996. "Shift Work, Nitrous Oxide Exposure, and Spontaneous Abortion among Swedish Midwives." *Occupational and Environmental Medicine* 53 (6): 374–78.
- Bahougne, Thibault, Eleni Angelopoulou, Nathalie Jeandidier, and Valérie Simonneaux. 2019. "Individual Evaluation of Luteinizing Hormone in Aged C57BL/6 J Female Mice." *GeroScience*, October. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00104-z>.
- Bailey, Matthew, and Rae Silver. 2014. "Sex Differences in Circadian Timing Systems: Implications for Disease." *Frontiers in Neuroendocrinology* 35 (1): 111–39. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.11.003>.
- Beaulé, Christian, Jennifer W. Mitchell, Peder T. Lindberg, Ruslan Damadzic, Lee E. Eiden, and Martha U. Gillette. 2009. "Temporally Restricted Role of Retinal PACAP: Integration of the Phase-Advancing Light Signal to the SCN." *Journal of Biological Rhythms* 24 (2): 126–34. <https://doi.org/10.1177/0748730409332037>.
- Beek, E M van der, H J Swarts, and V M Wiegant. 1999. "Central Administration of Antiserum to Vasoactive Intestinal Peptide Delays and Reduces Luteinizing Hormone and Prolactin Surges in Ovariectomized, Estrogen-Treated Rats." *Neuroendocrinology* 69 (4): 227–37. <https://doi.org/54423>.
- Beek, E M van der, V M Wiegant, H A van der Donk, R van den Hurk, and R M Buijs. 1993. "Lesions of the Suprachiasmatic Nucleus Indicate the Presence of a Direct Vasoactive Intestinal Polypeptide-Containing Projection to Gonadotrophin-Releasing Hormone Neurons in the Female Rat." *Journal of Neuroendocrinology* 5 (2): 137–44.
- Berson, David M, Felice A Dunn, and Motoharu Takao. 2002. "Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock." *Science (New York, N.Y.)* 295 (5557): 1070–73. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>.
- Bøggild, H, and A Knutsson. 1999. "Shift Work, Risk Factors and Cardiovascular Disease."

- Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 25 (2): 85–99.
- Boivin, Diane B, Geneviève M Tremblay, and Francine O James. 2007. “Working on Atypical Schedules.” *Sleep Medicine* 8 (6): 578–89. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.03.015>.
- Bonde, Jens Peter, Johnni Hansen, Henrik Albert Kolstad, Sigurd Mikkelsen, Jørgen H Olsen, David E Blask, Mikko Härmä, et al. 2012. “Work at Night and Breast Cancer--Report on Evidence-Based Options for Preventive Actions.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 38 (4): 380–90. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3282>.
- Bonde, Jens Peter, Kristian Tore Jørgensen, Matteo Bonzini, and Keith T Palmer. 2013. “Miscarriage and Occupational Activity: A Systematic Review and Meta-Analysis Regarding Shift Work, Working Hours, Lifting, Standing, and Physical Workload.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 39 (4): 325–34. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3337>.
- Bosch, Martha A, Karen J Tonsfeldt, and Oline K Rønnekleiv. 2013. “MRNA Expression of Ion Channels in GnRH Neurons: Subtype-Specific Regulation by 17 β -Estradiol.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 367 (1–2): 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.021>.
- Bouligand, Jérôme, Cristina Ghervan, Javier A Tello, Sylvie Brailly-Tabard, Sylvie Salenave, Philippe Chanson, Marc Lombès, Robert P Millar, Anne Guiochon-Mantel, and Jacques Young. 2009. “Isolated Familial Hypogonadotropic Hypogonadism and a GNRH1 Mutation.” *The New England Journal of Medicine* 360 (26): 2742–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900136>.
- Bracci, Massimo, Nicola Manzella, Alfredo Copertaro, Sara Staffolani, Elisabetta Strafella, Mariella Barbaresi, Benedetta Copertaro, Venerando Rapisarda, Matteo Valentino, and Lory Santarelli. 2014. “Rotating-Shift Nurses after a Day off: Peripheral Clock Gene Expression, Urinary Melatonin, and Serum 17- β -Estradiol Levels.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 40 (3): 295–304. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3414>.
- Breuer, Oded, Maha Abdulhadi-Atwan, Sharon Zeligson, Hila Fridman, Paul Renbaum, Ephrat Levy-Lahad, and David H Zangen. 2012. “A Novel Severe N-Terminal Splice Site KISS1R Gene Mutation Causes Hypogonadotropic Hypogonadism but Enables a Normal Development of Neonatal External Genitalia.” *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 167 (2): 209–16. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0127>.

- Brioude, Frédéric, Jérôme Bouligand, Bruno Francou, Jérôme Fagart, Ronan Roussel, Say Viengchareun, Laurent Combettes, et al. 2013. "Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in KISS1R (KISS1 Receptor): Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation." Edited by Andreas R. Janecke. *PLoS ONE* 8 (1): e53896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053896>.
- Bronson, F H, and F S Vom Saal. 1979. "Control of the Preovulatory Release of Luteinizing Hormone by Steroids in the Mouse." *Endocrinology* 104 (5): 1247–55. <https://doi.org/10.1210/endo-104-5-1247>.
- Brown-Grant, K, and G Raisman. 1977. "Abnormalities in Reproductive Function Associated with the Destruction of the Suprachiasmatic Nuclei in Female Rats." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 198 (1132): 279–96. <https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0098>.
- Brown, James B. 2011. "Types of Ovarian Activity in Women and Their Significance: The Continuum (a Reinterpretation of Early Findings)." *Human Reproduction Update* 17 (2): 141–58. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq040>.
- Cahill, D J, P G Wardle, C R Harlow, and M G Hull. 1998. "Onset of the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge: Diurnal Timing and Critical Follicular Prerequisites." *Fertility and Sterility* 70 (1): 56–59.
- Calder, Michele, Yee-Ming Chan, Renju Raj, Macarena Pampillo, Adrienne Elbert, Michelle Noonan, Carolina Gillio-Meina, et al. 2014. "Implantation Failure in Female Kiss1^{-/-} Mice Is Independent of Their Hypogonadic State and Can Be Partially Rescued by Leukemia Inhibitory Factor." *Endocrinology* 155 (8): 3065–78. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1916>.
- Caraty, A, J T Smith, D Lomet, S Ben Saïd, A Morrissey, J Cognie, B Doughton, G Baril, C Briant, and I J Clarke. 2007. "Kisspeptin Synchronizes Preovulatory Surges in Cyclical Ewes and Causes Ovulation in Seasonally Acyclic Ewes." *Endocrinology* 148 (11): 5258–67. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0554>.
- Carreón, Tania, Misty J Hein, Kevin W Hanley, Susan M Viet, and Avima M Ruder. 2014. "Coronary Artery Disease and Cancer Mortality in a Cohort of Workers Exposed to Vinyl Chloride, Carbon Disulfide, Rotating Shift Work, and o-Toluidine at a Chemical Manufacturing Plant." *American Journal of Industrial Medicine* 57 (4): 398–411.

<https://doi.org/10.1002/ajim.22299>.

- Cartwright, Judith E, and Paula Juliet Williams. 2012. "Altered Placental Expression of Kisspeptin and Its Receptor in Pre-Eclampsia." *The Journal of Endocrinology* 214 (1): 79–85. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0091>.
- Castanon-Cervantes, Oscar, Mingwei Wu, J Christopher Ehlen, Ketema Paul, Karen L Gamble, Russell L Johnson, Rachel C Besing, Michael Menaker, Andrew T Gewirtz, and Alec J Davidson. 2010. "Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (10): 5796–5805. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001026>.
- Cázarez-Márquez, Fernando, Sebastien Milesi, Marie-Pierre Laran-Chich, Paul Klosen, Andries Kalsbeek, and Valérie Simonneaux. 2019. "Kisspeptin and RFRP3 Modulate Body Mass in *Phodopus Sungorus* via Two Different Neuroendocrine Pathways." *Journal of Neuroendocrinology* 31 (4): e12710. <https://doi.org/10.1111/jne.12710>.
- Cetković, Aleksandar, Dragana Miljic, Aleksandar Ljubić, Michael Patterson, Mohammad Ghatei, Jelena Stamenković, Marina Nikolic-Djurovic, et al. 2012. "Plasma Kisspeptin Levels in Pregnancies with Diabetes and Hypertensive Disease as a Potential Marker of Placental Dysfunction and Adverse Perinatal Outcome." *Endocrine Research* 37 (2): 78–88. <https://doi.org/10.3109/07435800.2011.639319>.
- Chan, James P Butler, Valerie F Sidhoum, Nancy E Pinnell, and Stephanie B Seminara. 2012. "Kisspeptin Administration to Women: A Window into Endogenous Kisspeptin Secretion and GnRH Responsiveness across the Menstrual Cycle." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (8): E1458-67. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1282>.
- Chan, Y. M., S. Broder-Fingert, K. M. Wong, and S. B. Seminara. 2009. "Kisspeptin/Gpr54-Independent Gonadotrophin-Releasing Hormone Activity in Kiss1 and Gpr54 Mutant Mice." *Journal of Neuroendocrinology* 21 (12): 1015–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01926.x>.
- Chassard, David, Isabelle Bur, Vincent-Joseph Poirel, Jorge Mendoza, and Valérie Simonneaux. 2015. "Evidence for a Putative Circadian Kiss-Clock in the Hypothalamic AVPV in Female Mice." *Endocrinology*, May, en20141769. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1769>.
- Chen, Jong-Dar, Yu-Cheng Lin, and Shu-Tin Hsiao. 2010. "Obesity and High Blood Pressure of 12-Hour Night Shift Female Clean-Room Workers." *Chronobiology International* 27

(2): 334–44. <https://doi.org/10.3109/07420520903502242>.

- Cheong, Rachel Y, Robert Porteous, Pierre Chambon, István Abrahám, and Allan E Herbison. 2014. “Effects of Neuron-Specific Estrogen Receptor (ER) α and ER β Deletion on the Acute Estrogen Negative Feedback Mechanism in Adult Female Mice.” *Endocrinology* 155 (4): 1418–27. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1943>.
- Chevrier, L., F. Guimiot, and N. de Roux. 2011. “GnRH Receptor Mutations in Isolated Gonadotropic Deficiency.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 346 (1–2): 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.018>.
- Choe, H. K., H.-D. Kim, S. H. Park, H.-W. Lee, J.-Y. Park, J. Y. Seong, S. L. Lightman, G. H. Son, and K. Kim. 2013. “Synchronous Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Transcription and Secretion by Pulsatile Kisspeptin Stimulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (14): 5677–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213594110>.
- Christian, Catherine A, Jessica L Mobley, and Suzanne M Moenter. 2005. “Diurnal and Estradiol-Dependent Changes in Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (43): 15682–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504270102>.
- Christian, Catherine A, and Suzanne M Moenter. 2008. “Critical Roles for Fast Synaptic Transmission in Mediating Estradiol Negative and Positive Feedback in the Neural Control of Ovulation.” *Endocrinology* 149 (11): 5500–5508. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0453>.
- Chryssikopoulos, A, O Gregoriou, C Papadias, and C Loghis. 1998. “Gonadotropin Ovulation Induction and Pregnancies in Women with Kallmann’s Syndrome.” *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 12 (2): 103–8.
- Chu, Adrienne, Lei Zhu, Ian D Blum, Oliver Mai, Alexei Leliavski, Jan Fahrenkrug, Henrik Oster, Ulrich Boehm, and Kai-Florian Storch. 2013. “Global but Not Gonadotrope-Specific Disruption of Bmal1 Abolishes the Luteinizing Hormone Surge without Affecting Ovulation.” *Endocrinology* 154 (8): 2924–35. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1080>.
- Chu, Josefa Andrade, Margaret A Shupnik, and Suzanne M Moenter. 2009. “Differential Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Membrane Properties by Acutely Applied Estradiol: Dependence on Dose and Estrogen Receptor

- Subtype.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (17): 5616–27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0352-09.2009>.
- Chung, Fen-Fang, Chuan-Chiang Chou Yao, and Gwo-Hwa Wan. 2005. “The Associations between Menstrual Function and Life Style/Working Conditions among Nurses in Taiwan.” *Journal of Occupational Health* 47 (2): 149–56.
- Clarke, I J, J T Cummins, M E Crowder, and T M Nett. 1989. “Long-Term Negative Feedback Effects of Oestrogen and Progesterone on the Pituitary Gland of the Long-Term Ovariectomized Ewe.” *The Journal of Endocrinology* 120 (2): 207–14.
- Clarkson, X d’Anglemont de Tassigny, W H Colledge, A Caraty, and A E Herbison. 2009. “Distribution of Kisspeptin Neurones in the Adult Female Mouse Brain.” *Journal of Neuroendocrinology* 21 (8): 673–82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x>.
- Clarkson, and Allan E Herbison. 2006. “Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons.” *Endocrinology* 147 (12): 5817–25. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0787>.
- Cone, J E, L M Vaughan, A Huete, and S J Samuels. 1998. “Reproductive Health Outcomes among Female Flight Attendants: An Exploratory Study.” *Journal of Occupational and Environmental Medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 40 (3): 210–16.
- Cordina-Duverger, Émilie, Marie Houot, Nastassia Tvardik, Mounia El Yamani, Corinne Pilorget, and Pascal Guénel. 2018. “Prevalence of Night Work in France: Characterization from a Job-Exposure Matrix.” *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* N° 8-9 (12 mars 2019): 168–74.
- Cos, Samuel, Carlos Martínez-Campa, Maria D Mediavilla, and Emilio J Sánchez-Barceló. 2005. “Melatonin Modulates Aromatase Activity in MCF-7 Human Breast Cancer Cells.” *Journal of Pineal Research* 38 (2): 136–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00186.x>.
- Crowley, W F, and J W McArthur. 1980. “Simulation of the Normal Menstrual Cycle in Kallman’s Syndrome by Pulsatile Administration of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH).” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 51 (1): 173–75. <https://doi.org/10.1210/jcem-51-1-173>.

- Cumming, D C, L H Honoré, J Z Scott, and K P Williams. 1985. "The Late Luteal Phase in Infertile Women: Comparison of Simultaneous Endometrial Biopsy and Progesterone Levels." *Fertility and Sterility* 43 (5): 715–19.
- Czieselsky, Katja, Mel Prescott, Robert Porteous, Pauline Campos, Jenny Clarkson, Frederik J. Steyn, Rebecca E. Campbell, and Allan E. Herbison. 2016. "Pulse and Surge Profiles of Luteinizing Hormone Secretion in the Mouse." *Endocrinology* 157 (12): 4794–4802. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1351>.
- d'Anglemont de Tassigny, Lisa A. Fagg, Mark B. L. Carlton, and William H. Colledge. 2008. "Kisspeptin Can Stimulate Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Release by a Direct Action at GnRH Nerve Terminals." *Endocrinology* 149 (8): 3926–32. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1487>.
- Dalkin, A C, D J Haisenleder, G A Ortolano, T R Ellis, and J C Marshall. 1989. "The Frequency of Gonadotropin-Releasing-Hormone Stimulation Differentially Regulates Gonadotropin Subunit Messenger Ribonucleic Acid Expression." *Endocrinology* 125 (2): 917–24. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-917>.
- Davidson, A J, M T Sellix, J Daniel, S Yamazaki, M Menaker, and G D Block. 2006. "Chronic Jet-Lag Increases Mortality in Aged Mice." *Current Biology: CB* 16 (21): R914-6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.058>.
- Davis, Dana K Mirick, Chu Chen, and Frank Z Stanczyk. 2012. "Night Shift Work and Hormone Levels in Women." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 21 (4): 609–18. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-1128>.
- Davis, S, D K Mirick, and R G Stevens. 2001. "Night Shift Work, Light at Night, and Risk of Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 93 (20): 1557–62.
- Demirbilek, Huseyin, M Nuri Ozbek, Korcan Demir, L Damla Kotan, Yasar Cesur, Murat Dogan, Fatih Temiz, et al. 2015. "Normosmic Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Due to a Novel Homozygous Nonsense c.C969A (p.Y323X) Mutation in the KISS1R Gene in Three Unrelated Families." *Clinical Endocrinology* 82 (3): 429–38. <https://doi.org/10.1111/cen.12618>.
- Dhillon, Waljit S, Owais B Chaudhri, Michael Patterson, Emily L Thompson, Kevin G Murphy, Michael K Badman, Barbara M McGowan, et al. 2005. "Kisspeptin-54 Stimulates the

- Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis in Human Males.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (12): 6609–15. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1468>.
- Dhillon, Waljit S, Owais B Chaudhri, Emily L Thompson, Kevin G Murphy, Michael Patterson, Radha Ramachandran, Gurjinder K Nijher, et al. 2007. “Kisspeptin-54 Stimulates Gonadotropin Release Most Potently during the Preovulatory Phase of the Menstrual Cycle in Women.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (10): 3958–66. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1116>.
- Donato, Jose, Roberta M Cravo, Renata Frazão, Laurent Gautron, Michael M Scott, Jennifer Lachey, Inar A Castro, et al. 2011. “Leptin’s Effect on Puberty in Mice Is Relayed by the Ventral Premammillary Nucleus and Does Not Require Signaling in Kiss1 Neurons.” *The Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 355–68. <https://doi.org/10.1172/JCI45106>.
- Donoso, A O, A M Seltzer, C E Navarro, R J Cabrera, F J López, and A Negro-Vilar. 1994. “Regulation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Luteinizing Hormone Secretion by Hypothalamic Amino Acids.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]* 27 (4): 921–32.
- Dorling, Amber A, Martin G Todman, Kenneth S Korach, and Allan E Herbison. 2003. “Critical Role for Estrogen Receptor Alpha in Negative Feedback Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone mRNA Expression in the Female Mouse.” *Neuroendocrinology* 78 (4): 204–9. <https://doi.org/73703>.
- Ecochard, R, H Boehringer, M Rabilloud, and H Marret. 2001. “Chronological Aspects of Ultrasonic, Hormonal, and Other Indirect Indices of Ovulation.” *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 108 (8): 822–29.
- Endo, A, and T Watanabe. 1989. “Effects of Non-24-Hour Days on Reproductive Efficacy and Embryonic Development in Mice.” *Gamete Research* 22 (4): 435–41. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120220409>.
- Eyigor, O, and L Jennes. 1996. “Identification of Glutamate Receptor Subtype MRNAs in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Rat Brain.” *Endocrine* 4 (2): 133–39. <https://doi.org/10.1007/BF02782758>.
- Fatehi, Mohammad, and Zahra Fatehi-Hassanabad. 2008. “Effects of 17beta-Estradiol on Neuronal Cell Excitability and Neurotransmission in the Suprachiasmatic Nucleus of Rat.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of*

- Neuropsychopharmacology* 33 (6): 1354–64. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301523>.
- Filardo. 2002. “Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Transactivation by Estrogen via the G-Protein-Coupled Receptor, GPR30: A Novel Signaling Pathway with Potential Significance for Breast Cancer.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80 (2): 231–38.
- Filardo, J A Quinn, K I Bland, and A R Frackelton. 2000. “Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14 (10): 1649–60. <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532>.
- Francis, Aron B Abera, Mushi Matjila, Robert P Millar, and Arie A Katz. 2014. “Kisspeptin Regulation of Genes Involved in Cell Invasion and Angiogenesis in First Trimester Human Trophoblast Cells.” *PloS One* 9 (6): e99680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099680>.
- Francel, Jessica M, Gagandeep Kaur, and J David Glass. 2010. “Roles of Light and Serotonin in the Regulation of Gastrin-Releasing Peptide and Arginine Vasopressin Output in the Hamster SCN Circadian Clock.” *The European Journal of Neuroscience* 32 (7): 1170–79. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07374.x>.
- Francou, Bruno, Charlotte Paul, Larbi Amazit, Alejandra Cartes, Claire Bouvattier, Frédérique Albarel, Dominique Maiter, et al. 2016. “Prevalence of KISS1 Receptor Mutations in a Series of 603 Patients with Normosmic Congenital Hypogonadotrophic Hypogonadism and Characterization of Novel Mutations: A Single-Centre Study.” *Human Reproduction (Oxford, England)*, April. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew073>.
- Friend, K E, Y K Chiou, M B Lopes, E R Laws, K M Hughes, and M A Shupnik. 1994. “Estrogen Receptor Expression in Human Pituitary: Correlation with Immunohistochemistry in Normal Tissue, and Immunohistochemistry and Morphology in Macroadenomas.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78 (6): 1497–1504. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.6.7515390>.
- Frost, Poul, Henrik A Kolstad, and Jens Peter Bonde. 2009. “Shift Work and the Risk of Ischemic Heart Disease - a Systematic Review of the Epidemiologic Evidence.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 35 (3): 163–79.
- Funabashi, T, S Aiba, A Sano, K Shinohara, and F Kimura. 1999. “Intracerebroventricular

- Injection of Arginine-Vasopressin V1 Receptor Antagonist Attenuates the Surge of Luteinizing Hormone and Prolactin Secretion in Proestrous Rats.” *Neuroscience Letters* 260 (1): 37–40.
- Gan, Yong, Chen Yang, Xinyue Tong, Huilian Sun, Yingjie Cong, Xiaoxu Yin, Liqing Li, et al. 2015. “Shift Work and Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis of Observational Studies.” *Occupational and Environmental Medicine* 72 (1): 72–78. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102150>.
- García-Galiano, David, Dorette van Ingen Schenau, Silvia Leon, Magda A. M. Krajnc-Franken, Maria Manfredi-Lozano, Antonio Romero-Ruiz, Victor M. Navarro, et al. 2012. “Kisspeptin Signaling Is Indispensable for Neurokinin B, but Not Glutamate, Stimulation of Gonadotropin Secretion in Mice.” *Endocrinology* 153 (1): 316–28. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1260>.
- George, J T, R A Anderson, and R P Millar. 2012a. “Kisspeptin-10 Stimulation of Gonadotrophin Secretion in Women Is Modulated by Sex Steroid Feedback.” *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (12): 3552–59. <https://doi.org/10.1093/humrep/des326>.
- . 2012b. “Kisspeptin-10 Stimulation of Gonadotrophin Secretion in Women Is Modulated by Sex Steroid Feedback.” *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 (12): 3552–59. <https://doi.org/10.1093/humrep/des326>.
- Gibson, Erin M, Stephanie A Humber, Sachi Jain, Wilbur P Williams, Sheng Zhao, George E Bentley, Kazuyoshi Tsutsui, and Lance J Kriegsfeld. 2008. “Alterations in RFamide-Related Peptide Expression Are Coordinated with the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge.” *Endocrinology* 149 (10): 4958–69. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0316>.
- Gillette, M U, and S M Reppert. 1987. “The Hypothalamic Suprachiasmatic Nuclei: Circadian Patterns of Vasopressin Secretion and Neuronal Activity in Vitro.” *Brain Research Bulletin* 19 (1): 135–39.
- Goichot, B, L Weibel, F Chapotot, C Gronfier, F Piquard, and G Brandenberger. 1998. “Effect of the Shift of the Sleep-Wake Cycle on Three Robust Endocrine Markers of the Circadian Clock.” *The American Journal of Physiology* 275 (2 Pt 1): E243–8.
- Gold, E B, and E Tomich. 1994. “Occupational Hazards to Fertility and Pregnancy Outcome.” *Occupational Medicine (Philadelphia, Pa.)* 9 (3): 435–69.

- Gómez-Acebo, Inés, Trinidad Dierssen-Sotos, Kyriaki Papantoniou, María Teresa García-Unzueta, María Francisca Santos-Benito, and Javier Llorca. 2014. "Association between Exposure to Rotating Night Shift versus Day Shift Using Levels of 6-Sulfatoxymelatonin and Cortisol and Other Sex Hormones in Women." *Chronobiology International*, September, 1–8. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.958494>.
- Gordley, L B, G Lemasters, S R Simpson, and J H Yiin. 2000. "Menstrual Disorders and Occupational, Stress, and Racial Factors among Military Personnel." *Journal of Occupational and Environmental Medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 42 (9): 871–81.
- Gottsche, M J Cunningham, J T Smith, S M Popa, B V Acohido, W F Crowley, S Seminara, D K Clifton, and R A Steiner. 2004. "A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse." *Endocrinology* 145 (9): 4073–77. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0431>.
- Gottsche, Michelle L, Víctor M Navarro, Zhen Zhao, Christine Glidewell-Kenney, Jeffrey Weiss, J Larry Jameson, Donald K Clifton, Jon E Levine, and Robert A Steiner. 2009. "Regulation of Kiss1 and Dynorphin Gene Expression in the Murine Brain by Classical and Nonclassical Estrogen Receptor Pathways." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (29): 9390–95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0763-09.2009>.
- Greives, Timothy J, Alex O Mason, Melissa-Ann L Scotti, Jacob Levine, Ellen D Ketterson, Lance J Kriegsfeld, and Gregory E Demas. 2007. "Environmental Control of Kisspeptin: Implications for Seasonal Reproduction." *Endocrinology* 148 (3): 1158–66. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1249>.
- Grimes, E M, M L Taymor, and I E Thompson. 1975. "Induction of Timed Ovulation with Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Women Undergoing Insemination Therapy. I. Effect of a Single Parenteral Administration at Midcycle." *Fertility and Sterility* 26 (3): 277–82.
- Grundy, Anne, Harriet Richardson, Igor Burstyn, Caroline Lohrlich, Sandip K SenGupta, Agnes S Lai, Derrick Lee, John J Spinelli, and Kristan J Aronson. 2013. "Increased Risk of Breast Cancer Associated with Long-Term Shift Work in Canada." *Occupational and Environmental Medicine* 70 (12): 831–38. <https://doi.org/10.1136/oemed-2013-101482>.
- Gu, Fangyi, Jiali Han, Francine Laden, An Pan, Neil E. Caporaso, Meir J. Stampfer, Ichiro

- Kawachi, et al. 2015. "Total and Cause-Specific Mortality of U.S. Nurses Working Rotating Night Shifts." *American Journal of Preventive Medicine* 48 (3): 241–52. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2014.10.018>.
- Guermandi, E, W Vegetti, M M Bianchi, A Uglietti, G Ragni, and P Crosignani. 2001. "Reliability of Ovulation Tests in Infertile Women." *Obstetrics and Gynecology* 97 (1): 92–96.
- Guerriero, Kathryn A, Kim L Keen, Robert P Millar, and Ei Terasawa. 2012. "Developmental Changes in GnRH Release in Response to Kisspeptin Agonist and Antagonist in Female Rhesus Monkeys (Macaca Mulatta): Implication for the Mechanism of Puberty." *Endocrinology* 153 (2): 825–36. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1565>.
- Gumenyuk, Valentina, Ryan Howard, Thomas Roth, Oleg Korzyukov, and Christopher L Drake. 2014. "Sleep Loss, Circadian Mismatch, and Abnormalities in Reorienting of Attention in Night Workers with Shift Work Disorder." *Sleep* 37 (3): 545–56. <https://doi.org/10.5665/sleep.3494>.
- Habermehl, Tracy L, Kate C Parkinson, Gene B Hubbard, Yuji Ikeno, Jennifer I Engelmeyer, Björn Schumacher, and Jeffrey B Mason. 2019. "Extension of Longevity and Reduction of Inflammation Is Ovarian-Dependent, but Germ Cell-Independent in Post-Reproductive Female Mice." *GeroScience* 41 (1): 25–38. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0049-4>.
- Haisenleder, D J, A C Dalkin, G A Ortolano, J C Marshall, and M A Shupnik. 1991. "A Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulus Is Required to Increase Transcription of the Gonadotropin Subunit Genes: Evidence for Differential Regulation of Transcription by Pulse Frequency in Vivo." *Endocrinology* 128 (1): 509–17. <https://doi.org/10.1210/endo-128-1-509>.
- Haley, T. J., and W. G. McCormick. 1957. "PHARMACOLOGICAL EFFECTS PRODUCED BY INTRACEREBRAL INJECTION OF DRUGS IN THE CONSCIOUS MOUSE." *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 12 (1): 12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1957.tb01354.x>.
- Hall, A E Taylor, K A Martin, J Rivier, D A Schoenfeld, and W F Crowley. 1994. "Decreased Release of Gonadotropin-Releasing Hormone during the Preovulatory Midcycle Luteinizing Hormone Surge in Normal Women." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (15): 6894–98.
- Hamilton, Katherine J, Yukitomo Arao, and Kenneth S Korach. 2014. "Estrogen Hormone

- Physiology: Reproductive Findings from Estrogen Receptor Mutant Mice.” *Reproductive Biology* 14 (1): 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.12.002>.
- Hampton, S M, L M Morgan, N Lawrence, T Anastasiadou, F Norris, S Deacon, D Ribeiro, and J Arendt. 1996. “Postprandial Hormone and Metabolic Responses in Simulated Shift Work.” *The Journal of Endocrinology* 151 (2): 259–67.
- Han, Seong-Kyu, Michelle L Gottsch, Kathy J Lee, Simina M Popa, Jeremy T Smith, Sonya K Jakawich, Donald K Clifton, Robert A Steiner, and Allan E Herbison. 2005. “Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (49): 11349–56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005>.
- Hansen. 2001. “Increased Breast Cancer Risk among Women Who Work Predominantly at Night.” *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 12 (1): 74–77.
- Hansen, and Christina F Lassen. 2012. “Nested Case-Control Study of Night Shift Work and Breast Cancer Risk among Women in the Danish Military.” *Occupational and Environmental Medicine* 69 (8): 551–56. <https://doi.org/10.1136/oemed-2011-100240>.
- Harlow, S D, and S A Ephross. 1995. “Epidemiology of Menstruation and Its Relevance to Women’s Health.” *Epidemiologic Reviews* 17 (2): 265–86.
- Harlow, S D, and G M Matanoski. 1991. “The Association between Weight, Physical Activity, and Stress and Variation in the Length of the Menstrual Cycle.” *American Journal of Epidemiology* 133 (1): 38–49.
- Harlow, S D, and M Park. 1996. “A Longitudinal Study of Risk Factors for the Occurrence, Duration and Severity of Menstrual Cramps in a Cohort of College Women.” *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 103 (11): 1134–42.
- Hatch, M C, I Figa-Talamanca, and S Salerno. 1999. “Work Stress and Menstrual Patterns among American and Italian Nurses.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 25 (2): 144–50.
- Henningsen, Jo B, Caroline Ancel, Jens D Mikkelsen, François Gauer, and Valérie Simonneaux. 2017. “Roles of RFRP-3 in the Daily and Seasonal Regulation of Reproductive Activity in Female Syrian Hamsters.” *Endocrinology* 158 (3): 652–63. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1689>.

- Herbison. 2008. "Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Rodent: The Case for the Rostral Periventricular Area of the Third Ventricle (RP3V)." *Brain Research Reviews* 57 (2): 277–87. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.006>.
- Herbison, A E, and D T Theodosios. 1992. "Localization of Oestrogen Receptors in Preoptic Neurons Containing Neurotensin but Not Tyrosine Hydroxylase, Cholecystokinin or Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in the Male and Female Rat." *Neuroscience* 50 (2): 283–98.
- Hermansson, Jonas, Katja Gillander Gådin, Berndt Karlsson, Christina Reuterwall, Johan Hallqvist, and Anders Knutsson. 2015. "Case Fatality of Myocardial Infarction among Shift Workers." *International Archives of Occupational and Environmental Health* 88 (5): 599–605. <https://doi.org/10.1007/s00420-014-0984-z>.
- Hill, Steven M, Victoria P Belancio, Robert T Dauchy, Shulin Xiang, Samantha Brimer, Lulu Mao, Adam Hauch, et al. 2015. "Melatonin: An Inhibitor of Breast Cancer." *Endocrine-Related Cancer*, April. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0030>.
- Hoffman, Gloria E, Wei Wei Le, Isabelle Franceschini, Alain Caraty, and Juan P Advis. 2011. "Expression of Fos and in Vivo Median Eminence Release of LHRH Identifies an Active Role for Preoptic Area Kisspeptin Neurons in Synchronized Surges of LH and LHRH in the Ewe." *Endocrinology* 152 (1): 214–22. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0066>.
- Horikoshi, Yasuko, Hirokazu Matsumoto, Yoshihiro Takatsu, Tetsuya Ohtaki, Chieko Kitada, Satoshi Usuki, and Masahiko Fujino. 2003. "Dramatic Elevation of Plasma Metastatin Concentrations in Human Pregnancy: Metastatin as a Novel Placenta-Derived Hormone in Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (2): 914–19. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021235>.
- Horst, G T van der, M Muijtjens, K Kobayashi, R Takano, S Kanno, M Takao, J de Wit, et al. 1999. "Mammalian Cry1 and Cry2 Are Essential for Maintenance of Circadian Rhythms." *Nature* 398 (6728): 627–30. <https://doi.org/10.1038/19323>.
- Horvath, T L, V Cela, and E M van der Beek. 1998. "Gender-Specific Apposition between Vasoactive Intestinal Peptide-Containing Axons and Gonadotrophin-Releasing Hormone-Producing Neurons in the Rat." *Brain Research* 795 (1–2): 277–81.
- Hrabovszky. 2014. "Neuroanatomy of the Human Hypothalamic Kisspeptin System." *Neuroendocrinology* 99 (1): 33–48. <https://doi.org/10.1159/000356903>.

- Hrabovszky, P Ciofi, B Vida, M C Horvath, E Keller, A Caraty, S R Bloom, et al. 2010. "The Kisspeptin System of the Human Hypothalamus: Sexual Dimorphism and Relationship with Gonadotropin-Releasing Hormone and Neurokinin B Neurons." *The European Journal of Neuroscience* 31 (11): 1984–98. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07239.x>.
- Hrabovszky, I. Kalló, N. Szilávik, É. Keller, I. Merchenthaler, and Z. Liposits. 2007. "Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Express Estrogen Receptor- β ." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (7): 2827–30. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2819>.
- Huijbregts, Lukas, and Nicolas de Roux. 2010. "KISS1 Is Down-Regulated by 17 β -Estradiol in MDA-MB-231 Cells through a Nonclassical Mechanism and Loss of Ribonucleic Acid Polymerase II Binding at the Proximal Promoter." *Endocrinology* 151 (8): 3764–72. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0260>.
- Hull, M G, P E Savage, D R Bromham, A A Ismail, and A F Morris. 1982. "The Value of a Single Serum Progesterone Measurement in the Midluteal Phase as a Criterion of a Potentially Fertile Cycle ('ovulation') Derived From Treated and Untreated Conception Cycles." *Fertility and Sterility* 37 (3): 355–60.
- IARC. 2007. "Monographs Programme Finds Cancer Hazards Associated with Shiftwork, Painting and Firefighting." *International Agency for Research on Cancer (IARC)*.
- Iliodromiti, Stamatina, Richard A. Anderson, and Scott M. Nelson. 2015. "Technical and Performance Characteristics of Anti-Müllerian Hormone and Antral Follicle Count as Biomarkers of Ovarian Response." *Human Reproduction Update* 21 (6): 698–710. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu062>.
- Inoue, Naoko, Karin Sasagawa, Kotaro Ikai, Yuki Sasaki, Junko Tomikawa, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, et al. 2011. "Kisspeptin Neurons Mediate Reflex Ovulation in the Musk Shrew (*Suncus Murinus*)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (42): 17527–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113035108>.
- Irwig, Michael S, Gregory S Fraley, Jeremy T Smith, Blake V Acohido, Simina M Popa, Matthew J Cunningham, Michelle L Gottsch, Donald K Clifton, and Robert A Steiner. 2004. "Kisspeptin Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons and Regulation of KiSS-1 mRNA in the Male Rat." *Neuroendocrinology* 80 (4): 264–72. <https://doi.org/10.1159/000083140>.

- Jacobi, Jessica S, Cecilia Martin, Gabriel Nava, Michael C Jeziorski, Carmen Clapp, and Gonzalo Martínez de la Escalera. 2007. "17-Beta-Estradiol Directly Regulates the Expression of Adrenergic Receptors and Kisspeptin/GPR54 System in GT1-7 GnRH Neurons." *Neuroendocrinology* 86 (4): 260–69. <https://doi.org/10.1159/000107770>.
- Jayasena, Ali Abbara, Alexander N Comninou, Gurjinder M K Nijher, Georgios Christopoulos, Shakunthala Narayanaswamy, Chioma Izzi-Engbeaya, et al. 2014. "Kisspeptin-54 Triggers Egg Maturation in Women Undergoing in Vitro Fertilization." *The Journal of Clinical Investigation* 124 (8): 3667–77. <https://doi.org/10.1172/JCI75730>.
- Jayasena, A N Comninou, G M K Nijher, A Abbara, A De Silva, J D Veldhuis, R Ratnasabapathy, et al. 2013. "Twice-Daily Subcutaneous Injection of Kisspeptin-54 Does Not Abolish Menstrual Cyclicity in Healthy Female Volunteers." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (11): 4464–74. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1069>.
- Jayasena, A N Comninou, J D Veldhuis, S Misra, A Abbara, C Izzi-Engbeaya, M Donaldson, M A Ghatei, S R Bloom, and W S Dhillon. 2013. "A Single Injection of Kisspeptin-54 Temporarily Increases Luteinizing Hormone Pulsatility in Healthy Women." *Clinical Endocrinology* 79 (4): 558–63. <https://doi.org/10.1111/cen.12179>.
- Jayasena, Alexander N Comninou, Shakunthala Narayanaswamy, Sanjana Bhalla, Ali Abbara, Zainab Ganiyu-Dada, Mark Busbridge, Mohammad A Ghatei, Stephen R Bloom, and Waljit S Dhillon. 2014. "Acute and Chronic Effects of Kisspeptin-54 Administration on GH, Prolactin and TSH Secretion in Healthy Women." *Clinical Endocrinology* 81 (6): 891–98. <https://doi.org/10.1111/cen.12512>.
- Jayasena, G M K Nijher, A Abbara, K G Murphy, A Lim, D Patel, A Mehta, et al. 2010. "Twice-Weekly Administration of Kisspeptin-54 for 8 Weeks Stimulates Release of Reproductive Hormones in Women with Hypothalamic Amenorrhea." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 88 (6): 840–47. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.204>.
- Jayasena, Gurjinder M K Nijher, Owais B Chaudhri, Kevin G Murphy, Amita Ranger, Adrian Lim, Daksha Patel, et al. 2009. "Subcutaneous Injection of Kisspeptin-54 Acutely Stimulates Gonadotropin Secretion in Women with Hypothalamic Amenorrhea, but Chronic Administration Causes Tachyphylaxis." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (11): 4315–23. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0406>.
- Jayasena, Gurjinder M K Nijher, Alexander N Comninou, Ali Abbara, Adam Januszewski, Meriel L Vaal, Laboshy Sriskandarajah, et al. 2011. "The Effects of Kisspeptin-10 on

- Reproductive Hormone Release Show Sexual Dimorphism in Humans.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96 (12): E1963-72. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1408>.
- Jin, X, L P Shearman, D R Weaver, M J Zylka, G J de Vries, and S M Reppert. 1999. “A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock.” *Cell* 96 (1): 57–68.
- Jukic, Anne Marie Zaura, Clarice R Weinberg, Allen J Wilcox, D Robert McConnaughey, Paige Hornsby, and Donna D Baird. 2008. “Accuracy of Reporting of Menstrual Cycle Length.” *American Journal of Epidemiology* 167 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm265>.
- Kadokawa, H, M Matsui, K Hayashi, N Matsunaga, C Kawashima, T Shimizu, K Kida, and A Miyamoto. 2008. “Peripheral Administration of Kisspeptin-10 Increases Plasma Concentrations of GH as Well as LH in Prepubertal Holstein Heifers.” *The Journal of Endocrinology* 196 (2): 331–34. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0504>.
- Kadokawa, H, S Suzuki, and T Hashizume. 2008. “Kisspeptin-10 Stimulates the Secretion of Growth Hormone and Prolactin Directly from Cultured Bovine Anterior Pituitary Cells.” *Animal Reproduction Science* 105 (3–4): 404–8. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.005>.
- Kaiser, U B, A Jakubowiak, A Steinberger, and W W Chin. 1997. “Differential Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Gonadotropin Subunit and GnRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels in Vitro.” *Endocrinology* 138 (3): 1224–31. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4968>.
- Kalsbeek, A, R M Buijs, M Engelmann, C T Wotjak, and R Landgraf. 1995. “In Vivo Measurement of a Diurnal Variation in Vasopressin Release in the Rat Suprachiasmatic Nucleus.” *Brain Research* 682 (1–2): 75–82.
- Kauffman, Alexander S, Michelle L Gottsch, Juan Roa, Alisa C Byquist, Angelena Crown, Don K Clifton, Gloria E Hoffman, Robert A Steiner, and Manuel Tena-Sempere. 2007. “Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat.” *Endocrinology* 148 (4): 1774–83. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1540>.
- Kavvasoglu, Serif, Zehra Sema Ozkan, Banu Kumbak, Mehmet Simsek, and Necip Ilhan. 2012. “Association of Kisspeptin-10 Levels with Abortus Imminens: A Preliminary Study.” *Archives of Gynecology and Obstetrics* 285 (3): 649–53. <https://doi.org/10.1007/s00404-011-2061-0>.

- Kawakami, Shin-Ichi, Kanjun Hirunagi, Masumi Ichikawa, Hiroko Tsukamura, and Kei-Ichiro Maeda. 1998. "Evidence for Terminal Regulation of GnRH Release by Excitatory Amino Acids in the Median Eminence in Female Rats: A Dual Immunoelectron Microscopic Study." *Endocrinology* 139 (3): 1458–61. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5979>.
- Keen, Kim L, Frederick H Wegner, Stephen R Bloom, Mohammad A Ghatei, and Ei Terasawa. 2008. "An Increase in Kisspeptin-54 Release Occurs with the Pubertal Increase in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-1 Release in the Stalk-Median Eminence of Female Rhesus Monkeys in Vivo." *Endocrinology* 149 (8): 4151–57. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0231>.
- Kerdelhué, Bernard, Ssmuel Brown, Véronique Lenoir, John T Queenan, Georgeanna Seegar Jones, Robert Scholler, and Howard W Jones. 2002. "Timing of Initiation of the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Its Relationship with the Circadian Cortisol Rhythm in the Human." *Neuroendocrinology* 75 (3): 158–63. <https://doi.org/48233>.
- Khan, A R, and A S Kauffman. 2012. "The Role of Kisspeptin and RFamide-Related Peptide-3 Neurones in the Circadian-Timed Preovulatory Luteinising Hormone Surge." *Journal of Neuroendocrinology* 24 (1): 131–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02162.x>.
- Kiyokawa, Machiko, Toshiya Matsuzaki, Takeshi Iwasa, Rie Ogata, Masahiro Murakami, Riyo Kinouchi, Shinobu Yoshida, Akira Kuwahara, Toshiyuki Yasui, and Minoru Irahara. 2011. "Neuropeptide Y Mediates Orexin A-Mediated Suppression of Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in Ovariectomized Rats." *The Journal of Medical Investigation : JMI* 58 (1–2): 11–18.
- Klenke, Ulrike, Stephanie Constantin, and Susan Wray. 2010. "Neuropeptide Y Directly Inhibits Neuronal Activity in a Subpopulation of Gonadotropin-Releasing Hormone-1 Neurons via Y1 Receptors." *Endocrinology* 151 (6): 2736–46. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1198>.
- Knobil, E, T M Plant, L Wildt, P E Belchetz, and G Marshall. 1980. "Control of the Rhesus Monkey Menstrual Cycle: Permissive Role of Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone." *Science (New York, N.Y.)* 207 (4437): 1371–73.
- Knutsson, Anders, Lars Alfredsson, Berndt Karlsson, Torbjörn Akerstedt, Eleonor I Fransson, Peter Westerholm, and Hugo Westerlund. 2013. "Breast Cancer among Shift Workers: Results of the WOLF Longitudinal Cohort Study." *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 39 (2): 170–77. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3323>.

- Kolstad, H A, J P Bonde, N H Hjellund, T K Jensen, T B Henriksen, E Ernst, A Giwercman, N E Skakkebaek, and J Olsen. 1999. "Menstrual Cycle Pattern and Fertility: A Prospective Follow-up Study of Pregnancy and Early Embryonal Loss in 295 Couples Who Were Planning Their First Pregnancy." *Fertility and Sterility* 71 (3): 490–96.
- Kopp, Caroline, Volker Ressel, Esther Wigger, and Irene Tobler. 2006. "Influence of Estrus Cycle and Ageing on Activity Patterns in Two Inbred Mouse Strains." *Behavioural Brain Research* 167 (1): 165–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.09.001>.
- Kovanen, Leena, Sirkku T Saarikoski, Arpo Aromaa, Jouko Lönnqvist, and Timo Partonen. 2010. "ARNTL (BMAL1) and NPAS2 Gene Variants Contribute to Fertility and Seasonality." *PloS One* 5 (4): e10007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010007>.
- Krajnak, K, M L Kashon, K L Rosewell, and P M Wise. 1998. "Aging Alters the Rhythmic Expression of Vasoactive Intestinal Polypeptide mRNA but Not Arginine Vasopressin mRNA in the Suprachiasmatic Nuclei of Female Rats." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (12): 4767–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04767.1998>.
- Krege, J H, J B Hodgin, J F Couse, E Enmark, M Warner, J F Mahler, M Sar, K S Korach, J A Gustafsson, and O Smithies. 1998. "Generation and Reproductive Phenotypes of Mice Lacking Estrogen Receptor Beta." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15677–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677>.
- Kriegsfeld, Lance J, Dan Feng Mei, George E Bentley, Takayoshi Ubuka, Alex O Mason, Kazuhiko Inoue, Kazuyoshi Ukena, Kazuyoshi Tsutsui, and Rae Silver. 2006. "Identification and Characterization of a Gonadotropin-Inhibitory System in the Brains of Mammals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2410–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511003103>.
- Krizo, Jessica A, and Eric M Mintz. 2014. "Sex Differences in Behavioral Circadian Rhythms in Laboratory Rodents." *Frontiers in Endocrinology* 5 (January): 234. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00234>.
- Labyak, Susan, Susan Lava, Fred Turek, and Phyllis Zee. 2002. "Effects of Shiftwork on Sleep and Menstrual Function in Nurses." *Health Care for Women International* 23 (6–7): 703–14. <https://doi.org/10.1080/07399330290107449>.
- Lakati, Alice, Colin Binns, and Mark Stevenson. 2002. "The Effect of Work Status on

- Exclusive Breastfeeding in Nairobi.” *Asia-Pacific Journal of Public Health / Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health* 14 (2): 85–90.
- Lanfranco, Fabio, Jörg Gromoll, Sigrid von Eckardstein, Eva M Herding, Eberhard Nieschlag, and Manuela Simoni. 2005. “Role of Sequence Variations of the GnRH Receptor and G Protein-Coupled Receptor 54 Gene in Male Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism.” *European Journal of Endocrinology* 153 (6): 845–52. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02031>.
- Lapatto, Risto, J Carl Pallais, Dongsheng Zhang, Yee-Ming Chan, Amy Mahan, Felecia Cerrato, Wei Wei Le, Gloria E Hoffman, and Stephanie B Seminara. 2007. “Kiss1-/- Mice Exhibit More Variable Hypogonadism than Gpr54-/- Mice.” *Endocrinology* 148 (10): 4927–36. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0078>.
- Lauria, Laura, Terri J Ballard, Massimiliano Caldora, Clelia Mazzanti, and Arduino Verdecchia. 2006. “Reproductive Disorders and Pregnancy Outcomes among Female Flight Attendants.” *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 77 (5): 533–39.
- Lawson, Christina C, Elizabeth A Whelan, Eileen N Lividoti Hibert, Donna Spiegelman, Eva S Schernhammer, and Janet W Rich-Edwards. 2011. “Rotating Shift Work and Menstrual Cycle Characteristics.” *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 22 (3): 305–12. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182130016>.
- Lee, J H, M E Miele, D J Hicks, K K Phillips, J M Trent, B E Weissman, and D R Welch. 1996. “KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene.” *Journal of the National Cancer Institute* 88 (23): 1731–37.
- Legan, S J, G A Coon, and F J Karsch. 1975. “Role of Estrogen as Initiator of Daily LH Surges in the Ovariectomized Rat.” *Endocrinology* 96 (1): 50–56. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-50>.
- Lehman, M N, R Silver, W R Gladstone, R M Kahn, M Gibson, and E L Bittman. 1987. “Circadian Rhythmicity Restored by Neural Transplant. Immunocytochemical Characterization of the Graft and Its Integration with the Host Brain.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 7 (6): 1626–38.
- León, Silvia, David García-Galiano, Francisco Ruiz-Pino, Alexia Barroso, María Manfredi-Lozano, Antonio Romero-Ruiz, Juan Roa, et al. 2014. “Physiological Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Signaling in the Control of Mammalian Reproductive Axis: Studies in the NPFF1 Receptor Null Mouse.” *Endocrinology* 155 (8): 2953–65.

<https://doi.org/10.1210/en.2014-1030>.

- Leranth, Csaba, Neil J. MacLusky, Hideki Sakamoto, Marya Shanabrough, and Frederick Naftolin. 1985. "Glutamic Acid Decarboxylase-Containing Axons Synapse on LHRH Neurons in the Rat Medial Preoptic Area." *Neuroendocrinology* 40 (6): 536–39. <https://doi.org/10.1159/000124127>.
- Lima, C J G, S C Cardoso, E F L Lemos, E Zingler, C Capanema, L D Menezes, G Vogado, et al. 2014. "Mutational Analysis of the Genes Encoding RFamide-Related Peptide-3, the Human Orthologue of Gonadotrophin-Inhibitory Hormone, and Its Receptor (GPR147) in Patients with Gonadotrophin-Releasing Hormone-Dependent Pubertal Disorders." *Journal of Neuroendocrinology* 26 (11): 817–24. <https://doi.org/10.1111/jne.12207>.
- Logan, Ryan W, Changqing Zhang, Sengottuvelan Murugan, Stephanie O'Connell, Dale Levitt, Alan M Rosenwasser, and Dipak K Sarkar. 2012. "Chronic Shift-Lag Alters the Circadian Clock of NK Cells and Promotes Lung Cancer Growth in Rats." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (6): 2583–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102715>.
- Logie, James J, Fiona C Denison, Simon C Riley, Thayalini Ramaesh, Shareen Forbes, Jane E Norman, and Rebecca M Reynolds. 2012. "Evaluation of Kisspeptin Levels in Obese Pregnancy as a Biomarker for Pre-Eclampsia." *Clinical Endocrinology* 76 (6): 887–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04317.x>.
- Lohstroh, Pete N, Jiangang Chen, Jianming Ba, Louise M Ryan, Xiping Xu, James W Overstreet, and Bill L Lasley. 2003. "Bone Resorption Is Affected by Follicular Phase Length in Female Rotating Shift Workers." *Environmental Health Perspectives* 111 (4): 618–22.
- Louis, Gwendolyn W, Megan Greenwald-Yarnell, Rebecca Phillips, Lique M Coolen, Michael N Lehman, and Martin G Myers. 2011. "Molecular Mapping of the Neural Pathways Linking Leptin to the Neuroendocrine Reproductive Axis." *Endocrinology* 152 (6): 2302–10. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0096>.
- Lowrey, Phillip L, and Joseph S Takahashi. 2011. "Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms." *Advances in Genetics* 74 (January): 175–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>.
- Luo, Elena, Shannon B Z Stephens, Sharon Chaing, Nagambika Munaganuru, Alexander S Kauffman, and Kellie M Breen. 2015. "Corticosterone Blocks Ovarian Cyclicity and the LH Surge via Decreased Kisspeptin Neuron Activation in Female Mice." *Endocrinology*,

December, en20151711. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1711>.

- Luque, Raúl M, José Córdoba-Chacón, Manuel D Gahete, Víctor M Navarro, Manuel Tena-Sempere, Rhonda D Kineman, and Justo P Castaño. 2011. "Kisspeptin Regulates Gonadotroph and Somatotroph Function in Nonhuman Primate Pituitary via Common and Distinct Signaling Mechanisms." *Endocrinology* 152 (3): 957–66. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1142>.
- Lynch, Kristine E, Sunni L Mumford, Karen C Schliep, Brian W Whitcomb, Shvetha M Zarek, Anna Z Pollack, Elizabeth R Bertone-Johnson, et al. 2014. "Assessment of Anovulation in Eumenorrheic Women: Comparison of Ovulation Detection Algorithms." *Fertility and Sterility* 102 (2): 511-518.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.035>.
- Malcolm, Christine E, and David C Cumming. 2003. "Does Anovulation Exist in Eumenorrheic Women?" *Obstetrics and Gynecology* 102 (2): 317–18.
- Manenschijn, Laura, Rulanda G P M van Kruysbergen, Frank H de Jong, Jan W Koper, and Elisabeth F C van Rossum. 2011. "Shift Work at Young Age Is Associated with Elevated Long-Term Cortisol Levels and Body Mass Index." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96 (11): E1862-5. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1551>.
- Marcheva, Biliana, Kathryn Moynihan Ramsey, Ethan D Buhr, Yumiko Kobayashi, Hong Su, Caroline H Ko, Ganka Ivanova, et al. 2010. "Disruption of the Clock Components CLOCK and BMAL1 Leads to Hypoinsulinaemia and Diabetes." *Nature* 466 (7306): 627–31. <https://doi.org/10.1038/nature09253>.
- Marino, Jennifer L, Victoria L Holt, Chu Chen, and Scott Davis. 2008. "Shift Work, HCLOCK T3111C Polymorphism, and Endometriosis Risk." *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 19 (3): 477–84. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31816b7378>.
- Matsui, Hisanori, Yoshihiro Takatsu, Satoshi Kumano, Hirokazu Matsumoto, and Tetsuya Ohtaki. 2004. "Peripheral Administration of Metastin Induces Marked Gonadotropin Release and Ovulation in the Rat." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320 (2): 383–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.185>.
- Matsumoto, S, T Tamada, and S Konuma. 1979. "Endocrinological Analysis of Environmental Menstrual Disorders." *International Journal of Fertility* 24 (4): 233–39.
- Mayer, Christian, and Ulrich Boehm. 2011. "Female Reproductive Maturation in the Absence of Kisspeptin/GPR54 Signaling." *Nature Neuroscience* 14 (6): 704–10.

<https://doi.org/10.1038/nm.2818>.

- McElhinny, T L, C L Sisk, K E Holekamp, and L Smale. 1999. "A Morning Surge in Plasma Luteinizing Hormone Coincides with Elevated Fos Expression in Gonadotropin-Releasing Hormone-Immunoreactive Neurons in the Diurnal Rodent, *Arvicanthis Niloticus*." *Biology of Reproduction* 61 (4): 1115–22.
- McLean, Ashleigh C, Nicolas Valenzuela, Stephen Fai, and Steffany A L Bennett. 2012. "Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 67 (January): e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>.
- Mead, Emma J, Janet J Maguire, Rhoda E Kuc, and Anthony P Davenport. 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 (1): 140–47. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0818>.
- Melmed, Shlomo, and Kaiser Ursula. 2010. *The Pituitary*.
- Menaker, Michael, Zachary C Murphy, and Michael T Sellix. 2013. "Central Control of Peripheral Circadian Oscillators." *Current Opinion in Neurobiology* 23 (5): 741–46. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.03.003>.
- Mereness, Amanda L, Zachary C Murphy, Andrew C Forrestel, Susan Butler, CheMyong Ko, JoAnne S Richards, and Michael T Sellix. 2016. "Conditional Deletion of *Bmal1* in Ovarian Theca Cells Disrupts Ovulation in Female Mice." *Endocrinology* 157 (2): 913–27. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1645>.
- Messenger, S., E. E. Chatzidaki, D. Ma, A. G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, R. R. Thresher, et al. 2005. "Kisspeptin Directly Stimulates Gonadotropin-Releasing Hormone Release via G Protein-Coupled Receptor 54." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (5): 1761–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409330102>.
- Messing, K, M J Saurel-Cubizolles, M Bourguine, and M Kaminski. 1992. "Menstrual-Cycle Characteristics and Work Conditions of Workers in Poultry Slaughterhouses and Canneries." *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 18 (5): 302–9.
- . 1993. "Factors Associated with Dysmenorrhea among Workers in French Poultry Slaughterhouses and Canneries." *Journal of Occupational Medicine. : Official Publication of the Industrial Medical Association* 35 (5): 493–500.

- Miller, Brooke H, Susan Losee Olson, Jon E Levine, Fred W Turek, Teresa H Horton, and Joseph S Takahashi. 2006. "Vasopressin Regulation of the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Wild-Type and Clock Mutant Mice." *Biology of Reproduction* 75 (5): 778–84. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.052845>.
- Miller, Brooke H, Susan Losee Olson, Fred W Turek, Jon E Levine, Teresa H Horton, and Joseph S Takahashi. 2004. "Circadian Clock Mutation Disrupts Estrous Cyclicity and Maintenance of Pregnancy." *Current Biology: CB* 14 (15): 1367–73. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.055>.
- Miller, Brooke H, and Joseph S Takahashi. 2013. "Central Circadian Control of Female Reproductive Function." *Frontiers in Endocrinology* 4 (January): 195. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00195>.
- Mittelman-Smith, M. A., H. Williams, S. J. Krajewski-Hall, N. T. McMullen, and N. E. Rance. 2012. "Role for Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Neurons in Cutaneous Vasodilatation and the Estrogen Modulation of Body Temperature." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (48): 19846–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211517109>.
- Miyauchi, F, K Nanjo, and K Otsuka. 1992. "Effects of Night Shift on Plasma Concentrations of Melatonin, LH, FSH and Prolactin, and Menstrual Irregularity." *Sangyō Igaku. Japanese Journal of Industrial Health* 34 (6): 545–50.
- Moalla, Mariam, Faten Hadj Kacem, Abdullah Fahad Al-Mutery, Mona Mahfood, Nabila Mejdoub-Rekik, Mohamed Abid, Mouna Mnif-Feki, and Hassen Hadj Kacem. 2019. "Nonstop Mutation in the Kisspeptin 1 Receptor (KISS1R) Gene Causes Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, May. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01468-z>.
- Moenter, S M, A Caraty, A Locatelli, and F J Karsch. 1991. "Pattern of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Secretion Leading up to Ovulation in the Ewe: Existence of a Preovulatory GnRH Surge." *Endocrinology* 129 (3): 1175–82. <https://doi.org/10.1210/endo-129-3-1175>.
- Moline, M L, and H E Albers. 1988. "Response of Circadian Locomotor Activity and the Proestrous Luteinizing Hormone Surge to Phase Shifts of the Light-Dark Cycle in the Hamster." *Physiology & Behavior* 43 (4): 435–40.
- Moline, M L, H E Albers, R B Todd, and M C Moore-Ede. 1981. "Light-Dark Entrainment of

- Proestrous LH Surges and Circadian Locomotor Activity in Female Hamsters.” *Hormones and Behavior* 15 (4): 451–58.
- Molnár, I Kalló, Z Liposits, and E Hrabovszky. 2011. “Estradiol Down-Regulates RF-Amide-Related Peptide (RFRP) Expression in the Mouse Hypothalamus.” *Endocrinology* 152 (4): 1684–90. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1418>.
- Morello, H, L Caligaris, B Haymal, and S Taleisnik. 1992. “Daily Variations in the Sensitivity of Proestrous LH Surge in the Inhibitory Effect of Intraventricular Injection of 5-HT or GABA in Rats.” *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70 (4): 447–51.
- Mounzih, Khalid, Ronghua Lu, and Farid F. Chehab. 1997. “Leptin Treatment Rescues the Sterility of Genetically Obese Ob/Ob Males.” *Endocrinology* 138 (3): 1190–93. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.5024>.
- Mozurkewich, E L, B Luke, M Avni, and F M Wolf. 2000. “Working Conditions and Adverse Pregnancy Outcome: A Meta-Analysis.” *Obstetrics and Gynecology* 95 (4): 623–35.
- Muir, A I, L Chamberlain, N A Elshourbagy, D Michalovich, D J Moore, A Calamari, P G Szekeres, et al. 2001. “AXOR12, a Novel Human G Protein-Coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (31): 28969–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102743200>.
- Nakamura, K Shinohara, T Funabashi, and F Kimura. 2001. “Effect of Estrogen on the Expression of Cry1 and Cry2 MRNAs in the Suprachiasmatic Nucleus of Female Rats.” *Neuroscience Research* 41 (3): 251–55.
- Nakamura, Takahiro J, Michael T Sellix, Michael Menaker, and Gene D Block. 2008. “Estrogen Directly Modulates Circadian Rhythms of PER2 Expression in the Uterus.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (5): E1025-31. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90392.2008>.
- Nalbantoglu, Ozlem, Gulcin Arslan, Ozge Koprulu, Filiz Hazan, Semra Gursoy, and Behzat Ozkan. 2019. “Three Siblings with Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism in a Nonconsanguineous Family: A Novel KISS1R/GPR54 Loss-of-Function Mutation.” *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 0 (0): 0–0. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2019.2018.0230>.
- Navarro, V. M., J. M. Castellano, R. Fernández-Fernández, S. Tovar, J. Roa, A. Mayen, R. Nogueiras, et al. 2005. “Characterization of the Potent Luteinizing Hormone-Releasing

- Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54.” *Endocrinology* 146 (1): 156–63. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0836>.
- Navarro, V M, J M Castellano, R Fernández-Fernández, M L Barreiro, J Roa, J E Sanchez-Criado, E Aguilar, C Dieguez, L Pinilla, and M Tena-Sempere. 2004. “Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and Its Putative Receptor, GPR54, in Rat Hypothalamus and Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide.” *Endocrinology* 145 (10): 4565–74. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0413>.
- Navarro, V M, R Fernández-Fernández, J M Castellano, J Roa, A Mayen, M L Barreiro, F Gaytan, et al. 2004. “Advanced Vaginal Opening and Precocious Activation of the Reproductive Axis by KiSS-1 Peptide, the Endogenous Ligand of GPR54.” *The Journal of Physiology* 561 (Pt 2): 379–86. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072298>.
- Neal-Perry, Genevieve, Diane Lebesgue, Matthew Lederman, Jun Shu, Gail D Zeevalk, and Anne M Etgen. 2009. “The Excitatory Peptide Kisspeptin Restores the Luteinizing Hormone Surge and Modulates Amino Acid Neurotransmission in the Medial Preoptic Area of Middle-Aged Rats.” *Endocrinology* 150 (8): 3699–3708. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1667>.
- Nelson, J F, L S Felicio, P K Randall, C Sims, and C E Finch. 1982. “A Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I. Cycle Frequency, Length and Vaginal Cytology.” *Biology of Reproduction* 27 (2): 327–39. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.2.327>.
- Noel, Sekoni D, Kim L Keen, David I Baumann, Edward J Filardo, and Ei Terasawa. 2009. “Involvement of G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) in Rapid Action of Estrogen in Primate LHRH Neurons.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 23 (3): 349–59. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0299>.
- Nurminen, T. 1998. “Shift Work and Reproductive Health.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 24 Suppl 3 (January): 28–34.
- Ogawa, Sonoko, Johnny Chan, Jan-Ake Gustafsson, Kenneth S Korach, and Donald W Pfaff. 2003. “Estrogen Increases Locomotor Activity in Mice through Estrogen Receptor Alpha: Specificity for the Type of Activity.” *Endocrinology* 144 (1): 230–39. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220519>.
- Oishi, Hajime, Christian Klausen, George E Bentley, Tomohiro Osugi, Kazuyoshi Tsutsui, C

- Blake Gilks, Tetsu Yano, and Peter C K Leung. 2012. "The Human Gonadotropin-Inhibitory Hormone Ortholog RFamide-Related Peptide-3 Suppresses Gonadotropin-Induced Progesterone Production in Human Granulosa Cells." *Endocrinology* 153 (7): 3435–45. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1066>.
- Olsen, J. 1991. "Cigarette Smoking, Tea and Coffee Drinking, and Subfecundity." *American Journal of Epidemiology* 133 (7): 734–39.
- Opperhuizen, Linda W M van Kerkhof, Karin I Proper, Wendy Rodenburg, and Andries Kalsbeek. 2015. "Rodent Models to Study the Metabolic Effects of Shiftwork in Humans." *Frontiers in Pharmacology* 6 (January): 50. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00050>.
- Oster. 2010. "Adrenal Glucocorticoids Have a Key Role in Circadian Resynchronization in a Mouse Model of Jet Lag. - PubMed - NCBI." *J Clin Invest.* 2010.
- Ottem, Erich N, Jonathan G Godwin, and Sandra L Petersen. 2002. "Glutamatergic Signaling through the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Directly Activates Medial Subpopulations of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Neurons, but Does Not Appear to Mediate the Effects of Estradiol on LHRH Gene Expression." *Endocrinology* 143 (12): 4837–45. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220707>.
- Oyama, Ichiro, Tatsuhiko Kubo, Yoshihisa Fujino, Koji Kadowaki, Masamizu Kunitomo, Kiyoyumi Shirane, Hidetoshi Tabata, Ken Sabanai, Takehiro Nakamura, and Shinya Matsuda. 2012. "Retrospective Cohort Study of the Risk of Impaired Glucose Tolerance among Shift Workers." *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 38 (4): 337–42. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3297>.
- Palm, E M Van Der Beek, V M Wiegant, R M Buijs, and A Kalsbeek. 1999. "Vasopressin Induces a Luteinizing Hormone Surge in Ovariectomized, Estradiol-Treated Rats with Lesions of the Suprachiasmatic Nucleus." *Neuroscience* 93 (2): 659–66.
- Palm, Eline M van der Beek, Victor M Wiegant, Ruud M Buijs, and Andries Kalsbeek. 2001. "The Stimulatory Effect of Vasopressin on the Luteinizing Hormone Surge in Ovariectomized, Estradiol-Treated Rats Is Time-Dependent." *Brain Research* 901 (1–2): 109–16. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02309-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02309-5).
- Pan, An, Eva S Schernhammer, Qi Sun, and Frank B Hu. 2011. "Rotating Night Shift Work and Risk of Type 2 Diabetes: Two Prospective Cohort Studies in Women." Edited by Leif Groop. *PLoS Medicine* 8 (12): e1001141. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001141>.

- Papantoniou, Kyriaki, Oscar J Pozo, Ana Espinosa, Josep Marcos, Gemma Castaño-Vinyals, Xavier Basagaña, Elena Juanola Pagès, et al. 2015. “Increased and Mistimed Sex Hormone Production in Night Shift Workers.” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 24 (5): 854–63. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1271>.
- Park, Sungjin, Juhyun Nam, Jong-Ku Lee, Sung-Soo Oh, Hee-Tae Kang, and Sang-Baek Koh. 2015. “Association between Night Work and Cardiovascular Diseases: Analysis of the 3rd Korean Working Conditions Survey.” *Annals of Occupational and Environmental Medicine* 27 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/s40557-015-0064-1>.
- Parkening, T A, T J Collins, and E R Smith. 1982. “Plasma and Pituitary Concentrations of LH, FSH, and Prolactin in Aging C57BL/6 Mice at Various Times of the Estrous Cycle.” *Neurobiology of Aging* 3 (1): 31–35. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(82\)90058-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(82)90058-6).
- Pati, Chandrawanshi, and Reinberg. 2001. “Shift Work: Consequences and Management.” *Curr Sci*, 81, 32–52.
- Pauerstein, C J, C A Eddy, H D Croxatto, R Hess, T M Siler-Khodr, and H B Croxatto. 1978. “Temporal Relationships of Estrogen, Progesterone, and Luteinizing Hormone Levels to Ovulation in Women and Infrahuman Primates.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 130 (8): 876–86. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(78\)90264-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(78)90264-8).
- Pesch, Beate, Volker Harth, Sylvia Rabstein, Christian Baisch, Markus Schiffermann, Dirk Pallapies, Nadine Bonberg, et al. 2010. “Night Work and Breast Cancer - Results from the German GENICA Study.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 36 (2): 134–41.
- Petersen, Sandra L, Erich N Ottem, and Clifford D Carpenter. 2003. “Direct and Indirect Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Estradiol.” *Biology of Reproduction* 69 (6): 1771–78. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.019745>.
- Piet, Richard, Henry Dunckley, Kiho Lee, and Allan E Herbison. 2016. “Vasoactive Intestinal Peptide Excites GnRH Neurons in Male and Female Mice.” *Endocrinology* 157 (9): 3621–30. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1399>.
- Piet, Richard, Antoine Fraissenon, Ulrich Boehm, and Allan E Herbison. 2015. “Estrogen Permits Vasopressin Signaling in Preoptic Kisspeptin Neurons in the Female Mouse.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (17):

- 6881–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4587-14.2015>.
- Pilorz, Violetta, and Stephan Steinlechner. 2008. “Low Reproductive Success in Per1 and Per2 Mutant Mouse Females Due to Accelerated Ageing?” *Reproduction (Cambridge, England)* 135 (4): 559–68. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0434>.
- Pinilla, Leonor, Enrique Aguilar, Carlos Dieguez, Robert P Millar, and Manuel Tena-Sempere. 2012. “Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms.” *Physiological Reviews* 92 (3): 1235–1316. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010>.
- Plant, Tony M. 2019. “The Neurobiological Mechanism Underlying Hypothalamic GnRH Pulse Generation: The Role of Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus.” *F1000Research* 8 (June): 982. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18356.1>.
- Plant, Tony M. 2006. “The Role of KiSS-1 in the Regulation of Puberty in Higher Primates.” *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 155 Suppl (November): S11-6. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02232>.
- Plant, Tony M, Suresh Ramaswamy, and Meloni J Dipietro. 2006. “Repetitive Activation of Hypothalamic G Protein-Coupled Receptor 54 with Intravenous Pulses of Kisspeptin in the Juvenile Monkey (Macaca Mulatta) Elicits a Sustained Train of Gonadotropin-Releasing Hormone Discharges.” *Endocrinology* 147 (2): 1007–13. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1261>.
- Poling, M C, J H Quennell, G M Anderson, and A S Kauffman. 2013. “Kisspeptin Neurones Do Not Directly Signal to RFRP-3 Neurones but RFRP-3 May Directly Modulate a Subset of Hypothalamic Kisspeptin Cells in Mice.” *Journal of Neuroendocrinology* 25 (10): 876–86. <https://doi.org/10.1111/jne.12084>.
- Quennell, J H, M Z Rizwan, H-L Relf, and G M Anderson. 2010. “Developmental and Steroidogenic Effects on the Gene Expression of RFamide Related Peptides and Their Receptor in the Rat Brain and Pituitary Gland.” *Journal of Neuroendocrinology* 22 (4): 309–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01963.x>.
- Rabstein, Sylvia, Volker Harth, Beate Pesch, Dirk Pallapies, Anne Lotz, Christina Justenhoven, Christian Baisch, et al. 2013. “Night Work and Breast Cancer Estrogen Receptor Status--Results from the German GENICA Study.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 39 (5): 448–55. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3360>.
- Radovick, Sally, Jon E Levine, and Andrew Wolfe. 2012. “Estrogenic Regulation of the GnRH

- Neuron.” *Frontiers in Endocrinology* 3 (January): 52.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00052>.
- Ralph, M R, R G Foster, F C Davis, and M Menaker. 1990. “Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period.” *Science (New York, N.Y.)* 247 (4945): 975–78.
- Reeth, O Van. 1998. “Sleep and Circadian Disturbances in Shift Work: Strategies for Their Management.” *Hormone Research* 49 (3–4): 158–62.
- Revel, Florent G, Michel Saboureau, Mireille Masson-Pévet, Paul Pévet, Jens D Mikkelsen, and Valérie Simonneaux. 2006. “Kisspeptin Mediates the Photoperiodic Control of Reproduction in Hamsters.” *Current Biology: CB* 16 (17): 1730–35.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.025>.
- Ribeiro, S M Hampton, L Morgan, S Deacon, and J Arendt. 1998. “Altered Postprandial Hormone and Metabolic Responses in a Simulated Shift Work Environment.” *The Journal of Endocrinology* 158 (3): 305–10.
- Ribeiro, C M Leite, B Kalil, C R Franci, J A Anselmo-Franci, and R E Szawka. 2015. “Kisspeptin Regulates Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurones and Prolactin Secretion in an Oestradiol-Dependent Manner in Male and Female Rats.” *Journal of Neuroendocrinology* 27 (2): 88–99. <https://doi.org/10.1111/jne.12242>.
- Richard, N, G Galmiche, S Corvaisier, A Caraty, and M-L Kottler. 2008. “KiSS-1 and GPR54 Genes Are Co-Expressed in Rat Gonadotrophs and Differentially Regulated in Vivo by Oestradiol and Gonadotrophin-Releasing Hormone.” *Journal of Neuroendocrinology* 20 (3): 381–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01653.x>.
- Roa, J, J M Castellano, V M Navarro, D J Handelsman, L Pinilla, and M Tena-Sempere. 2009. “Kisspeptins and the Control of Gonadotropin Secretion in Male and Female Rodents.” *Peptides* 30 (1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.009>.
- Robertson, Jessica L, Donald K Clifton, Horacio O de la Iglesia, Robert A Steiner, and Alexander S Kauffman. 2009. “Circadian Regulation of Kiss1 Neurons: Implications for Timing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone/Luteinizing Hormone Surge.” *Endocrinology* 150 (8): 3664–71. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0247>.
- Rometo, Adonna M, Sally J Krajewski, Mary Lou Voytko, and Naomi E Rance. 2007. “Hypertrophy and Increased Kisspeptin Gene Expression in the Hypothalamic Infundibular Nucleus of Postmenopausal Women and Ovariectomized Monkeys.” *The*

- Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (7): 2744–50.
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-0553>.
- Rønnekleiv, Oline K, Chunguang Zhang, Martha A Bosch, and Martin J Kelly. 2014. “Kisspeptin and Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Excitability: Molecular Mechanisms Driven by 17 β -Estradiol.” *Neuroendocrinology*, December.
<https://doi.org/10.1159/000370311>.
- Roos, Judith, Sarah Johnson, Sarah Weddell, Erhard Godehardt, Julia Schiffner, Günter Freundl, and Christian Gnoth. 2015. “Monitoring the Menstrual Cycle: Comparison of Urinary and Serum Reproductive Hormones Referenced to True Ovulation.” *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care: The Official Journal of the European Society of Contraception* 20 (6): 438–50.
<https://doi.org/10.3109/13625187.2015.1048331>.
- Rosa, R R, M H Bonnet, R R Bootzin, C I Eastman, T Monk, P E Penn, D I Tepas, and J K Walsh. 1990. “Intervention Factors for Promoting Adjustment to Nightwork and Shiftwork.” *Occupational Medicine (Philadelphia, Pa.)* 5 (2): 391–415.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2203163>.
- Rosenfeld, D L, S Chudow, and R A Bronson. 1980. “Diagnosis of Luteal Phase Inadequacy.” *Obstetrics and Gynecology* 56 (2): 193–96.
- Roseweir, Antonia K, Alexander S Kauffman, Jeremy T Smith, Kathryn A Guerriero, Kevin Morgan, Justyna Pielecka-Fortuna, Rafael Pineda, et al. 2009. “Discovery of Potent Kisspeptin Antagonists Delineate Physiological Mechanisms of Gonadotropin Regulation.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (12): 3920–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009>.
- Rosmond, R, L Lapidus, and P Björntorp. 1996. “The Influence of Occupational and Social Factors on Obesity and Body Fat Distribution in Middle-Aged Men.” *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 20 (7): 599–607.
- Roux, Nicolas de, Jean-Claude Carel, and Juliane Leger. 2016. “Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: A Trait Shared by Several Complex Neurodevelopmental Disorders.” In *Endocrine Development*, 29:72–86. <https://doi.org/10.1159/000438875>.
- Roux, Nicolas de, Emmanuelle Genin, Jean-Claude Carel, Fumihiko Matsuda, Jean-Louis Chaussain, and Edwin Milgrom. 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): 10972–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100>.
- Royston, S E, N Yasui, A G Kondilis, S V Lord, J A Katzenellenbogen, and M M Mahoney. 2014. “ESR1 and ESR2 Differentially Regulate Daily and Circadian Activity Rhythms in Female Mice.” *Endocrinology* 155 (7): 2613–23. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1101>.
- Russo, Kimberly A, Janet L La, Shannon B Z Stephens, Matthew C Poling, Namita A Padgaonkar, Kimberly J Jennings, David J Piekarski, Alexander S Kauffman, and Lance J Kriegsfeld. 2015. “Circadian Control of the Female Reproductive Axis Through Gated Responsiveness of the RFRP-3 System to VIP Signaling.” *Endocrinology*, April, en20141762. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1762>.
- Santoro, N, M Filicori, and W F Crowley. 1986. “Hypogonadotropic Disorders in Men and Women: Diagnosis and Therapy with Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone.” *Endocrine Reviews* 7 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-1-11>.
- Sasaki, Reinaldo S A, Mario S Approbato, Mônica C S Maia, Eliamar Aparecida de B Fleury, Christiane R Giviziez, and Neuma Zanluchi. 2016. “Patients’ Auto Report of Regularity of Their Menstrual Cycles. Medical History Is Very Reliable to Predict Ovulation. A Cross-Sectional Study.” *JBRA Assisted Reproduction* 20 (3): 118–22. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160027>.
- Schernhammer, Candyce H Kroenke, Francine Laden, and Susan E Hankinson. 2006. “Night Work and Risk of Breast Cancer.” *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 17 (1): 108–11.
- Schernhammer, F Laden, F E Speizer, W C Willett, D J Hunter, I Kawachi, and G A Colditz. 2001. “Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses’ Health Study.” *Journal of the National Cancer Institute* 93 (20): 1563–68.
- Scott, A J. 2000. “Shift Work and Health.” *Primary Care* 27 (4): 1057–79.
- Scully, K M, A S Gleiberman, J Lindzey, D B Lubahn, K S Korach, and M G Rosenfeld. 1997. “Role of Estrogen Receptor-Alpha in the Anterior Pituitary Gland.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (6): 674–81. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0019>.
- Sébert, M-E, D Lomet, S Ben Saïd, P Monget, C Briant, R J Scaramuzzi, and A Caraty. 2010. “Insights into the Mechanism by Which Kisspeptin Stimulates a Preovulatory LH Surge and Ovulation in Seasonally Acyclic Ewes: Potential Role of Estradiol.” *Domestic Animal*

- Endocrinology* 38 (4): 289–98. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.01.001>.
- Sellix, Michael T, and Michael Menaker. 2010. “Circadian Clocks in the Ovary.” *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 21 (10): 628–36. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.002>.
- Seminara, Stephanie B., Sophie Messenger, Emmanouella E. Chatzidaki, Rosemary R. Thresher, James S. Acierno, Jenna K. Shagoury, Yousef Bo-Abbas, et al. 2003. “The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty.” *New England Journal of Medicine* 349 (17): 1614–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>.
- Semple, R K, J C Achermann, J Ellery, I S Farooqi, F E Karet, R G Stanhope, S O’rahilly, and S A Aparicio. 2005. “Two Novel Missense Mutations in g Protein-Coupled Receptor 54 in a Patient with Hypogonadotropic Hypogonadism.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (3): 1849–55. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1418>.
- Shahab, Muhammad, Claudio Mastronardi, Stephanie B Seminara, William F Crowley, Sergio R Ojeda, and Tony M Plant. 2005. “Increased Hypothalamic GPR54 Signaling: A Potential Mechanism for Initiation of Puberty in Primates.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (6): 2129–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409822102>.
- Shaw, N D, S N Histed, S S Srouji, J Yang, H Lee, and J E Hall. 2010. “Estrogen Negative Feedback on Gonadotropin Secretion: Evidence for a Direct Pituitary Effect in Women.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (4): 1955–61. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2108>.
- Shi, Jiajun, Ben Zhang, Ji-Yeob Choi, Yu-Tang Gao, Huaixing Li, Wei Lu, Jirong Long, et al. 2016. “Age at Menarche and Age at Natural Menopause in East Asian Women: A Genome-Wide Association Study.” *AGE* 38 (5–6): 513–23. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9939-5>.
- Shimizu, Takashi, Yuko Hirai, Chiaki Murayama, Akio Miyamoto, Hitoshi Miyazaki, and Koyomi Miyazaki. 2011. “Circadian Clock Genes Per2 and Clock Regulate Steroid Production, Cell Proliferation, and Luteinizing Hormone Receptor Transcription in Ovarian Granulosa Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412 (1): 132–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.058>.
- Shinohara, K, K Tominaga, Y Isobe, and S T Inouye. 1993. “Photic Regulation of Peptides Located in the Ventrolateral Subdivision of the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: Daily

- Variations of Vasoactive Intestinal Polypeptide, Gastrin-Releasing Peptide, and Neuropeptide Y.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (2): 793–800.
- Shortridge, L A, G K Lemasters, B Valanis, and V Hertzberg. 1995. “Menstrual Cycles in Nurses Handling Antineoplastic Drugs.” *Cancer Nursing* 18 (6): 439–44.
- Silveira, L. G., S. D. Noel, A. P. Silveira-Neto, A. P. Abreu, V. N. Brito, M. G. Santos, S. D. C. Bianco, et al. 2010. “Mutations of the KISS1 Gene in Disorders of Puberty.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95 (5): 2276–80. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2421>.
- Simon, C, L Weibel, and G Brandenberger. 2000. “Twenty-Four-Hour Rhythms of Plasma Glucose and Insulin Secretion Rate in Regular Night Workers.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 278 (3): E413-20.
- Simonneaux. 2018. “A Kiss to Drive Rhythms in Reproduction.” *European Journal of Neuroscience*, December. <https://doi.org/10.1111/ejn.14287>.
- Simonneaux, Isabelle Bur, Caroline Ancel, Laura Ansel, and Paul Klosen. 2012. “A Kiss for Daily and Seasonal Reproduction.” *Progress in Brain Research* 199 (January): 423–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00024-1>.
- Simonneaux, V., and T. Bahougne. 2015. “A Multi-Oscillatory Circadian System Times Female Reproduction.” *Frontiers in Endocrinology* 6 (OCT). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00157>.
- Singh, Surya P, Andrew Wolfe, Yewade Ng, Sara A DiVall, Colleen Buggs, Jon E Levine, Fredric E Wondisford, and Sally Radovick. 2009. “Impaired Estrogen Feedback and Infertility in Female Mice with Pituitary-Specific Deletion of Estrogen Receptor Alpha (ESR1).” *Biology of Reproduction* 81 (3): 488–96. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075259>.
- Small, Chanley M, Amita K Manatunga, Mitchel Klein, Heather S Feigelson, Celia E Dominguez, Ruth McChesney, and Michele Marcus. 2006. “Menstrual Cycle Characteristics: Associations with Fertility and Spontaneous Abortion.” *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 17 (1): 52–60.
- Smarr, B L, J J Gile, and H O de la Iglesia. 2013. “Oestrogen-Independent Circadian Clock Gene Expression in the Anteroventral Periventricular Nucleus in Female Rats: Possible

- Role as an Integrator for Circadian and Ovarian Signals Timing the Luteinising Hormone Surge.” *Journal of Neuroendocrinology* 25 (12): 1273–79. <https://doi.org/10.1111/jne.12104>.
- Smith-DiJulio, K, E Sullivan Mitchell, and N Fugate Woods. 2005. “Concordance of Retrospective and Prospective Reporting of Menstrual Irregularity by Women in the Menopausal Transition.” *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society* 8 (4): 390–97. <https://doi.org/10.1080/13697130500345018>.
- Smith, B V Acohido, D K Clifton, and R A Steiner. 2006. “KiSS-1 Neurones Are Direct Targets for Leptin in the Ob/Ob Mouse.” *Journal of Neuroendocrinology* 18 (4): 298–303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x>.
- Smith, Jeremy T, Matthew J Cunningham, Emilie F Rissman, Donald K Clifton, and Robert A Steiner. 2005. “Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse.” *Endocrinology* 146 (9): 3686–92. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0488>.
- Smith, L Jiennes, and P M Wise. 2000. “Localization of the VIP2 Receptor Protein on GnRH Neurons in the Female Rat.” *Endocrinology* 141 (11): 4317–20. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7876>.
- Smith, Muhammad Shahab, Alda Pereira, K.-Y. Francis Pau, and Iain J. Clarke. 2010. “Hypothalamic Expression of KISS1 and Gonadotropin Inhibitory Hormone Genes During the Menstrual Cycle of a Non-Human Primate¹.” *Biology of Reproduction* 83 (4): 568–77. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085407>.
- Sonigo, Charlotte, Justine Bouilly, Nadège Carré, Virginie Tolle, Alain Caraty, Javier Tello, Fabian-Jesus Simony-Conesa, Robert Millar, Jacques Young, and Nadine Binart. 2012. “Hyperprolactinemia-Induced Ovarian Acyclicity Is Reversed by Kisspeptin Administration.” *The Journal of Clinical Investigation* 122 (10): 3791–95. <https://doi.org/10.1172/JCI63937>.
- Spieler. 1980. “Temporal Relationships between Ovulation and Defined Changes in the Concentration of Plasma Estradiol-17 Beta, Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone, and Progesterone. I. Probit Analysis. World Health Organization, Task Force on Methods for Th.” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 138 (4): 383–90. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9378\(80\)90133-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0002-9378(80)90133-7).
- Spinelli, A, I Figà-Talamanca, and J Osborn. 1997. “Time to Pregnancy and Occupation in a Group of Italian Women.” *International Journal of Epidemiology* 26 (3): 601–9.

- Steyn, F J, Y Wan, J Clarkson, J D Veldhuis, A E Herbison, and C Chen. 2013. "Development of a Methodology for and Assessment of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Juvenile and Adult Male Mice." *Endocrinology* 154 (12): 4939–45. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1502>.
- Stocker, Linden J, Nicholas S Macklon, Ying C Cheong, and Susan J Bewley. 2014. "Influence of Shift Work on Early Reproductive Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Obstetrics and Gynecology* 124 (1): 99–110. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000321>.
- Summa, Keith C, Martha Hotz Vitaterna, and Fred W Turek. 2012. "Environmental Perturbation of the Circadian Clock Disrupts Pregnancy in the Mouse." *PloS One* 7 (5): e37668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037668>.
- Sundell, G, I Milsom, and B Andersch. 1990. "Factors Influencing the Prevalence and Severity of Dysmenorrhoea in Young Women." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 97 (7): 588–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2390501>.
- Szawka, Raphael E, Aline B Ribeiro, Cristiane M Leite, Cleyde V V Helena, Celso R Franci, Greg M Anderson, Gloria E Hoffman, and Janete A Anselmo-Franci. 2010. "Kisspeptin Regulates Prolactin Release through Hypothalamic Dopaminergic Neurons." *Endocrinology* 151 (7): 3247–57. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1414>.
- Takasu, Nana N, Takahiro J Nakamura, Isao T Tokuda, Takeshi Todo, Gene D Block, and Wataru Nakamura. 2015. "Recovery from Age-Related Infertility under Environmental Light-Dark Cycles Adjusted to the Intrinsic Circadian Period." *Cell Reports* 12 (9): 1407–13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.049>.
- Takumi, Ken, Norio Iijima, Shimpei Higo, and Hitoshi Ozawa. 2012. "Immunohistochemical Analysis of the Colocalization of Corticotropin-Releasing Hormone Receptor and Glucocorticoid Receptor in Kisspeptin Neurons in the Hypothalamus of Female Rats." *Neuroscience Letters* 531 (1): 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.10.010>.
- Tang, Zi-Run, Rui Zhang, Zheng-Xing Lian, Shou-Long Deng, and Kun Yu. 2019. "Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease." *Cells* 8 (10): 1123. <https://doi.org/10.3390/cells8101123>.
- Taziaux, Melanie, Annemieke S Staphorsius, Mohammad A Ghatei, Stephen R Bloom, Dick F Swaab, and Julie Bakker. 2016. "Kisspeptin Expression in the Human Infundibular Nucleus in Relation to Sex, Gender Identity, and Sexual Orientation." *The Journal of*

Clinical Endocrinology and Metabolism 101 (6): 2380–89.
<https://doi.org/10.1210/jc.2015-4175>.

- Teles, Suzy D C Bianco, Vinicius Nahime Brito, Ericka B Trarbach, Wendy Kuohung, Shuyun Xu, Stephanie B Seminara, Berenice B Mendonca, Ursula B Kaiser, and Ana Claudia Latronico. 2008. “A GPR54-Activating Mutation in a Patient with Central Precocious Puberty.” *The New England Journal of Medicine* 358 (7): 709–15.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa073443>.
- Teles, E B Trarbach, S D Noel, G Guerra-Junior, A Jorge, D Beneduzzi, S D Bianco, et al. 2010. “A Novel Homozygous Splice Acceptor Site Mutation of KISS1R in Two Siblings with Normosmic Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism.” *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 163 (1): 29–34.
<https://doi.org/10.1530/EJE-10-0012>.
- Tenenbaum-Rakover, Yardena, Monique Commenges-Ducos, André Iovane, Chantal Aumas, Osnat Admoni, and Nicolas de Roux. 2007. “Neuroendocrine Phenotype Analysis in Five Patients with Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism Due to a L102P Inactivating Mutation of GPR54.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (3): 1137–44. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2147>.
- Themmen, and Huhtaniemi. 2000. “Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function.” *Endocrine Reviews* 21 (5): 551–83. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.5.0409>.
- Theorell, T, G Ahlberg-Hulten, M Jodko, F Sigala, and B de la Torre. 1993. “Influence of Job Strain and Emotion on Blood Pressure in Female Hospital Personnel during Workhours.” *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 19 (5): 313–18.
- Thompson, E L, M Patterson, K G Murphy, K L Smith, W S Dhillon, J F Todd, M A Ghatei, and S R Bloom. 2004. “Central and Peripheral Administration of Kisspeptin-10 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis.” *Journal of Neuroendocrinology* 16 (10): 850–58.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01240.x>.
- Tomikawa, Junko, Tamami Homma, Shigeyuki Tajima, Takako Shibata, Yoko Inamoto, Kenji Takase, Naoko Inoue, et al. 2010. “Molecular Characterization and Estrogen Regulation of Hypothalamic KISS1 Gene in the Pig.” *Biology of Reproduction* 82 (2): 313–19.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079863>.
- Tonsfeldt, K J, C P Goodall, K L Latham, and P E Chappell. 2011. “Oestrogen Induces

- Rhythmic Expression of the Kisspeptin-1 Receptor GPR54 in Hypothalamic Gonadotrophin-Releasing Hormone-Secreting GT1-7 Cells.” *Journal of Neuroendocrinology* 23 (9): 823–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02188.x>.
- Topaloglu, A. Kemal, Javier A. Tello, L. Damla Kotan, Mehmet N. Ozbek, M. Bertan Yilmaz, Seref Erdogan, Fatih Gurbuz, Fatih Temiz, Robert P. Millar, and Bilgin Yuksel. 2012a. “Inactivating KISS1 Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism.” *New England Journal of Medicine* 366 (7): 629–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1111184>.
- Topaloglu, A Kemal, Frank Reimann, Metin Guclu, Ayse Serap Yalin, L Damla Kotan, Keith M Porter, Ayse Serin, et al. 2009. “TAC3 and TACR3 Mutations in Familial Hypogonadotropic Hypogonadism Reveal a Key Role for Neurokinin B in the Central Control of Reproduction.” *Nature Genetics* 41 (3): 354–58. <https://doi.org/10.1038/ng.306>.
- Topaloglu, A Kemal, Javier A Tello, L Damla Kotan, Mehmet N Ozbek, M Bertan Yilmaz, Seref Erdogan, Fatih Gurbuz, Fatih Temiz, Robert P Millar, and Bilgin Yuksel. 2012b. “Inactivating KISS1 Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism.” *The New England Journal of Medicine* 366 (7): 629–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1111184>.
- Tovar, S, M J Vázquez, V M Navarro, R Fernández-Fernández, J M Castellano, E Vigo, J Roa, et al. 2006. “Effects of Single or Repeated Intravenous Administration of Kisspeptin upon Dynamic LH Secretion in Conscious Male Rats.” *Endocrinology* 147 (6): 2696–2704. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1397>.
- Tuntiseranee, P, J Olsen, A Geater, and O Kor-anantakul. 1998. “Are Long Working Hours and Shiftwork Risk Factors for Subfecundity? A Study among Couples from Southern Thailand.” *Occupational and Environmental Medicine* 55 (2): 99–105.
- Ubuka, Takayoshi, Kazuhiko Inoue, Yujiro Fukuda, Takanobu Mizuno, Kazuyoshi Ukena, Lance J Kriegsfeld, and Kazuyoshi Tsutsui. 2012. “Identification, Expression, and Physiological Functions of Siberian Hamster Gonadotropin-Inhibitory Hormone.” *Endocrinology* 153 (1): 373–85. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1110>.
- Ubuka, Takayoshi, Kevin Morgan, Adam J. Pawson, Tomohiro Osugi, Vishwajit S. Chowdhury, Hiroyuki Minakata, Kazuyoshi Tsutsui, Robert P. Millar, and George E. Bentley. 2009. “Identification of Human GnIH Homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the Cognate Receptor, GPR147 in the Human Hypothalamic Pituitary Axis.” Edited by Immo A. Hansen. *PLoS ONE* 4 (12): e8400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008400>.

- Uchikawa, Miho, Madoka Kawamura, Nobuhiko Yamauchi, and Masa-aki Hattori. 2011. "Down-Regulation of Circadian Clock Gene Period 2 in Uterine Endometrial Stromal Cells of Pregnant Rats during Decidualization." *Chronobiology International* 28 (1): 1–9. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.522289>.
- Ulhôa, M A, E C Marqueze, L G A Burgos, and C R C Moreno. 2015. "Shift Work and Endocrine Disorders." *International Journal of Endocrinology* 2015 (January): 826249. <https://doi.org/10.1155/2015/826249>.
- Varcoe, Tamara J, Nicole Wight, Athena Voultsios, Mark D Salkeld, and David J Kennaway. 2011. "Chronic Phase Shifts of the Photoperiod throughout Pregnancy Programs Glucose Intolerance and Insulin Resistance in the Rat." Edited by Shin Yamazaki. *PloS One* 6 (4): e18504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018504>.
- Vida, B, L Deli, E Hrabovszky, T Kalamatianos, A Caraty, C W Coen, Z Liposits, and I Kalló. 2010. "Evidence for Suprachiasmatic Vasopressin Neurones Innervating Kisspeptin Neurones in the Rostral Periventricular Area of the Mouse Brain: Regulation by Oestrogen." *Journal of Neuroendocrinology* 22 (9): 1032–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02045.x>.
- Vyas, Manav V, Amit X Garg, Arthur V Iansavichus, John Costella, Allan Donner, Lars E Laugsand, Imre Janszky, Marko Mrkobrada, Grace Parraga, and Daniel G Hackam. 2012. "Shift Work and Vascular Events: Systematic Review and Meta-Analysis." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 345 (jul26_1): e4800. <https://doi.org/10.1136/bmj.e4800>.
- Wan, Gwo-Hwa, and Fen-Fang Chung. 2012. "Working Conditions Associated with Ovarian Cycle in a Medical Center Nurses: A Taiwan Study." *Japan Journal of Nursing Science : JJNS* 9 (1): 112–18. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7924.2011.00191.x>.
- Wang, Fang Gu, Mingfen Deng, Lan Guo, Ciyong Lu, Canquan Zhou, Shouzhen Chen, and Yanwen Xu. 2016. "Rotating Shift Work and Menstrual Characteristics in a Cohort of Chinese Nurses." *BMC Women's Health* 16 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s12905-016-0301-y>.
- Wang, H, B Masironi, H Eriksson, and L Sahlin. 1999. "A Comparative Study of Estrogen Receptors Alpha and Beta in the Rat Uterus." *Biology of Reproduction* 61 (4): 955–64.
- Watanabe, Miho, Atsuo Fukuda, and Junichi Nabekura. 2014. "The Role of GABA in the Regulation of GnRH Neurons." *Frontiers in Neuroscience* 8 (January): 387. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00387>.

- Weibel, L, and G Brandenberger. 2002. "The Start of the Quiescent Period of Cortisol Remains Phase Locked to the Melatonin Onset despite Circadian Phase Alterations in Humans Working the Night Schedule." *Neuroscience Letters* 318 (2): 89–92.
- Weinberg, C R, D D Baird, and A J Wilcox. 1994. "Sources of Bias in Studies of Time to Pregnancy." *Statistics in Medicine* 13 (5–7): 671–81.
- Whirledge, Shannon, and John A. Cidlowski. 2013. "A Role for Glucocorticoids in Stress-Impaired Reproduction: Beyond the Hypothalamus and Pituitary." *Endocrinology* 154 (12): 4450–68. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1652>.
- White, J O, M J Herschman, G Parmar, K A Philipson, M G Elder, N A Habib, and C B Wood. 1987. "Activated Oestrogen Receptor in Human Breast Cancer: Clinical and Biochemical Correlates." *The British Journal of Surgery* 74 (7): 588–90.
- Wiegand, S J, E Terasawa, W E Bridson, and R W Goy. 1980. "Effects of Discrete Lesions of Preoptic and Suprachiasmatic Structures in the Female Rat. Alterations in the Feedback Regulation of Gonadotropin Secretion." *Neuroendocrinology* 31 (2): 147–57.
- Williams, Wilbur P., Stephan G. Jarjisian, Jens D. Mikkelsen, and Lance J. Kriegsfeld. 2011. "Circadian Control of Kisspeptin and a Gated GnRH Response Mediate the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge." *Endocrinology* 152 (2): 595–606. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0943>.
- Williams, Wilbur P, and Lance J Kriegsfeld. 2012. "Circadian Control of Neuroendocrine Circuits Regulating Female Reproductive Function." *Frontiers in Endocrinology* 3 (January): 60. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00060>.
- Wintermantel, Tim M, Rebecca E Campbell, Robert Porteous, Dagmar Bock, Hermann-Josef Gröne, Martin G Todman, Kenneth S Korach, et al. 2006. "Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility." *Neuron* 52 (2): 271–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.07.023>.
- Wolfe, Andrew, and Sheng Wu. 2012. "Estrogen Receptor- β in the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron." *Seminars in Reproductive Medicine* 30 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299594>.
- Wu, Shaohua, Hong Zhang, Jiwen Tian, Lifan Liu, Yun Dong, and Ting Mao. 2014. "Expression of Kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the First Trimester Trophoblast and

- Decidua of Women with Recurrent Spontaneous Abortion.” *Pathology, Research and Practice* 210 (1): 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.09.017>.
- Xu, Jing, Melissa A Kirigiti, Michael A Cowley, Kevin L Grove, and M Susan Smith. 2009. “Suppression of Basal Spontaneous Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Activity during Lactation: Role of Inhibitory Effects of Neuropeptide Y.” *Endocrinology* 150 (1): 333–40. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0962>.
- Yang, Bo, Quan Jiang, Ting Chan, Wendy K W Ko, and Anderson O L Wong. 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.” *General and Comparative Endocrinology* 165 (1): 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.06.001>.
- Ye, Han Hui, Jae Uk Jeong, Man Joong Jeon, and Joon Sakong. 2013. “The Association between Shift Work and the Metabolic Syndrome in Female Workers.” *Annals of Occupational and Environmental Medicine* 25 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/2052-4374-25-33>.
- Yip, Hoong, Ulrich Boehm, Allan E Herbison, and Rebecca E Campbell. 2015. “Conditional Viral Tract-Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse.” *Endocrinology*, April, en20151131. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1131>.
- Yoo, Seung-Hee, Shin Yamazaki, Phillip L Lowrey, Kazuhiro Shimomura, Caroline H Ko, Ethan D Buhr, Sandra M Siepka, et al. 2004. “PERIOD2::LUCIFERASE Real-Time Reporting of Circadian Dynamics Reveals Persistent Circadian Oscillations in Mouse Peripheral Tissues.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (15): 5339–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>.
- Yoshinaka, Kiichi, Ai Yamaguchi, Ritsuko Matsumura, Koichi Node, Isao Tokuda, and Makoto Akashi. 2017. “Effect of Different Light-Dark Schedules on Estrous Cycle in Mice, and Implications for Mitigating the Adverse Impact of Night Work.” *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 22 (10): 876–84. <https://doi.org/10.1111/gtc.12522>.
- Young, Jacques, Jérôme Bouligand, Bruno Francou, Marie-Laure Raffin-Sanson, Stéphanie Gaillez, Marc Jeanpierre, Michael Grynberg, et al. 2010. “TAC3 and TACR3 Defects Cause Hypothalamic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism in Humans.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (5): 2287–95.

<https://doi.org/10.1210/jc.2009-2600>.

- Young, Jacques, Jyothis T George, Javier A Tello, Bruno Francou, Jerome Bouligand, Anne Guiochon-Mantel, Sylvie Brailly-Tabard, Richard A Anderson, and Robert P Millar. 2013. “Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Implications.” *Neuroendocrinology* 97 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1159/000336376>.
- Zhu, J L, N H Hjollund, H Boggild, and J Olsen. 2003. “Shift Work and Subfecundity: A Causal Link or an Artefact?” *Occupational and Environmental Medicine* 60 (9): E12.

**Perturbation de la rythmicité
circadienne : Impact sur la fonction
reproductive de souris femelles**

Résumé

Chez les mammifères femelles, la fonction reproductive dépend à la fois d'une horloge biologique synchronisée par le cycle lumière/obscurité et par un équilibre entre le rétrocontrôle négatif et positif des œstrogènes, dont les concentrations varient en fonction de la maturation folliculaire. Chez les femmes, un nombre croissant d'études signalent un impact négatif des environnements chronodisruptifs, comme le travail posté / de nuit, sur la fertilité. Les objectifs de mon travail étaient d'étudier les effets d'un décalage de phase unique ou chronique sur les cycles reproducteurs de souris (C57BL/6J) femelles adultes. Dans ce but j'ai 1) mis au point un modèle de suivi longitudinal (sur plusieurs mois) de la sécrétion de LH le jour du proestrus sur des individus uniques ; 2) analysé les effets d'une avance ou d'un retard de phase unique (10h) sur les cycles estriens et l'occurrence du pic préovulatoire de LH ; 3) analysé les effets d'avance/retard de phases chroniques (jusqu'à 9 mois) sur les cycles estriens, le pic préovulatoire de LH et la fertilité ; 4) mis au point d'injection intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de peptides associée au suivi individuel de LH afin de proposer des méthodes de resynchronisation du pic préovulatoire de LH chez des souris soumises à des déphasages. Mes travaux montrent qu'une avance ou un retard de phase unique perturbe peu le cycle reproducteur des souris femelles jeunes tandis qu'un décalage chronique altère fortement à la fois la régularité des cycles estriens, la sécrétion préovulatoire de LH et la fertilité. Ces données fondamentales démontrent un impact négatif de la perturbation chronique des cycles journaliers sur l'axe reproducteur des souris femelles. Une extrapolation de nos données fondamentales chez la femme, notamment dans un contexte de travail posté, est à l'heure actuelle prématurée. Cependant, au vu de nos résultats, une étude prospective chez la femme est indispensable.

Résumé en anglais

In female mammals, cycles in reproductive function depend on both a biological clock synchronized to the light/dark cycle, and a balance between the negative and positive feedbacks of estradiol which concentration varies during ovary maturation. In women, studies report that chronodisruptive environments, notably those experienced in shiftwork conditions, may impair fertility and gestational success. The objective of this study was to explore, in female mice, the effects of shifted light/dark cycles on both the robustness of the estrous cycles and the timing of the preovulatory luteinizing hormone (LH) surge, two hallmarks of mammalian reproductive health. When mice were exposed to a single 10 h-phase advance or 10 h-phase delay, the occurrence and timing of the LH surge and estrous cyclicity were recovered at the third estrous cycle. By contrast, when mice were exposed to a chronic shift (successive rotations of 10 h-phase advance for 3 days followed by 10 h-phase delay for 4 days), they exhibited a severely impaired reproductive activity. Most mice had no preovulatory LH surge already at the beginning of the chronic shift. Furthermore, the gestational success of mice exposed to a chronic shift was reduced since the number of pups was two times lower in shifted as compared to control mice. In conclusion, this study reports that female mice exposure to a single-phase shift has minor reproductive effects whereas exposure to chronically disrupted light/dark cycles markedly impairs the preovulatory LH surge occurrence, leading to reduced fertility.