



**HAL**  
open science

# Mécanismes neuroendocrines de la saisonnalité, un pas vers des modèles génétiquement modifiés

Clarisse Quignon

► **To cite this version:**

Clarisse Quignon. Mécanismes neuroendocrines de la saisonnalité, un pas vers des modèles génétiquement modifiés. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ104 . tel-04006847

**HAL Id: tel-04006847**

**<https://theses.hal.science/tel-04006847>**

Submitted on 27 Feb 2023

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

**Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UP3212**

# THÈSE

présentée par :

**Clarisse QUIGNON**

soutenue le :  
**23 avril 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

---

## **Mécanismes neuroendocrines du contrôle saisonnier de la reproduction, un pas vers des modèles génétiquement modifiés**

---

**THÈSE dirigée par :**

**Pr. François GAUER**

Professeur des universités, Université de Strasbourg, CNRS UPR 3212  
Strasbourg

**CO-ENCADRANTE :**

**Dr. Valérie SIMONNEAUX**

Directrice de recherche, CNRS, CNRS UPR 3212 Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. Ariane SHARIF**

**Dr. Hugues DARDENTE**

Maître de conférences, Université de Lille 2, INSERM U1172 Lille  
Chargé de recherche, INRAE, INRAE UMR PRC Nouzilly

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Dr. Stéphane GASMAN**

**Dr. Frédéric FLAMANT**

Directeur de recherche, INSERM, CNRS UPR 3212 Strasbourg  
Directeur de recherche, INRAE, IGFL Lyon



## *Remerciements*

J'ai appris bien des choses pendant ma thèse, mais j'ai malheureusement manqué la formation remerciement. A la place je préfère raconter la petite histoire d'une grande aventure qui a commencée le 2 octobre 2017.

Pour une (presque) bretonne, ma thèse a été comme un voyage en mer.

Un jour d'octobre j'ai pris la mer, vers une destination inconnue et entrepris ce long périple à la fois fatigant, excitant, surprenant, effrayant et stimulant, qu'est la thèse. Pendant ce voyage il y a des jours où le vent m'a poussé en avant et d'autres où il a soufflé fort contre moi, m'obligeant à retrousser mes manches pour ramer plus fort encore et continuer d'avancer. La mer est parfois bien agitée pendant le voyage de la thèse, les vagues et la tempête peuvent donner le mal de mer ou le mal du pays. Il m'est arrivé de baisser les rames, de laisser tomber les armes et me laisser dériver. Heureusement bien souvent j'ai navigué sous un beau soleil qui a chatouillé mes photorécepteurs et m'a donné l'énergie nécessaire pour recharger les batteries et profiter du voyage. Je n'ai pas toujours été seule sur ma barque au cours du périple. J'ai parfois croisé d'autres bateaux. Leurs passagers m'ont souri, saluée et certains même se sont amarrés à mon embarcation pour naviguer un moment avec moi avant de repartir pour mener leur propre barque. Certaines personnes sont montées à mon bord, elles m'ont soutenues, encouragées et même donné quelques coups de rames et un bon coup de pouce quand j'étais démotivée. En presque 4 ans, j'en ai croisé des bateaux, des gros, des moins gros, des colorés, des bateaux à moteur qui filent et d'autres à voile qui prennent leur temps. Tous ont compté, et c'est grâce à chacun d'eux que je garde de mon Odyssée un souvenir heureux. Quelques personnes étaient là à mon départ et sont restées sur le quai à me regarder partir. Je sais qu'ils m'encouragent de loin et plus que tout je sais qu'ils seront là à l'arrivée. Il y en a même un qui me rejoint dès que je rentre au port et tend une oreille attentive à mes récits d'aventure.

A bord j'ai un gilet de sauvetage. Pourtant je sais nager. Seulement voilà, ce voyage est fatigant et parfois un peu effrayant, alors même si je n'ai pas besoin tous les jours de ce gilet de sauvetage, le savoir à mes côtés est rassurant et je sais que le jour ou je manquerai d'énergie, il sera là et je pourrai simplement me laisser flotter grâce à lui.

Aujourd'hui j'ai fait un magnifique voyage, j'en sors changée, j'ai les cheveux salés et le teint halé. J'ai en moi une toute nouvelle énergie, j'ai vécu une superbe expérience et fais des rencontres inoubliables. Il est maintenant temps pour moi d'arriver à bon port et de quitter le navire.



Finally, never would this journey have been possible without a key element, my boat. I would not have gone so far without her. It has now been 4 years since she proposed to me and she welcomed me on board. I trusted her from the first day on this little boat and I knew that with her I would reach the end of the journey. She carried me, supported me and today I am a little sad, I will soon have to leave her.

From the smile to the stroke of the oar, from the stroke of the wind to the stroke of the thunder, on the sea or on land, transporter or transported, you all played a role in this great play that was my thesis and I want to say to each of you a sincere thank you, from the bottom of my heart, and good luck !

A vous tous,

Valérie, François, VJ, Seb, Hassan, Matt, Eleni, Zélie, Guillaume, Bastien, Nadia, Perrine, Damien, Fernando, Fabiana, Rosanna, Noëmi, Mathilda, Marine, Vebjørn, Maëlle, Jorge, Virginie, Béa, Dom, Nicolas, Bruno et Olivier, Fatima et Sonia, Momo, Denis, Christophe et Philippe, Jérémie, Lucas, Eléonore, Doctoneuro, les théâtres, la famille mes animaux et mon jury.

« Le bonheur est un festin de miettes », grâce à vous tous j'ai bien mangé pendant ma thèse.

*« Some men see things and ask 'why ?'  
I dream of things that never were and ask 'why not ?' »*

George Bernard Shaw -

Cette thèse en Neurosciences, Neuroendocrinologie a été réalisée à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI, CNRS, UP3212), dans l'équipe « Rythmes neuroendocrines de la reproduction », sous la direction du **Professeur François GAUER** (directeur de thèse) et du **Docteur Valérie SIMONNEAUX** (chef d'équipe).

## ***Publications***

**QUIGNON, C.**, Beymer, M., Gauthier, K., Gauer, F. & Simonneaux, V. Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of Rfrp gene expression in mice. *FASEB J* (2020)

Angelopoulou, E., **QUIGNON, C.**, Kriegsfeld, L. J. & Simonneaux, V. Functional Implications of RFRP-3 in the Central Control of Daily and Seasonal Rhythms in Reproduction. *Front Endocrinol* (2019) (REVIEW)

## ***Communications écrites (poster)***

- Disclosing neuroendocrine mechanisms of seasonality, a step towards genetically modified models. Clarisse Quignon. Clarisse Quignon, Karine Vanacker, Matthew Beymer, Valérie Simonneaux. *Congrès de la société française de neuroendocrinology (SNE), Dijon 2017*
- Thyroid hormones system is involved in the melatonin-dependent control of Rfrp expression in C57 mice. Clarisse Quignon, Karine Vanacker, Valérie Simonneaux. *Congrès de la société française de neuroendocrinology (SNE), Tours 2019*
- Thyroid hormones system is involved in the melatonin-dependent control of Rfrp expression in C57 mice. Clarisse Quignon, Karine Vanacker, Valérie Simonneaux. *Congrès Neurofrance (SDN), Marseille 2019*

## ***Communications orales***

- Utilisation de modèles de souris pour aborder les mécanismes génétiques de la saisonnalité. Clarisse Quignon. *Congrès de la société française de chronobiologie (SFC), Rabat 2018*

- Neuroendocrine mechanisms of seasonality, a step towards genetically modified models. Clarisse Quignon. *International congress of neuroendocrinology (ICN), Toronto 2018*
- A short story about light and seasonal adaptations. Clarisse Quignon. *Ecole d'été lumière et transmission, Strasbourg 2018*
- Thyroid hormones system is involved in the melatonin-dependent control of Rfrp expression in C57 mice. Clarisse Quignon. *Congrès de la société française de neuroendocrinology (SNE), Tours 2019 (Blitz)*
- Neuroendocrine mechanisms of seasonality, a step towards genetically modified models. Clarisse Quignon. *European Biological Rhythms Society Congress (EBRS), Lyon 2019*
- Neuroendocrine mechanisms of seasonality, a step towards genetically modified models. Clarisse Quignon. *Journées de l'école doctorale, Strasbourg 2019*
- Neuroendocrine mechanisms of seasonality, a step towards genetically modified models. Clarisse Quignon. *Journée du Neuropôle, Strasbourg 2020*

## *Résumé de thèse*

### **Mécanismes neuroendocrines du contrôle saisonnier de la reproduction, un pas vers des modèles génétiquement modifiés**

La synchronisation de la reproduction avec les saisons est essentielle chez les mammifères vivant dans des zones tempérées afin d'assurer la naissance de la progéniture à une période de l'année où le climat et la disponibilité des ressources sont optimales. La mélatonine, dont la production nocturne par la glande pinéale dépend des variations annuelles de la durée du jour (ou photopériode), constitue une représentation endocrine des saisons. La mélatonine contrôle la production hypophysaire de thyrostimuline (TSH) qui en aval agit au niveau des tanocytes pour réguler l'expression des déiodinases Dio2 et Dio3 qui régulent la production intra-hypothalamique d'hormones thyroïdiennes T3. Les variations saisonnières du contenu hypothalamique en T3 sont nécessaires au contrôle saisonnier de la reproduction mais les cibles cellulaires impliquées dans cet effet synchronisateur de la T3 sont actuellement inconnues.

Des études réalisées dans notre équipe suggèrent que la T3 hypothalamique, pourrait synchroniser la reproduction saisonnière en agissant sur le RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) et/ou la kisspeptine, deux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle central des fonctions reproductives. Mon projet de thèse a été de tester cette hypothèse en utilisant plusieurs approches. Dans une première étude, j'ai analysé le rôle des récepteurs à T3 sur le contrôle saisonnier des neuropeptides hypothalamiques en modélisant l'effet des saisons chez des souris de différentes souches et avec des modifications génétiques ciblées. Dans une seconde étude, j'ai étudié la neurogenèse hypothalamique chez le hamster syrien, un rongeur saisonnier, afin de déterminer si les variations saisonnières du nombre de neurones à RFRP-3 dépendent de phénomènes saisonniers de neurogenèse et/ou d'apoptose. Dans une dernière approche j'ai étudié le potentiel d'un modèle de souris saisonnières hybrides pour l'étude de l'intégration centrale du message photopériodique et participé au développement d'un modèle de hamster génétiquement modifié, dans le but à long terme d'étudier l'effet d'une délétion du gène codant pour le RFRP-3 sur le contrôle saisonnier de la reproduction.

## ***PROJET 1 : Rôle des TR $\alpha$ dans la régulation des neuropeptides hypothalamiques de la reproduction par la T3***

Bien que la souris C57BL/6J soit génétiquement déficiente en mélatonine et ne soit pas un reproducteur saisonnier, des études ont montré qu'elle est néanmoins capable d'intégrer le message mélatoninergique dans l'hypothalamus. Nous avons évalué si de la mélatonine exogène administrée la nuit dans l'eau de boisson des souris, de façon à mimer une production nocturne de mélatonine en photopériode courte, permet d'induire une réponse photopériodique de la voie TSH/T3/neuropeptides hypothalamiques chez des souris C57BL/6J, similaire à celle observée chez des souris CBA produisant de la mélatonine naturellement.

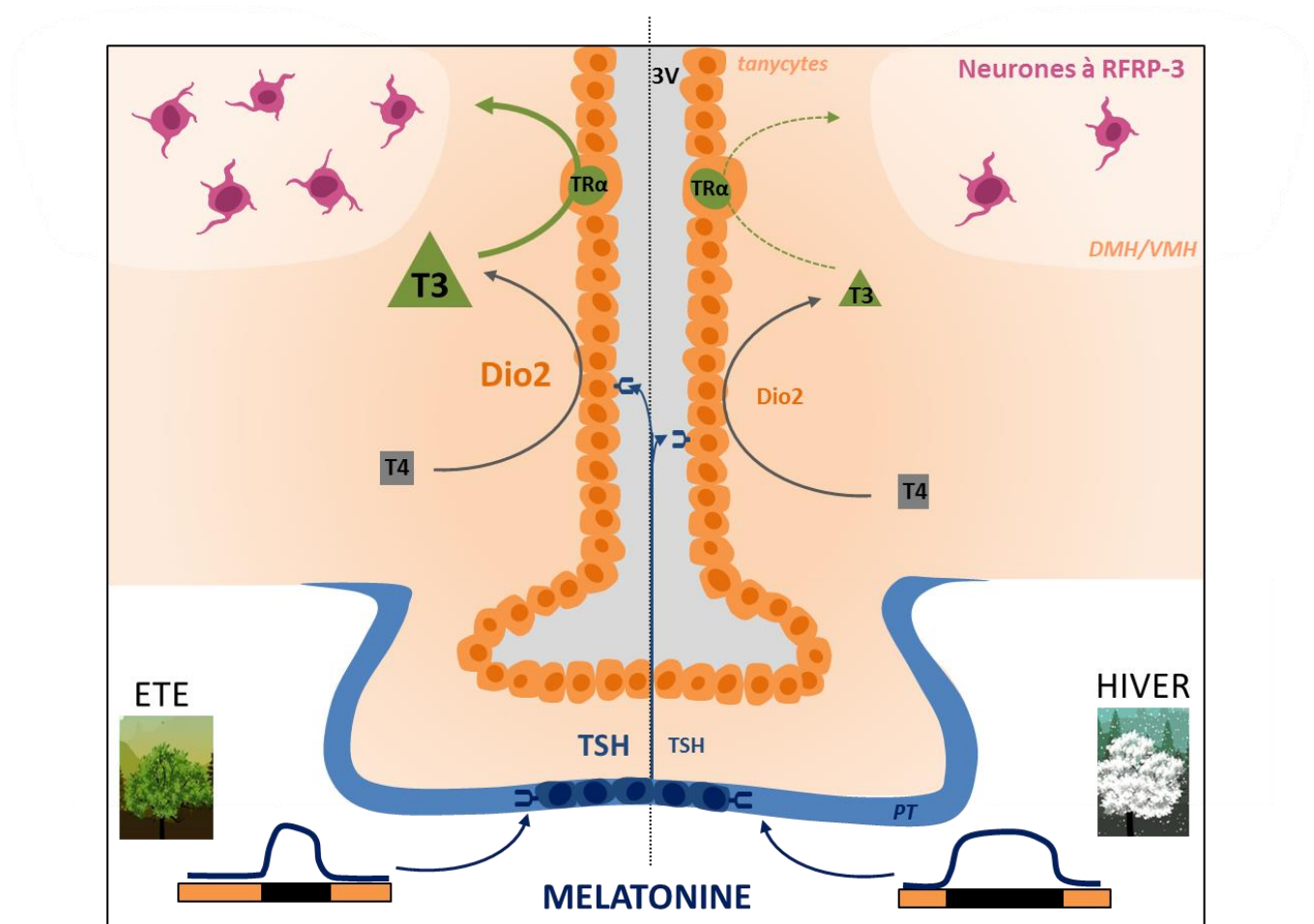
De plus, afin de déterminer si les variations de RFRP-3 sont médiées par les hormones thyroïdiennes, nous avons étudié son expression chez des souris C57BL/6J porteuse d'une mutation du récepteur alpha aux hormones thyroïdiennes (TR $\alpha$ ) afin de voir si la mélatonine agit toujours sur ce neuropeptide lorsque le système thyroïdien est altéré.

Nous avons ainsi établi que la mélatonine administrée dans l'eau de boisson des souris C57BL/6J diminue l'expression des gènes codants pour la TSH, Dio2 et le RFRP-3 et augmente l'expression du gène codant la Dio3 chez les souris supplémentées mais n'a pas d'effet sur l'expression du gène codant pour la kisspeptine. Ces résultats, similaires à ceux observés chez les souris CBA produisant de la mélatonine endogène, valident notre protocole expérimental.

Par conséquent, des souris C57BL/6J mâles porteuses d'une mutation générale du TR $\alpha$  ont été générées et leurs homologues non porteurs de la mutation ont servi de contrôles dans cette étude. Chaque phénotype (mutées ou non) a été séparé en 2 groupes, l'un recevant de la mélatonine, l'autre du solvant. Nous avons pu montrer que la supplémentation en mélatonine chez les souris contrôles restaure des variations de l'intégralité de la voie hypothalamique TSH/déiodinases/neurones à RFRP-3, en revanche, chez les souris mutées, la mélatonine perd son effet régulateur sur l'expression de *Rfrp*, suggérant que les neurones à RFRP-3 sont soumis à des variations mélatoninergiques faisant intervenir la T3 via une action sur son récepteur TR $\alpha$ .

Chez des souris mutées pour le TR $\alpha$  uniquement dans les neurones, l'expression de RFRP-3 est toujours régulée par la mélatonine, indiquant que l'effet vu avec la mutation générale est probablement indirect, médiée par des cellules non-neuronales.

Des études de colocalisation du TR $\alpha$  avec différents types de cellules gliales du système nerveux central ont montré une expression forte de ce récepteur dans les tanocytes, des cellules ependymales longeant la paroi du 3<sup>ème</sup> ventricule. Nous avons donc proposé l'hypothèse que la régulation saisonnière de RFRP-3 par les hormones thyroïdiennes pourrait faire intervenir des récepteurs TR $\alpha$  localisés dans les tanocytes (Figure A).



**Figure A** : Modèle hypothétique de la régulation saisonnière dépendante de la mélatonine des neurones à RFRP-3 par l'action de la T3 sur des récepteurs TR $\alpha$  tanocytaires

## *PROJET 2 : La neurogenèse saisonnière hypothalamique chez le hamster syrien*

Suite aux résultats obtenus dans le projet 1, montrant que la T3 régule les variations saisonnières du nombre de neurones à RFRP-3 dans l'hypothalamus, j'ai testé l'hypothèse que la T3 pourrait réguler les variations du nombre de neurones à RFRP-3 *via* des mécanismes de prolifération cellulaire (neurogenèse) et de mort cellulaire (apoptose) chez le hamster syrien, un modèle de rongeur saisonnier.

J'ai donc étudié les changements de neurogenèse et d'apoptose dans l'hypothalamus lors du passage d'une photopériode à l'autre et tenté d'identifier les types cellulaires nouvellement intégrés dans les réseaux hypothalamiques suite à la neurogenèse.

De la BrdU, un marqueur s'intégrant dans les cellules du système nerveux central en prolifération, a été injecté à 12 groupes de hamsters syriens à différents temps (2 jours, 1, 2, 4, 8 et 12 semaines) après inversion des conditions de photopériode longue (estivale) à photopériode courte (hivernale) et inversement. Les cerveaux ont ensuite été collectés afin d'évaluer le profil de prolifération cellulaire par immunohistochimie des cellules BrdU-positives aux différents temps du passage d'une photopériode à l'autre.

Les résultats montrent qu'il y a une augmentation rapide de la prolifération cellulaire lors du passage d'une photopériode longue à une photopériode courte puis une diminution précoce de cette prolifération avant le retour à une photopériode longue avec des niveaux qui restent bas pendant toute la durée de la photopériode longue. Contrairement à la prolifération cellulaire, il n'y a pas de variations photopériodiques de la Caspase-3, un marqueur d'apoptose, dans l'hypothalamus.

J'ai ensuite cherché à phénotyper les cellules nouvellement intégrées dans l'hypothalamus par une technique de doubles marquages de BrdU avec des protéines hypothalamiques impliquées dans la reproduction et le métabolisme. Les co-marquages avec des neuropeptides candidats n'ont révélé aucune colocalisation du BrdU avec le RFRP-3, la kisspeptine et la somatostatine. L'augmentation de la prolifération cellulaire en photopériode courte alors que le nombre de neurones à RFRP-3 dans l'hypothalamus est minimum et l'absence de colocalisation du RFRP-3 avec la BrdU suggèrent que les variations saisonnières du nombre de neurones à RFRP-3 ne seraient pas régulées par des processus de neurogenèse ou d'apoptose hypothalamique.



### *PROJET 3 : Développement de modèles génétiquement modifiés pour l'étude des rythmes saisonniers*

Les expériences investiguant les mécanismes moléculaires et cellulaires du contrôle saisonnier de la reproduction sont actuellement limitées à des études pharmacologiques et comportementales faute de modèles génétiquement modifiés disponibles chez les espèces saisonnières. Une alternative serait d'utiliser des modèles de souris produisant de la mélatonine comme la MSM chez lesquelles une mutation pourrait être introduite grâce à un croisement avec des souris C57BL/6J, déficientes en mélatonine mais chez lesquelles de nombreux modèles génétiquement modifiés existent.

#### *3A : Etude de l'intégration photopériodique chez des souris MSMxC57BL/6J*

J'ai évalué l'intégration de la photopériode centrale et gonadique chez des souris hybrides issues d'un croisement entre des MSM et des C57BL/6J placées en photopériode longue ou courte.

La réponse photopériodique de la TSH, des déiodinases, du RFRP-3 ainsi que celle de la masse des testicules et des vésicules séminales s'est avérée très variable d'un animal à l'autre, suggérant une production de mélatonine hétérogène chez les souris hybrides.

#### *3B : Premières étapes de développement d'un modèle de hamster syrien génétiquement modifié*

Le hamster est le rongeur saisonnier le plus utilisé pour analyser les mécanismes photopériodiques. Dans notre équipe nous souhaitons développer des modèles de hamsters syrien KO par la technique de CRISPR/Cas9 afin d'améliorer nos connaissances de la régulation et du rôle de la voie neuroendocrine dépendant de la mélatonine, grâce notamment à une délétion du gène codant pour le RFRP-3.

La génération de modèles animaux mutés par la technique de CRISPR/Cas9 se fait en 3 étapes principales :

- La super-ovulation des femelles et récupération des embryons
- La micro-injection du système CRISPR Cas9 dans l'embryon
- La réimplantation des embryons chez des mères-porteuses préparées à la gestation

Nous avons déterminé la dose optimale d'hormones à injecter chez les femelles pour obtenir une super-ovulation permettant la collecte d'un grand nombre d'ovocytes fécondés par animal. En parallèle, des

mâles vasectomisés ont été accouplés avec des femelles « mères-porteuses » afin de les préparer à la gestation.

Nous avons ensuite tenté de réimplanter les embryons non modifiés chez les mères-porteuses. La chirurgie de réimplantation a été mise au point en parallèle de la vérification de la viabilité des embryons ex-utéro. Pour l'instant aucune naissance issue d'une réimplantation n'a été obtenue mais ce projet d'équipe à long terme se poursuit et demande une maîtrise technique et une optimisation de chaque étape du protocole qu'il faut adapter pour le modèle du hamster. C'est pourquoi, ma participation à l'élaboration de cette technique et les compétences acquises sont une grande plus-value pour moi et ont permis de faire avancer mon équipe dans le développement d'un modèle de hamster génétiquement modifié.

### *Conclusion*

Ces travaux de thèse ont montré que les variations mélatoninergiques de T3 dans l'hypothalamus régulent l'expression de RFRP-3 en agissant sur des récepteurs TR $\alpha$  non-neuronaux, potentiellement tanycytaires. Les variations saisonnières du nombre de neurones à RFRP-3 ne semblent pas dépendre de la neurogenèse hypothalamique. Finalement, le développement de modèles saisonniers génétiquement modifiés est essentiel pour mieux comprendre les mécanismes du contrôle saisonnier de la reproduction et du rôle du RFRP-3 dans cette régulation.

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis une meilleure compréhension des mécanismes neuroendocriniens par lesquels la mélatonine régule les fonctions reproductives et a contribué au développement de nouveaux modèles animaux adaptés pour les études saisonnières.



# Sommaire

## Mécanismes neuroendocrines du contrôle saisonnier de la reproduction, un pas vers des modèles génétiquement modifiés

Liste des abréviations.....	1
Liste des figures .....	3
<b>Introduction .....</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre 1: Environnement, saisons et adaptations .....</b>	<b>7</b>
<b><i>I- Des rythmes dans l'environnement .....</i></b>	<b>8</b>
1- Des rythmes sur terre .....	8
2- Qu'est-ce qu'un rythme biologique ? .....	9
3- Des changements environnementaux aux rythmes des saisons .....	9
<b><i>II- L'adaptation des organismes aux rythmes saisonniers de l'environnement .....</i></b>	<b>11</b>
1- Des adaptations comportementales, physiologiques et phénotypiques .....	11
a- Migration .....	11
b- Hibernation .....	12
c- Activité métabolique .....	13
d- Pelage .....	15
e- Reproduction .....	16
2- Un timing de reproduction réglé comme une horloge .....	16
a- La synchronisation par les facteurs environnementaux .....	18
b- L'effet du mâle sur l'ovulation .....	19
c- Lactation et diapause, des mécanismes de blocage de la reproduction .....	19
d- L'activation photoréfractaire, un mécanisme de synchronisation endogène .....	20

3- L'impact de l'activité humaine sur les adaptations saisonnières .....	20
a- Les changements climatiques .....	21
b- La pollution lumineuse nocturne .....	22

## **Chapitre 2 : Horloge et calendrier neuroendocrine, mélatonine .....24**

### ***III- Une horloge endogène synchronisée par les rythmes de l'environnement .....25***

1- Des rythmes endogènes chez toutes les espèces du vivant .....	25
2- Les noyaux suprachiasmatiques : horloge centrale circadienne .....	28
3- La mélatonine : horloge circadienne et calendrier saisonnier .....	28
a- La production nocturne de mélatonine .....	28
b- Un calendrier neuroendocrine des saisons .....	30

### ***IV- L'intégration du signal saisonnier dans le système nerveux central des mammifères ..32***

1- La mélatonine, messager principale pour le contrôle saisonnier de la reproduction .....	32
2- La <i>pars tuberalis</i> , un rôle central dans l'intégration du message mélatoninergique .....	33
a- La mélatonine agit sur des récepteurs localisés dans la <i>pars tuberalis</i> .....	33
b- Le contrôle mélatonine-dépendant de la production de TSH $\beta$ .....	33
3- Les hormones thyroïdiennes, relais saisonnier de la mélatonine dans l'hypothalamus .....	35
a- Les tanocytes au cœur de la régulation de la balance thyroïdienne .....	35
b- L'hypothalamus, le centre de traitement de l'information environnementale photopériodique .....	36

## **Chapitre 3 : Reproduction, neuropeptides hypothalamiques, hormones thyroïdiennes .....38**

<b>V-</b>	<b><i>L'axe reproducteur, une cible du message saisonnier</i></b> .....	<b>39</b>
1-	L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (axe HPG) .....	39
2-	La kisspeptine et le RFRP-3, des neuromodulateurs en amont des neurones à GnRH .....	40
a-	Kisspeptine .....	40
b-	RFRP-3 .....	41
c-	Le rôle de la Kp et du RFRP-3 dans l'induction du pic préovulatoire de LH .....	44
<b>VI-</b>	<b><i>La régulation saisonnière de l'axe reproducteur par les hormones thyroïdiennes</i></b> .....	<b>45</b>
1-	La production locale des hormones thyroïdiennes et leurs mécanismes d'action .....	45
2-	Une action des hormones thyroïdiennes directement sur les neurones à GnRH ? .....	48
3-	Une action des hormones thyroïdiennes <i>via</i> une régulation de la Kp et/ou du RFRP-3 .....	49
a-	La régulation saisonnière de Kp .....	49
b-	Régulation saisonnière de RFRP-3 .....	52
	<b>Chapitre 4 : Neurogenèse tanycytaire, modèles animaux génétiquement modifiés</b> .....	<b>58</b>
<b>VII-</b>	<b><i>L'hypothèse du contrôle thyroïdien de la reproduction via une neurogenèse hypothalamique saisonnière</i></b> .....	<b>59</b>
1-	Les tanocytes, des cellules au cœur de l'intégration du message saisonnier dans l'hypothalamus .....	59
a-	Une structure plastique à l'interface cerveau-périphérie .....	59
b-	Une sensibilité à la photopériode .....	60
c-	Une niche neurogénique .....	61
2-	Une neurogenèse saisonnière sous le contrôle des hormones thyroïdiennes ? .....	61

<b>VIII- Quels modèles pour étudier les rythmes saisonniers ? .....</b>	<b>66</b>
1- Les espèces saisonnières et non-saisonnières .....	66
a- Les espèces saisonnières .....	66
b- Le rat et la souris, modèles d'étude des fonctions « saisonniers » ? .....	67
2- Le développement de nouveaux modèles génétiquement modifiés .....	70
a- La souris comme modèle pour l'étude des rythmes saisonniers .....	70
b- Des modèles saisonniers génétiquement modifiés par la méthode CRISPR/Cas9 .....	71
<b>Objectifs et projets de thèse .....</b>	<b>75</b>
PROJET 1: La régulation des neuropeptides hypothalamiques de la reproduction par la T3 .....	75
PROJET 2 : La neurogenèse saisonnière hypothalamique chez le hamster syrien .....	75
PROJET 3 : Développement de modèles génétiquement modifiés pour l'étude des rythmes saisonniers ..	76
<b>PROJET 1 : Rôle des TR<math>\alpha</math> dans la régulation des neuropeptides hypothalamiques de la reproduction par la T3 .....</b>	<b>81</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>83</b>
1- Animaux	
a- Caractéristique des souches de souris .....	83
b- Protocole d'exposition des souris .....	83
2- Prélèvement des tissus .....	84
a- Euthanasie au CO <sub>2</sub> .....	84
b- Prélèvements sang, testicules, vésicules séminales .....	84
c- Fixation des tissus par perfusion intra-cardiaque et récupération du cerveau dans le fixateur.	84
3- Préparation des coupes de cerveau .....	85

a-	Déshydratation des cerveaux à l'alcool .....	85
b-	Enrobage en PEG .....	85
c-	Coupe des cerveaux au microtome et montage sur lame .....	85
4-	Hybridation <i>in situ</i> non-radioactive .....	86
a-	Principe de l'hybridation <i>in situ</i> .....	86
b-	Fabrication des ribosondes marquées .....	87
c-	Pré-hybridation des coupes .....	87
d-	Hybridation des ribosondes sur le tissu .....	87
e-	Post-fixation et détection des ribosondes .....	88
5-	Immunohistochimie .....	89
a-	Principe de l'immunohistochimie .....	89
b-	Préparation des coupes pour l'immunohistochimie .....	90
c-	Immunomarquage simple .....	90
6-	Doubles marquages .....	93
a-	Marquage TR $\alpha$ et <i>Rfrp</i> .....	93
b-	Marquage TR $\alpha$ et GFAP .....	94
c-	Marquage TR $\alpha$ et Vimentine .....	94
7-	Observation et analyse du signal .....	94
8-	Analyse statistique des résultats .....	95
	<b>Résultats</b> .....	<b>96</b>
	Variations photopériodiques de la voie TSH $\beta$ /T3/neuropeptides RF-amides chez des souris produisant (CBA) ou non (C57BL/6J) de la mélatonine .....	96
	Effets de la mélatonine exogène sur la voie TSH $\beta$ /T3/neuropeptides RF-amides chez des souris mutées (Thra0/0) ou non (contrôles, Thra+/+) pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR $\alpha$ .....	98
	Effet direct ou indirect de la T3 sur les neurones à RFRP-3 .....	100



Discussion .....	103
<b>PROJET 2 : La néogenèse saisonnière hypothalamique chez le hamster syrien.....</b>	<b>106</b>
Matériel et méthodes .....	108
1- Animaux .....	108
a- Stabulation et protocole d'exposition des hamsters .....	108
b- Protocole d'injection de la BrdU .....	108
2- Prélèvement des tissus .....	110
3- Traitement et préparation des coupes de cerveau .....	111
a- Traitement des cerveaux pour l'étude de la prolifération et mort cellulaire .....	111
b- Traitement des cerveaux pour l'étude de la différenciation cellulaire .....	111
4- Immunohistochimie BrdU et Caspase-3 .....	112
a- Préparation des coupes pour l'IHC .....	112
b- Immunomarquage simple .....	113
5- Double marquages BrdU et protéines candidates .....	113
6- Observation et analyse du signal .....	114
7- Analyse statistique des résultats .....	114
<b>Résultats .....</b>	<b>116</b>
Evaluation de la réponse physiologique des hamsters syriens au changement de photopériode .....	116
Evaluation de la prolifération cellulaire dans la SVZ, la SGZ et l'hypothalamus au cours d'une transition entre deux photopériodes chez le hamster syrien .....	117
Evaluation de l'apoptose dans l'hypothalamus au cours d'une transition entre deux photopériodes chez le hamster syrien .....	120
Identification des cellules néoformées intégrées dans les réseaux hypothalamiques .....	122

Discussion .....	123
<b>PROJET 3 : Développement de modèles génétiquement modifiés pour l'étude des rythmes saisonniers</b> .....	<b>126</b>
<u>PROJET 3A : Etude de l'intégration photopériodique chez des souris MSMxC57/BL6J</u> .....	128
Matériel et méthodes .....	128
1- Animaux .....	128
2- Prélèvement des tissus, préparation des coupes de cerveau .....	128
3- HIS et IHC, analyse du signal .....	128
Résultats .....	129
Intégration photopériodique physiologique et neuroendocrine chez les souris MSMxC57 .....	129
<u>PROJET 3B : Premières étapes de développement d'un modèle de hamster syrien génétiquement modifié</u> .....	131
Matériel et méthodes .....	131
1- Théorie de la technique d'édition de génome par CRISPR/Cas9 .....	131
2- Animaux .....	133
3- Préparation des femelles .....	133
4- Prélèvement des embryons .....	134
5- Réimplantation des embryons .....	136
Résultats .....	138
Discussion des résultats des projets 3A et 3B .....	138
<b>Discussion générale et perspectives</b> .....	<b>143</b>
I- <i>L'étude des cibles hypothalamiques des hormones thyroïdiennes</i> .....	<b>143</b>

1- L'expression de <i>Rfrp</i> mais pas celle de <i>Kiss1</i> est régulée par la mélatonine chez la souris .....	144
2- L'expression de <i>Rfrp</i> est régulée par la mélatonine <i>via</i> des récepteurs TR $\alpha$ non-neuronaux .....	146
a- Une compensation par le TR $\beta$ .....	147
b- Une régulation <i>via</i> des cellules gliales avoisinant les neurones à RFRP-3 ? (Figure 53-1) ...	148
c- Une régulation <i>via</i> la plasticité des prolongements tanycytaires ? (Figure 53-2) .....	148
d- Une régulation <i>via</i> des phénomènes de neurogenèse ? (Figure 53-3) .....	150

## ***II- L'étude de la neurogenèse hypothalamique saisonnière chez le hamster syrien .....150***

1- La prolifération cellulaire augmente en PC chez le hamster syrien .....	150
2- Y a-t-il un rôle de la neurogenèse dans le contrôle des fonctions saisonnières de la reproduction et/ou du métabolisme ? .....	152

## ***III- Le rôle du RFRP-3 dans le contrôle saisonnier de la reproduction .....153***

1- Le RFRP-3 est impliqué dans la synchronisation de la reproduction .....	153
2- Le rôle potentiel du RFRP-3 entre la reproduction et le métabolisme .....	154
3- Le rôle potentiel du RFRP-3 sur l'effet du stress sur le contrôle de la reproduction .....	157
4- Conclusion .....	158

## **Conclusion Générale .....160**

## **Références bibliographiques.....163**

## **Article.....196**

## Liste des abréviations

### A

$\alpha$  -GSU : sous-unité glycoprotéique  $\alpha$   
AANAT : sérotonine N-acétyltransférase  
ARC : noyau arqué

### B

$\beta$ -NGF : la sous-unité  $\beta$  du facteur de croissance nerveuse

### C

CRISPR/Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ associated protein Caspase 9

### D

D: période nocturne  
Dio : diodine  
DMH : hypothalamus dorso-médian

### E

EYA3 : eye absent 3

### F

FSH : hormone folliculo-stimulante

### G

GnRH : gonadolibérine (Gonadotropin-Releasing Hormone)  
GnIH : Gonadotropin-Inhibitory Hormone  
GONAD : Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery  
GPR147 : récepteur du RFRP-3  
GPR54 : récepteur de la Kp

### H

hCG : human chorionic gonadotropin  
HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransferase  
(axe) HPG : axe hypothalamo-hypophysogonadique

### I

IHC : immunohistochimie  
IML : cellules intermédiolatérales  
IP : injection intra-péritonéale  
ISH : hybridation *in situ*

### K

KI, KO : Knock-In, Knock-Out  
*Kiss1* : gene codant la kisspeptine  
Kp : kisspeptin

### L

L: période diurne  
LAT : L-amino acid transporter  
LH : hormone lutéinisante  
LH-RH : LH releasing hormone

### M

MBH : hypothalamus médiobasal  
MCT : monocarboxylate anion transporter  
MT1/2 : récepteurs à la mélatonine

### N

NSC : Noyau suprachiasmatique

### O

OATP : organic anion-transporting polypeptides

### P

PC/PL : Photopériode courte/longue  
PMSG : pregnant mare serum gonadotropin  
POA : aire préoptique  
PVN : noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus  
RXR : récepteur X aux rétinoïdes

## **R**

RALDH1 : retinaldehyde dehydrogenase 1

RFRP : RF-related peptide

*Rfrp* : gène codant le RFRP-3

rT3 : reverse T3

RXR : récepteur à l'acide rétinoïque

## **S**

SCG : ganglions cervicaux supérieurs

SGZ : zone sub-granulaire

Shh : Sonic hedgehog

SIX1 : sine oculis homeobox1

SVZ : zone sub-ventriculaire

## **T**

T2 : diiodothyronine

T3 : triiodothyronine

T4 : thyroxine

TEF : thyrotroph embryonic factor

TR : récepteur aux hormones thyroïdiennes

TRE : TH-responsive element

TRH : thyroïdolibérine (Thyroid-Releasing Hormone)

TSH : thyroïdostimuline (thyroid stimulated hormone)

TSH $\beta$  : sous-unité  $\beta$  de la TSH

TSH-R : Récepteur à la TSH

## **U**

UI : unité internationale

## **V**

VMH : hypothalamus ventro-médian

## Liste des figures et tableaux

**Figure A** : Modèle hypothétique de la régulation saisonnière dépendante de la mélatonine des neurones à RFRP-3 par l'action de la T3 sur des récepteurs TR $\alpha$  tanyctaires

**Figure 1** : La révolution de la terre autour du soleil et sa rotation autour de son axe incliné à l'origine des saisons

**Figure 2** : Paramètres descriptifs d'un rythme biologique circadien

**Figure 3** : Répartition des zones climatiques en fonction de leur exposition aux rayons solaires

**Figure 4** : Cycles d'éveil-torpeur et de température au cours de l'hibernation

**Figure 5** : Variation saisonnière du pelage, du poids corporel et de la prise alimentaire chez le hamster sibérien

**Figure 6** : Variation de la couleur du pelage chez quelques espèces saisonnières

**Figure 7** : Synchronisation de la période de reproduction par la photopériode

**Figure 8** : Variations photopériodiques du volume des gonades chez le hamster syrien

**Figure 9** : Altération des adaptations saisonnières par le réchauffement climatique et la pollution lumineuse

**Figure 10** : Extrait et modélisation des expériences de Jean-Jacques d'Ortous de Mairan

**Figure 11** : Horlogium florae de Carl von Linné

**Figure 12** : Photo de Michel Siffre lors de sa deuxième expérience « hors du temps » pendant 205 jours en 1972 dans une cave au Texas

**Figure 13** : Schéma de la voie photoneuroendocrine régulant la production de mélatonine

**Figure 14** : Variation de la production de mélatonine chez des mammifères en photopériode longue ou courte

**Figure 15** : Modèle proposé pour la régulation photopériodique de *TSH $\beta$*  par *Eya3*

**Figure 16** : Régulation de la voie *TSH $\beta$* -T3 par la mélatonine chez un reproducteur de jours longs (hamster sibérien) et un reproducteur de jours courts (mouton)

**Figure 17** : Fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique (axe HPG)

**Figure 18** : Modulation de l'axe HPG par les neurones à kisséptine et RFRP-3

**Figure 19** : Induction du pic de LH coordonnée par la kisséptine et le RFRP-3

**Figure 20** : Régulation photopériodique des hormones thyroïdiennes par les déiodinases

**Figure 21** : Fonctionnement des récepteurs nucléaires à la T3

**Figure 22** : Contrôle saisonnier de la libération de GnRH par la plasticité des pieds tanyctaires

**Figure 23** : Expression photopériodique de *Kiss1* différente chez les mammifères

**Figure 24** : Expression photopériodique de *Rfrp* conservée chez les mammifères

**Figure 25** : Régulation des neurones à kisspeptine et RFRP-3 par les variations photopériodiques de T3 sous le contrôle de la mélatonine

**Figure 26** : Plasticité des prolongements tanycytaires

**Figure 27** : Variations photopériodiques de la neurogenèse dans l'hypothalamus du mouton

**Figure 28** : Production nocturne de mélatonine chez la souris

**Figure 29** : Effet de l'administration de mélatonine chez des souris C57BL/6J

**Figure 30** : Fonctionnement du système CRISPR/Cas9

**Figure 31** : Schéma illustrant le dépôt d'anticorps et l'incubation des lames en chambre humide

**Figure 32** : Principe de l'immunohistochimie amplifiée par un système avidin-biotine et de l'immunofluorescence

**Figure 33** : Effet de la photopériode sur l'expression de *TSH*, *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris CBA et C57BL/6J

**Figure 34** : Effet de la mélatonine exogène sur l'expression de  $TSH\beta$ , *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris C57BL/6J porteuse (*Thra0/0*) ou non (*Thra+/+*) d'une mutation générale du  $TR\alpha$

**Figure 35** : Expression du  $TR\alpha$  dans l'hypothalamus de souris et co-marquage avec le RFRP-3

**Figure 36** : Effet de la mélatonine exogène sur l'expression de  $TSH\beta$ , *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris C57BL/6J porteuse (*Cre3xThraAMI/+*) ou non (*ThraAMI/+*) d'une mutation restreinte dans les neurones du  $TR\alpha$  et double immunohistochimie de  $TR\alpha$  et vimentine chez des souris C57BL/6J.

**Figure 37** : Protocole d'injection de BrdU chez des hamsters mâles transférés d'une photopériode courte (PC, 10hL/14hD) à une photopériode longue (PL, 14hL/10hD)

**Figure 38** : Protocole d'injection de BrdU chez des hamsters mâles transférés d'une photopériode longue (PL) à une photopériode courte (PC)

**Figure 39** : Schéma illustrant le système d'épuisette sur des plaques à 12 puits utilisées pour l'immunohistochimie en coupes flottantes

**Figure 40** : Masse des testicules (A) et des vésicules séminales (B) de hamsters syriens à différents temps après la transition d'une photopériode courte (PC) à une photopériode longue (PL) et inversement

**Figure 41** : Prolifération cellulaire dans l'hypothalamus au cours d'une transition photopériodique chez le hamster syrien

**Figure 42** : Prolifération cellulaire dans la zone sub-ventriculaire (SVZ) et sub-granulaire (SGZ) au cours des transitions photopériodiques chez le hamster syrien

**Figure 43** : Expression de la caspase-3 activée dans l'hypothalamus au cours d'une transition photopériodique chez le hamster syrien

**Figure 44** : Doubles marquages immunohistochimiques de la BrdU avec RFRP-3, la Kp et la somatostatine (C)

**Figure 45** : Effet de la photopériode sur la masse des testicules et des vésicules séminales chez des souris MSMxC57

**Figure 46** : Effet de la photopériode sur l'expression de  $TSH\beta$ , *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris MSMxC57BL/6J

**Figure 47** : Protocole de la technique d'édition de génome par CRISPR/Cas9 chez le hamster syrien

**Figure 48** : Protocole de préparation des femelles donneuses et receveuses d'embryons chez le hamster syrien

**Figure 49** : Photographie et représentation schématique de la région péri-ovarienne du rongeur

**Figure 50** : Incision et extraction de l'oviducte chez des hamsters femelles pseudo-gestantes anesthésiées pour une réimplantation embryonnaire

**Figure 51** : Implantation des embryons dans l'ampoule des femelles pseudo-gestantes à l'aide d'un capillaire

**Figure 52** : Expression de Kiss1 et de Rfrp respectivement indépendante et dépendante de la mélatonine chez la souris CBA et C57BL/6J

**Figure 53** : Figure récapitulative des résultats du Projet 1 chez les souris C57BL/6J mutée ou non pour le TR $\alpha$

**Figure 54** : Figure illustrant les différentes hypothèses proposées pour expliquer la régulation des neurones à RFRP-3 par la T3 *via* les TR $\alpha$

**Figure 55** : Photographie d'un double marquage immunohistochimique de vimentine et RFRP-3

**Figure 56** : Effet orexigénique d'une injection centrale de RFRP-3 chez la gerboise

**Figure 57** : L'activation des neurones à RFRP-3 augmente ponctuellement lors d'un stress aigu

**Tableau 1** : Régulation de la kisspeptine (Kp) par la photopériode, la mélatonine et les stéroïdes sexuels et effet des injections de Kp chez les mammifères

**Tableau 2** : Régulation du RFRP-3 par la photopériode, la mélatonine et les stéroïdes sexuels et effet des injections de RFRP-3 chez les mammifères

**Tableau 3** : Liste des ribosondes utilisées pour l'hybridation *in situ*

**Tableau 4** : Composition des solutions utilisées pour la fixation, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie

**Tableau 5** : Liste des anticorps utilisés pour l'immunohistochimie et leur dilution

**Tableau 6** : Composition du milieu de culture des embryons de hamsters HECM-9 (d'après Li et al., 2018)



# *Introduction*



**Jardin des plantes, Paris**

-

**Printemps**

# **Mécanismes neuroendocrines du contrôle saisonnier de la reproduction, un pas vers des modèles génétiquement modifiés.**

## ***Introduction***

Au cours de cette thèse j'ai étudié des mécanismes biologiques à différents niveaux ; moléculaire, cellulaire, tissulaire, comportemental. J'ai également abordé des disciplines différentes, dont la neuroendocrinologie, la chronobiologie, la génétique, la physiologie et l'éthologie.

Cette pluridisciplinarité est nécessaire pour faire le lien entre les adaptations des organismes observées dans le monde du vivant et la compréhension des mécanismes génétiques, moléculaires et cellulaires qui les sous-tendent. C'est également cette pluridisciplinarité qui a été le fil conducteur de la rédaction de ce manuscrit de thèse.

# *Chapitre 1*

## **Environnement**

---

### **Saisons**

---

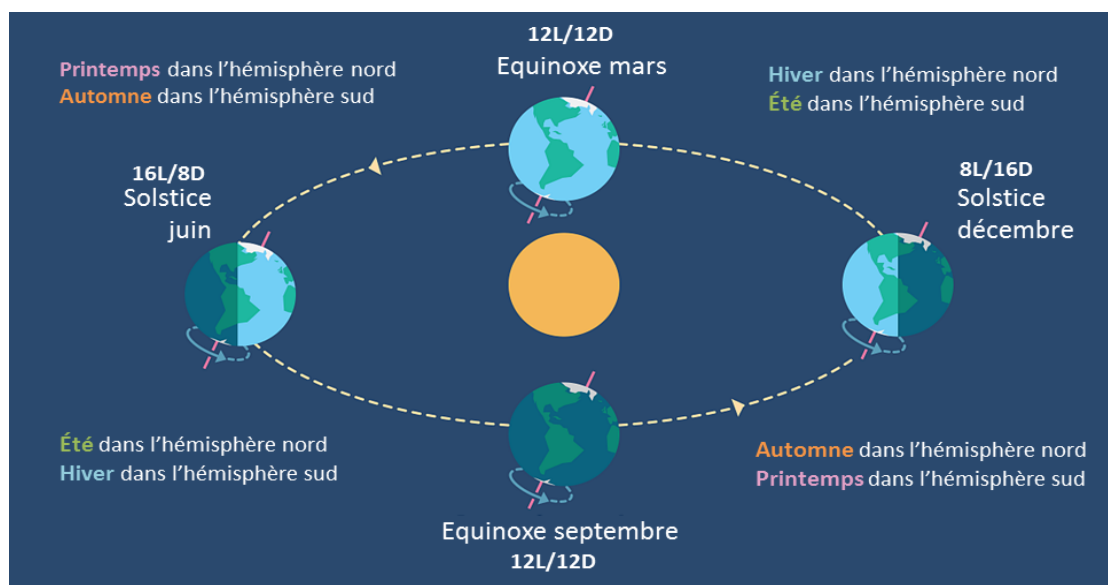
## **Adaptations**

## I- Des rythmes dans l'environnement

### 1- Des rythmes sur terre

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements », cette phrase célèbre de Darwin, considéré comme le père de la théorie de l'évolution, résume parfaitement la complexité du monde du vivant. L'évolution résulte d'une combinaison entre des mutations génétiques aléatoires, et une sélection naturelle des traits phénotypiques, physiologiques ou comportementaux les plus avantageux aboutissant à l'adaptation des organismes à leur environnement. La fixation d'un trait évolutif est essentiellement conditionnée par le bénéfice énergétique qu'il apporte, optimisant la survie et la pérennité de l'espèce. Cependant l'approvisionnement en énergie n'est pas constant et présente des cycles journaliers et annuels induits par les cycles géophysique terrestres. Aussi, un trait évolutif observé chez la grande majorité, sinon tous les organismes, est la présence de **rythmes biologiques** journaliers et saisonniers qui assurent l'adaptation temporelle des espèces à leur environnement cyclique.

D'un point de vue géophysique, la terre tourne sur elle-même en 24 heures (24h) avec un axe de rotation passant par les pôles nord et sud, incliné selon un angle de  $23,5^\circ$  tout en parcourant une ellipse autour du soleil pendant une durée de 365 jours. Ainsi, la durée d'ensoleillement journalière au niveau des hémisphères nord et sud varie en fonction de la position de la terre vis-à-vis du soleil au cours de l'année (Figure 1). La rotation de la terre autour de son axe et sa révolution autour du soleil sont à l'origine des rythmes terrestres journaliers (alternance jour/nuit) et annuels (rythmes saisonniers).



**Figure 1 :** La rotation de la terre autour du soleil et de son axe incliné à l'origine des saisons

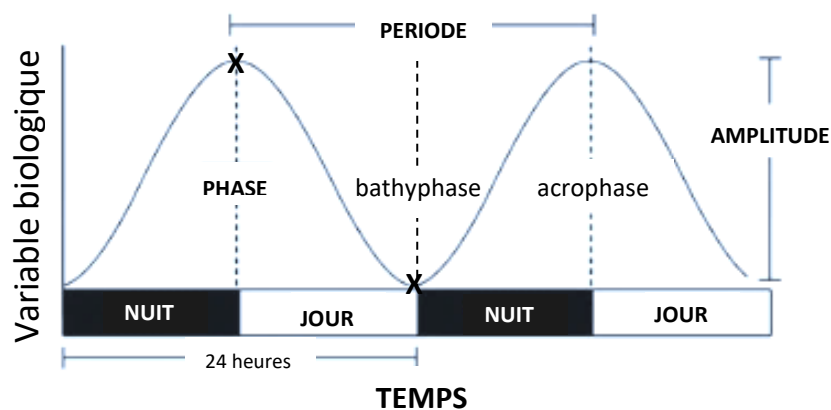
La trajectoire de la terre autour du soleil et sa rotation sur elle-même autour d'un axe incliné selon un angle de  $23,5^\circ$ , induit des variations d'ensoleillement à l'origine des rythmes journaliers et saisonniers. Les équinoxes et solstices marquent le passage d'une saison à l'autre. L=lumière/D=obscurité

## 2- Qu'est-ce qu'un rythme biologique ?

D'après l'encyclopédie Larousse, un rythme, du grec *rhythmos*, signifiant la cadence, se définit comme le retour d'un fait ou phénomène à des intervalles réguliers dans le temps. La durée de cet intervalle est appelée la période. Dans le monde du vivant, trois types de rythmes biologiques sont décrits en fonction de la durée de leur période :

- Les rythmes ultradiens (du latin *ultra diem*, avec une fréquence « supérieure à un jour »), ont une période inférieure à 20 heures, souvent de quelques secondes à quelques heures (par exemple le rythme pacemaker des cellules cardiaques, la sécrétion pulsatile de certaines hormones)
- Les rythmes infradiens (du latin *infra diem*, avec une fréquence « inférieure à un jour »), ont une période supérieure à 28 heures, souvent de quelques jours à plusieurs mois (par exemple les cycles menstruels, les cycles annuels)
- Les rythmes circadiens (du latin *circa diem*, « environ un jour »), ont une période de 20 à 28 heures (par exemple, le cycle sommeil/veille, la température corporelle).

Outre la période, deux autres paramètres décrivent un rythme : la phase, qui correspond à un point particulier du cycle (la bathyphase équivaut à la valeur la plus basse, et l'acrophase, le point le plus haut) et l'amplitude, qui correspond à la différence entre les valeurs de la bathyphase et de l'acrophase (Silver and Rainbow, 2013 ; Figure 2).



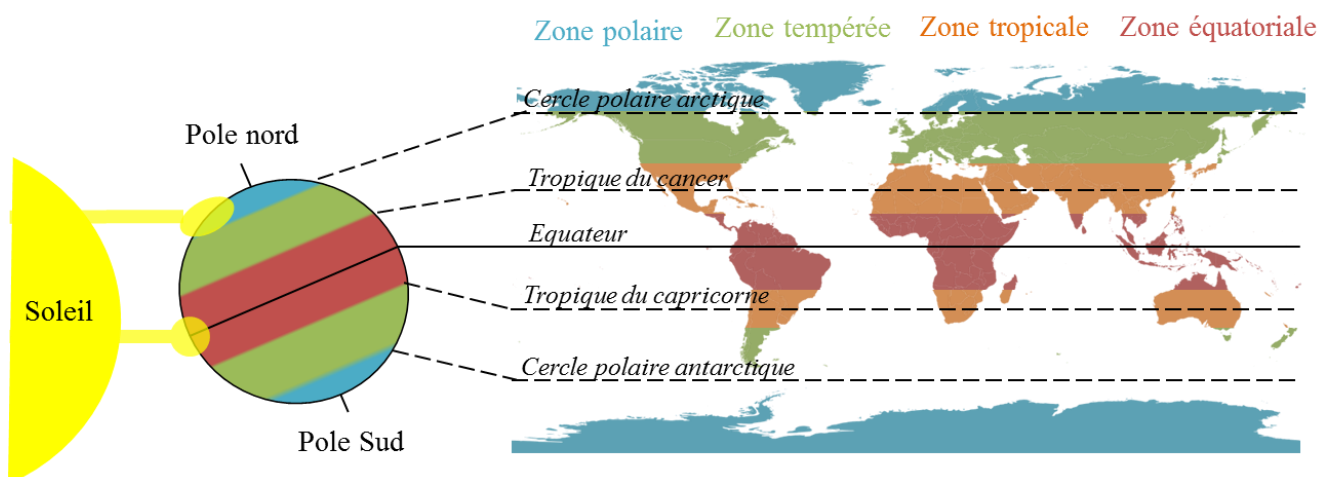
**Figure 2 :** Paramètres descriptifs d'un rythme biologique circadien

Un rythme biologique est un phénomène cyclique décrit par sa période (qui lorsqu'elle est proche de 24h correspond à un rythme circadien), sa phase et son amplitude.

## 3- Des changements environnementaux aux rythmes des saisons

Les cycles géophysiques annuels induisent des variations de paramètres climatiques comme la luminosité, la température et l'humidité, avec des différences notables selon la latitude. Ainsi, les zones terrestres équatoriales, tropicales, tempérées et polaires n'ont pas les mêmes climats car elles sont

exposées de façon différente aux rayons du soleil (Figure 1 et 3). Les changements annuels de l'environnement dépendent de deux paramètres principaux : la durée journalière d'exposition au soleil (aussi appelée photopériode) et l'énergie lumineuse reçue par unité de surface selon l'angle d'inclinaison des rayons solaires par rapport à la terre. Dans **les zones tempérées**, ces différentes expositions lumineuses définissent 4 **saisons**. L'été, la photopériode est longue et l'énergie solaire est forte car les rayons du soleil sont quasiment à la verticale du sol, ce qui donne un climat chaud et généralement humide. L'hiver, la photopériode est courte et l'énergie solaire est plus faible car les rayons du soleil sont obliques, ce qui donne un climat froid et généralement sec. L'automne et le printemps, sont des saisons intermédiaires où le climat est plus variable. La transition d'une saison à l'autre correspond au passage de la terre à l'une des 4 positions notables de son ellipse autour du soleil (Figure 1). Le solstice d'été correspond au jour de l'année où la photopériode est la plus longue et marque le passage du printemps à l'été, et le solstice d'hiver correspond au jour de l'année où la photopériode est la plus courte et marque le passage de l'automne à l'hiver. Les équinoxes correspondent à une période de l'année où la durée du jour et de la nuit est identique en tout point du globe et ils marquent le début de l'automne et du printemps. Dans les régions tropicales, l'année est divisée en deux saisons dépendantes de la pluviométrie : la saison sèche et la saison humide (ou saison des pluies). Dans les régions polaires, les rayons du soleil atteignent la terre avec un angle fortement incliné (Figure 3), ils apportent moins d'énergie lumineuse et le climat est froid toute l'année. Dans ces régions, pendant les jours précédant et suivant le solstice d'hiver, le soleil n'est pas visible, donnant lieu à des nuits polaires tandis qu'aux alentours du solstice d'été le soleil est constamment visible, donnant lieu à des jours polaires.



**Figure 3 :** Répartition des zones climatiques en fonction de leur exposition aux rayons solaires

Sur la terre on peut séparer quatre principales zones climatiques selon la durée d'ensoleillement journalière et l'angle avec lequel les rayons du soleil atteignent la surface de la terre : les zones polaires, tempérées, tropicales et équatoriales.



Les cycles géophysiques annuels exercent une forte pression de sélection en induisant des **changements climatiques** drastiques conduisant à de grandes variations annuelles de la disponibilité en nourriture dans certaines zones du globe. Anticiper, se synchroniser et s'adapter aux variations annuelles de l'environnement sont des actions essentielles à la survie de nombreuses espèces dans tous les domaines du vivant. Certaines espèces entreprennent des transformations comportementales et/ou phénotypiques drastiques en réponse aux contraintes exercées par les variations saisonnières de leur environnement.

## *II- L'adaptation des organismes aux rythmes saisonniers de l'environnement*

### *1- Des adaptations comportementales, physiologiques et phénotypiques*

Dans les zones tempérées, les variations saisonnières de luminosité, température, humidité, ressources alimentaires ou encore prédation, induisent une pression qui favorise la sélection des organismes dont des **adaptations saisonnières** assurent efficacement la survie de l'espèce.

Dans le monde animal, plusieurs stratégies existent afin de répondre aux contraintes exercées par les variations saisonnières de l'environnement. Certaines espèces se déplacent vers des zones où les conditions sont plus avantageuses, c'est un comportement migratoire. D'autres espèces hibernent ou entrent en torpeur pour économiser leur énergie lorsque les conditions se détériorent. Finalement certaines espèces font face à ces difficultés grâce à des adaptations métaboliques ou reproductives ou à des transformations phénotypiques avantageuses.

#### *a- Migration*

En hiver, les conditions climatiques difficiles et l'amenuisement des ressources alimentaires augmentent la compétition pour ces ressources et la prédation. De nombreuses espèces animales migrent donc temporairement vers un environnement bénéficiant d'un climat plus favorable avec des ressources plus abondantes, où elles se reproduisent et élèvent leurs progénitures, puis retournent vers leur habitat naturel quand la période d'abondance se termine. Les saumons par exemple se reproduisent dans les cours d'eau douce où les conditions sont plus favorables à la ponte des œufs, les petits migrent ensuite vers la mer où ils trouvent une plus grande richesse en nourriture et un environnement leur permettant de se développer avant de retourner vers l'eau des rivières où ils pourront perpétuer le cycle (Dingle, 2014).

Les espèces migratrices possèdent de grandes capacités d'endurance leur permettant de se déplacer rapidement sur une longue distance. La classe des oiseaux, regroupe de nombreuses espèces capables de migrer sur des kilomètres grâce à leur capacité à voler. Chez les mammifères, le record de la plus longue migration est attribué à la baleine à bosse pouvant parcourir jusqu'à 8500km pour

atteindre des eaux tempérées favorables à leur reproduction. Les comportements migratoires sont également observés chez de nombreuses espèces d'insectes (ex : papillons monarque, criquet pèlerin) ou chez des reptiles comme la tortue luth lors de la saison des pontes (Bowlin et al., 2010).

Cette stratégie adaptative très coûteuse en énergie exerce une forte pression de sélection sur les individus qui, s'ils sont âgés, faibles ou malades, auront du mal à aller au bout du trajet. La migration nécessite souvent des anticipations physiologiques et/ou comportementales. Ainsi, de nombreuses espèces font des réserves de graisse leur permettant de réduire leur alimentation en cours de migration. Les oiseaux peuvent ainsi doubler leur poids avant d'entreprendre un long trajet et le volume du cœur et des muscles liés au vol augmente largement tandis que celui des organes digestifs et reproducteurs s'atrophie afin d'optimiser les dépenses énergétiques (Piersma, 1998).

Les comportements migratoires ne sont pas initiés par les changements de température ou de disponibilité des ressources mais bien souvent par les changements de la photopériode. En effet, des études ont montré que des animaux gardés en condition de lumière artificielle, peuvent migrer dans des directions opposées à celles de leurs congénères en lumière naturelle, au détriment de leurs besoins naturels (Dingle, 2014).

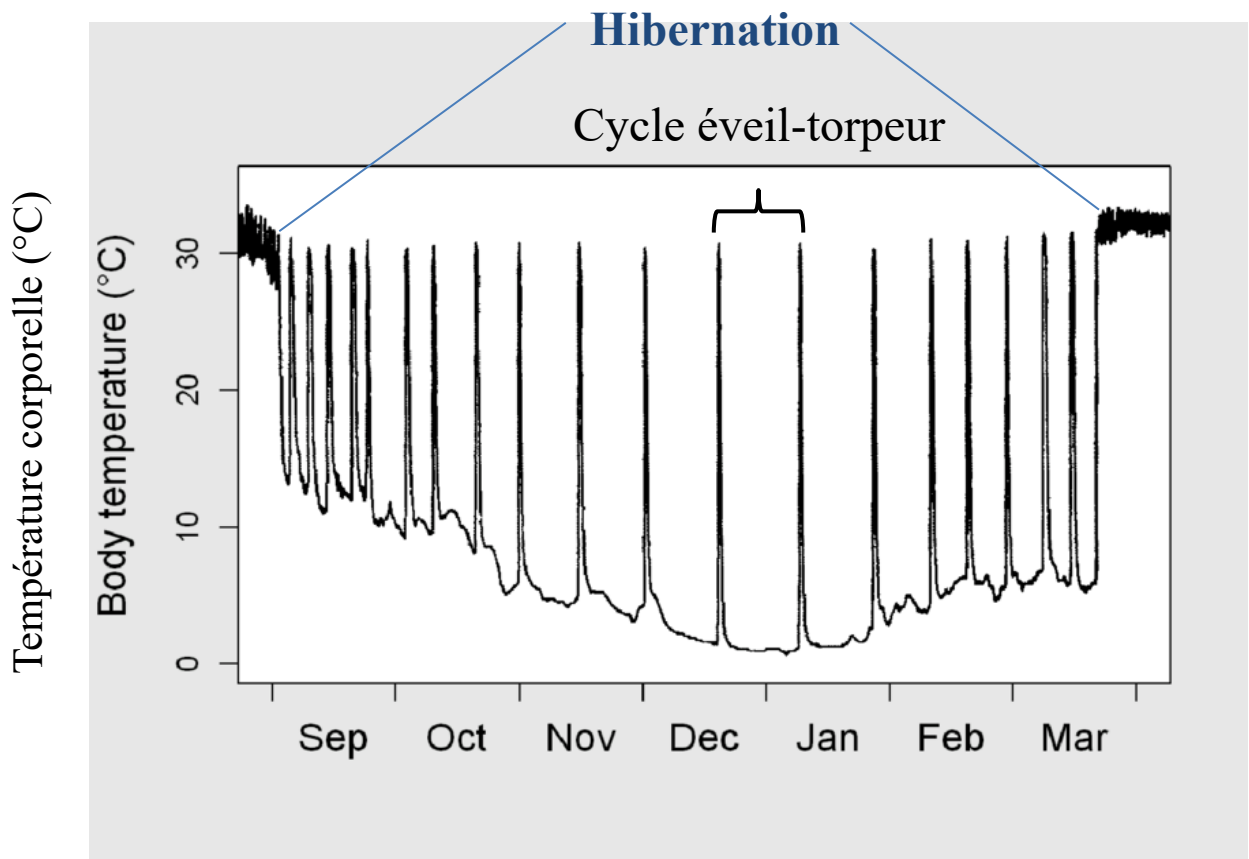
#### b- Hibernation

Certaines espèces restent sur place pendant l'hiver mais adoptent une stratégie de survie visant à réduire les dépenses en hibernant. Pendant l'hibernation l'animal passe par des phases d'hypométabolisme, appelées torpeurs. pendant lesquelles le rythme respiratoire et cardiaque diminue (moins de 6 battements/min chez l'écureuil par exemple), la température corporelle baisse (jusqu'à 0°C chez le loir par exemple) ainsi que la dépense énergétique (Milsom et al., 1999; Nedergaard and Cannon, 1990; Pajunen, 1974, [Figure 4](#)).

La fréquence et l'amplitude des phases de torpeur varient selon les espèces avec des phases pouvant aller de quelques heures à plusieurs semaines. L'alternance des phases de torpeur et d'éveil est souvent dépendante de la température. Ces phases d'hypométabolisme surviennent donc en général la nuit et sont souvent plus longues au milieu de l'hiver quand les températures sont les plus froides.

Pendant les phases d'éveil l'animal peut s'alimenter et même allaiter dans le cas de l'ours par exemple qui donne naissance en hiver et allaite ses petits pendant ses phases d'éveil en attendant leur sortie de la tanière au printemps (Staples, 2016; Walker and Berger, 1980).





**Figure 4 :** Cycles d'éveil-torpeur et de température au cours de l'hibernation

Les animaux hibernants passent par des phases de torpeurs pendant lesquelles la température corporelle chute, accompagnées d'un hypométabolisme. La fréquence et l'amplitude des cycles d'éveil-torpeur varie généralement en fonction de la température externe. Figure adaptée à partir des données d'hibernation chez l'écureuil d'après le papier de Williams et al., 2011.

Comme pour la migration, l'hibernation est souvent précédée d'une augmentation importante des réserves graisseuses afin de stocker l'énergie nécessaire à la survie pendant cette période d'hypométabolisme (Vuarin and Henry, 2014). De nombreux animaux hibernants se réfugient dans un terrier ou un endroit clos pour conserver de la chaleur, d'éventuelles réserves de nourriture et se protéger des prédateurs qui cherchent activement de la nourriture en période hivernale.

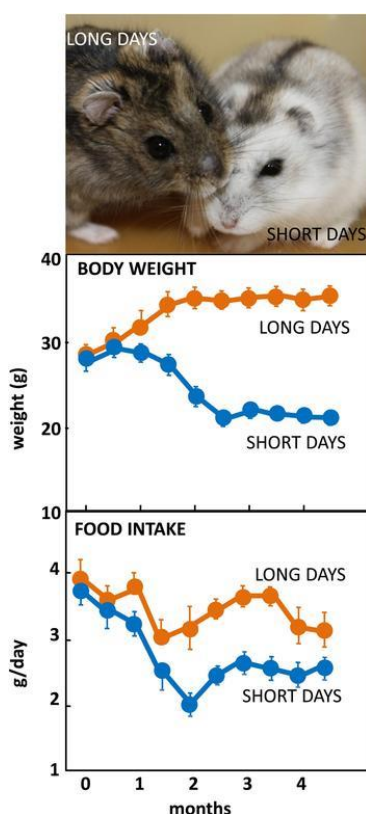
Certaines espèces de reptiles ou d'amphibiens, sensibles à la dessiccation, ont besoin de se protéger de la chaleur plus que du froid. Il existe donc également des comportements d'estivation, un état ressemblant à la torpeur pendant lequel l'animal est en somnolence mais ses fonctions métaboliques et cérébrales restent en vigilance pour assurer le réveil de l'animal (Staples, 2016). L'estivation concerne surtout les espèces vivant dans des zones très arides telles que le crocodile du Nil qui s'enfouit dans la vase pour y trouver de la fraîcheur ou le crapaud du désert, qui forme un cocon humide pour se protéger des fortes chaleurs.

### c- Activité métabolique

Le métabolisme des organismes dépend principalement de la balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique. Ces paramètres peuvent fortement varier en fonction de la saison selon les besoins et la sollicitation de l'organisme à un moment donné (Figure 5).

Dans la nature, l'automne est une période encore abondante en nourriture pendant laquelle de nombreuses espèces prennent du poids afin de faire des réserves énergétiques et augmenter leur chances de survie pendant la période de restriction hivernale (Wade et al., 1986). De plus, comme expliqué précédemment, avant une période de migration ou d'hibernation, les animaux font généralement des réserves de graisses afin de se préparer pour une période de forte dépense énergétique ou de restriction alimentaire (Piersma, 1998; Vuarin and Henry, 2014). Les réserves graisseuses peuvent compenser la diminution de la prise alimentaire en assurant le maintien des fonctions métaboliques de base (John, 2005). Elle sont surtout une formidable réserve énergétique utile à la thermogénèse qui permet aux espèces de se protéger du froid (John, 2005; Young, 1976).

A l'inverse, certaines espèces, comme le hamster sibérien (Travaglio and Ebling, 2019), diminuent leur masse corporelle en augmentant leur activité locomotrice liée à la recherche de nourriture à stocker et en se privant afin de faire des réserves de nourriture pour passer l'hiver (Figure 5). Par ailleurs, la réactivation de plusieurs systèmes lors du passage au phénotype printanier peut être très coûteuse en énergie, c'est pourquoi certaines espèces augmentent leur masse en amont du printemps (Boon et al., 2000; Wade and Bartness, 1984).



**Figure 5 :** Variation saisonnière du pelage, du poids corporel et de la prise alimentaire chez le hamster sibérien

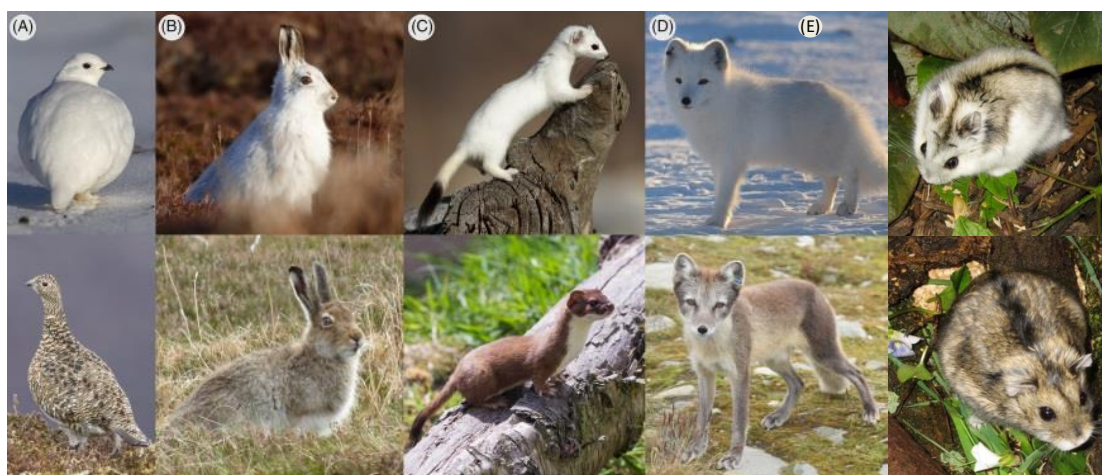
Chez le hamster siberien, le transfert d'une photopériode longue (long days) vers une photopériode courte (short days) se traduit par un blanchiment du pelage, une diminution du poids corporel (body weight) et de la prise alimentaire (food intake). Image issue de Travaglio and Ebling, 2019.

#### d- Pelage

Le pelage fait partie des caractères phénotypiques qui peuvent changer entre les saisons. En automne, la densité de poils augmente suivi d'une perte de poils au printemps. Ce changement de fourrure modifie les échanges thermiques et par conséquent aide l'animal à maintenir une température corporelle stable (Zimova et al., 2018).

Chez certaines espèces vivant dans des régions froides polaires ou montagneuses, la couleur du pelage change également avec les saisons. Ainsi chez l'hermine, le hamster syrien ou encore le lièvre, le pelage s'éclaircit généralement à l'approche de l'hiver, leur permettant de se camoufler facilement dans la neige pour réduire les risques d'attaque par des prédateurs. Si cette adaptation phénotypique se trouve donc principalement chez les petits mammifères comme le hamster sibérien ou le lièvre des montagnes, quelques espèces de prédateurs comme le renard arctique l'ont aussi acquise, afin de leur conférer un avantage dans leur chasse de nourriture (Zimova et al., 2018, Figure 6).

Les mécanismes sous-tendant le changement de couleur de pelage ne sont pas encore entièrement élucidés. Il semblerait néanmoins que ces changements ne soient pas liés à la température ou à la chute de neige mais à la photopériode, avec un pelage qui blanchit en réponse à une diminution de la durée du jour (Kuhlmann et al., 2003).



**Figure 6 :** Variation de la couleur du pelage chez quelques espèces saisonnières

Le changement de la densité du poil et de la couleur du pelage est une stratégie adaptative saisonnière visant à augmenter les chances de survie. En hiver, le blanchiment du pelage permet aux espèces d'être moins visible sur la neige, réduisant ainsi le risque de prédation ou facilitant la chasse pour les prédateurs. (A) lagopède alpin ; (B) lièvre des montagnes ; (C) hermine ; (D) renard arctique ; (E) hamster syrien. Image adaptée de Zimova et al., 2018.

## e- Reproduction

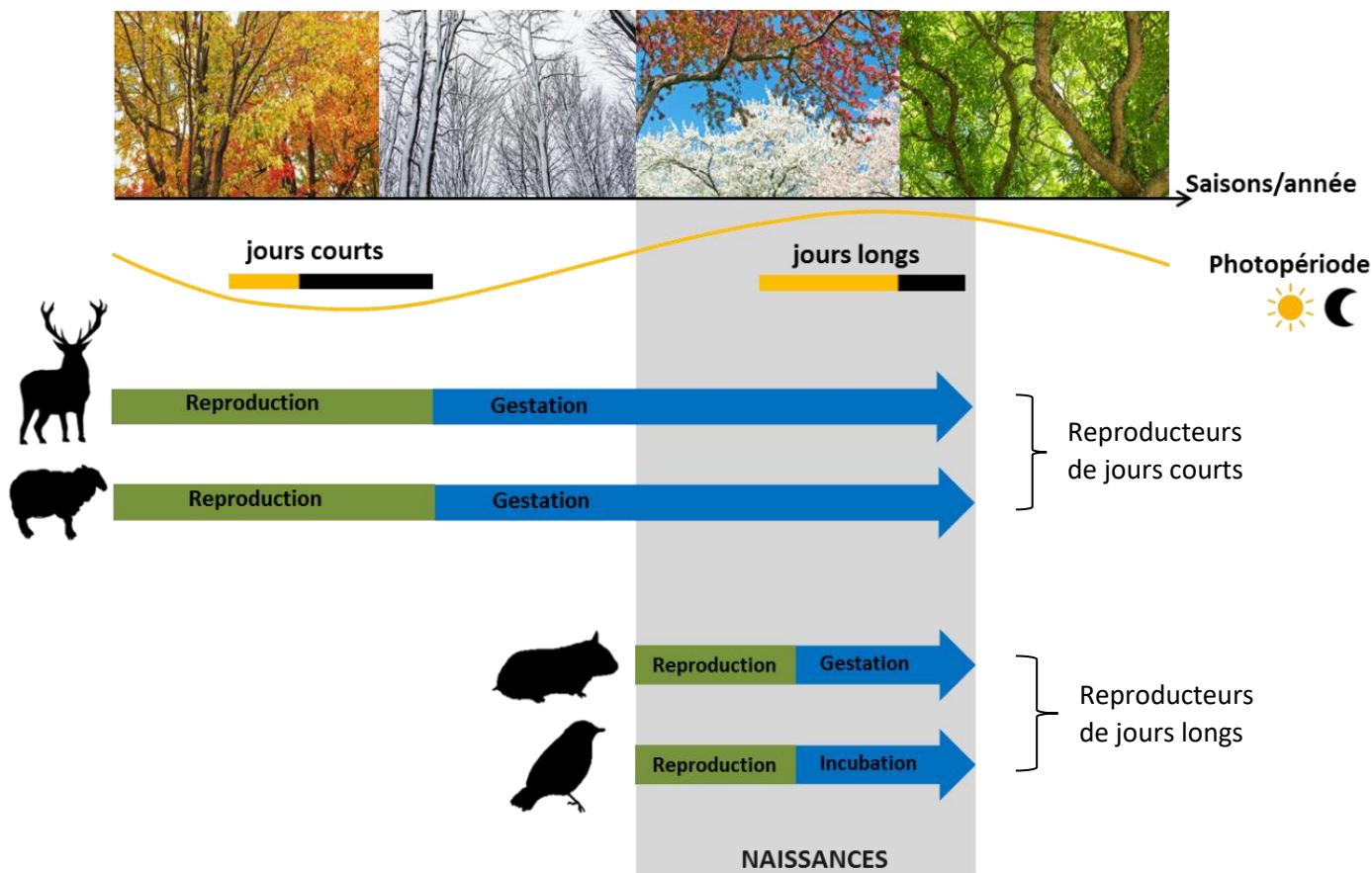
La **synchronisation de la période de reproduction avec la saison** fait partie des adaptations saisonnières les plus observées et les mieux étudiées dans le monde du vivant. Chez les mammifères, la période de reproduction varie d'une espèce à l'autre selon la durée de gestation de la femelle, afin que les petits naissent dans des conditions les plus favorables à leur survie, au printemps ou en été (Hastings et al., 1985, [Figure 7](#)). Pendant ces saisons, le climat est doux, la nourriture est abondante et l'hiver est assez loin pour permettre aux petits de se développer suffisamment pour affronter les conditions hivernales à venir.

Il existe deux principales stratégies de reproduction dans la nature, la stratégie R et la stratégie K. La stratégie R consiste à produire beaucoup de petits avec généralement une reproduction qui n'est pas limitée par les saisons et des jeunes qui atteignent rapidement la maturité. Malgré des conditions qui ne sont pas toujours favorables à leur développement, la multiplication des petits augmente les chances que certains jeunes atteignent l'âge adulte. La stratégie K à l'inverse, consiste à produire peu de descendance mais à consacrer d'avantage d'énergie au soin des jeunes afin de favoriser leur survie. Les gestations ainsi que la durée avant d'atteindre la maturation des jeunes sont souvent plus longues que chez les espèces à stratégie de reproduction R. La plupart des espèces dont la reproduction est synchronisée avec les saisons adoptent la stratégie K. La synchronisation du timing de reproduction avec les saisons semble donc apporter un avantage évolutif pour ces espèces en favorisant le développement des petits dans de bonnes conditions (Hengeveld, 2002; Rushton, 1985).

### 2- Un timing de reproduction réglé comme une horloge

Afin que les petits naissent aux environs du printemps-été, chaque espèce de mammifère dispose d'une fenêtre de temps pour la reproduction qui dépend de la durée de gestation de la femelle. Il existe deux grands types de reproducteurs saisonniers :

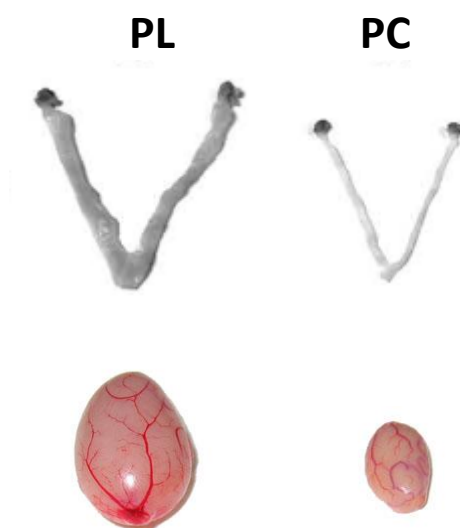
- Les **reproducteurs dits de jours courts**, qui se reproduisent en automne-hiver, sont généralement des mammifères de taille moyenne ou grande qui ont une période de gestation longue, souvent de plusieurs mois
- Les **reproducteurs dits de jours longs**, qui se reproduisent au printemps-été sont généralement des petits mammifères dont la période de gestation va de quelques jours à quelques semaines et qui peuvent avoir plusieurs portées de petits consécutives pendant la période propice (Hastings et al., 1985, [Figure 7](#)).



**Figure 7 :** Synchronisation de la période de reproduction par la photopériode

Afin que les petits naissent aux alentours du printemps, les espèces dont la gestation dure plusieurs mois se reproduisent en automne/hiver (reproducteurs de jours courts) et ceux dont la gestation ne dure que quelques semaines se reproduisent au printemps/été (reproducteurs de jours longs). Les espèces saisonnières synchronisent leur période de reproduction avec les saisons grâce aux variations annuelles de la photopériode.

Les variations de l'activité de reproduction au cours de l'année sont corrélées à des changements saisonniers du système reproducteur. Pendant la phase d'inactivité sexuelle (période d'anoestrus), les organes génitaux mâles et femelles sont atrophiés et/ou inactifs. Pendant la phase d'activité sexuelle (période d'oestrus), la production des hormones sexuelles et le volume des organes génitaux augmentent et les animaux ont un comportement sexuel actif (Hoffmann et al., 1986; Rosmalen et al., 2020; Wood and Loudon, 2014).



**Figure 8 :** Variations photopériodiques du volume des gonades chez le hamster syrien

Chez le hamster syrien qui est un reproducteur de jours longs, le volume de l'utérus et des ovaires chez la femelle et celui des testicules chez le mâle augmente en photopériode longue (PL) et diminue en photopériode courte (PC).

Ces modifications du système reproducteur des espèces saisonnières dépendent des variations annuelles de la photopériode (Dardente et al., 2019; Hazlerigg and Simonneaux, 2014). L'humidité, la température ou la disponibilité des ressources alimentaires peuvent également agir pour synchroniser l'activité de reproduction avec les saisons (El Allali et al., 2013; Eskes, 1983; Kriegsfeld et al., 2000; Larkin et al., 2002; Nelson et al., 1983; Rajaratnam and Redman, 1998; Visser et al., 2015), mais c'est la photopériode qui est le facteur principal indiquant le moment de l'année chez les mammifères.

D'un point de vue évolutif, cette stratégie s'explique par la prédictibilité des variations annuelles de ces différents paramètres. En effet, les variations de température et d'humidité ainsi que la disponibilité des ressources alimentaires peuvent varier d'une année sur l'autre. En revanche, les variations annuelles de la photopériode, qui dépendent directement de la rotation de la terre autour du soleil, constituent un facteur stable et prédictible. Elles permettent donc aux organismes d'**anticiper** les changements de saisons et au système reproducteur de se préparer pour une période d'activité ou de repos sexuel.

En laboratoire, les cycles saisonniers de la reproduction peuvent être reproduits en exposant les animaux à une photopériode courte (PC) correspondant à une photopériode d'automne-hiver (8-10h de lumière et 14-16h d'obscurité sur 24h) ou à une photopériode longue (PL) correspondant à une photopériode de printemps-été (14-16h de lumière et 8-10h d'obscurité par jour généralement). La durée



de photopériode à partir de laquelle une espèce la considère comme longue ou courte est appelée photopériode critique, et elle est variable en fonction des espèces.

En plus de la photopériode elle-même, les espèces saisonnières sont aussi sensibles à une augmentation ou une diminution de la durée du jour (l'historique photopériodique) (Ebenhöh and Hazlerigg, 2013; Gorman and Zucker, 1997; Petri et al., 2016). Egalement, selon la photopériode à laquelle est exposée la mère pendant la gestation, la descendance peut présenter une réponse physiologique aux saisons différentes (programmation photopériodique maternelle) (van Dalum et al., 2019; Sáenz de Miera et al., 2017). Finalement certaines espèces possèdent une horloge circannuelle endogène capable de réguler des cycles reproducteurs indépendamment de la photopériode, même si cette horloge est synchronisée par les variations de la photopériode (Sáenz de Miera et al., 2014).

#### b- L'effet du mâle sur l'ovulation

Chez les mammifères femelles, il existe deux principales catégories d'ovulation, spontanée et provoquée. La plupart des femelles présentent des cycles ovulatoires réguliers avec une ovulation spontanée, avec ou sans la présence d'un mâle. Chez les brebis ou la chèvre, l'introduction d'un mâle pendant la période d'œstrus, et en particulier d'un mâle sexuellement actif dans l'environnement de la femelle peut également induire l'ovulation (Chemineau, 1983; Lindsay et al., 1975; Perkins and Fitzgerald, 1994). Chez quelques espèces comme la lapine, la chatte ou la chamelle, l'accouplement est nécessaire pour provoquer l'ovulation chez la femelle (Derouin-Tochon et al., 2019). De récentes études montrent que c'est la présence de la sous-unité  $\beta$  du facteur de croissance nerveuse ( $\beta$ -NGF) dans le liquide séminal du mâle qui serait le facteur responsable de l'ovulation induite chez ces femelles (El Allali et al., 2017; Ratto et al., 2019 pour revues).

#### c- Lactation et diapause, des mécanismes de blocage de la reproduction

Des mécanismes de blocage de la reproduction peuvent se mettre en place lorsque la période n'est pas propice. Par exemple, chez de nombreuses espèces, l'allaitement des petits supprime le pic pré-ovulatoire d'hormone lutéinisante (LH) et inhibe l'ovulation. Ce blocage de l'activité de reproduction permet à la mère de concentrer son énergie sur l'élevage efficace de sa progéniture avant d'en engendrer une nouvelle (McNeilly et al., 1994; Smith et al., 2010b).

Chez quelques espèces, lorsqu'un accouplement a lieu à un moment non favorable à la gestation (pendant la lactation ou à la fin de la période de reproduction), l'embryon formé peut entrer dans un état de diapause. L'embryon en diapause reste sous sa forme de blastocyste dans les trompes utérines et ne se développera qu'à l'arrivée de conditions plus propices. Les mécanismes sous-tendant l'entrée et la sortie de la diapause ne sont pas encore très bien compris aujourd'hui mais des études montrent que ce phénomène pourrait concerner de nombreuses espèces (Renfree and Fenelon, 2017).

#### d- L'activation photoréfractaire, un mécanisme de synchronisation endogène

Chez certaines espèces maintenues pendant longtemps en photopériode inhibitrice, un phénomène d'activation « photoréfractaire » se met en place caractérisée par une recrudescence spontanée de l'activité gonadique malgré la photopériode inhibitrice. En laboratoire, des hamsters syriens et sibériens mâles maintenus plus de 20 semaines en PC inhibitrice présentent une augmentation spontanée de la taille et de l'activité des testicules (Milesi et al., 2017). Chez le hamster sibérien, une étude a montré, qu'un protocole de restriction alimentaire empêche la survenue de l'activation photoréfractaire (Dooley and Prendergast, 2012), suggérant que la disponibilité en nourriture dans l'environnement conditionnerait la levée d'inhibition reproductive. Cet affranchissement de la réponse au signal photopériodique inhibiteur prolongé permettrait au système reproducteur de s'activer par anticipation, dès lors que les ressources énergétiques sont amenées à devenir favorables à la reproduction.

En conclusion, il existe de nombreuses stratégies d'adaptations saisonnières dans le monde animal, permettant aux espèces de répondre aux contraintes exercées par leur environnement. Ces mécanismes adaptatifs peuvent être comportementaux comme l'hibernation ou la migration, phénotypiques comme les changements du pelage, ou encore physiologiques comme les adaptations métaboliques ou reproductives (Varpe, 2017). En particulier, de nombreux mécanismes permettent de réguler finement le contrôle saisonnier de la reproduction qui est un processus adaptatif essentiel pour la survie de l'espèce.

### 3- L'impact de l'activité humaine sur les adaptations saisonnières

L'impact de l'activité humaine sur les écosystèmes s'est accru au fur et à mesure de son essor technique et démographique. Selon la liste rouge de l'Union Internationale de Conservation de la Nature, plus de 35000 espèces seraient aujourd'hui en danger d'extinction suite aux effets de la surexploitation, de l'agriculture, de l'élevage, de la déforestation ou encore de l'urbanisation (Maxwell et al., 2016). Plus inquiétant encore, ce sont les conséquences climatiques résultant de l'activité humaine qui pourraient, à long terme, causer une extinction de masse des espèces (Urban, 2015). La compréhension des mécanismes d'adaptations des organismes à cet environnement en pleine mutation rapide devient donc un enjeu majeur pour comprendre l'**impact de ces changements environnementaux** sur la survie des espèces.

L'illustration la plus connue d'adaptation en réponse à une modification humaine de l'environnement est probablement celui de la phalène du bouleau dont le phénotype de couleur noire a



rapidement remplacé le phénotype de couleur blanche au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle car la phalène noire était moins visible pour les prédateurs sur les troncs noircis par la pollution due à la révolution industrielle (Cook, 2003).

La fixation d'un trait avantageux se fait sur de nombreuses générations d'individus. Aussi, l'évolution peut se faire rapidement chez des espèces avec des cycles générationnels courts. C'est ce qui est constaté avec la résistance des insectes aux insecticides ou encore des bactéries aux antibiotiques. En revanche, chez les mammifères ou les oiseaux qui ont une durée de vie plus longue, ces processus de sélection sont très lents (Verin et al., 2017), soulevant la question de la capacité d'élaborer des réponses adaptatives aux changements rapides de l'environnement (Bradshaw and Holzapfel, 2008; Radchuk et al., 2019; Urban, 2015).

#### a- Les changements climatiques

De nombreuses études montrent des modifications des adaptations saisonnières en réponse au réchauffement climatique qui pourraient avoir un impact sur la survie de certaines espèces (Inouye et al., 2000; Ozgul et al., 2010; Parmesan and Yohe, 2003; Post and Forchhammer, 2008; Radchuk et al., 2019; Réale et al., 2003). L'augmentation de la température (Figure 9), l'adoucissement des températures hivernales et le manque de pluie, entraînent des décalages de la période de floraison et de croissance des plantes et des modifications de la disponibilité en eau et en nourriture dans l'environnement. Ces changements climatiques et la modification des ressources environnementales qui en découle peuvent avoir des conséquences sur le comportement et les adaptations saisonnières de certaines espèces animales (Post and Forchhammer, 2008; Réale et al., 2003, Figure 9). Des études rapportent des décalages de la période de migration de certains oiseaux (Inouye et al., 2000; Radchuk et al., 2019), ou d'hibernation de certains mammifères (Inouye et al., 2000; Ozgul et al., 2010). Les épisodes caniculaires de plus en plus fréquents et longs, peuvent rendre difficile la survie des petits sensibles à la dessiccation. En outre, les températures hivernales plus douces entraînent une avance de la disponibilité des ressources alimentaires pouvant conduire à une avance de la période de reproduction de certains oiseaux et mammifères (Post and Forchhammer, 2008; Radchuk et al., 2019; Réale et al., 2003). Si certaines conséquences du réchauffement climatique comme l'adoucissement des températures hivernales sont bénéfiques pour certaines espèces, la raréfaction des chutes de neige dans certaines régions peut se révéler délétère pour les espèces dont le pelage blanc d'hiver les rend plus visibles pour les prédateurs (Mills et al., 2013; Zimova et al., 2016).

Pour conclure, le réchauffement rapide de l'environnement peut occasionner des modifications comportementales, comme l'adaptation de la migration ou de l'hibernation ou un décalage de la période de reproduction. Les adaptations phénotypiques et physiologiques comme les modifications du pelage ou de l'activité du système reproducteur dépendent souvent d'une sélection génétique qui nécessite beaucoup de temps.

Plusieurs études s'interrogent sur la capacité des organismes à s'adapter assez rapidement aux effets anthropologiques du réchauffement climatique. Les études écophysiologiques et le croisement des données par méta-analyse semblent donc plus que jamais importants afin de considérer l'impact des changements rapides de l'environnement sur les différents mécanismes d'adaptations saisonnières dans le monde du vivant.

#### b- La pollution lumineuse nocturne

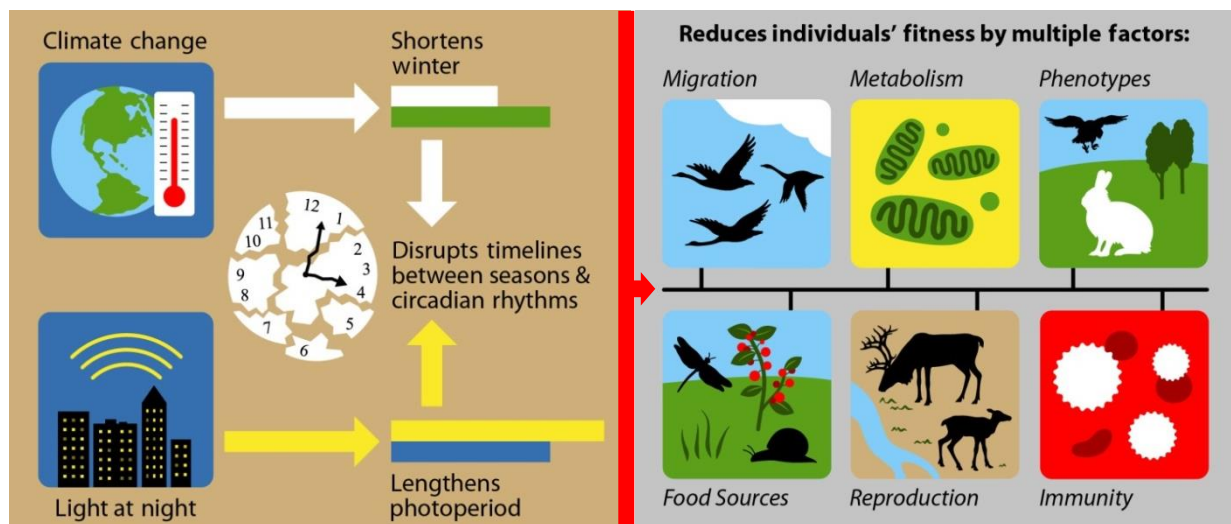
La pollution lumineuse nocturne est une autre conséquence de l'activité humaine sur l'environnement qui peut induire des altérations des rythmes journaliers et saisonniers chez de nombreuses espèces vivant à proximité des espaces urbains. Depuis des années, l'essor démographique et économique a conduit à une augmentation rapide de l'intensité et de la distribution de la lumière artificielle même pendant la période nocturne (Cinzano and Falchi, 2020; Gaston et al., 2013; Kyba et al., 2017; Riegel, 1973).

La distinction entre les périodes de jour et de nuit est un signal important pour de nombreux mécanismes physiologiques et comportementaux. Aussi, la présence de lumière artificielle la nuit peut avoir des conséquences directes sur ces mécanismes. Par exemple, la lumière nocturne peut dérouter la trajectoire des oiseaux en migration qui peuvent alors se heurter plus fréquemment aux immeubles ou aux installations de la ville moins éclairés (Gaston et al., 2013; La Sorte and Horton, 2021; Van Doren et al., 2017). En revanche, la présence de nombreux insectes aux alentours des dispositifs d'éclairage urbain facilite l'accès à la nourriture de certaines espèces, comme les oiseaux, les chauves-souris ou encore l'araignée qui tisse sa toile proche des sources de lumière (Gaston et al., 2013; Rydell, 1991; Willmott et al., 2018). Ainsi, certaines espèces se rapprochent des zones urbaines tandis que d'autres fuient la lumière, le développement urbain a donc redistribué la présence de certaines espèces et modifié les relations proies-prédateurs de nombreux écosystèmes.

Outre l'effet direct de la lumière, la présence de lumière la nuit altère le signal nocturne nécessaire pour synchroniser les rythmes journaliers et saisonniers, entraînant des conséquences physiologiques chez certaines espèces (Bedrosian et al., 2011; Brainard et al., 1983; Evans et al., 2007; Navara and Nelson, 2007; Reiter et al., 2007; Shuboni and Yan, 2010, [Figure 9](#)). Ainsi, certains organismes vivant aux abords des villes ont des rythmes d'activité/sommeil, de recherche/prise de nourriture, et de sécrétion hormonale qui changent pour s'adapter non plus aux conditions environnementales naturelles, mais à celles imposées par les contraintes urbaines (Fonken et al., 2010; Gaston et al., 2013; de Jong et al., 2017; Navara and Nelson, 2007; Nelson and Chbeir, 2018). Plusieurs études rapportent également une altération de la réponse du système immunitaire suite à l'exposition à de la lumière nocturne (Aubrecht et al., 2014; Cissé et al., 2020; Dauchy et al., 1997; Durrant et al., 2015). Par ailleurs, des études en laboratoire ont montré que même une faible quantité de lumière pendant la nuit induit une inhibition du phénotype de photopériode courte chez des hamsters (Aubrecht

et al., 2014; Ikeno et al., 2014). Des modifications de la période de reproduction ont également été observées chez l'oiseau (Dominoni et al., 2013; Kempenaers et al., 2010; Longcore, 2010), le primate (LeTallec et al., 2015) et des marsupiaux (Robert et al., 2015). Plusieurs études rapportent également une désynchronisation de la migration liée à la pollution lumineuse nocturne. Certains oiseaux migrent trop tôt ou trop tard (La Sorte and Horton, 2021; Smith et al., 2021) et des perturbations des comportements migratoires ont été observées chez des saumons (Riley et al., 2012).

La présence de lumière la nuit peut donc avoir un impact direct mais également indirect en désynchronisant les rythmes journaliers et saisonniers. La pollution lumineuse nocturne qui s'étend et s'intensifie dans l'environnement pourrait donc avoir un impact à long terme en modifiant les écosystèmes et les interactions entre les espèces et leur milieu de vie.



**Figure 9 :** Altération des adaptations saisonnières par le réchauffement climatique et la pollution lumineuse

Le réchauffement climatique et l'augmentation de la pollution lumineuse nocturne entraînent une désynchronisation des rythmes et des adaptations biologiques de certaines espèces avec l'environnement. La disponibilité alimentaire, la migration/hibernation et les adaptations saisonnières de la reproduction, du métabolisme et de l'immunité sont des facteurs qui peuvent varier en réponse aux changements climatiques et à la présence de lumière artificielle la nuit. Image issue de Walker et al., 2019.

En conclusion, l'activité humaine a des impacts écologiques qui pourraient altérer les adaptations biologiques des organismes à leur environnement. En particulier, l'effet anthropologique du changement climatique et de la présence de lumière artificielle la nuit semble impacter les rythmes biologiques de certaines espèces (Walker et al., 2019, Figure 9). Afin d'évaluer l'impact de l'activité humaine, il est nécessaire de comprendre la relation complexe entre la pression de sélection exercée par l'environnement et la réponse adaptative des organismes aux contraintes environnementales.

# *Chapitre 2*

## **Horloge et Calendrier**

---

### **Mélatonine**

### III- Une horloge endogène synchronisée par les rythmes de l'environnement

Si très tôt des philosophes comme Hippocrate, Aristote ou Sophocle se sont interrogés sur la relation entre les rythmes du vivant et l'environnement, ce n'est qu'au XVIII<sup>ème</sup> siècle, que les études prennent une dimension scientifique avec les observations de Carl von Linné et de Jean-Jacques d'Ortous de Mairan sur les rythmes des plantes.

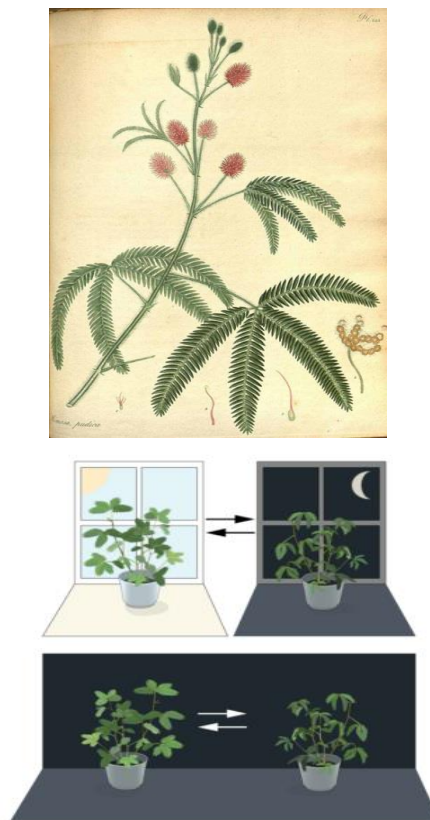
#### 1- Des rythmes endogènes chez toutes les espèces du vivant

En effet, en 1729, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan publie pour la première fois une étude « d'observation botanique » dans laquelle il décrit avec précision les cycles d'ouverture et de repliement des feuilles du *Mimosa pudica*. Le point crucial de cette étude réside dans la découverte de la continuité de ce phénomène lorsque la plante est soustraite à l'alternance du jour et de la nuit par un isolement à l'obscurité (Figure 10). Cette observation est la première mise en évidence de l'existence de **rythmes endogènes** indépendants des signaux environnementaux dans le monde du vivant (De Mairan, 1729).

**OBSERVATION BOTANIQUE.**

ON sçait que la Sensitive est *heliotrope*, c'est-à-dire que ses rameaux & ses feuilles se dirigent toujours vers le côté d'où vient la plus grande lumière, & l'on sçait de plus qu'à cette propriété qui lui est commune avec d'autres Plantes, elle en joint une qui lui est plus particulière, elle est Sensitive à l'égard du Soleil ou du jour, ses feuilles & leurs pédicules se replient & se contractent vers le coucher du Soleil, de la même manière dont cela se fait quand on touche la Plante, ou qu'on l'agite. Mais M. de Mairan a observé qu'il n'est point nécessaire pour ce phénomène qu'elle soit au Soleil ou au grand air, il est seulement un peu moins marqué lorsqu'on la tient toujours enfermée dans un lieu obscur, elle s'épanouit encore très-sensiblement pendant le jour, & se replie ou se resserre régulièrement le soir pour toute la nuit. L'expérience a été faite sur la fin de l'Été, & bien répétée. La Sensitive sent donc le Soleil sans le voir en aucune manière; & cela paroît avoir rapport à cette malheureuse délicatesse d'un grand nombre de Malades, qui s'aperçoivent dans leurs Lits de la différence du jour & de la nuit.

Il seroit curieux d'éprouver si d'autres Plantes, dont les feuilles ou les fleurs s'ouvrent le jour, & se ferment la nuit, conserveroient comme la Sensitive cette propriété dans des lieux obscurs; si on pourroit faire par art, par des fourneaux plus ou moins chauds, un jour & une nuit qu'elles sentissent; si on pourroit renverser par là l'ordre des phénomènes du vrai jour & de la vraie nuit, &c. Mais les occupations ordinaires de M. Mairan ne lui ont pas permis de pousser les expériences jusque-là, & il se contente d'une simple invitation aux Botanistes & aux Physiciens, qui pourront eux-mêmes avoir d'autres choses à suivre. La marche de la véritable Physique, qui est l'Expérimentale, ne peut être que fort lente.



**Figure 10 :** Extrait et modélisation des expériences de Jean-Jacques d'Ortous de Mairan

Dans son étude sur les cycles d'ouverture et de repliement des feuilles du *Mimosa pudica*, en 1729, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan met en évidence la présence de rythmes endogènes qui persistent chez la plante lorsqu'elle est soustraite à l'alternance jour/nuit par une isolation à l'obscurité (De Mairan, 1729).



Avant ces travaux, Carl von Linné avait déjà noté que certaines plantes ont des rythmes réguliers d'ouverture et de fermeture des fleurs qui se produisent à différents moments de la journée selon les espèces. Il publie ainsi, en 1751 l'« horlogium florum » illustrant ces cycles de floraison en fonction de l'heure de la journée (Figure 11). Avec cette horloge florale, Linné montre que les plantes ont des rythmes biologiques différents selon les espèces avec des phases différentes par rapport aux heures de levée et de coucher du soleil.



**Figure 11 :** Horlogium florum de Carl von Linné

En 1751, Carl von Linné crée une horloge à partir des rythmes journaliers de floraison dont la phase diffère selon l'espèce de la plante.

Depuis ces études chez les plantes, de nombreuses autres expériences ont mis en évidence l'existence de rythmes biologiques endogènes chez toutes les espèces animales.

L'avènement de l'électricité au 20<sup>ème</sup> siècle marque un tournant majeur dans l'étude de la **chronobiologie** avec la possibilité pour les scientifiques d'élaborer des protocoles plus complexes en contrôlant les conditions de lumière dans leurs expériences.

Durant la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, les études se succèdent chez les plantes (Wilkins, 1960), les arthropodes (Bruce and Pittendrigh, 1957), les mammifères (Aschoff, 1960; Bünning, 1935; Pittendrigh, 1960), pour confirmer l'existence d'une rythmicité endogène chez les êtres vivants. Enfin, lors d'un vol dans l'espace, une étude de la NASA montre que des champignons conservent une

rythmicité qui est identique à celle sur terre en l'absence de tout signal géophysique (Sulzman et al., 1984).

Finalement, des études chez l'humain testent l'hypothèse de l'existence d'une horloge endogène humaine. Malgré des études précoces qui montrent la persistance de rythmes journaliers chez des soldats de la seconde guerre mondiale enfermés dans des bunkers (Wever, 1975a, 1975b), c'est Michel Siffre, un spéléologue français, qui est reconnu comme pionnier de l'étude des rythmes endogènes chez l'humain. En 1962 il réalise une expérience « hors du temps » en s'isolant pendant deux mois dans une grotte souterraine, pendant laquelle il mesure plusieurs de ses paramètres biologiques (cycle veille/sommeil, température corporelle) hors de tous repères temporels (Figure 12). Mr Siffre a non seulement confirmé l'existence de rythmes circadiens endogènes chez l'humain, mais il a également observé, en notant ses heures de coucher et de lever que son rythme circadien endogène a une période supérieure à 24h (24,5h) conduisant à un décalage jour après jours de son rythme de veille-sommeil en l'absence de repères temporels (Siffre, 1965).



**Figure 12 :** Photo de Michel Siffre lors de sa deuxième expérience « hors du temps » pendant 205 jours en 1972 dans une cave au Texas.

L'ensemble de ces expériences a mené aux conclusions que chaque organisme vivant possède des rythmes endogènes, générés par une horloge biologique synchronisée par des signaux environnementaux comme l'alternance jour/nuit (Aschoff, 1965; Pittendrigh, 1960).

C'est également en observant les cycles de floraison qu'un effet de la durée relative du jour et de la nuit est observé chez les plantes et que le terme « photopériodisme » est introduit pour la première fois dans des écrits scientifiques (Garner and Allard, 1922; Tournois, 1912). Des études chez différentes espèces montrent finalement que les animaux aussi sont sensibles aux variations saisonnières de leur

environnement (Aschoff, 1965; Hammond et al., 1953; Wolfson, 1947; Wolfson and Winn, 1948; Yeates, 1949).

Le concept de rythme endogène synchronisé par les variations journalières et saisonnières de l'environnement a été à l'origine de nombreuses études visant à localiser et comprendre le fonctionnement d'horloge biologique. La suite de ce chapitre se concentre sur les découvertes du mécanisme de l'horloge endogène chez les mammifères.

## 2- Les noyaux suprachiasmatiques : horloge centrale circadienne

Dans les années 70', la quête pour la localisation de l'horloge centrale s'intensifie. En découvrant des projections de la rétine sur l'hypothalamus antérieur via le tractus rétinohypothalamique, l'équipe de Moore met en évidence le rôle clé de cette région du cerveau dans la réception du message photique issu de l'environnement (Moore and Lenn, 1972). Peu de temps après, des études de lésion de structures cérébrales chez le rat mènent à la conclusion que la destruction d'un noyau bilatéral localisé sur le chiasma optique, appelé **noyau suprachiasmatique** (NSC), entraîne une perte de la rythmicité de la locomotion (Stephan and Zucker, 1972) et de la sécrétion de cortisol (Moore and Eichler, 1972). Quelques années plus tard le NSC est décrit comme une horloge circadienne centrale qui coordonne l'activité d'oscillateurs secondaires périphériques (Moore-Ede, 1983). Finalement, l'équipe de Ralph démontre le rôle pacemaker du NSC grâce à une ambitieuse expérience de transplantation. Les chercheurs montrent non seulement qu'une transplantation de NSC restaure la rythmicité circadienne d'animaux dont le NSC avait été lésé préalablement, mais aussi que la période des rythmes restaurés des receveurs correspond à celle des donneurs (Ralph et al., 1990).

Il faudra attendre la fin des années 1990 pour que le premier gène horloge chez les mammifères soit identifié par l'équipe de Takahashi (Antoch et al., 1997). De nombreux travaux ont ensuite démontré que l'activité circadienne des neurones du NSC est régie par des boucles de régulations de la transcription de plusieurs gènes horloges (Hastings et al., 2018; Rosenwasser and Turek, 2015 pour revues, [Figure 13](#)). Une mutation de l'un de ces gènes horloges entraîne une désynchronisation des neurones du NSC et une altération de la rythmicité circadienne de l'ensemble de l'organisme (Weaver, 1998).

## 3- La mélatonine : horloge circadienne et calendrier saisonnier

### a- La production nocturne de mélatonine

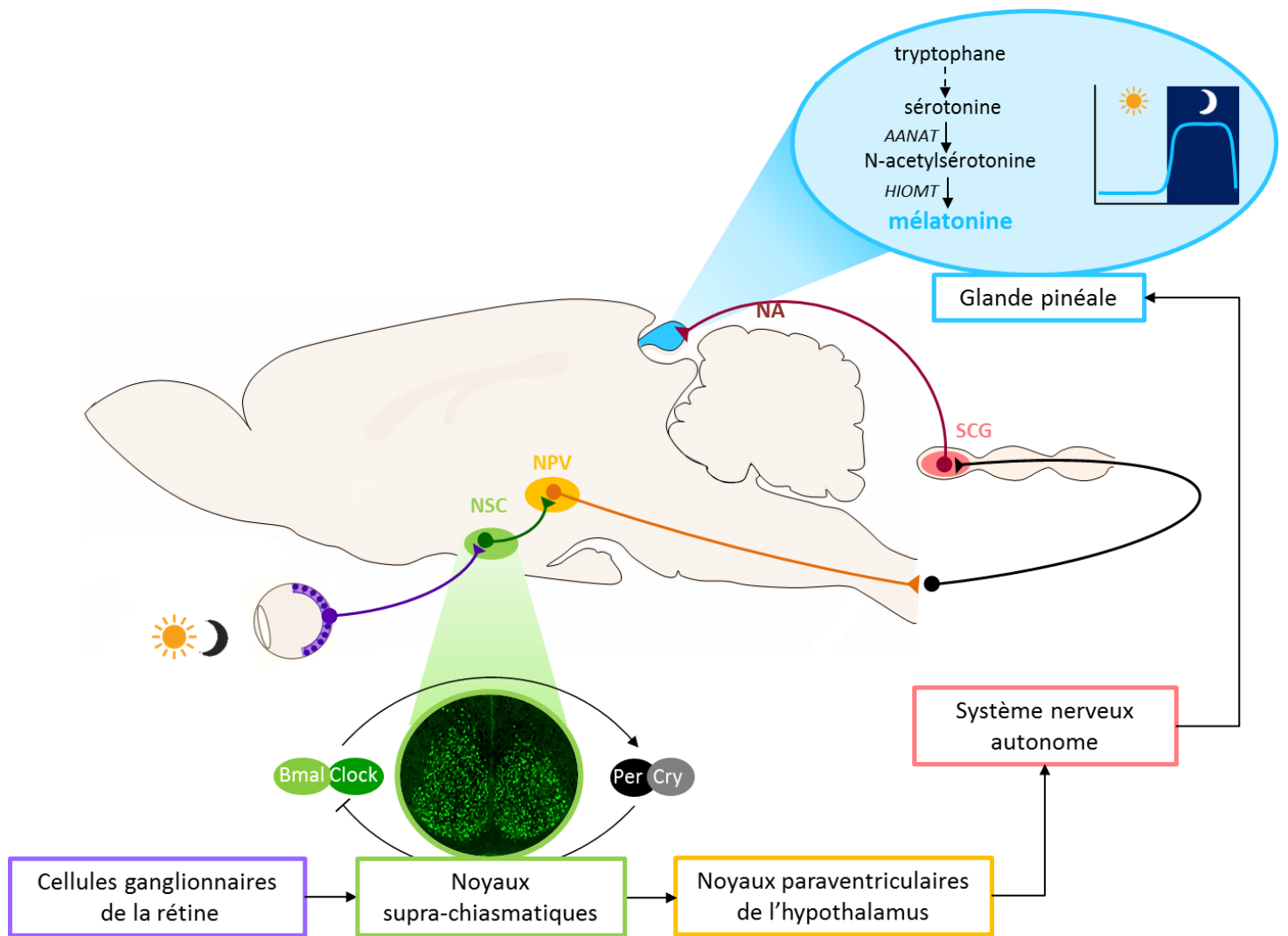
Dès le milieu des années 60', une équipe de chercheurs américains met en évidence des rythmes journaliers de la synthèse de mélatonine, une hormone produite par la glande pinéale, et de



l'hydroxyindole-O-méthyltransferase (HIOMT), une enzyme nécessaire à la synthèse de la mélatonine (Axelrod et al., 1965; Wurtman et al., 1963). Quelques années plus tard, l'équipe de Moore et Klein montre la rythmicité circadienne de l'activité de la sérotonine N-acétyltransférase (AANAT), une autre enzyme impliquée dans la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale (Ellison et al., 1972; Klein and Moore, 1979; Moore and Klein, 1974). Dans leurs études, les deux équipes observent que l'activité de la HIOMT et celle de la NAT respectivement, augmente la nuit et est inhibée par la lumière. De plus, Moore et Klein montrent qu'une ablation du NSC abolit le rythme journalier de l'activité de la AANAT, suggérant que la glande pinéale constituerait une des sorties de l'horloge centrale. De cette observation importante découle de nombreuses études liant la **mélatonine**, aux rythmes journaliers et saisonniers.

En effet, la synthèse de mélatonine étant inhibée par la lumière pendant la journée, la sécrétion de mélatonine dans la circulation a lieu uniquement pendant la nuit (Gern et al., 1978; Wurtman et al., 1963). La lumière est perçue par les cellules à mélanopsine de la couche ganglionnaire de la rétine puis le signal est véhiculé aux NSC via le tractus rétino-hypothalamique. L'activation des NSC par la lumière se traduit par une inhibition Gabaergique des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), relais essentiel du message photique à la glande pinéale. Les neurones du PVN projettent sur les cellules intermédiolatérales (IML) qui contactent les ganglions cervicaux supérieurs (SCG) innervant la glande pinéale. La noradrénaline libérée par les terminaisons nerveuses des SCG pendant la nuit stimule les pinéalocytes et induit une cascade de signalisation résultant en une stimulation de l'expression de plusieurs gènes et de l'activité de protéines nécessaires à la synthèse de mélatonine. La noradrénaline stimule la synthèse nocturne de AANAT, qui catalyse la réaction d'acétylation de la sérotonine en N-acétylsérotonine, aboutissant à une augmentation de la formation de mélatonine par la HIOMT (Simonneaux and Ribelayga, 2003 pour revue, [Figure 13](#)).

La mélatonine n'est pas stockée mais libérée directement après sa synthèse dans la circulation, et sa durée de demi-vie dans la circulation générale est courte (entre 15 et 20 minutes) (Brown et al., 1985; Ferreira et al., 1996; Gibbs and Vriend, 1981). Par conséquent, son rythme de synthèse se traduit par un rythme identique dans la circulation générale, conférant à la mélatonine un rôle de donneur de temps précis. La stimulation de la glande pinéale étant inversement corrélée à l'activité des NSC, la libération de mélatonine suit un rythme journalier avec un pic nocturne qui donne à l'organisme une information temporelle endocrine lui permettant de repérer la phase de nuit et celle de jour.



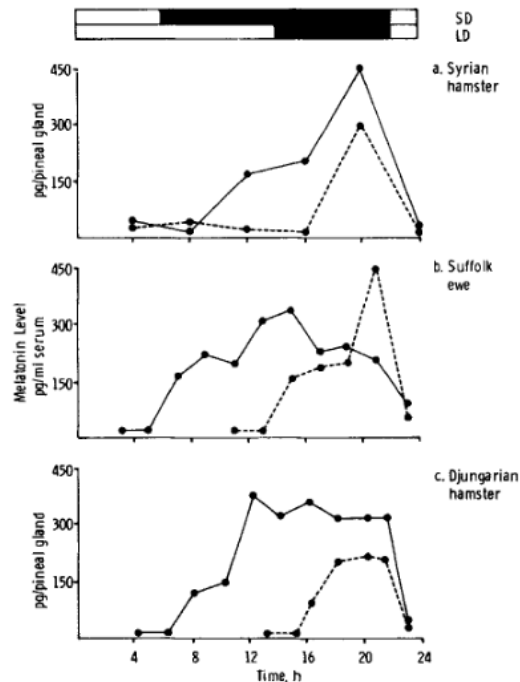
**Figure 13 :** Schéma de la voie photoneuroendocrine régulant la production de mélatonine

Les variations journalières de la lumière sont perçues par les cellules à mélanopsine de la rétine. Le signal est véhiculé aux noyaux supra-chiasmatiques (NSC) via le tractus rétino-hypothalamique, puis transmis aux noyaux paraventriculaires (NPV) de l'hypothalamus puis aux ganglions cervicaux supérieurs (SCG) dont les neurones noradrénergiques projettent vers la glande pinéale. Sous le contrôle de l'horloge des NSC, la noradrénaline (NA) est libérée la nuit dans la glande pinéale et stimule la synthèse et la libération nocturne de mélatonine.

#### b- Un calendrier neuroendocrine des saisons

La sécrétion de mélatonine suit également un rythme saisonnier lié aux variations annuelles de la durée relative du jour et de la nuit. Les NSC étant activés par la lumière, les rythmes journaliers de l'activité électrique des NSC et de l'expression des gènes horloges sont donc dépendants des variations photopériodiques. La glande pinéale étant une sortie de l'horloge des NSC, la production de mélatonine suit donc un rythme saisonnier corrélé à la durée de nuit. Ainsi, des études de dosage de mélatonine ont montré que le pic nocturne de mélatonine est plus long en hiver lorsque les nuits sont longues et

inversement, en été, lorsque les nuits sont courtes, le pic nocturne de sécrétion de mélatonine est court (Florant and Tamarkin, 1984; Illnerová et al., 1984; Kennaway et al., 1983; Roberts et al., 1985, [Figure 14](#)). Ces variations annuelles de la **production nocturne de mélatonine dépendante de la photopériode** constituent un véritable calendrier neuroendocrine permettant à l'organisme de repérer et d'anticiper la période de l'année (Elliott, 1976; Hastings et al., 1985).



**Figure 14 :** Variation de la production de mélatonine chez des mammifères en photopériode longue ou courte

Etant donné que la durée de la nuit varie avec les saisons et que la glande pinéale ne produit de la mélatonine que pendant la nuit, le pic nocturne de mélatonine est plus long en photopériode courte (SD) qu'en photopériode longue (LD). Ainsi, chez les mammifères, la durée du pic nocturne de mélatonine forme un calendrier neuroendocrine fiable indiquant les saisons. Image issue de Hastings et al., 1985.

#### *IV- L'intégration du signal saisonnier dans le système nerveux central des mammifères*

Ce calendrier endocrine créé par les variations annuelles de la production de mélatonine synchronise plusieurs fonctions biologiques avec les saisons. La mélatonine a ainsi été liée aux variations saisonnières de l'activité métabolique (Bartness and Wade, 1985; Bartness et al., 1993; Wade and Bartness, 1984) de la qualité du pelage (Fenn et al., 2011; Rose et al., 1984), de l'immunité (Demas and Nelson, 1998; Nelson and Demas, 1996) et d'autres adaptations saisonnières dont notamment l'activité de reproduction (Bittman and Karsch, 1984; Goldman and Darrow, 1983; Hastings et al., 1985; Hoffman and Reiter, 1965).

## 1- La mélatonine, messenger principal pour le contrôle saisonnier de la reproduction

Dès les années 1960, des études chez les rongeurs montrent que la suppression de la sécrétion de mélatonine par pinéalectomie, altère les rythmes saisonniers de plusieurs fonctions biologiques, notamment la reproduction (Hoffman and Reiter, 1965; Reiter, 1968). Parce que les premières études ont été réalisées chez des reproducteurs de jours longs, il a été suggéré que la mélatonine pourrait inhiber directement l'activité des gonades, mais rapidement de nouveaux résultats chez des reproducteurs de jours courts ont suggéré que la mélatonine aurait plutôt un rôle d'indicateur de la photopériode/des saisons (Arendt et al., 1983; Bittman and Karsch, 1984).

Chez des hamsters gardés en PL, une injection quotidienne de mélatonine en fin de journée inhibe la reproduction mais n'a aucun effet si l'injection est faite le matin (Stetson et al., 1983; Tamarkin et al., 1976). En outre, l'injection unique de mélatonine ne semble pas produire d'effet chez des hamsters ayant subi une ablation de la glande pinéale au préalable. Ces résultats suggèrent que la mélatonine injectée pourrait s'ajouter à la mélatonine endogène pour produire un pic nocturne long de mélatonine induisant un effet inhibiteur sur l'activité gonadique. Cette hypothèse a été confirmée par une autre étude montrant que chez des hamsters pinéalectomisés, un protocole de trois injections de mélatonine espacées de 3h chaque jour est capable d'inhiber l'axe reproducteur, que les injections soient faites pendant la nuit ou pendant la journée. Ces résultats démontrent que la durée d'administration de mélatonine exogène est plus importante que le moment de l'injection (Tamarkin et al., 1977). Par la suite, plusieurs études ont montré que des infusions chroniques longues mimant l'hiver, ou courtes mimant l'été, de mélatonine la nuit chez des animaux pinéalectomisés induisent des effets reproducteurs différents selon le phénotype reproducteur (Bittman and Karsch, 1984; Carter and Goldman, 1983a, 1983b; Stetson and Watson-Whitmyre, 1986 pour revue). Chez le hamster qui est un reproducteur de jours longs, une infusion longue (12h) de mélatonine pendant 6 semaines induit une régression des gonades et une infusion courte (4-6h) induit un phénotype reproducteur actif (Carter and Goldman, 1983a, 1983b). Chez la brebis qui est un reproducteur de jours courts, une infusion courte (8h) de mélatonine inhibe la sécrétion de LH et l'ovulation tandis qu'une infusion longue (16h) est stimulatrice (Bittman and Karsch, 1984; Bittman et al., 1985).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que le signal mélatoninergique est essentiel pour la régulation saisonnière de la reproduction et que c'est la **durée de la production nocturne de mélatonine** qui sert de signal pour inhiber ou activer l'axe reproducteur en fonction de la physiologie reproductive de l'espèce (Goldman and Darrow, 1983; Hastings et al., 1985 pour revue).

Pendant de nombreuses années, les sites d'action de la mélatonine pour synchroniser les fonctions saisonnières, et notamment la reproduction, ont été discutés. Plusieurs structures hypothalamiques ont été proposées, mais actuellement il est généralement accepté que le principal site d'action de la mélatonine est la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse (Hazlerigg and Simonneaux, 2014).

## 2- La *pars tuberalis*, un rôle central dans l'intégration du message mélatoninergique

### a- La mélatonine agit sur ses récepteurs localisés dans la *pars tuberalis*

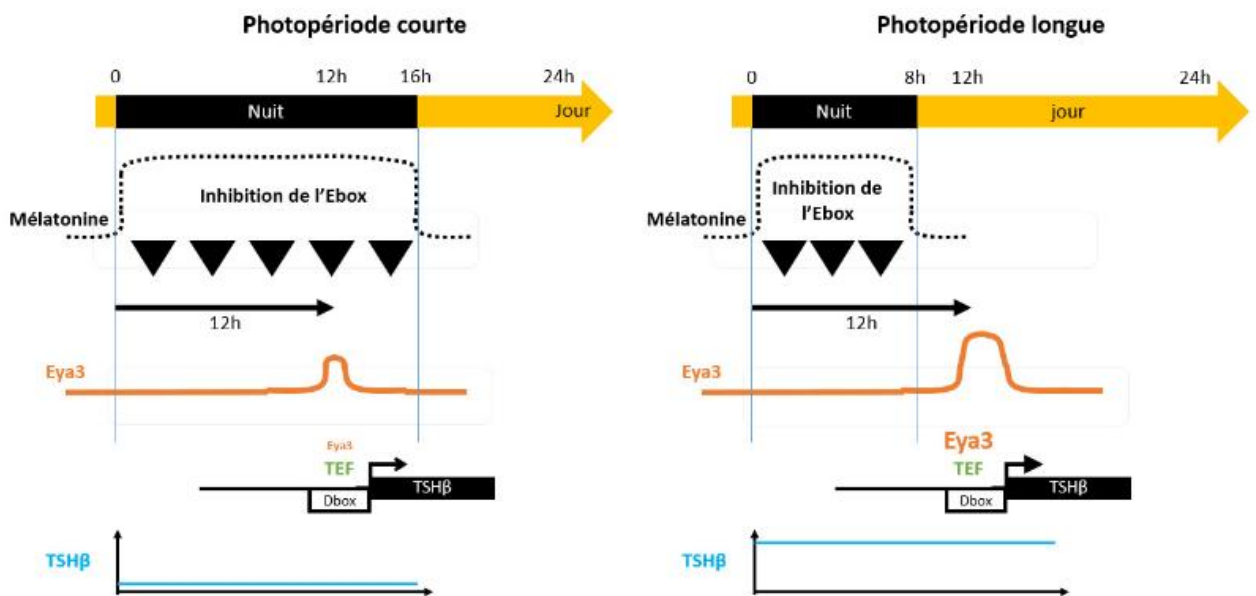
Il existe deux types de récepteurs à la mélatonine, les récepteurs MT1 et MT2 (Reppert, 1997). Les études de cartographie des récepteurs à la mélatonine montrent une expression de MT2 peu spécifique dans de nombreuses structures dont l'amygdale, l'hippocampe et les bulbes olfactifs. L'expression de MT1 est restreinte à quelques régions cérébrales ciblées dont le NSC et la *pars tuberalis*, une région de l'adénohypophyse située le long de la face ventrale de l'éminence médiane, où la densité de récepteurs MT1 est très forte chez toutes les espèces de mammifères étudiés (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002, 2019; Masson-Pévet et al., 1994; Williams and Morgan, 1988). Plusieurs études rapportent des variations photopériodiques de l'expression des récepteurs MT1 dans la *pars tuberalis* (Dardente et al., 2003; Guerrero et al., 2000; Schuster et al., 2000; Wagner et al., 2007). De plus, les hamsters sibériens qui n'ont pas de récepteur MT2 fonctionnel ont tout de même une réponse circadienne et saisonnière liée à la mélatonine (Weaver et al., 1996). Finalement, chez des souris C3H produisant de la mélatonine endogène, un Knock-Out (KO) du récepteur MT1 bloque la réponse neuroendocrine dépendante de l'intégration du signal mélatoninergique, tandis que cette réponse est conservée chez des souris KO pour le récepteur MT2 (Yasuo et al., 2009). L'ensemble de ces observations indiquent que l'intégration et la transmission du message photopériodique porté par la mélatonine se fait *via* les récepteurs MT1 localisés dans la *pars tuberalis* (Figure 16).

### b- Le contrôle mélatonine-dépendant de la production de TSH $\beta$

Au sein de la *pars tuberalis*, les cellules exprimant le récepteur MT1 ont été identifiées comme des cellules thyrotropes, produisant la thyrostimuline (TSH), une hormone formée à partir d'un hétérodimère d'une sous-unité  $\beta$  (TSH $\beta$ ) et de la sous-unité glycoprotéique  $\alpha$  ( $\alpha$ -GSU). La production de TSH $\beta$  et d' $\alpha$ -GSU dans ces cellules varie en fonction de la photopériode avec une expression plus forte en PL qu'en PC (Bockmann et al., 1996; Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002). Chez des souris C57BL/6J déficientes en mélatonine, des injections de mélatonine exogène diminuent l'expression de TSH dans la *pars tuberalis* (Ono et al., 2008a). Ensemble, ces observations indiquent que le pic long de mélatonine en PC inhibe la production de TSH $\beta$  par les cellules de la *pars tuberalis*.

En 2008, une importante analyse transcriptomique réalisée chez la caille marque un tournant dans la compréhension du mécanisme par lequel la photopériode régule l'expression de TSH. Les résultats de cette étude montrent que le gène codant pour la protéine eye absent 3 (EYA3) fait partie du groupe de gènes qui augmentent de façon précoce avec celui codant pour la TSH $\beta$  lors du passage des animaux d'une PC à une PL (Nakao et al., 2008). En 2010, des travaux réalisés chez des mammifères (brebis et souris), confirment que l'expression de EYA3 est plus élevée en PL qu'en PC et proposent un

modèle dans lequel les variations d'EYA3 sont impliquées dans la régulation photopériodique de l'expression de TSH $\beta$  (Figure 15). Dans la *pars tuberalis*, EYA3 se dimérise avec la protéine sine oculis homeobox 1 (SIX1) pour former un complexe coactivateur du thyrotroph embryonic factor (TEF) qui agit sur une D box contenue dans la séquence promotrice du gène de la TSH $\beta$ . En PC, le pic long de mélatonine inhibe le pic de EYA3 pendant la nuit, ce qui réduit l'expression de TSH $\beta$ . En PL, le pic court de mélatonine permet de conserver un pic de EYA3 le matin, résultant en une activation de l'expression de TSH $\beta$  (Dardente et al., 2010, 2014; Masumoto et al., 2010).



**Figure 15 :** Modèle proposé pour la régulation photopériodique de TSH $\beta$  par Eya3

Le pic long de mélatonine en photopériode courte inhibe le pic de EYA3 pendant la nuit alors que le pic court de mélatonine en photopériode longue permet de conserver un pic de EYA3 le matin. EYA3 agit comme coactivateur du TEF pour activer la synthèse de TSH $\beta$  en se fixant sur une Dbox située dans le promoteur du gène, résultant en une augmentation de TSH $\beta$  en photopériode longue lors du pic de EYA3. Image adaptée de Dardente et al., 2010.

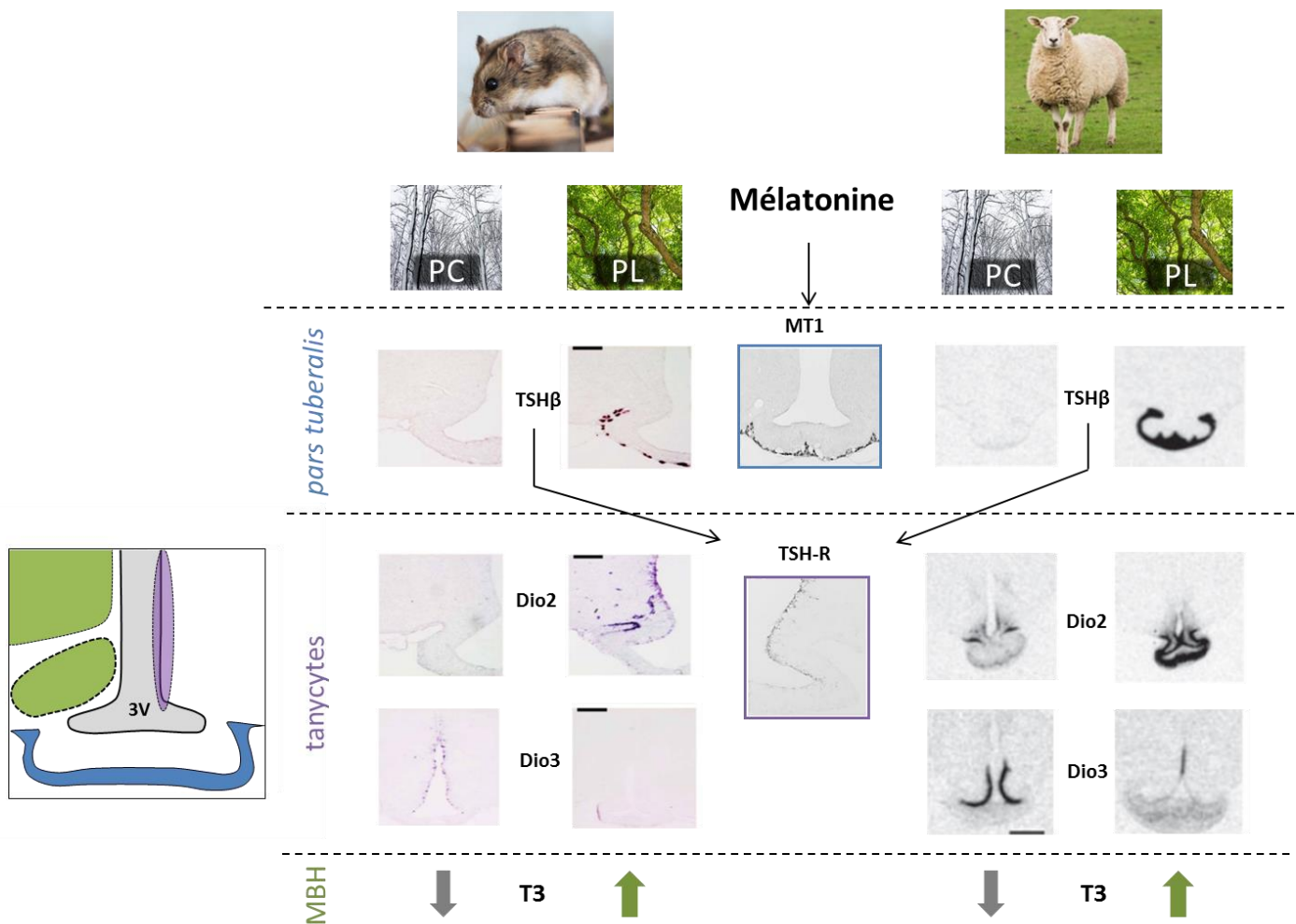
res en formant une interface entre l'hypophyse et les centres neuroendocrines dans le cerveau. Le signal photopériodique porté par la mélatonine est intégré, *via* les récepteurs MT1, dans les cellules thyrotropes de la *pars tuberalis* pour transmettre le signal saisonnier vers l'hypothalamus, suggérant que la TSH $\beta$  agit comme messenger rétrograde de l'hypophyse vers le cerveau. Des études ont montré qu'il existe également une voie antérograde issue de la *pars tuberalis*, qui utilise un autre messenger appelé pour l'instant « tubéraline », dépendant des variations de mélatonine pour réguler la sécrétion de prolactine par l'adénohypophyse (Korf, 2018; Lincoln and Clarke, 1994; Morgan, 2000).

### 3- Les hormones thyroïdiennes, relais saisonnier de la mélatonine dans l'hypothalamus

#### a- Les tanocytes au cœur de la régulation de la balance thyroïdienne

La localisation spécifique des récepteurs à la TSH (TSH-R) sur les **tanocytes**, des cellules épendymales tapissant les parois latérales et ventrales à la base du 3<sup>ème</sup> ventricule (Hanon et al., 2008, [Figure 16](#)) a conduit à proposer l'hypothèse d'un site d'action de la TSH $\beta$  sur ces tanocytes qui expriment des enzymes du métabolisme des **hormones thyroïdiennes**. En effet, les tanocytes synthétisent la déiodinase 2 (Dio2) qui convertit la prohormone thyroxine (T4) en triiodothyronine (T3) bioactive et la déiodinase 3 (Dio3) qui catalyse la transformation de la T3 et de la T4 en formes inactives (Bianco and Kim, 2006 pour revue). Il a été montré que la TSH $\beta$  stimule l'expression de *Dio2* et/ou diminue celle de *Dio3* dans les tanocytes, ce qui résulte en une augmentation de T3 dans l'hypothalamus médiobasal (MBH) (Watanabe et al., 2004; Yasuo et al., 2005; Yoshimura et al., 2003). De plus, chez des souris KO pour le TSH-R, la régulation de l'expression de *Dio2* et *Dio3* par la mélatonine est abolie (Ono et al., 2008a). De façon intéressante, la régulation photopériodique de la TSH $\beta$  dans la *pars tuberalis* et des *Dio2/Dio3* dans les tanocytes est similaire entre les espèces se reproduisant en jours courts (hamsters) et celles se reproduisant en jour long (brebis). Ainsi, chez toutes les espèces saisonnières, le pic long de mélatonine en PC induit une baisse de la concentration locale de T3 dans le MBH (Hazlerigg and Simonneaux, 2014; Ono et al., 2008; Yasuo et al., 2005, [Figure 16](#)).





**Figure 16 :** Régulation de la voie TSHβ-T3 par la mélatonine chez un reproducteur de jours longs (hamster sibérien) et un reproducteur de jours courts (mouton)

La mélatonine se fixe sur les récepteurs MT1 situés sur des cellules thyroïdiques dans la *pars tuberalis* et régule la production de TSHβ qui, en se fixant sur ses récepteurs TSH-R localisés sur les tanycytes, régule l'expression des diodinasés (Dio) 2 et 3, et par conséquent les concentrations intra-hypothalamiques de T3. Ainsi, l'augmentation de la production de TSHβ en photopériode longue (PL) stimule l'expression de Dio2 et diminue celle de Dio3, conduisant à une augmentation de T3 dans le MBH au printemps/été. A l'inverse, l'inhibition de la production de TSHβ en photopériode courte (PC), induit une diminution de celle de Dio2 et une augmentation de celle de Dio3, résultant en une concentration faible de T3 dans le MBH en automne/hiver. Images TSHβ, Dio2, Dio3 pour le hamster sibérien issues de Milesi et al., 2017 ; pour la brebis, Sáenz de Miera et al., 2013 ; MT1 récepteurs, Klosen et al., 2002 ; TSH-R, Klosen et al., 2013.

### b- L'hypothalamus, le centre de traitement de l'information environnementale photopériodique

Dès les années 90, des études ont montré que le passage à l'état photoréfractaire des brebis était bloqué par une thyroïdectomie, ce qui suggérait un rôle important des hormones thyroïdiennes dans les mécanismes de régulation des fonctions saisonnières (Moenter et al., 1991; Nicholls et al., 1988; Thrun et al., 1997). Aussi, il a été proposé que les variations saisonnières de la concentration d'hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus pourraient être impliquées dans l'intégration du message saisonnier



et l'adaptation physiologique aux saisons. Cette hypothèse a été confirmée par l'observation que des implants intrahypothalamiques de T3 empêchent l'expression du phénotype inhibé chez des hamsters sibériens transférés d'une PL à une PC (Barrett et al., 2007) et qu'une infusion cérébrale chronique (plusieurs semaines) de TSH chez des hamsters sibériens et syriens est capable de restaurer l'activité de reproduction des hamsters gardés en PC inhibitrice (Klosen et al., 2013). La régulation saisonnière de T3 étant conservée chez toutes les espèces saisonnières (Figure 16), il est probable que les mécanismes en aval régulant les phénotypes reproducteurs soient différents entre les reproducteurs de jours courts ou longs. En effet, il est probable que la concentration élevée de T3 liée au pic court de mélatonine en PL, ait un effet activateur sur l'axe reproducteur des espèces se reproduisant en PL, et un effet inhibiteur de l'activité de reproduction des espèces se reproduisant en PC (Hazlerigg and Simonneaux, 2014).

L'hypothalamus semble donc être le centre de traitement de l'information photopériodique en intégrant les variations des concentrations locales d'hormones thyroïdiennes dépendantes des changements annuels de la production de mélatonine. Cependant, les cibles des hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus ainsi que leurs mécanismes d'action pour réguler les fonctions saisonnières, sont encore inconnues.

Un des objectifs de ma thèse a été d'étudier comment le message saisonnier, véhiculé par les variations des concentrations de T3 dans l'hypothalamus, module l'expression de certaines populations de neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'axe reproducteur.

# *Chapitre 3*

## **Reproduction**

---

### **Neuropeptides hypothalamiques**

---

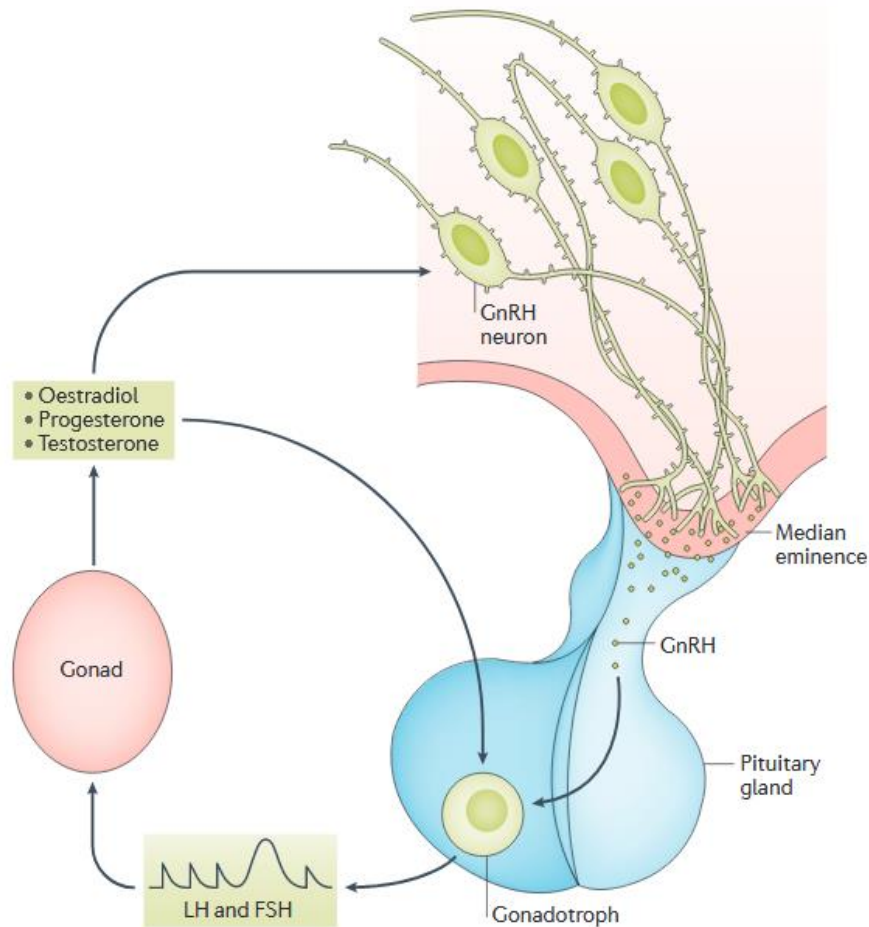
### **Hormones thyroïdiennes**

## V- *L'axe reproducteur, une cible du message saisonnier*

De nombreuses études, notamment par des expériences de lésion (Berria et al., 1989; Hileman et al., 1994; Maywood et al., 1996) ont mis en évidence le rôle du MBH dans la régulation de la reproduction par la mélatonine (Anderson et al., 2003; Lincoln and Maeda, 1992; Maywood et al., 1996). Si les premiers travaux ont cherché à identifier des sites d'action de la mélatonine directement dans le MBH (Berria et al., 1989; Lincoln and Maeda, 1992; Maywood et al., 1996; Song and Bartness, 1996), il est maintenant accepté que la mélatonine agit indirectement via la T3 sur les **centres hypothalamiques régulant la reproduction** (Dardente et al., 2014; Hazlerigg and Simonneaux, 2014; Yoshimura et al., 2003).

### 1- L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (axe HPG)

Le contrôle de l'activité de reproduction dépend d'une petite population de neurones bipolaires, dispersés dans l'aire préoptique (POA) de l'hypothalamus qui synthétisent la gonadolibérine (Gonadotropin-Releasing Hormone, GnRH). Ces neurones projettent dans l'éminence médiane et libèrent de la GnRH de manière pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. La GnRH se fixe sur des récepteurs GnRH-R localisés sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse pour stimuler la sécrétion de LH et d'hormone folliculo-stimulante (FSH). Ces gonadotropines agissent sur les gonades pour contrôler la production de gamètes et de stéroïdes sexuels qui en retour exercent un rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Herbison, 2016 pour revue, [Figure 17](#)).



**Figure 17 :** Fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (axe HPG)

Les neurones à gonadolibérine (GnRH) de l'aire préoptique libèrent dans l'éminence médiane la GnRH qui stimule en aval la production d'hormones lutéinisante (LH) et folliculo-stimulante (FSH) par les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Ces gonadotropines agissent sur l'activité des gonades et induisent la sécrétion de stéroïdes sexuels qui exercent un rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Image issue de Herbison, 2016.

## 2- La kisspeptine et le RFRP-3, des neuromodulateurs en amont des neurones à GnRH

De nombreuses études ont cherché à identifier les systèmes pouvant coordonner l'activité des neurones à GnRH et plusieurs neuropeptides et neurotransmetteurs ont été proposés pour jouer un rôle dans cette régulation. A partir des années 2000, deux neuropeptides de la famille des arginine-phenylalanine (RF)-amides, la **kisspeptine** (Kp) et la Gonadotropin-Inhibitory Hormone (GnIH) ont été proposés comme régulateurs de l'activité des neurones à GnRH (Kriegsfeld et al., 2018; Pinilla et al., 2012).

### a- Kisspeptine

La Kp, codée par le gène *Kiss1*, est essentiellement exprimée dans deux populations de neurones localisées dans le noyau arqué (ARC) et la POA.

En 2003, deux équipes indépendantes découvrent qu'une mutation du gène codant pour le récepteur de la Kp, GPR54 (aussi appelé Kiss1r), empêche la maturation de l'axe reproducteur et altère le comportement sexuel (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003) chez l'humain et la souris. Le rôle de la Kp et de son récepteur dans le déclenchement de la puberté et la fertilité ont également été mis en évidence chez de nombreuses espèces (Pinilla et al., 2012 pour revue). La Kp se caractérise notamment par un effet stimulateur puissant sur les neurones à GnRH.

En effet, des études montrent que des injections de Kp augmentent la sécrétion de GnRH ainsi que de LH et FSH (Gottsch et al., 2004; Messenger et al., 2005; Navarro et al., 2004; Okamura et al., 2013; Shahab et al., 2005) tandis que l'utilisation d'un antagoniste du Kp bloque la sécrétion des gonadotropines (Matsui and Asami, 2014). Plusieurs travaux prouvent que la Kp agit directement sur les neurones à GnRH. En effet, les neurones à Kp projettent directement sur les neurones à GnRH (Clarkson and Herbison, 2006; Decourt et al., 2016) qui expriment des récepteurs à la Kp à leur surface (Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005). De plus, des enregistrements électrophysiologiques ont montré que l'administration de Kp dans le milieu augmente la décharge de potentiels d'action des neurones à GnRH (Liu et al., 2008; Quaynor et al., 2007). Finalement, un KO du GPR54 spécifiquement dans les neurones à GnRH induit le même phénotype d'hypogonadisme hypogonadotrope que celui observé chez des animaux avec un KO du récepteur général (Novaira et al., 2014).

Les neurones à Kp de l'ARC projettent sur les terminaisons des neurones à GnRH pour réguler la pulsativité de la sécrétion de LH (Choe et al., 2013; Ezzat et al., 2015) et l'effet inhibiteur des stéroïdes sexuels sur l'expression de *Kiss1* dans l'ARC contribue au rétrocontrôle négatif de la régulation de GnRH/LH (Pinilla et al., 2012). Les neurones à Kp de la POA projettent sur le corps cellulaire des neurones à GnRH pour induire le pic préovulatoire de LH chez les femelles. Aussi, chez les femelles le nombre de neurones exprimant *Kiss1* dans la POA est plus important que chez les mâles (Yeo et al., 2016) et l'augmentation d'estrogènes pendant la période préovulatoire stimule l'expression de *Kiss1* dans la POA qui contribue au rétrocontrôle positif induisant le pic de GnRH/LH précédant l'ovulation (Ansel et al., 2010; Herbison, 2016; Pinilla et al., 2012; Smith et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance des neurones à Kp dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH et par conséquent de l'axe reproducteur.

#### b- RFRP-3

En 2000, Tsutsui et collaborateurs découvrent un nouveau neuropeptide capable d'inhiber la sécrétion de gonadotropines par l'hypophyse chez des cailles japonaises. Ce neuropeptide est alors nommé Gonadotropin-inhibitory hormone ou GnIH (Tsutsui et al., 2000) et son orthologue chez les mammifères, découvert la même année est nommé le RF-related peptide ou RFRP (Hinuma et al., 2000). Le gène *Rfrp* (ou *Npvf*) produit deux peptides fonctionnels, le RFRP-1 et le **RFRP-3**, à partir d'un même prépropeptide (Tsutsui, 2009). Chez les mammifères, comme montré dans l'étude de Tsutsui chez

l'oiseau, le RFRP-3 inhibe la production de LH (Clarke et al., 2008; Henningsen et al., 2017; Johnson et al., 2007; Kriegsfeld et al., 2006). En revanche, le RFRP-1 semble pas ou peu impliqué dans la régulation de l'axe HPG (Ancel et al., 2012; Pineda et al., 2010; Ubuka et al., 2012a) mais pourrait être impliqué dans d'autres fonctions neuroendocrines comme le contrôle de la sécrétion de prolactine (Hinuma et al., 2000). C'est donc essentiellement le RFRP-3 qui a été étudié pour son rôle dans la régulation de l'axe reproducteur (Tsutsui and Ubuka, 2020 pour revue).

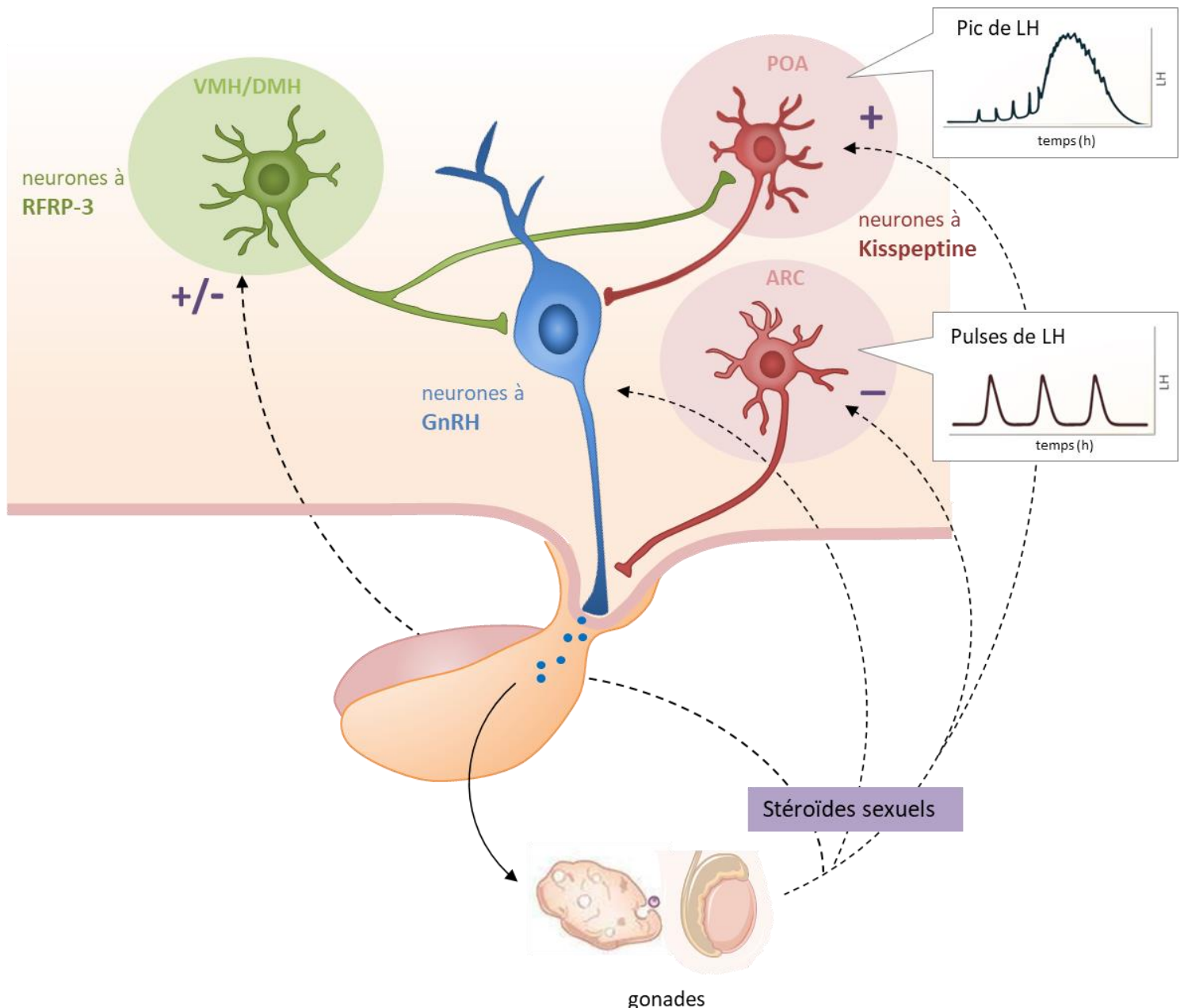
Les neurones à RFRP-3 sont localisés dans l'hypothalamus dorso- et ventro-médian (DMH et VMH) et projettent dans plusieurs régions hypothalamiques, notamment sur les neurones à GnRH (Henningsen et al., 2016; Kriegsfeld et al., 2006; Ubuka et al., 2012b) qui expriment le récepteur à RFRP-3 GPR147 (Rizwan et al., 2012; Ubuka et al., 2012b). Des projections à RFRP-3 ont également été localisées sur les neurones à Kp qui expriment le GPR147 (Rizwan et al., 2012). Ces résultats indiquent que le RFRP-3 pourrait agir directement sur les neurones à GnRH ou indirectement *via* une interaction avec les neurones à Kp (Figure 18).

Des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches d'hypothalamus de souris montrent que le RFRP-3 diminue l'activité électrique de 41% des neurones à GnRH (Ducret et al., 2009). Cependant, cette étude montre également qu'une petite population (12%) des neurones à GnRH est activée par le RFRP-3. Cet effet différentiel pourrait expliquer que dans certaines conditions, le RFRP-3 active l'axe HPG. En effet, plusieurs études rapportent un effet stimulateur du RFRP-3 sur la sécrétion de LH, notamment chez des mâles (Ancel et al., 2012; 2017; Leon and Tena-Sempere, 2015; Ubuka et al., 2012a). De façon générale, le RFRP-3 présente des effets variables selon le sexe, la dose, le moment d'injection, ou encore l'espèce (Angelopoulou et al., 2019 pour revue). Ces résultats variables pourraient dépendre de la régulation de l'activité des neurones à RFRP-3 par des stéroïdes sexuels, qui semble également variable selon l'espèce, le sexe et le moment du cycle chez la femelle. Ainsi, un traitement oestrogénique augmente l'activité des neurones à RFRP-3 chez des hamsters syriens femelles ovariectomisées (Kriegsfeld et al., 2006), et diminue l'expression de *Rfrp* chez des souris (Poling et al., 2012). Chez le hamster syrien, la ratte et le hamster sibérien, une supplémentation en stéroïdes sexuels après une gonadectomie ne semble pas produire d'effet sur l'expression de *Rfrp* (Angelopoulou et al., 2019; Henningsen et al., 2017; Rasri-Klosen et al., 2017; Revel et al., 2008) tandis que ce protocole induit un effet dépendant de la photopériode chez la brebis (Lomet et al., 2020). L'effet des stéroïdes sexuels sur le RFRP-3 semble également dépendant des concentrations circulantes qui varient au cours du cycle ovulatoire (Henningsen et al., 2017; Lomet et al., 2020).

Finalement, un KO du GRP147 chez la souris n'induit aucun impact majeur sur la puberté ni sur la fertilité des souris (León et al., 2014) et une récente étude montre que l'activation chronique des neurones à RFRP produit un effet reproducteur modéré sans impact sur la fertilité (Mamgain et al.,

2021). De façon intéressante, cette dernière étude suggère un rôle essentiel des neurones à RFRP dans l'inhibition de l'axe HPG par le stress (Mamgain et al., 2021).

Pour conclure, même si le rôle précis du RFRP-3 dans la fonction de reproduction est encore largement discuté et si son mode d'action demande encore à être étudié, toutes les études s'accordent à montrer que ce neuropeptide est capable de moduler l'activité des neurones à GnRH et par conséquent la sécrétion des gonadotropines.



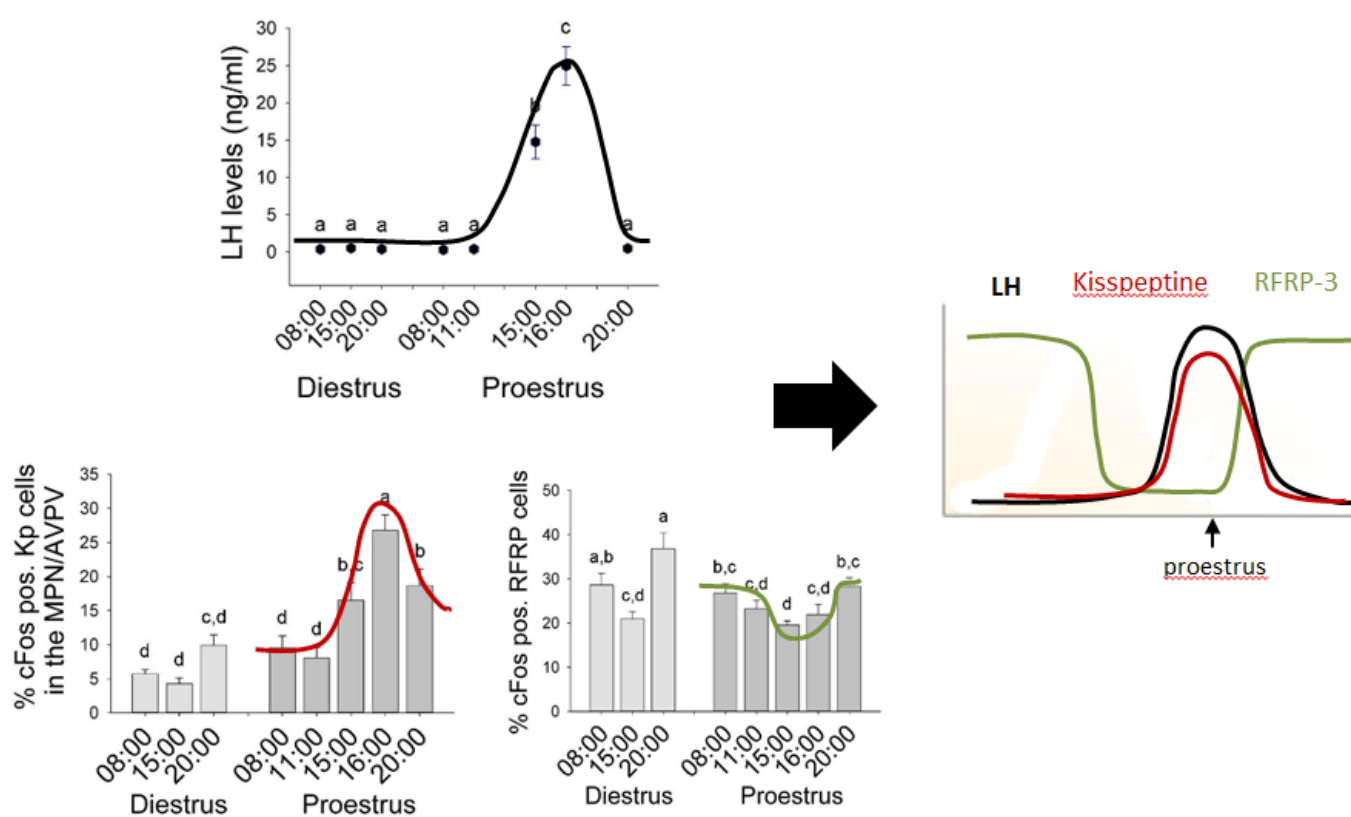
**Figure 18 :** Modulation de l'axe HPG par les neurones à kisspeptine et RFRP-3

Les neurones à kisspeptine dans le noyau arqué (ARC) et l'aire préoptique (POA) activent les neurones à GnRH et sont impliqués respectivement dans la libération pulsatile et le pic pré-ovulatoire de LH par l'hypophyse. Les neurones à RFRP-3 dans l'hypothalamus ventro- (VMH) et dorso- (DMH) médian sont essentiellement des inhibiteurs de l'activité des neurones à GnRH. Les stéroïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur les neurones à kisspeptine de l'ARC, positif sur ceux de la POA et variable sur les neurones à RFRP-3 selon le sexe, l'espèce ou le moment du cycle ovulatoire.



### c- Le rôle de la Kp et du RFRP-3 dans l'induction du pic préovulatoire de LH

La Kp et le RFRP-3 semblent jouer un rôle important pour coordonner l'induction du pic de LH, essentiel à l'ovulation. En effet, les neurones à RFRP-3 et à Kp reçoivent des afférences de l'horloge circadienne du NSC (Angelopoulou et al., 2019). Ces signaux circadiens, associés au rétrocontrôle des stéroïdes sexuels, permettent une augmentation ponctuelle de l'activité stimulatrice des neurones à Kp, coordonnée avec une diminution de l'activité inhibitrice des neurones à RFRP-3 à la transition repos/activité (jour/nuit chez les rongeurs nocturnes) le jour du proestrus. Ensemble l'activation des neurones à Kp et l'inhibition des neurones à RFRP-3 participeraient à la synchronisation du pic préovulatoire de LH (Angelopoulou et al., 2019; Henningsen et al., 2017, Figure 19).



**Figure 19 :** Induction du pic de LH coordonnée par la kisspeptine et le RFRP-3

Au moment du proestrus, l'augmentation ponctuelle de l'activité des neurones à kisspeptine (Kp) et l'inhibition de celle des neurones à RFRP-3 participent à la synchronisation du pic-préovulatoire de LH à la transition repos/activité. Figures adaptées de Henningsen et al., 2017.

En plus des signaux journaliers, les neurones à Kp et à RFRP-3 intègrent des signaux saisonniers et seraient impliqués dans la régulation dépendante de la photopériode de la reproduction chez les espèces saisonnières (Angelopoulou et al., 2019; Simonneaux, 2020 pour revues). Ainsi, ces deux neuropeptides pourraient constituer des **cibles pour les hormones thyroïdiennes** afin de véhiculer le message mélatoninergique et réguler l'activité saisonnière des neurones à GnRH et de la reproduction.



## **VI- La régulation saisonnière de l'axe reproducteur par les hormones thyroïdiennes**

En 1999, une étude de Viguié et collaborateurs montre que, chez des brebis thyroïdectomisées, une infusion intracérébroventriculaire de T4, contrairement à des administrations en périphérie, pendant 3 mois mime la diminution saisonnière de LH observée chez des brebis contrôles (Viguié et al., 1999). Chez des hamsters sibériens, l'utilisation de microimplants hypothalamiques libérant de la T3, induit un phénotype métabolique et reproducteur de PL chez les hamsters gardés en PC inhibitrice (Barrett et al., 2007; Murphy et al., 2012). Ces résultats indiquent que les hormones thyroïdiennes agissent au niveau central, notamment dans le MBH, pour réguler la reproduction saisonnière. L'effet opposé observé entre les reproducteurs de jours courts et de jours longs pourrait s'expliquer par un mécanisme d'action différent et/ou des cibles différentes des hormones thyroïdiennes.

Dans le système nerveux central, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes sont exprimés de façon quasiment ubiquitaire. Une large variété de types cellulaires expriment ces récepteurs (Dufourny et al., 2016; Wallis et al., 2010), il y a donc une grande quantité de cibles potentielles des hormones thyroïdiennes pouvant jouer un rôle dans le contrôle saisonnier de la reproduction.

### **1- La production locale des hormones thyroïdiennes et leurs mécanismes d'action**

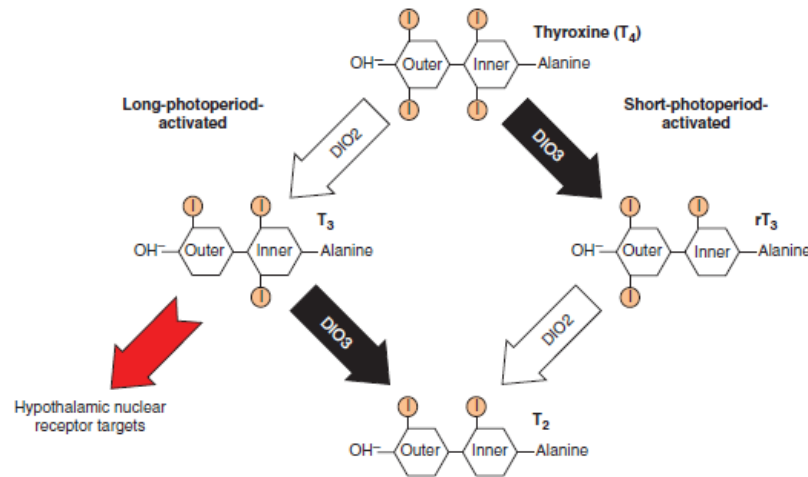
Les hormones thyroïdiennes sont produites par la glande thyroïde. Ces hormones ont un rôle prépondérant dans la croissance, le développement et le métabolisme de tous les vertébrés, et semblent agir sur de nombreux types cellulaires, tissus et organes différents (Bernal, 2007; Köhrle, 2018 pour revues).

Les principales hormones sécrétées par la glande thyroïde sont la prohormone T4 et l'hormone bioactive **T3**. Les hormones thyroïdiennes circulantes régulent leur propre synthèse par un système de rétroaction sur la glande thyroïde. La T3 inhibe l'activité des neurones produisant la thyroïdolibérine (TRH) dans le PVN. La TRH active la production de TSH par l'hypophyse antérieure qui stimule la sécrétion des hormones thyroïdiennes par la glande thyroïde. Cette régulation rétroactive permet de maintenir des niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes relativement constants. La glande thyroïde produit majoritairement la prohormone T4 (4 fois plus que la T3) dont la conversion en hormone bioactive T3 est régulée localement dans les tissus cibles grâce à des enzymes déiodinases (Mendoza and Hollenberg, 2017).

Il existe 3 types de déiodinases, Dio1, 2 et 3, qui produisent toutes une réaction de déiodination. La Dio2 convertit la T4 en T3 active, la Dio3 désactive la T4 et la T3 en reverse T3 (rT3) ou

diiodothyronine (T2) respectivement (Figure 20) et la Dio1 peut produire les deux types de réactions (St Germain et al., 2009).

C'est donc l'expression des déiodinases qui conditionne les concentrations locales de T3. Ainsi, dans l'hypothalamus, les concentrations d'hormones thyroïdiennes sont régulées par les déiodinases des tancytes dont l'activité est régulée, *via* la TSH $\beta$  de la *pars tuberalis*, par les rythmes saisonniers de la mélatonine (Hazlerigg and Simonneaux, 2014; Yasuo et al., 2005).



**Figure 20 :** Régulation photopériodique des hormones thyroïdiennes par les déiodinases

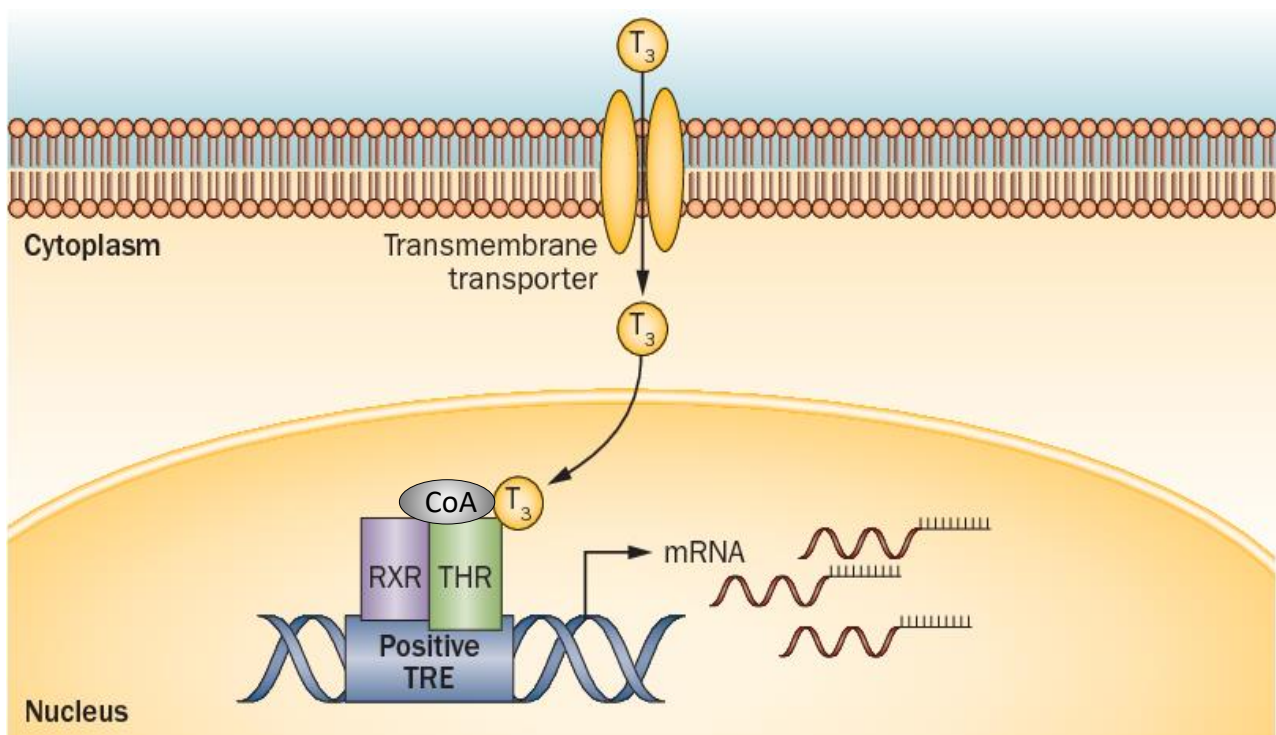
La déiodinase (Dio) 2 convertit la prohormone thyroxine (T<sub>4</sub>) en hormone bioactive triiodothyronine (T<sub>3</sub>) et la Dio3 convertit la T<sub>4</sub> et la T<sub>3</sub> en formes inactives. En photopériode longue (PL) l'augmentation de la Dio2 induit une augmentation hypothalamique de T<sub>3</sub> qui peut agir pour réguler l'expression de certains gènes en agissant sur des récepteurs nucléaires. Figure issue de Wood and Loudon, 2014.

Les hormones thyroïdiennes nécessitent des transporteurs spécifiques pour traverser les membranes (Figure 21). Il existe trois grandes familles de transporteurs des hormones thyroïdiennes: les organic anion-transporting polypeptides (OATP), les monocarboxylate anion transporters (MCT) et les L-amino acid transporters (LAT) (Suzuki and Abe, 2008). En particulier, le transporteur MCT8 est spécifique de la T<sub>4</sub> et la T<sub>3</sub> et semble exprimé dans les neurones de toutes les régions cérébrales sensibles aux hormones thyroïdiennes ainsi que dans les tancytes (Heuer et al., 2005; Milesi et al., 2017).

La T<sub>3</sub> exerce son action en se liant sur des récepteurs nucléaires qui agissent comme facteurs de transcription. Les **récepteurs aux hormones thyroïdiennes** (TR) forment généralement un hétérodimère avec des récepteurs X aux rétinoïdes (RXR) et recrutent des co-régulateurs différents lorsqu'ils sont liés ou non à la T<sub>3</sub>. Ainsi, le complexe RXR/TR non-lié à la T<sub>3</sub> s'associe à un co-répresseur et inhibe généralement la transcription du gène cible en se fixant sur un site « TH-responsive

element » (TRE) du promoteur. La liaison de la T3 sur le TR induit un changement de sa conformation et le recrutement d'un facteur co-activateur à la place du co-répresseur. Les co-répresseurs et co-activateurs liés au complexe RXR/TR peuvent induire respectivement une deacétylation des histones entraînant une répression de la transcription du gène ou une acétylation qui active la transcription (Figure 21). Certaines études rapportent néanmoins des effets contradictoires de la fixation des TR selon les cofacteurs, les tissus ou les types cellulaires ciblés ou les isotopes de TR (Flamant and Gauthier, 2013; Flamant et al., 2017; Grøntved et al., 2015; Lazcano et al., 2019).

Il existe trois isoformes principales de TR capables de se lier à la T3 : TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 et TR $\beta$ 2, synthétisés à partir des gènes *Thra* et *Thrb* (ou *THRA* et *THRB* chez l'humain) (Mendoza and Hollenberg, 2017). Les autres isoformes formés à partir de l'épissage alternatif de ces gènes ne possèdent généralement pas de domaine de liaison au ligand et/ou à l'ADN et sont donc incapables de se lier à la T3 (Chassande et al., 1997; Flamant et al., 2017; Williams, 2000).



**Figure 21 :** Fonctionnement des récepteurs nucléaires à la T3

La T3 entre dans les cellules grâce à des transporteurs membranaires et agit sur des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes (THR) formant un hétérodimère avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR). Le complexe THR/RXR se fixe sur un site TH-responsive element (TRE) dans le promoteur du gène cible et recrute des co-activateurs lorsqu'il est lié à la T3 afin d'activer la transcription du gène cible. Figure issue de Ortiga-Carvalho et al., 2014.

Dans le cerveau, les TR $\alpha$ 1 sont exprimés de façon quasiment ubiquitaire tandis que les TR $\beta$  ont une distribution plus restreinte à certaines régions, dont l'hypothalamus (Bernal et al., 2015; Bradley et al., 1989).

La multiplication des isoformes et l'expression large des récepteurs aux hormones thyroïdiennes rendent difficiles les études sur le mode d'action et les cibles cellulaires dans l'hypothalamus pour le contrôle saisonnier de la reproduction.

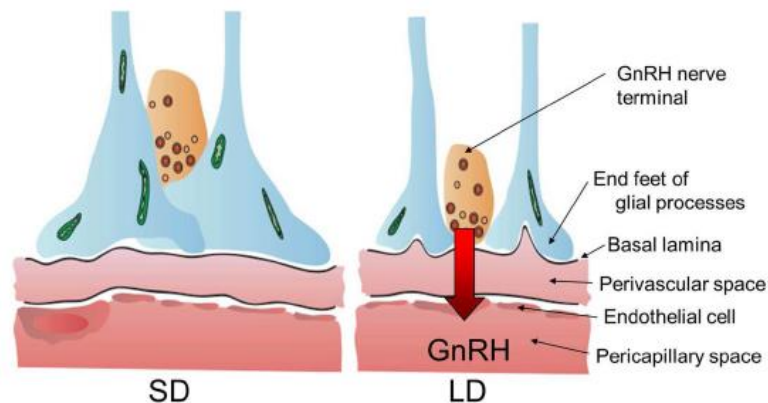
## 2- Une action des hormones thyroïdiennes directement sur les neurones à GnRH ?

Etonnamment, très peu d'études se sont intéressées à l'action directe des hormones thyroïdiennes sur les neurones à GnRH. Chez la brebis, le nombre de neurones à GnRH ne varie pas entre la PL et la PC (Urbanski et al., 1991) mais la pulsativité de sécrétion de GnRH augmente lorsqu'elles sont en PC activatrice (Barrell et al., 1992) et diminue en PL inhibitrice (Clarke, 1988; Clarke et al., 1987). De plus, l'ablation de la thyroïde n'a pas d'effet sur le nombre, la distribution et la morphologie des neurones à GnRH mais augmente la fréquence de pulsativité de la sécrétion de GnRH et la concentration systémique de LH conduisant à une activation sexuelle des brebis toute l'année (Webster et al., 1991).

Les travaux de Jansen et collaborateurs en 1997, montrent une colocalisation du TR $\alpha$  avec 28% des neurones à GnRH chez le hamster et 46% chez le mouton. De façon intéressante, ils relèvent également la présence du TR $\alpha$  dans de nombreuses cellules gliales avoisinant les neurones à GnRH (Jansen et al., 1997) dont le nombre varie selon le statut reproducteur de l'animal (Lehman et al., 1997). Ces travaux suggèrent l'existence d'un phénomène de plasticité saisonnière de l'interaction des neurones à GnRH avec les cellules gliales qui pourrait être régulé par les Tr $\alpha$ .

Un phénomène similaire est observé au niveau des tanycytes, dont les prolongements peuvent se rétracter ou s'étaler dans l'éminence médiane et le MBH en fonction du contexte physiologique, possiblement pour moduler la sécrétion de GnRH dans la circulation sanguine hypophysaire (Prevot et al., 2018; Shinomiya et al., 2014 pour revues). Ce mécanisme a particulièrement été étudié pour son rôle dans le contrôle de la libération de GnRH au moment du pro-œstrus (Prevot et al., 1998, 1999). Il existe également une plasticité saisonnière des pieds tanycytaires qui pourrait être impliquée dans le contrôle saisonnier de la sécrétion de GnRH. En effet, des études chez l'oiseau (Yamamura et al., 2004, 2006), chez le mouton (Butruille et al., 2018; Jansen et al., 2003) et chez le hamster (Bolborea et al., 2011) ont montré des modulations saisonnières de la structure des tanycytes, notamment aux alentours de l'éminence médiane où projettent les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH (Figure 22). Chez la caille japonaise, il a été montré que les TR sont nombreux dans l'éminence médiane (Yamamura et

al., 2004) et des implants de T3 chez des caillies gardées en PC induisent une rétraction des tancytes et l'induction d'un phénotype de PL (Yamamura et al., 2006).



**Figure 22 :** Contrôle saisonnier de la libération de GnRH par la plasticité des pieds tancytaires

En photopériode courte (SD), les terminaisons des pieds tancytaires forment une barrière et empêchent le contact des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH avec la lame basale de l'éminence médiane. En photopériode longue (LD), les pieds tancytaires se rétractent ce qui pourrait faciliter la libération de GnRH dans le système circulatoire. Figure issue de Shinomiya et al., 2014.

L'ensemble de ces résultats suggère que les variations photopériodiques des hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus pourraient réguler l'activité des neurones à GnRH, en agissant directement sur ces derniers pour réguler la pulsativité de la sécrétion de GnRH et/ou en induisant une restructuration des pieds tancytaires pour moduler la libération de GnRH dans la circulation hypophysaire.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse d'un effet direct des hormones thyroïdiennes sur la régulation saisonnière de GnRH. Il est également possible que les neurones peptidergiques opérant en amont des neurones à GnRH, comme les neurones à Kp et RFRP-3, puissent constituer des cibles des hormones thyroïdiennes.

### 3- Une action des hormones thyroïdiennes *via* une régulation de la Kp et/ou du RFRP-3

Comme décrit précédemment, la Kp et le RFRP-3 sont deux neuropeptides qui régulent l'activité des neurones à GnRH. La localisation des neurones à Kp et à RFRP-3 au sein du MBH suggère qu'ils pourraient être régulés par les hormones thyroïdiennes pour synchroniser la reproduction avec les saisons.

A la différence des neurones exprimant la GnRH, le nombre de neurones exprimant la Kp et le RFRP-3 varie entre la PC et la PL chez toutes les espèces étudiées à ce jour (Angelopoulou et al., 2019; Simonneaux, 2020; Simonneaux et al., 2013 pour revues).

#### a- La régulation saisonnière de Kp

Toutes les espèces saisonnières étudiées jusqu'à présent montrent des variations photopériodiques/saisonnières de l'expression de *Kiss1* dans l'ARC, mais le sens de la variation diffère selon les espèces.

Chez le hamster Syrien, des injections de mélatonine mimant une PC diminuent l'expression de *Kiss1* dans l'ARC tandis qu'une ablation de la glande pinéale l'augmente (Ansel et al., 2010; Revel et al., 2006) indiquant que les variations saisonnières de Kp dans l'ARC sont régulées par la mélatonine, avec un effet inhibiteur du pic long de mélatonine en PC chez cette espèce. De plus, l'expression de *Kiss1* dans l'ARC est inhibée par l'augmentation des stéroïdes sexuels circulants chez les animaux sexuellement actifs (Ansel et al., 2010; Rasri-Klosen et al., 2017; Revel et al., 2006). La balance entre les effets inhibiteurs de la mélatonine et des stéroïdes sexuels aboutit à une régulation différente de *Kiss1* selon les espèces de reproducteurs de jours longs. Ainsi, parmi les rongeurs sexuellement actifs en PL, l'expression de *Kiss1* dans l'ARC augmente chez le hamster syrien (Ansel et al., 2010; Revel et al., 2006; [Figure 23](#)) et la gerboise (Talbi et al., 2016a), mais diminue chez le hamster sibérien (Greives et al., 2007; Mason et al., 2007; Rasri-Klosen et al., 2017, [Figure 23](#)) et le hamster européen (Sáenz de Miera et al., 2014) à cause de l'effet du rétrocontrôle inhibiteur puissant des stéroïdes sexuels. Chez les grands mammifères comme le mouton (Caraty et al., 2007; Chalivoix et al., 2010; Smith et al., 2007; [Figure 23](#)), le dromadaire (Ainani et al., 2020) et le cerf (Barrell et al., 2016), où la PC active la reproduction, il semble que l'expression de *Kiss1* augmente dans tous les cas malgré l'effet du rétrocontrôle inhibiteur des stéroïdes sexuels ([Tableau 1](#)).

Dans la POA, la régulation saisonnière de l'expression de Kp dépend principalement de l'effet rétroactif des stéroïdes sexuels et est donc augmentée quand les animaux sont sexuellement actifs, quelque soit la photopériode (Simonneaux, 2020 pour revue, [Tableau 1](#)).

	PC	PL	Photo-réfraction	Pinéal-ectomie	Injection mélatonine	Effet stéroïdes	Injections Kp Photopériode inhibitrice
<b>Souris C57</b>	→ (Quignon, 2020)	→	X		→	AVPV activateur ARC inhibiteur (Harter, 2018)	12L/12D ↑ LH, FSH, GnRH
<b>Souris Mel-Pro (C3H, CBA)</b>	→ (Quignon, 2020 Saenz de Miera, 2020)	→	X				
<b>Mouton</b>	↑ AVPV ↑ ARC ↑ Contacts Kp-GnRH (Chalivoix 2010, Smith 2008)	↓ ↓ ↓				AVPV stéroïdes sexuels dépendant ARC stéroïdes sexuels indépendant > dépendant (Franceschini 2006, Caraty 2007, Chalivoix 2010)	↑ LH ovulation (Caraty 2007)
<b>Hamster Sibérien</b>	↓ AVPV ↑ ARC (Greives 2007, Mason 2007, Simonneau 2009)	↑ ↓	↓ (Milesi 2017)			AVPV stéroïdes sexuels dépendant (Ansel 2010, Chalivoix 2010) ARC stéroïdes sexuels dépendant (Greives 2008, Rasri-Klosen 2017, Saenz de Miera 2014)	LH, GnRH, stéroïdes Phénotype LP Injections périphériques: ↑ LH Pas phénotype LP (Rasri-Klosen 2017)
<b>Hamster Syrien</b>	↓ AVPV ↓ ARC (Revel 2006a)	↑ ↑	↑ ↑ (Revel 2006a, Ansel 2010)	↑ ↑ (Revel 2006a, Ansel 2010)	↓ (Revel 2006a, Ansel 2010)	AVPV stéroïdes sexuels dépendant (Ansel 2010) ARC stéroïdes sexuels Indépendant > dépendant (Revel 2006a)	↑ LH, GnRH, stéroïdes Phénotype LP Injections périphériques: ↑ LH Phénotype LP (Revel 2006, Ansel 2011)

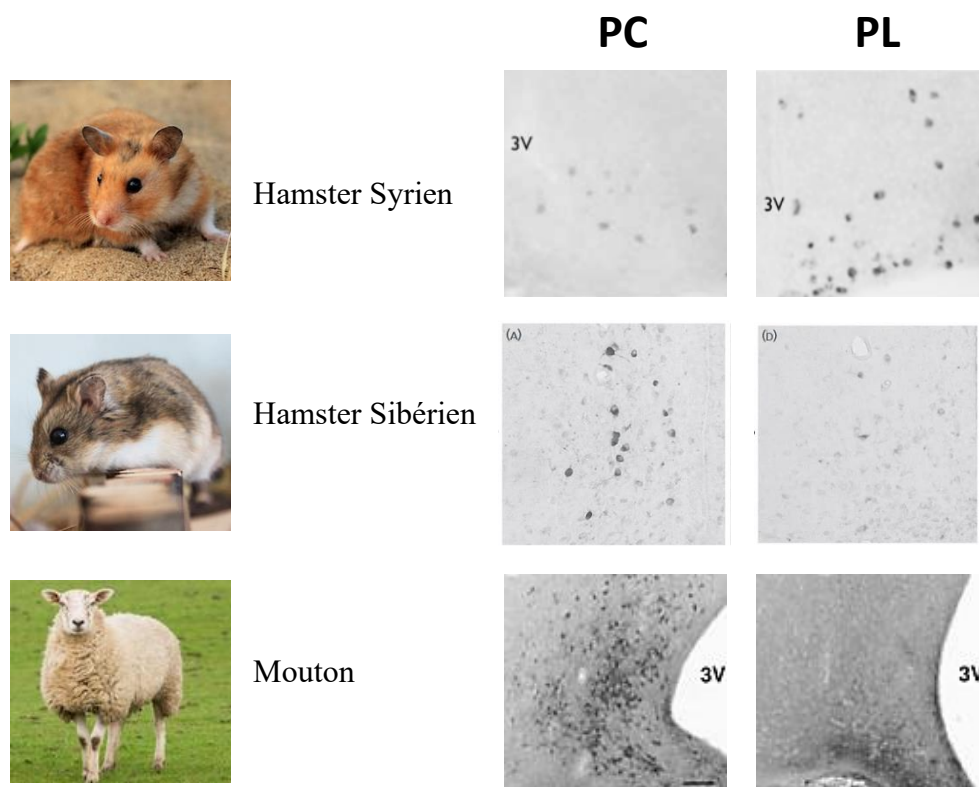
**Tableau 1 :** Régulation de la kisséptine (Kp) par la photopériode, la mélatonine et les stéroïdes sexuels et effet des injections de Kp chez les mammifères



	SP	LP	Photo-réfraction	Pinéal-ectomie	Injection mélatonine	Effet stéroïdes	Injections RFRP-3 Photopériode inhibitrice
<b>Souris C57</b>	→ (Quignon, 2020)	→	X		Voie orale ↓ (Quignon, 2020)	<b>Indépendant</b> stéroïdes sexuels  (Quennell 2010, Poling 2012)	12L/12D ↓ LH, GnRH  (Kriegsfeld 2006, Johnson 2007, Clarke 2008)
<b>Souris Mel-Pro (C3H, CBA)</b>	→ (Quignon, 2020 Saenz de Miera, 2020)	↑	X				
<b>Mouton</b>	→  (Smith 2008, Dardente 2008)	↑				<b>dépendant</b> stéroïdes sexuels  (Lomet 2020)	↓ LH, FSH, GnRH  (Smith 2008, Clarke 2008, 2012; Sart 2009) → LH (Decourt 2016)
<b>Hamster Sibérien</b>	→ Contacts RFRP3-GnRH (Revel 2008, Ubuka 2012)	↑ ↑	→  (Milesi 2017)	↑  (Revel 2008, Ubuka 2012)	↓  (Revel 2008, Ubuka 2012)	<b>Indépendant</b> Stéroïdes sexuels  (Revel 2008, Ubuka 2012)	↑ LH  ↓ LH chez hamsters en PL Pas d'effet gonadique  (Ubuka 2012, Cazarez-marquez, 2019)
<b>Hamster Syrien</b>	→ Contacts RFRP3-GnRH (Mason 2010, Revel 2008)	↑ ↑	↑  (Milesi 2017)	↑  (Revel 2008)	↓  (Revel 2008)	<b>Indépendant</b> Stéroïdes sexuels  (Revel 2008, Mason 2010)	↑ LH, GnRH, stéroïdes Phénotype LP + Kp  ↓ LH, stéroïdes, gonades + Kp chez hamsters en PL  (Ancel 2012, Henningsen 2017)

**Tableau 2 :** Régulation du RFRP-3 par la photopériode, la mélatonine et les stéroïdes sexuels et effet des injections de RFRP-3 chez les mammifères





**Figure 23 :** Expression photopériodique de *Kiss1* différente chez les mammifères

Chez le hamster syrien, l'expression de *Kiss1* est plus élevée en photopériode longue (PL) qu'en photopériode courte (PC) tandis que chez le hamster sibérien et le mouton, l'expression de *Kiss1* est plus élevée en PC qu'en PL. Images issues de Ansel et al., 2010 pour le hamster syrien, Rasri-Klosen et al., 2017 pour le sibérien et Smith et al., 2008 pour le mouton.

L'observation d'une régulation photopériodique des neurones à Kp, notamment dans l'ARC, a suggéré qu'ils pourraient être impliqués dans la modulation de l'activité de reproduction par la photopériode.

Pour appuyer cette hypothèse, des études ont montré que des infusions chroniques de Kp réactivent l'activité de reproduction chez des animaux gardés en photopériode inhibitrice. Ainsi, la Kp est capable d'augmenter la sécrétion de LH et réactiver l'ovulation chez des brebis gardées en PL inhibitrice. De la même façon, des infusions de Kp réactivent entièrement l'axe reproducteur de hamsters sibériens (Cázarez-Márquez et al., 2019) ou syriens mâles (Ansel et al., 2011; Revel et al., 2006) et femelles (Henningsen et al., 2017) maintenus en PC inhibitrice.

Pour conclure, les variations saisonnières de la synthèse de Kp dans l'ARC semblent être sous le contrôle à la fois de la mélatonine et du rétrocontrôle des **stéroïdes sexuels** (Simonneaux, 2020) pour revue, [Tableau 1](#)). Les neurones à Kp n'expriment pas de récepteurs à la mélatonine (Li et al., 2011), il est probable que la mélatonine agisse indirectement *via* la voie TSH-hormones thyroïdiennes pour réguler les variations saisonnières de *Kiss1*. En effet, une étude a montré que plus de 90% des neurones

à Kp expriment le récepteur TR $\alpha$  chez la brebis (Dufourny et al., 2016). Cependant, l'expression de Kp pourrait également être régulée par la neurokinin B ou la dynorphine, deux neuropeptides co-exprimés dans les neurones à Kp dont l'expression varie avec la photopériode (Bartzen-Sprauer et al., 2014; Lomet et al., 2020) ou encore par des neurones dopaminergiques inhibant l'action de la Kp sur la GnRH (Goodman et al., 2012).

De façon intrigante, si l'augmentation de T3 en PL est conservée chez les espèces saisonnières, la régulation de Kp induite par la PL est différente chez les animaux qui se reproduisent en jours courts et en jours longs. Ceci suggère que les hormones thyroïdiennes pourraient avoir une action opposée chez les deux types de reproducteurs en agissant de façon indirecte ou *via* des récepteurs différents pour réguler la synthèse de *Kiss1*.

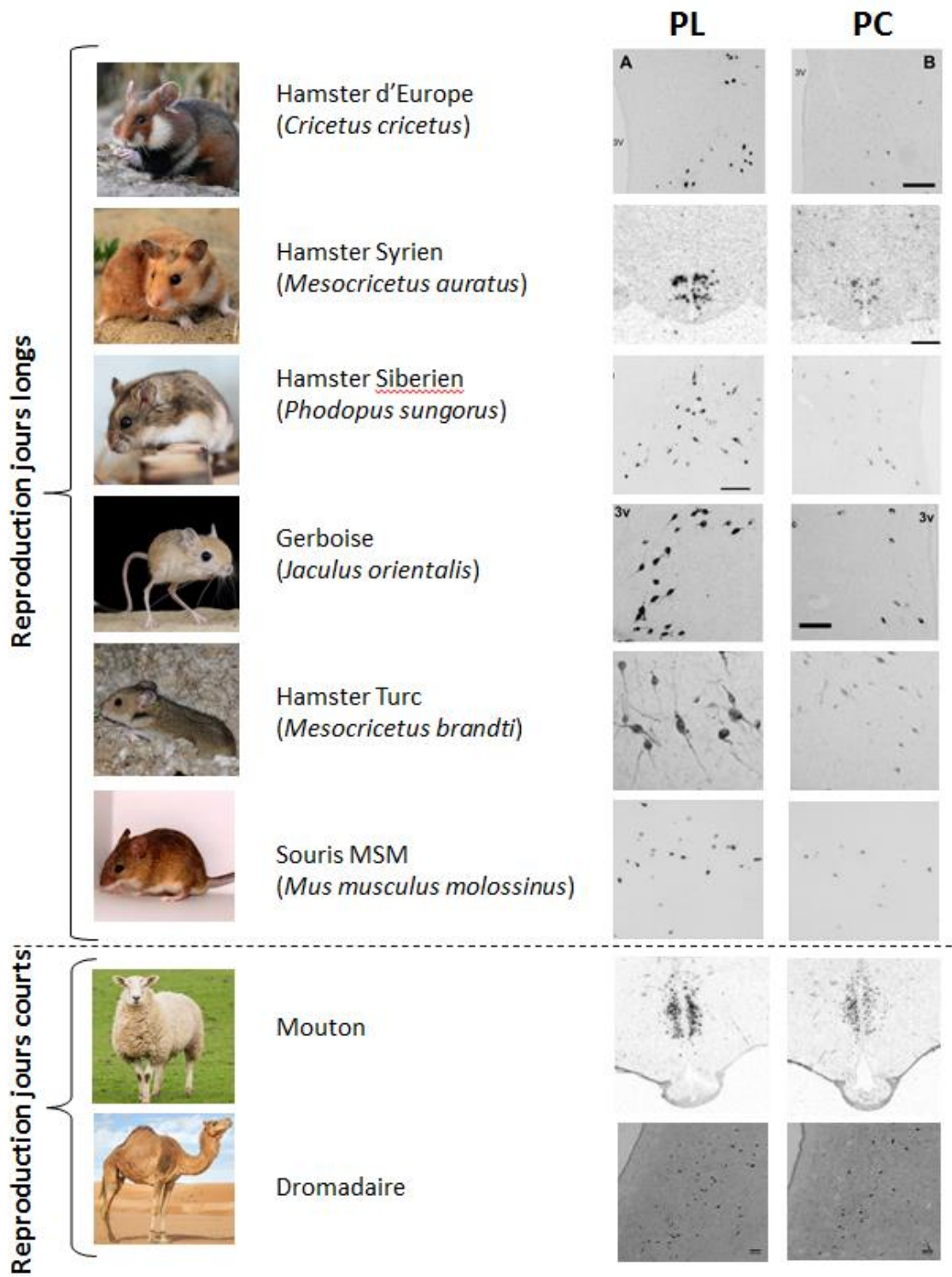
Finalement, des études montrent également un effet de la disponibilité des ressources alimentaires et de certains facteurs métaboliques comme la leptine sur l'expression de Kp (Castellano and Tena-Sempere, 2013; Navarro, 2020; Paul et al., 2009; Smith et al., 2006). Puisque la disponibilité des ressources alimentaires change avec les saisons et que les espèces saisonnières présentent des variations annuelles de leur activité métabolique, il est possible que ces facteurs impactent l'activité saisonnière de reproduction indirectement en agissant sur l'expression de Kp.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre la régulation saisonnière des neurones à Kp, notamment par les hormones thyroïdiennes.

#### b- Régulation saisonnière de RFRP-3

A la différence de la Kp, les **variations saisonnières de RFRP-3 sont très conservées** chez toutes les espèces étudiées avec une augmentation de l'expression de *Rfrp* en PL et une diminution en PC que ce soit chez les reproducteurs de jours longs comme le hamster syrien (Mason et al., 2010; Revel et al., 2008), le hamster sibérien (Revel et al., 2008; Ubuka et al., 2012a), le hamster européen (Sáenz de Miera et al., 2014) et la gerboise (Janati et al., 2013) ou chez des espèces reproductrices de jours courts comme le mouton, (Dardente et al., 2008; Smith et al., 2008) ou le dromadaire (Ainani et al., 2020) (Angelopoulou et al., 2019 pour revue, [Figure 24](#)).

De façon intéressante, la diminution du nombre de neurones à RFRP-3 en PC est généralement corrélée à une diminution de la densité des fibres RFRP-3 apposées sur les neurones à GnRH en PC (Henningesen et al., 2016; Mason et al., 2010; Smith et al., 2008; Ubuka et al., 2012a).



**Figure 24 :** Expression photopériodique de *Rfrp* conservée chez les mammifères

Chez les reproducteurs de jours longs, comme chez les reproducteurs de jours courts, la variation saisonnière/photopériodique de l'expression de *Rfrp* est conservée avec une augmentation en photopériode longue (PL) et une diminution en photopériode courte (PC) chez toutes les espèces étudiées. Image issue de Angelopoulou et al., 2019.

Des expériences chez les rongeurs ont montré le rôle de la mélatonine dans les variations photopériodiques du nombre de neurones à RFRP-3 (Revel et al., 2008; Ubuka et al., 2012a). Chez le hamster syrien et le sibérien, il a été montré que la pinéalectomie avant le transfert en PC inhibitrice, empêche la diminution du nombre de neurones à RFRP-3 qui reste identique à celui des animaux en PL, associé à un maintien de l'activité de reproduction. A l'inverse, des injections de mélatonine chez des hamsters gardés en PL induit une diminution drastique du nombre de neurones à RFRP-3 (Revel et al., 2008; Ubuka et al., 2012a, [Tableau 2](#)). La diminution de l'expression de RFRP-3 dans le MBH en PC semble donc bien sous le contrôle de la mélatonine.

L'effet rétroactif saisonnier des stéroïdes sexuels sur les neurones à RFRP-3 est controversé et dépend des espèces avec une expression de RFRP-3 qui semble indépendante de ce rétrocontrôle chez le hamster mâle et femelle (Henningsen et al., 2017; Mason et al., 2010; Revel et al., 2008; Smith et al., 2008; Ubuka et al., 2012b) mais dépendante chez le mouton (Lomet et al., 2020).

De façon intéressante, la diminution conservée de RFRP-3 en PC est associée à des phénotypes d'activité sexuelle opposés, respectivement actif ou inactif chez les reproducteurs de jours courts ou de jours longs, suggérant un effet opposé du RFRP-3 sur la synchronisation saisonnière de la reproduction selon le phénotype reproducteur ([Figure 24](#)). Chez la brebis, une infusion de RFRP-3 a été associée à une inhibition de la production de GnRH et de LH (Clarke et al., 2008; Sari et al., 2009; Smith et al., 2008, 2012). Cependant, une étude plus récente utilisant différents protocoles d'administration du RFRP-3 n'a trouvé aucun effet des infusions de RFRP-3 chez les brebis (Decourt et al., 2016). Chez les hamsters syriens et sibériens mâles, des injections aiguës de RFRP-3 augmentent la production de GnRH et de LH et les niveaux de testostérone circulants (Ancel et al., 2012; Ubuka et al., 2012a). L'étude d'Ubuka sur le hamster sibérien montre cependant que l'effet du RFRP-3 est variable selon la photopériode à laquelle sont adaptés les hamsters sibériens au moment de l'injection (Ubuka et al., 2012a) avec un effet inhibiteur en PL et stimulateur en PC (Ubuka et al., 2012a). Au contraire l'effet stimulateur du RFRP-3 chez le hamster syrien mâle s'observe en PC et en PL (Ancel et al., 2012). Des effets aigus dépendants du sexe ont également été rapportés chez la souris (Ancel et al., 2017) et le hamster syrien (Ancel et al., 2021; Henningsen et al., 2017) avec un effet stimulateur sur la LH chez les mâles et un effet inhibiteur au moment du pic préovulatoire chez les femelles.

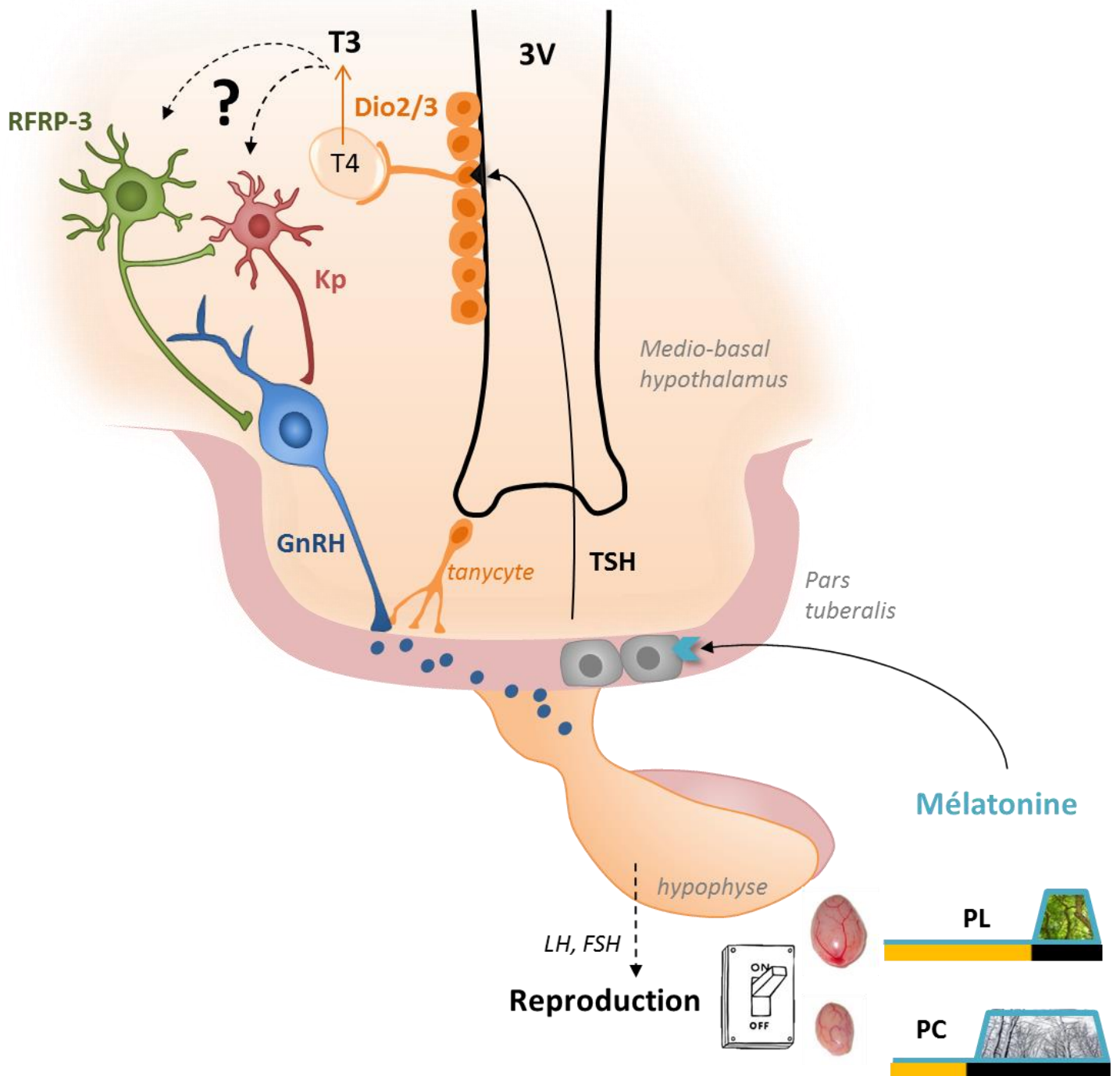
Chez des hamsters syriens mâles et femelles maintenus en PC inhibitrice, des injections chroniques (plusieurs semaines) de RFRP-3 restaurent une activité de reproduction associée à une augmentation de Kp dans l'ARC similaires à celles observées en PL (Ancel et al., 2012; Henningsen et al., 2017; Ubuka et al., 2012a) suggérant un rôle majeur du RFRP-3 dans le contrôle saisonnier de la reproduction chez cette espèce. Cependant, ce même protocole n'a pas été capable de restaurer le système reproducteur de hamsters sibériens mâles et femelles (Cázarez-Márquez et al., 2019).

Si la Kp semble nécessaire à une activité normale du système reproducteur, l'altération de l'action du RFRP-3 ne semble pas induire de conséquences majeures sur le système reproducteur (León et al., 2014). Le RFRP-3 semble néanmoins avoir un rôle clé dans la régulation saisonnière de la reproduction étant donné ses variations photopériodiques importantes et ses effets rapportés sur l'axe HPG. Ainsi, l'augmentation conservée du nombre de neurones exprimant le RFRP-3 en PL, associée à un effet inhibiteur rapporté (bien que non confirmé) sur l'axe HPG du mouton, et à un effet stimulateur sur l'axe HPG de certains rongeurs, suggère que cette population neuronale pourrait constituer un lien entre l'intégration du signal photopériodique et la régulation différentielle de l'axe HPG en fonction du phénotype reproducteur de jours courts ou longs. Les neurones à RFRP-3 pourraient intégrer le message photopériodique via une action directe ou indirecte des hormones thyroïdiennes et transmettre cette information au système reproducteur en agissant sur les neurones à GnRH et/ou à Kp, ou *via* des cibles intermédiaires (Figure 25). Les différents effets du RFRP-3 selon le sexe, l'espèce ou la photopériode suggèrent que le RFRP-3 pourrait agir via différents récepteurs de la famille des peptides RF-amides (Quillet et al., 2016; Rouméas et al., 2015) ou encore via une action indirecte utilisant un médiateur intermédiaire.

Pour conclure, bien que chez toutes les espèces étudiées à ce jour, les variations saisonnières de RFRP-3 sont très conservées avec des niveaux d'expression plus élevés en PL qu'en PC, le rôle du RFRP-3 dans le contrôle saisonnier de l'activité de reproduction est encore largement discuté. L'augmentation de T3 intrahypothalamique en PL étant également conservée chez toutes les espèces saisonnières étudiées, les neurones à RFRP-3 pourraient constituer une cible des hormones thyroïdiennes pour transmettre le message mélatoninergique vers l'axe reproducteur. A l'appui de cette hypothèse, il a été rapporté que des changements de concentrations en hormones thyroïdiennes chez des souris hyper- et hypothyroïdiennes modifient l'expression de RFRP-3. Cette étude montre par ailleurs que les neurones à RFRP-3 expriment respectivement 51,4% et 33% de TR $\alpha$  et TR $\beta$ , indiquant la possibilité d'un effet direct des hormones thyroïdiennes sur ces neurones (Kiyohara et al., 2017). A l'inverse, une récente étude d'analyse de génome chez la brebis ne relève aucun effet d'une thyroïdectomie sur l'expression de *Rfrp* (Lomet et al., 2018).

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour clarifier l'effet des hormones thyroïdiennes sur les neurones à RFRP-3 et analyser si une altération du système thyroïdien pourrait supprimer les variations photopériodiques de RFRP-3 dans l'hypothalamus.





**Figure 25 :** Régulation des neurones à kisspeptine et RFRP-3 par les variations photopériodiques de T3 sous le contrôle de la mélatonine

Les variations photopériodiques de TSH dépendantes de la mélatonine régulent l'expression des diodinasés (Dio) 2 et 3 qui contrôlent les concentrations d'hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus médio-basal de façon à avoir un niveau de T3 plus élevé en photopériode longue que courte. Il est proposé que la T3 locale régule les neurones à RFRP-3 et à kisspeptine (Kp) qui agissent directement ou indirectement sur les neurones à gonadolibérine (GnRH) pour contrôler la production des hormones sexuelles lutéinisantes (LH) et folliculo-stimulantes (FSH) et la reproduction en fonction de la photopériode.

A l'appui de cette littérature incluant des études réalisées dans mon équipe, j'ai développé un projet visant à étudier la régulation de l'expression des neuropeptides hypothalamiques Kp et RFRP-3 par la T3. Dans ce projet j'ai principalement cherché à répondre à deux questions :

- *Est-ce que les variations de T3, dépendantes de la mélatonine dans l'hypothalamus régulent l'expression saisonnière de Kp et/ou de RFRP-3 ?*
- *Comment les hormones thyroïdiennes agissent sur l'expression des neuropeptides hypothalamiques ?*

Pour répondre à ces questions, j'ai analysé l'effet de la mélatonine sur l'expression des gènes de la voie TSH-T3 et des peptides RF-amides hypothalamiques chez des souris contrôles, puis sur des souris portant une mutation d'un récepteur aux hormones thyroïdiennes soit générale, soit neuronale. Par la suite l'utilisation de souris portant cette mutation uniquement dans les neurones m'a permis de tester l'hypothèse d'un effet direct de la T3 sur les neurones à RF-amides hypothalamiques.

### Régulation des neuropeptides RF-amides par la T3 hypothalamique

Intégration photopériodique	Régulation saisonnière de l'axe reproducteur
<ul style="list-style-type: none"> <li>• La <b>mélatonine</b> constitue un <b>message neuroendocrine</b> indiquant la <b>photopériode</b> dans le système nerveux central</li> <li>• Les variations de mélatonine induisent la production de TSH<math>\beta</math> dans la <i>pars tuberalis</i> et régulent des variations de l'expression de Dio2 et Dio3 dans les tanocytes</li> <li>• La balance des Dio2/3 induit une <b>augmentation des concentrations hypothalamiques de T3 en PL</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les neurones à <b>Kp</b> et <b>RFRP-3</b> régulent l'activité des neurones à GnRH</li> <li>• L'expression de Kp et RFRP-3 varie en fonction de la photopériode</li> <li>• Kp et RFRP-3 semblent jouer un rôle dans le <b>contrôle saisonnier de la reproduction</b></li> </ul>
<p><b>Questions:</b></p> <p>Est-ce que les variations de T3, dépendantes de la mélatonine dans l'hypothalamus régulent l'expression saisonnière de Kp et/ou de RFRP-3 ?</p> <p>Comment les hormones thyroïdiennes agissent-elles sur l'expression des neuropeptides hypothalamiques?</p>	

  
**PROJET 1**

# *Chapitre 4*

## **Neurogenèse tanycytaire**

---

### **Modèles animaux génétiquement modifiés**



## VII- *L'hypothèse du contrôle thyroïdien de la reproduction via une neurogenèse hypothalamique saisonnière.*

Les tanocytes ont un rôle central dans l'intégration du message photopériodique en régulant les concentrations locales d'hormones thyroïdiennes dans le MBH grâce à une régulation de la balance des Dio2/Dio3 par la TSH $\beta$  de la *pars tuberalis*. Cependant, les mécanismes par lesquels les hormones thyroïdiennes transfèrent l'information saisonnière vers le système reproducteur restent encore non-élucidés. Si la première partie de ma thèse a porté sur l'étude du rôle des TR dans la médiation des effets des hormones thyroïdiennes sur les neurones à Kp et RFRP-3 hypothalamiques, dans la seconde partie de ma thèse j'ai testé l'hypothèse d'une régulation de ces neurones hypothalamiques *via* des processus de neurogenèse saisonnière issue des tanocytes.

### 1- Les tanocytes, des cellules au cœur de l'intégration du message saisonnier dans l'hypothalamus

#### a- Une structure plastique à l'interface cerveau-périphérie

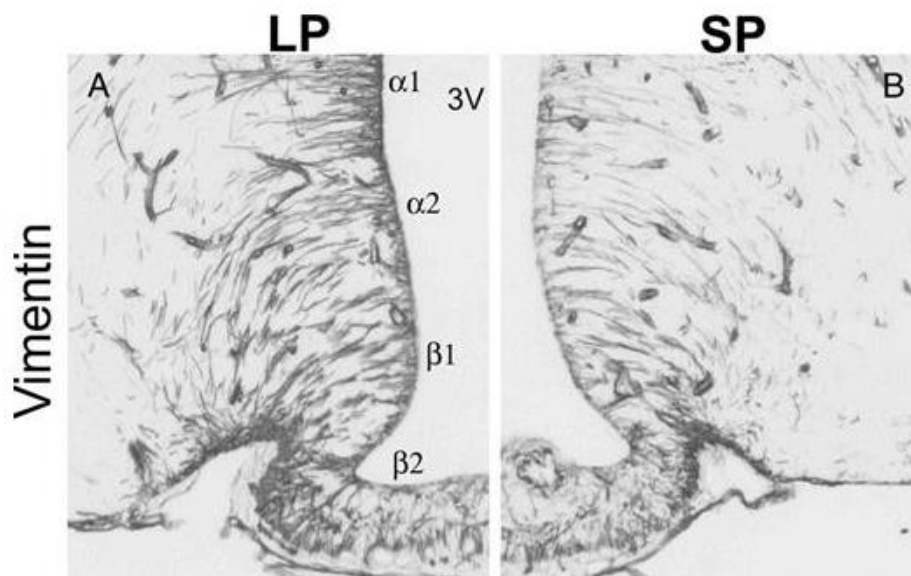
Les tanocytes sont des cellules épendymaires spéciales dont les corps cellulaires bordent les parois latérales et basales du 3<sup>ème</sup> ventricule et dont les prolongements s'étendent dans l'éminence médiane, l'ARC, le VMH et le DMH. Les terminaisons des prolongements tanocytaires (pieds tanocytaires) présentent une plasticité morphologique qui s'adapte en fonction de différentes conditions environnementales et physiologiques (Prévoit et al., 1999, 2013). Il existe plusieurs types de tanocytes, définis principalement par leur localisation (Rodríguez et al., 2005). Les tanocytes  $\beta$  bordent la paroi ventrale et les parois latérales les plus ventrales du 3<sup>ème</sup> ventricule. Ils envoient des prolongements dans l'éminence médiane et l'ARC et leurs terminaisons sont souvent en contact avec les capillaires fenestrés de l'éminence médiane. Leur position stratégique à la limite entre l'hypothalamus et le système vasculaire leur donne un rôle de barrière contrôlant le passage des molécules du sang vers le liquide céphalo-rachidien. Les tanocytes  $\alpha$  bordent les parois latérales du 3<sup>ème</sup> ventricule en position dorsale et envoient des prolongements vers le DMH et le VMH principalement. Leurs terminaisons sont également en contact avec le système vasculaire, ce qui leur permet aussi de jouer un rôle d'interface entre l'hypothalamus et le sang dont la perméabilité varie en fonction des signaux métaboliques perçus (Prévoit et al., 2018).

Actuellement, l'exemple le plus documenté du rôle des tanocytes dans la communication cerveau-périphérie concerne la régulation de l'activité métabolique par la prise alimentaire (Bolborea and Dale, 2013; Ebling and Lewis, 2018; Langlet, 2014; Prévoit et al., 2018 pour revues). En effet, les

tanycytes sont capables de détecter les niveaux de glucose sanguin (Elizondo-Vega et al., 2015; García et al., 2003), et, après un jeûne de 24h, la barrière tanycytaire se réorganise afin d'augmenter sa perméabilité aux molécules comme la ghréline qui stimule les neurones orexigéniques de l'hypothalamus (Langlet et al., 2013). Une autre étude a montré des effets de plasticité similaires visant à laisser passer de la leptine en fonction du statut nutritionnel de l'individu (Balland et al., 2014). Les tanycytes semblent donc avoir un rôle clé à l'interface hypothalamus-périphérie dans la modulation et le maintien de la balance énergétique en agissant sur le comportement d'alimentation.

#### b- Une sensibilité à la photopériode

La morphologie des tanycytes semble aussi sensible à la photopériode. En effet, chez les espèces saisonnières comme le hamster sibérien, la densité des prolongements tanycytaires varie entre une PC et une PL (Bolborea et al., 2011; Butruille et al., 2018; Diedrich et al., 2020; Kameda et al., 2003, [Figure 26](#)) et ces modifications morphologiques sont dépendantes des changements saisonniers de la production de mélatonine (Bolborea et al., 2011). La plasticité des prolongements tanycytaires pourrait donc être impliquée dans la perméabilité de la barrière en fonction du statut reproducteur saisonnier de l'animal (Shinomiya et al., 2014; Yamamura et al., 2004, section VI.2).



**Figure 26 :** Plasticité des prolongements tanycytaires

Chez le hamster sibérien, la densité des prolongements tanycytaires (visualisés ici par un marquage à la vimentine) dans l'hypothalamus médiobasal change entre la photopériode longue (LP) et la photopériode courte (SP). Image issue de Bolborea et al., 2011.

Comme précédemment décrit, les tanycytes présentent des variations saisonnières de leur activité biochimique. Ainsi, l'activité des Dio2 et Dio3 (voir section IV-3.a), mais aussi l'expression des gènes codant pour les transporteurs des hormones thyroïdiennes OATP1 et MCT8 (Ross et al., 2011)

présentent des variations photopériodiques. De plus, d'autres gènes et protéines tanycytaires varient avec la photopériode, comme certains composants du système de signalisation de l'acide rétinoïque (Barrett et al., 2006; Ross et al., 2004; Shearer et al., 2010), le GPR50 (Barrett et al., 2006), les gènes de synthèse des transporteurs OATP1 et MCT8 (Lomet et al., 2018) ou encore la L-Dopachrome tautomerase qui pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération de progéniteurs neuronaux (Dardente and Lomet, 2018). S'il est maintenant bien établi que les tanycytes participent à la régulation saisonnière des concentrations intrahypothalamiques d'hormones thyroïdiennes (Hazlerigg and Simonneaux, 2014), le rôle potentiel des gènes et protéines tanycytaires dans les mécanismes saisonniers reste encore à élucider.

### c- Une niche neurogénique

Les cellules neurales progénitrices/souches sont des cellules multipotentes capables de se diviser et se différencier pour générer de nouvelles cellules neuronales ou gliales dans le système nerveux central (néogenèse). Les niches neurogéniques sont classiquement localisées dans la zone sub-granulaire (SGZ) du gyrus denté dans l'hippocampe et la zone sub-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux (Vukovic et al., 2011). Cependant, depuis le milieu des années 2000, des études montrent que les tanycytes expriment certains marqueurs de cellules progénitrices/souches et constitueraient donc également une niche neurogénique (Kokoeva et al., 2005a, 2007; Lee and Blackshaw, 2012; Migaud et al., 2010b; Pierce and Xu, 2010; Prevot et al., 2018; Xu et al., 2005).

Les cellules progénitrices/souches issues des tanycytes semblent se différencier en neurones ou en cellules gliales intégrant les réseaux hypothalamiques principalement dans l'ARC, le DMH et le VMH ainsi que dans l'éminence médiane (Chaker et al., 2016; Lee and Blackshaw, 2012). Plusieurs études ont montré l'implication de ces cellules nouvellement formées dans des mécanismes de régulation du métabolisme et de la balance énergétique liée à la prise alimentaire (Bolborea and Dale, 2013; Haan et al., 2013; Kokoeva et al., 2005a; Lee and Blackshaw, 2012). D'autres études sont nécessaires afin d'étudier un rôle potentiel de cette néogenèse hypothalamique dans d'autres grandes fonctions régulées par les réseaux cellulaires de l'hypothalamus comme la reproduction.

## 2- Une neurogenèse saisonnière sous le contrôle des hormones thyroïdiennes ?

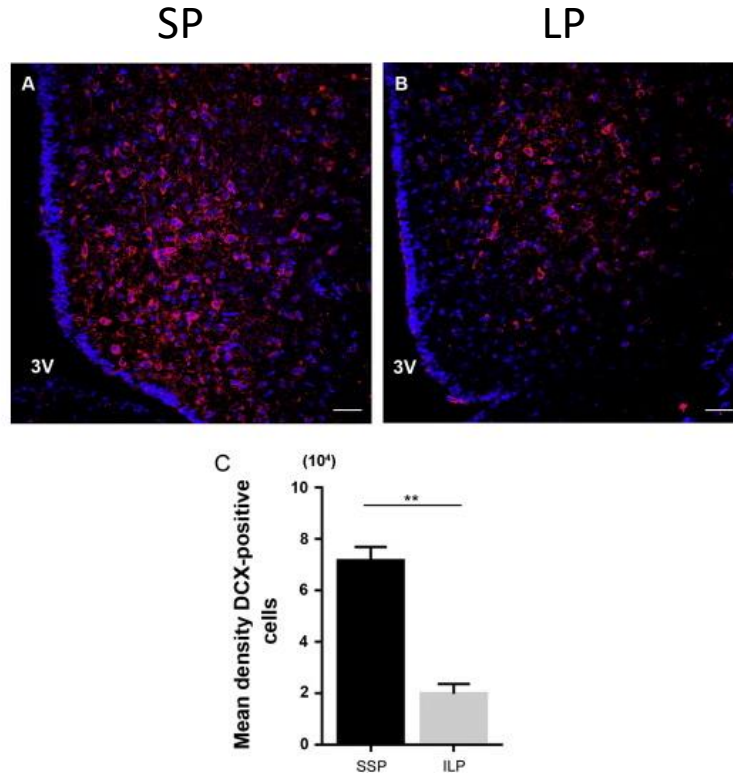
Dès les années 1990, des études montrent que des processus de neurogenèse sous le contrôle de signaux photopériodiques sont impliqués dans l'apprentissage du chant chez certaines espèces d'oiseaux (Kirn and Schwabl, 1997; Kirn et al., 1991; Nottebohm et al., 1994; Rasika et al., 1994).

Par ailleurs, deux études précurseurs montrent une régulation saisonnière de la néogenèse chez les mammifères. L'étude de Galéa et collaborateurs montre une diminution de la **prolifération cellulaire** dans le gyrus denté de femelles campagnols en PL activatrice (Galea and McEwen, 1999). La

seconde étude, de Huang et collaborateurs, montre une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire en PC dans la SVZ, la SGZ ainsi que dans l'hypothalamus chez le hamster syrien (Huang et al., 1998). Ces premières études concluent que la régulation saisonnière de la prolifération cellulaire pourrait jouer un rôle important dans les adaptations saisonnières endocrines et comportementales.

Par la suite, il a été postulé que des mécanismes de néogenèse issue des tanocytes pourraient participer à la régulation saisonnière de grandes fonctions hypothalamiques comme le contrôle de la balance énergétique ou de la reproduction (Bolborea and Dale, 2013; Hazlerigg and Lincoln, 2011; Helfer et al., 2019).

L'équipe de Migaud et collaborateurs a apporté des données renforçant cette hypothèse en démontrant que, chez des brebis, la prolifération cellulaire dans l'hypothalamus suit un cycle saisonnier dépendant de la mélatonine (Figure 27). Une première étude en 2011 montre une augmentation de la prolifération cellulaire dans la région du MBH et dans l'éminence médiane en PC qui est indépendante du rétrocontrôle des stéroïdes sexuels. Cette étude montre également que 70% des nouvelles cellules s'intégrant dans l'hypothalamus ont un profil astrocytaire contre seulement 16,7% ayant un profil neuronal (Migaud et al., 2011). En 2018, cette même équipe confirme la présence de variations photopériodiques de prolifération cellulaire dans l'hypothalamus et le gyrus denté des brebis et démontre que l'ablation de la glande pinéale diminue le pic de prolifération observé chez les animaux en PC, suggérant que ces variations photopériodiques seraient sous un contrôle mélatoninergique (Batailler et al., 2018). L'effet de la mélatonine sur la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices/souches avait déjà été rapporté (Chu et al., 2016) mais n'avait jusqu'alors jamais été étudié dans un contexte saisonnier.



**Figure 27 :** Variations photopériodiques de la neurogenèse hypothalamique chez le mouton

Chez le mouton, la neurogenèse (visualisée ici grâce à un marqueur de la doublecortine) dans l'hypothalamus augmente en photopériode courte (SP) et diminue en photopériode longue (LP). Image issue de Migaud et al., 2015.

La mélatonine pourrait agir directement sur des cellules progénitrices/souches qui expriment des récepteurs MT1 (Niles et al., 2004) ou pourrait agir via les modifications saisonnières d'hormones thyroïdiennes et/ou d'acide rétinoïque.

Le système rétinoïque pourrait également être impliqué dans la régulation saisonnière de la **néogenèse hypothalamique**. En effet, l'acide rétinoïque inhibe la prolifération cellulaire (Crandall et al., 2004; Goodman et al., 2012; Jacobs et al., 2006) et une étude de Shearer et collaborateurs chez des rats F344 montre que l'expression de l'enzyme rétinaldéhyde déshydrogénase 1 (RALDH1), qui catalyse la synthèse d'acide rétinoïque dans les tanocytes, est élevée en PL lorsque la prolifération cellulaire est la plus basse (Shearer et al., 2012).

Le rôle des hormones thyroïdiennes dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices/souches est bien documenté (Fanibunda et al., 2018; Kapoor et al., 2015; Remaud et al., 2014). Des études chez l'animal montrent que l'hypothyroïdisme induit une diminution de la survie, de la différenciation et/ou de la prolifération des progéniteurs de la SVZ et de la SGZ associée à une augmentation de l'apoptose dans ces zones (Ambrogini et al., 2005; Desouza et al., 2005; Lemkine et al., 2005; Montero-Pedrazuela et al., 2006). L'utilisation de modèles de souris transgéniques a permis

de démontrer une implication des TR dans cette régulation (Desouza et al., 2005; Kapoor et al., 2010, 2012; Lemkine et al., 2005; López-Juárez et al., 2012) mais les mécanismes moléculaires sous-tendant l'action neurogénique des hormones thyroïdiennes dans le cerveau adulte ne sont pas encore bien connus.

Dans une revue de 2019, Helfer et collaborateurs proposent un nouveau modèle dans lequel la neurogenèse tancytaire pourrait réguler les variations saisonnières de la masse corporelle et de l'activité de reproduction. Leur modèle suggère que, chez le hamster, la diminution de T3 en PC augmenterait l'apoptose dans l'hypothalamus qui serait compensée par une prolifération accrue des progéniteurs cellulaires (Helfer et al., 2019). Un tel mécanisme serait cohérent avec le fait que la prolifération cellulaire semble plus forte en PC chez le hamster et la brebis, au moment où la concentration de T3 hypothalamique est basse (Helfer et al., 2019; Huang et al., 1998; Migaud et al., 2011; Shearer et al., 2012), mais n'expliquerait pas l'opposition du phénotype sexuel saisonnier entre les reproducteurs de jours courts et de jours longs.

De façon intéressante, l'utilisation d'un bloqueur de la prolifération cellulaire chez les brebis induit un décalage de leur période de reproduction, suggérant que les cellules nouvellement formées dans l'hypothalamus seraient impliquées dans la synchronisation de la reproduction des brebis (Batailler et al., 2018).

Dans la seconde partie de ma thèse j'ai testé l'hypothèse que des populations de neurones hypothalamiques impliqués dans la reproduction, comme les neurones à Kp ou à RFRP-3, pourraient être régulées par des mécanismes saisonniers de neurogenèse.

Ce nouveau projet s'est articulé autour de deux questions :

- 1- Existe-t-il des variations photopériodiques de la prolifération cellulaire et/ou de l'apoptose dans l'hypothalamus du hamster syrien ?*
- 2- Est-ce que de nouveaux neurones à Kp et/ou RFRP-3 sont intégrés dans les réseaux hypothalamiques à partir de processus de neurogenèse ?*

Pour répondre à ces questions, j'ai d'abord caractérisé les rythmes photopériodiques de prolifération cellulaire dans l'hypothalamus du hamster syrien, puis j'ai essayé d'identifier le profil des cellules nouvelles formées et intégrées dans les réseaux hypothalamiques.

## La néogenèse saisonnière dans l'hypothalamus du hamster

<b>Reproduction saisonnière</b>	<b>Néogenèse hypothalamique saisonnière</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Les <b>variations saisonnières</b> de la production de mélatonine induisent des changements de la <b>concentration d'hormones thyroïdiennes</b> dans l'hypothalamus</li><li>• Le <b>nombre de neurones</b> exprimant la <b>Kp</b> et le <b>RFRP-3</b> varie en fonction de la photopériode</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans des processus de <b>néogenèse</b></li><li>• Le mouton présente des variations saisonnières de la <b>prolifération cellulaire hypothalamique</b></li><li>• La neurogenèse hypothalamique chez le mouton semble <b>dépendante de la mélatonine</b> et serait impliquée dans la <b>synchronisation saisonnière de la reproduction</b></li></ul>

### Questions:

Est-ce qu'il existe des variations photopériodiques de la prolifération cellulaire et/ou de l'apoptose dans l'hypothalamus du hamster syrien?

Est-ce que des neurones à Kp et/ou RFRP-3 sont nouvellement formés par des processus de neurogenèse et intégrés dans les réseaux hypothalamiques?



### PROJET 2

## VIII- *Quels modèles pour étudier les rythmes saisonniers ?*

Le choix du modèle animal pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les rythmes saisonniers est très important, notamment parce que les adaptations aux contraintes environnementales présentent de fortes différences inter-espèces. Certaines espèces hibernent ou migrent, la période de reproduction diffère selon la physiologie de reproduction et notamment de la durée de gestation de la femelle, etc... Par ailleurs, certaines espèces de souris peuvent être des modèles intéressants pour l'étude des mécanismes d'action de la mélatonine ou des hormones thyroïdiennes bien que leur activité de reproduction ne soit pas conditionnée par la photopériode.

### 1- *Les espèces saisonnières et non-saisonnières*

La plupart des études sur les mécanismes centraux régulant les adaptations saisonnières utilisent des modèles animaux dont la physiologie et notamment l'activité de reproduction, varie avec la photopériode. Chez ces espèces « saisonnières », les variations de l'axe reproducteur peuvent s'accompagner de changements métaboliques, de la qualité du pelage ou encore de comportements (migration ou hibernation par exemple). Chez les espèces « non-saisonnières » le changement de photopériode n'induit pas de changement phénotypique ou comportemental visible, mais ces espèces peuvent néanmoins intégrer le message neuroendocrine photopériodique.

#### a- *Les espèces saisonnières*

La variété des modèles saisonniers utilisés est un avantage puisqu'elle permet de faire des comparaisons entre espèces, et ainsi d'évaluer les traits conservés et ceux dépendants de l'espèce. Ces comparaisons peuvent se faire chez des espèces très différentes comme le hamster et le mouton mais également chez des espèces appartenant à une même famille (différents modèles de hamsters) (Moffatt et al., 1993; Pévet, 1988). Une grande majorité des études sont réalisées chez des espèces d'oiseaux ou de mammifères (Dardente et al., 2019; Hazlerigg and Simonneaux, 2014; Nakayama and Yoshimura, 2018) mais des études sont également réalisées chez des espèces d'autres taxons comme les reptiles (Hawley and Aleksuk, 1976; Southwood et al., 2003), les téléostéens (Migaud et al., 2010a; Nakane et al., 2013), ou encore les insectes (Abrieux et al., 2020; Iiams et al., 2019; Matsuda et al., 2020).

Les reproducteurs de jours longs, comme les rongeurs ou les oiseaux, sont généralement des espèces de petite taille avec un temps de gestation/incubation court, ce qui permet un contrôle relativement facile des élevages. La caille, le hamster syrien et le hamster sibérien (Hazlerigg and Simonneaux, 2014; Hoffman and Reiter, 1965; Nakayama and Yoshimura, 2018) sont les modèles les



plus utilisés bien qu'il existe des études chez d'autres espèces d'oiseaux (ex : le moineau (Dixit and Singh, 2020), les étourneaux (Stevenson et al., 2013), la poule (Turkowska et al., 2014)) et de rongeurs (ex : la gerboise (Talbi et al., 2016a), le hamster d'europe (Dardente et al., 2003; Sáenz de Miera et al., 2018), le hamster turc (Hong and Stetson, 1986; Piekarski et al., 2014), le campagnol (Dark et al., 1983; Nelson et al., 1983)).

Chez les reproducteurs de jours courts, le mouton est l'espèce la plus étudiée (Dardente, 2012; Karsch et al., 1988; Ortavant et al., 1988) car la compréhension des mécanismes de la saisonnalité chez les ovins peut apporter des bénéfices dans le secteur agronomique, mais il existe également des études chez le cerf (Pollock, 1975; Suttie et al., 1989), le primate non-humain (Aujard et al., 2007; Sha et al., 2020), le dromadaire (Ainani et al., 2020; El Allali et al., 2005) et la chèvre (Muñoz et al., 2019). L'élevage de ces animaux peut s'avérer compliqué étant donné leur grande taille et leur période de gestation longue. Les études se font donc souvent dans le milieu naturel et/ou en partenariat avec des institutions agricoles ou vétérinaires.

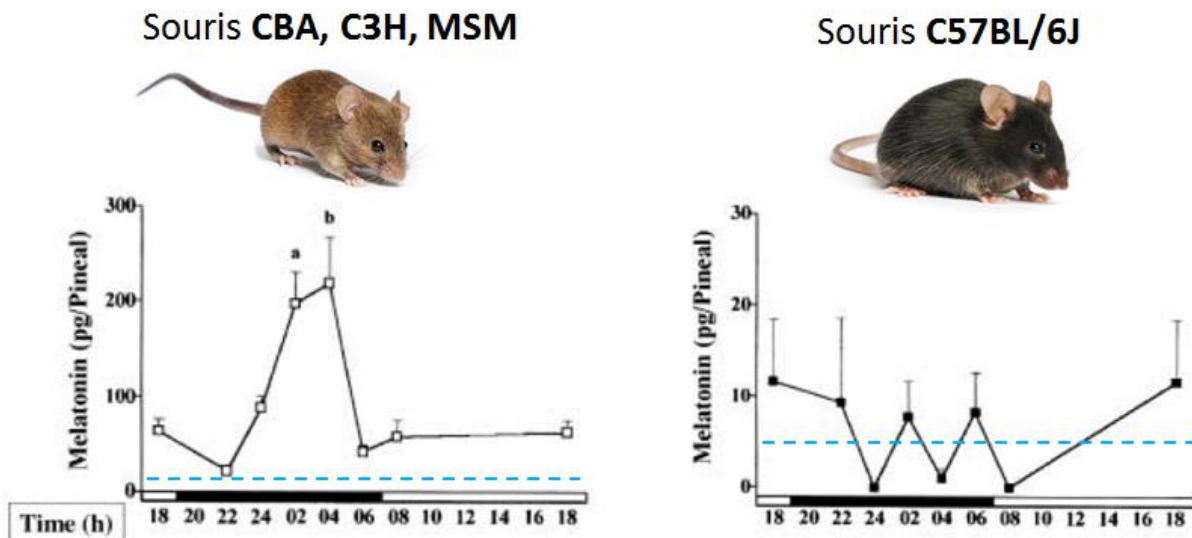
Le problème principal avec l'utilisation des modèles animaux saisonniers "non-conventionnels" est le manque de connaissance de leur génome et par conséquent l'**absence de modèles génétiquement modifiés**. De plus, l'efficacité des produits pharmacologiques et la sélectivité des anticorps ne sont souvent pas renseignées chez ces espèces. Enfin, le faible nombre d'études sur ces modèles limite la comparaison des résultats expérimentaux.

L'utilisation de modèles non-saisonniers, plus conventionnels en laboratoire, peut permettre de pallier ces difficultés dans certaines limites.

#### b- Le rat et la souris, modèles d'étude des fonctions « saisonnières » ?

La souris et le rat sont les deux modèles animaux les plus utilisés en laboratoire. Leur génome complet étant séquencé, de nombreux modèles génétiquement modifiés sont disponibles.

Dans la plupart des laboratoires, les rats et souris sont élevés avec une photopériode constante de 12 heures de lumière (12L) et 12 heures d'obscurité (12D). De plus, la plupart des souches de souris communes, comme la souris **C57BL/6J** par exemple, sont **déficientes en mélatonine** (Kennaway 2019, Goto 1989, von Gall 2000). Elle produit une quantité basale de mélatonine constante et très faible qui ne varie pas avec un changement de photopériode (Stehle 2002, [Figure 28](#)). Cette déficience en mélatonine est due à une mutation dans les gènes codant pour la HIOMT et/ou la AANAT, deux enzymes impliquées dans la synthèse de mélatonine (Ebihara et al., 1986; Kasahara et al., 2010; Roseboom et al., 1998, voir section III.3.a, [Figure 13](#)). Ces souris expriment néanmoins des récepteurs MT1 et MT2 et sont donc sensibles à la mélatonine exogène (Klosen et al., 2019; Ono et al., 2008a).



**Figure 28 :** Production nocturne de mélatonine chez la souris

Les souches de souris CBA, C3H et MSM produisent de la mélatonine avec un pic nocturne dont la durée est corrélée à la durée de la nuit. Les souris C57BL/6J sont déficientes en mélatonine, elles produisent un niveau résiduel très bas de mélatonine qui ne varie pas entre le jour et la nuit. Image adaptée de Stehle 2002.

Il existe cependant quelques souches de souris qui produisent de la mélatonine avec un pic nocturne dont la durée varie en fonction de la photopériode (Figure 28). Ainsi, les souches C3H et CBA produisent de la mélatonine et peuvent être utilisées comme modèle non-saisonnier pour l'étude des mécanismes d'intégration du signal photopériodique dans le système nerveux. En revanche, ces souris ne présentent aucune variation de l'activité et de la taille des gonades en fonction de la photopériode (Goto and Ebihara, 1990; Kennaway, 2019; Yasuo et al., 2009). La MSM (*Mus musculus molossinus*) est une souche de souris hybride dérivée d'une souche sauvage japonaise qui produit de la mélatonine et présente des variations photopériodiques modérées de la taille des organes reproducteurs (Goto et al., 1989; Kasahara et al., 2010; Moriwaki et al., 2009; Sáenz de Miera et al., 2020). La souris sylvestre ou souris du soir (*Peromyscus maniculatus*) est dérivée d'une souche sauvage prélevée dans le nord des Etats-unis. Elle produit également de la mélatonine mais seulement un tiers des animaux présente une régression des gonades en PC tandis que chez les autres le système reproducteur n'est pas sensible aux variations de la photopériode (Blank and Freeman, 1991; Fail and Whitsett, 1988). Ces observations sur différentes souches de souris semi-sauvages suggèrent que dans la nature, les souris pourraient avoir des traits saisonniers marqués, notamment une reproduction saisonnière afin de donner naissance aux petits lorsque les conditions environnementales sont favorables.

Toutes les souches de rats de laboratoire semblent produire de la mélatonine mais seule la souche Fischer 344 (F344) présente des variations photopériodiques de la taille des gonades et une réduction de l'activité de reproduction en PC. Ces rats ont donc été utilisés dans plusieurs études

investigant des mécanismes dépendant de la photopériode (Heideman and Sylvester, 1997; Leadem, 1988; Tavolaro et al., 2015; Yasuo et al., 2007).

Pour finir, de nombreuses études discutent l'impact des saisons chez l'humain. La plupart des populations humaines se sont affranchies des contraintes environnementales de la lumière, de la température et de la disponibilité alimentaire et sont capables de se reproduire à tout moment de l'année. Cependant, il a été montré que la sécrétion nocturne de mélatonine est plus longue en hiver qu'en été chez des humains (Wehr, 1991). De plus, plusieurs études montrent des effets subtils des saisons chez l'humain. L'effet le plus connu est l'apparition de symptômes dépressifs en automne/hiver, appelée « dépression saisonnière ». Cette dépression due à la réduction de la durée d'exposition journalière à la lumière en fin d'automne/hiver touche environ 2% de personnes en Europe (Magnusson, 2000). L'effet positif des traitements de luminothérapie sur les symptômes dépressifs suggère un effet mélatonine-dépendant dans cette pathologie qui pourrait être due à une dérégulation de la transmission monoaminergique en réponse à l'augmentation de la synthèse de mélatonine en PC (Kurlansik and Ibay, 2012; Winkler et al., 2006). L'impact des facteurs environnementaux saisonniers sur le système reproducteur humain est très controversé. En effet, des variations annuelles du nombre de naissances ont été rapportées, cependant ces variations pourraient être dues à un effet social ou culturel plutôt qu'un effet direct des variations saisonnières environnementales (Bronson, 1995). Plusieurs études montrent des variations saisonnières de la qualité du sperme humain, avec une augmentation de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes au printemps (Andolz et al., 2001; Chen et al., 2004; Levitas et al., 2013).

En 2015, une étude a démontré que plus de 4000 gènes humains présentent des profils saisonniers de leur expression avec une opposition de phase entre les populations de l'hémisphère nord et celles de l'hémisphère sud (Dopico et al., 2015). Cette étude pionnière a montré en particulier que des gènes impliqués dans le système immunitaire sont régulés de façon saisonnière chez l'humain. Une étude récente a aussi montré l'existence de rythmes saisonniers de l'expression de nombreuses hormones circulantes chez l'humain (Tendler et al., 2021). Dans cette ambitieuse analyse de millions d'échantillons sanguins provenant du service de santé israélien, les chercheurs ont mis en évidence la rythmicité annuelle des concentrations d'hormones impliquées dans la reproduction comme la testostérone, l'œstradiol ou la LH, mais également des hormones du métabolisme, de la lactation, du stress ou encore de la croissance (Tendler et al., 2021). Finalement, une méta-analyse récente rapporte des variations annuelles des concentrations circulantes de TSH et de T3 chez l'humain (Kuzmenko et al., 2021)

Par conséquent, si l'espèce humaine ne présente pas un phénotype ouvertement saisonnier, il semble néanmoins que la synthèse de nombreuses hormones et protéines soit dépendante des saisons. Il

serait intéressant d'étudier si ces régulations dépendent de variations photopériodiques de la production de mélatonine ou d'autres facteurs environnementaux (lumière, alimentation).

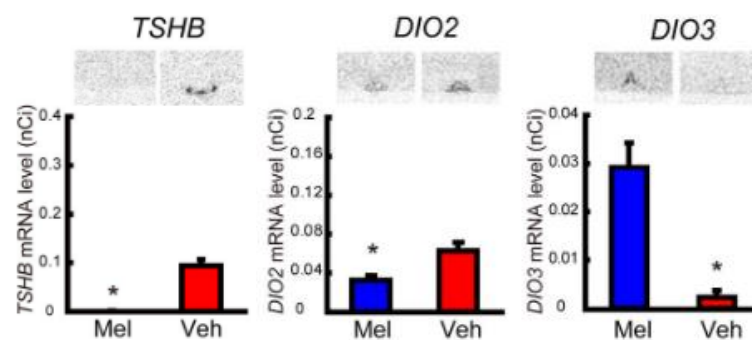
## 2- Le développement de nouveaux modèles génétiquement modifiés

Chez les espèces saisonnières produisant de la mélatonine, il existe très peu de modèles génétiquement modifiés disponibles. Aussi, la plupart des études sur les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les fonctions saisonnières de ces espèces utilisent souvent des agents pharmacologiques. La disponibilité de modèles de KO, de Knock-In (KI), permettant de marquer certaines populations cellulaires ou encore d'exprimer un gène lié à un promoteur particulier, ouvrirait de nouvelles perspectives pour les études dans le domaine de la saisonnalité.

Etant donné la quantité de modèles génétiquement disponibles chez les souris C57BL/6J, l'utilisation de cette souris pourrait s'avérer intéressante malgré sa déficience en mélatonine. Qui plus est, l'émergence de nouvelles techniques d'édition de génome pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la création de modèles saisonniers génétiquement modifiés.

### a- La souris comme modèle pour l'étude des rythmes saisonniers

Bien que les souris C57BL/6J ne présentent aucune variation de l'expression de TSH $\beta$ , Dio2 et Dio3, une étude d'Ono et collaborateurs en 2008 a montré qu'une injection journalière de mélatonine pendant 3 semaines inhibe l'expression de TSH $\beta$  et de Dio2 et augmente celle de Dio3 (Ono et al., 2008, Figure 29). Ces observations suggèrent que les souris **C57BL/6J conservent des récepteurs MT1 fonctionnels** et sont capables d'intégrer le signal mélatoninergique au moins jusqu'au niveau des tanocytes. Ces souris peuvent donc servir de modèles génétiques pour comprendre les mécanismes moléculaires utilisés par la mélatonine pour intégrer et transmettre le message photopériodique vers les centres hypothalamiques contrôlant la reproduction et l'activité métabolique.



**Figure 29** : Effet de l'administration de mélatonine chez des souris C57BL/6J

Une injection de mélatonine (Mel) une heure avant l'extinction de la lumière pendant trois semaines chez des souris C57BL6J gardées en photopériode longue inhibe l'expression de la thyroestimuline (TSH $\beta$ ) et de la diodine 2 (Dio2) et augmente l'expression de la diodine 3 (Dio3). Image adaptée de Ono et al., 2008.

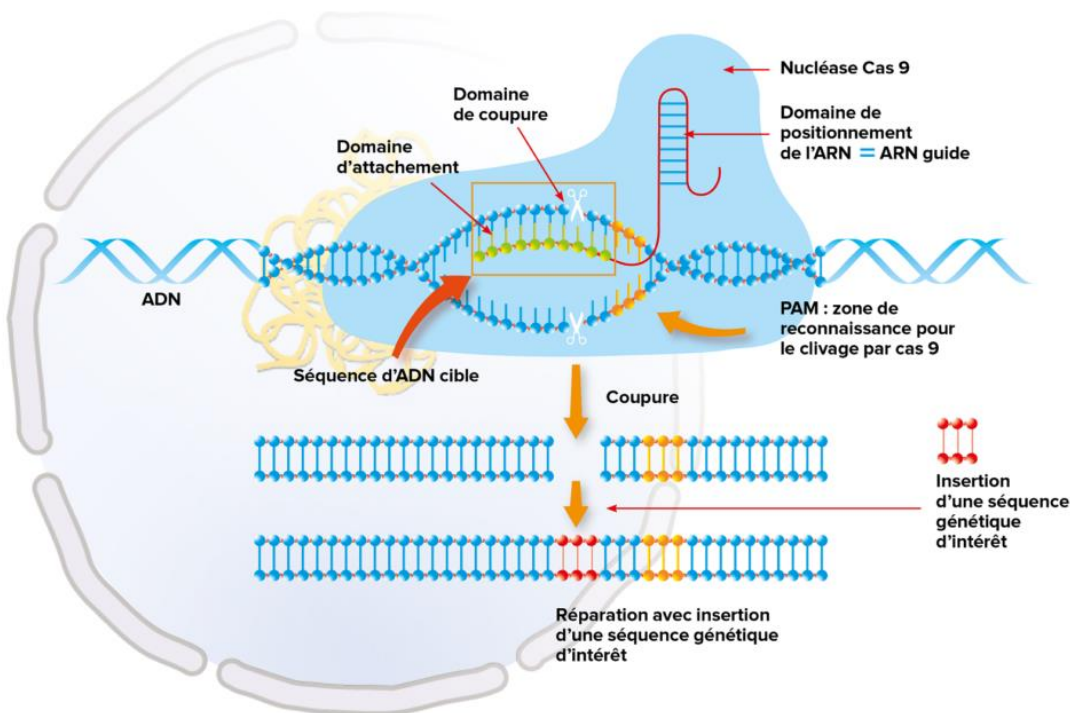
Chez les souris produisant de la mélatonine, peu de modèles génétiquement modifiés sont commercialisés et l'édition de génome par recombinaison homologue peut s'avérer fastidieuse et longue. Dans leur étude de 2009, Yasuo et collaborateurs ont pu générer, après des rétrocroisements sur 10 générations, une souris C3H portant une mutation du gène codant le récepteur MT1 et/ou MT2. Une autre solution est de croiser des souris déficientes en mélatonine porteuses d'une mutation avec des souris produisant de la mélatonine, comme les souris MSMxC57BL/6J produites par Kasahara et collaborateurs en 2010 (Kasahara 2010) ou les souris CBAxC57BL/6J générées par l'équipe de Ribelayga (Zhang et al., 2018). Ce protocole est également fastidieux et nécessite d'être prudent puisqu'il est nécessaire que les souris générées soient homozygotes pour les gènes codant l'HIOMT et l'AANAT.

Pour conclure, la souris peut être un modèle intéressant pour pallier le manque de modèles génétiquement modifiés chez les espèces saisonnières. L'obtention de souris produisant de la mélatonine et porteuses de mutations spécifiques est très longue car elle nécessite de nombreux croisements et un génotypage rigoureux des animaux pour s'assurer qu'ils produisent bien de la mélatonine. Une alternative consiste à utiliser des souris déficientes en mélatonine mais porteuses de MT1 fonctionnels, comme la C57BL/6J, chez lesquelles de nombreux modèles génétiques sont commercialisés, et de les supplémenter en mélatonine. Ces protocoles permettent d'étudier les mécanismes moléculaires de l'intégration photopériodique véhiculée par la mélatonine mais ne permettent néanmoins pas d'étudier les adaptations phénotypiques qui en résultent.

De nouvelles techniques d'édition du génome comme le CRISPR/Cas9, moins coûteuses et moins longues que la technique classique par recombinaison homologue, pourraient permettre de développer de nouveaux modèles mieux adaptés pour l'étude des rythmes saisonniers.

#### b- Des modèles saisonniers génétiquement modifiés par la méthode CRISPR/Cas9

Le CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein Caspase 9) est une technique d'**édition de génome** utilisée depuis une dizaine d'années (Doudna and Charpentier, 2014). Cette technique consiste à transférer une cellule avec une endonucléase Cas9 et un ARN guide qui reconnaît une séquence génomique d'intérêt et dirige la Cas9 afin de cliver l'ADN de manière séquence spécifique (Figure 30). L'utilisation de ce système au premier stade embryonnaire (lorsque l'ovocyte fécondé n'est pas encore divisé), permet d'obtenir des animaux portant une mutation dirigée générale et permet d'insérer des séquences génétiques d'intérêt lors de la réparation de l'ADN pour générer des modèles de KI (Doudna and Charpentier, 2014).



**Figure 30 :** Fonctionnement du système CRISPR/Cas9

Le CRISPR/Cas9 est une technique d'édition de génome utilisant une endonucléase Cas9, dirigée par un ARN guide pour reconnaître et cliver une séquence ADN d'intérêt. Cette technique peut permettre de créer des modèles de KO ou de KI si une séquence génétique choisie est insérée lors de la réparation de l'ADN. Image issue de GNIS-PEDAGOGIE.org

Chez les espèces se reproduisant en jours courts, plusieurs équipes ont appliqué la technique de CRISPR/Cas9 avec succès pour générer des modèles de moutons et de chèvres génétiquement modifiés (Kalds et al., 2019). Chez les hamsters syriens, cette technique a été utilisée avec succès pour la première fois en 2014 par Fan et collaborateurs. Même si plusieurs types de hamsters syriens génétiquement modifiés ont été créés avec cette technique par la suite, la manipulation des embryons de hamsters, très sensibles, semble être un point limite pour l'application de cette techniques (Fan et al., 2014; Li et al., 2018) et actuellement, seulement deux équipes semblent la maîtriser (Dong et al., 2018; Fan et al., 2014).

En effet, la technique classique pour utiliser les systèmes d'édition de génome comme le CRISPR/Cas9 consiste à extraire des ovocytes fécondés d'une femelle, réaliser une micro-injection pour insérer le système d'édition de génome dans le pronucléus puis de réimplanter les ovocytes dans l'utérus d'une mère porteuse. Cette technique nécessite donc de maintenir les embryons dans un milieu de culture et des conditions contrôlées, ce qui s'avère complexe pour les embryons de hamster supportant très mal les variations de température ou encore l'exposition à la lumière (Fan et al., 2014; Li et al., 2018). La technique GONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) combinée au CRISPR/Cas9 pourrait être une alternative à l'introduction du système par micro-injection. En effet cette technique

consiste à injecter le système d'édition de génome directement dans l'oviducte des femelles gestantes à proximité des embryons, puis de faire une électroporation sur les oviductes pour qu'il s'insère dans les embryons (Kiyohara et al., 2017; Kobayashi et al., 2018). Cette technique permet donc d'éviter les étapes de manipulation *ex vivo* des embryons.

Malgré les difficultés techniques de l'adaptation et l'application des techniques modernes d'édition de génomes comme le CRISPR/Cas9 chez les espèces non-conventionnelles, la possibilité de générer des modèles animaux saisonniers génétiquement modifiés offre des perspectives intéressantes pour l'étude des mécanismes saisonniers.

En parallèle de mes deux projets de recherche (voir sections VI.3.b et VII.2 respectivement), j'ai travaillé sur le développement de nouveaux modèles animaux génétiquement modifiés adaptés pour l'étude des rythmes saisonniers. J'ai d'une part, participé activement à l'élaboration d'un projet visant à générer un modèle de hamster syrien KO grâce à la méthode de CRISPR/Cas9. D'autre part, j'ai tenté d'étudier l'effet d'un KO des récepteurs aux hormones thyroïdiennes sur l'expression des neuropeptides hypothalamiques chez un modèle de souris hybrides MSMxC57BL/6J produisant de la mélatonine et portant une mutation.

## Des modèles génétiquement modifiés pour l'étude des rythmes saisonniers

Modèles animaux saisonniers	La souris comme modèle saisonnier?
<ul style="list-style-type: none"><li>• Le <b>hamster</b> et le <b>mouton</b> sont les modèles animaux les plus utilisés pour étudier les mécanismes saisonniers</li><li>• Il existe <b>très peu de modèles génétiquement modifiés chez les espèces saisonnières</b></li><li>• Le <b>CRISPR/Cas9</b> est un système <b>d'édition de génome</b> qui a été appliqué avec succès chez le hamster et le mouton</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• La plupart des lignées de <b>souris</b> de laboratoire (<b>C57BL/6J</b>) sont <b>déficientes en mélatonine</b> mais ont des <b>récepteurs à la mélatonine fonctionnels</b></li><li>• Il existe quelques lignées de souris <b>produisant de la mélatonine (CBA, C3H)</b>, qui peuvent présenter un <b>phénotype reproducteur saisonnier modéré (MSM)</b></li><li>• Des <b>croisements de lignées</b> de souris peuvent générer des modèles produisant de la mélatonine et porteurs d'une mutation</li></ul>
<p><b>PROJET 3</b></p> <p>Développer un modèle de hamster syrien KO grâce au système CRISPR/Cas9</p> <p>Utiliser un modèle de souris hybrides qui produisent de la mélatonine et portent une mutation pour étudier l'effet d'un KO des récepteurs aux hormones thyroïdiennes sur l'expression des neuropeptides hypothalamiques</p>	



## *Objectifs et projets de thèse*

Mon travail de thèse a été d'étudier les mécanismes neuroendocrines qui sous-tendent le contrôle saisonnier de la reproduction. Mes projets ont été dictés par une volonté de poursuivre les réalisations scientifiques de mon équipe d'accueil et de compléter les connaissances dans mon domaine de recherche. J'ai particulièrement travaillé sur la compréhension du rôle et du mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes dans la régulation de l'axe reproducteur via les neuropeptides hypothalamiques Kp et RFRP-3. J'ai également été motivée par une réelle volonté de faire avancer le domaine de l'étude des rythmes saisonniers, aujourd'hui limité par le manque d'outils génétiques disponibles chez les espèces saisonnières. Ainsi j'ai eu le plaisir de participer au développement de nouveaux modèles animaux génétiquement modifiés adaptés à l'étude des fonctions biologiques saisonnières.

### **PROJET 1 : La régulation des neuropeptides hypothalamiques de la reproduction par la T3**

Au cours de la première partie de ma thèse j'ai cherché à comprendre comment les hormones thyroïdiennes régulent l'expression photopériodique de Kp et de RFRP-3. Dans un premier temps, j'ai validé l'utilisation d'un modèle de souris supplémentées en mélatonine pour cette étude afin d'avoir accès à des modèles génétiquement modifiés. Par la suite j'ai utilisé un modèle de souris supplémentées en mélatonine et portant une mutation du récepteur aux hormones thyroïdiennes TR $\alpha$  afin d'évaluer l'effet de ce KO sur les variations photopériodiques de l'expression de Kp et de RFRP-3. La comparaison des résultats chez des souris avec une délétion du TR $\alpha$  dans toutes les cellules et chez des souris exprimant la mutation uniquement dans les neurones m'a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes et leurs cibles cellulaires dans l'hypothalamus.

### **PROJET 2 : La néogenèse saisonnière hypothalamique chez le hamster syrien**

Les résultats du projet 1 ont été à la base de mon second projet de recherche, visant à tester l'hypothèse que les variations annuelles du nombre de neurones à Kp et RFRP-3 pourraient provenir de processus de néogenèse hypothalamique. Afin d'étudier cette hypothèse, j'ai d'une part, caractérisé le profil de prolifération cellulaire dans l'hypothalamus au cours de la transition d'une PC à une PL et inversement. D'autre part, j'ai tenté de phénotyper les nouvelles cellules intégrées dans l'hypothalamus, en analysant plus particulièrement si des neurones à Kp et/ou à RFRP-3 sont issus de cette néogenèse tancytaire. Finalement j'ai quantifié les niveaux d'apoptose dans l'hypothalamus au cours de la

transition entre les photopériodes afin d'étudier si les rythmes de prolifération cellulaire sont corrélés à des rythmes de morts cellulaires.

### PROJET 3 : Développement de modèles génétiquement modifiés pour l'étude des rythmes saisonniers

A ce jour, très peu d'outils génétiques sont disponibles chez les espèces saisonnières, c'est pourquoi, en parallèle de mes deux projets, j'ai testé et aidé à générer des modèles animaux innovants permettant d'avancer dans les études des rythmes saisonniers. Depuis le début de ma thèse j'ai participé à un projet d'élaboration d'un modèle de hamster syrien génétiquement modifié grâce au système CRISPR/Cas9. J'ai également travaillé, en collaboration avec une équipe de Lyon, sur un modèle de souris issue d'un croisement entre des souris C57BL/6J et MSM produisant de la mélatonine endogène et exprimant la mutation du TR $\alpha$ , chez lesquelles j'ai étudié l'expression des gènes de la voie mélatonine dépendante chez ces souris placées en PC ou en PL.

## *Projets de thèse*



**Ile de Versailles, Nantes**

-

**Eté**

# PROJET 1

---

## Rôle des TR $\alpha$ dans la régulation des neuropeptides hypothalamiques de la reproduction par la T3

*D'après l'article:*

Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of Rfrp gene expression in mice.

Quignon C, Beymer M, Gauthier K, Gauer F, Simonneaux V

FASEB J. 2020 Sep;34(9):12072-12082.

*Communication dans les Actualités du CNRS :*

Les hormones thyroïdiennes au cœur de l'intégration des saisons par le cerveau.

Dans ce projet, j'ai étudié si les changements photopériodiques de l'expression des gènes codant pour la Kp et le RFRP-3 sont régulés par les variations des concentrations de T3, dépendantes de la mélatonine, chez des souris C57BL/6J (ne produisant pas de mélatonine) et CBA (produisant de la mélatonine). L'utilisation de souris m'a permis d'évaluer les effets de la mélatonine sur la voie TSH/T3/neuropeptides hypothalamiques chez des souris porteuses ou non d'une mutation du gène codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR $\alpha$ .

Dans un premier temps, j'ai d'abord vérifié que les souris C57BL/6J, qui possèdent des récepteurs à la mélatonine fonctionnels, répondent à une administration de mélatonine exogène, comme cela a été précédemment rapporté (Ono et al., 2008b). Cependant, pour reproduire au mieux les concentrations plasmatiques nocturnes de mélatonine endogène, j'ai choisi d'administrer de la mélatonine dans l'eau de boisson pendant la nuit plutôt que par des séries d'injections intrapéritonéales aiguës de mélatonine. J'ai donc analysé l'expression des gènes codant pour TSH, Dio2, Dio3, Kp et RFRP-3, chez des souris C57BL/6J supplémentées en mélatonine ou en solvant (contrôle) pendant la nuit et j'ai comparé ces résultats à ceux obtenus chez des souris CBA adaptées à une PC ou PL.

Après avoir mesuré les effets de la mélatonine nocturne administrée dans l'eau de boisson, le même protocole de supplémentation en mélatonine a été appliqué à des souris C57BL/6J portant une mutation du TR $\alpha$  générale ou restreinte aux neurones, afin d'évaluer l'effet du blocage de la signalisation thyroïdienne sur l'expression des différents gènes d'intérêt.

Finalement, cette étude a été complétée par des co-marquages immunohistochimiques de TR $\alpha$  avec différents marqueurs de cellules neuronales et gliales qui ont permis d'identifier les cibles cellulaires potentielles de la T3 dans l'hypothalamus.



# *Matériel et méthodes*

## **1- Animaux**

Toutes les expériences ont été validées par le Chronobiotron et le Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg, et ont été réalisées en accord avec la directive 2010/63/UE du Parlement européen du 22 septembre 2010.

Des souris mâles adultes (âgées de 6 à 12 semaines) ont été placés dans des cages adaptées (type II), de 1 à 5 animaux par cage avec de la nourriture (Safe) et de l’eau *ad libitum*. La température dans la pièce était de  $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , la lumière était allumée pendant la période diurne (L) et de la lumière rouge tamisée non active sur l’horloge circadienne était allumée pendant la période nocturne (D).

### **a- Caractéristiques des souches de souris**

Deux souches de souris mâles adultes ont été utilisées : des souris **C57BL/6J** (élevage Janvier Labs) déficientes en mélatonine et des souris **CBA/N** (élevage Janvier Labs) produisant de la mélatonine.

Plusieurs fonds de souris C57BL/6J portant des modifications génétiques du *Thra*, le gène encodant le récepteur aux hormones thyroïdiennes  $\text{TR}\alpha$ , ont été générées par l’Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon. Pour évaluer l’effet global de  $\text{TR}\alpha$ , des souris portant un KO général de  $\text{TR}\alpha$  (**Thra0/0**) ainsi que les mâles non porteurs de la mutation issus de la même portée (**Thra+/+**) ont été utilisées. Pour évaluer l’effet spécifique de  $\text{TR}\alpha$  dans les neurones, des souris C57BL/6J exprimant spécifiquement dans les neurones l’allèle *TR $\alpha$ 1L400R*, une forme dominante négative du  $\text{TR}\alpha$  (**Cre3xThraAMI/+**) ainsi que les mâles non-porteurs issus de la même portée (**ThraAMI/+**) ont été générées en utilisant la lignée de souris Cre3 (Banares) qui exprime la Cre recombinase dans les neurones seulement et non dans les cellules gliales avec une expression particulièrement forte dans la région hypothalamique. Chez les souris Cre3xThraAMI/+ l’expression de la forme *TR $\alpha$ 1L400R* mutante du récepteur élimine toute capacité des cellules à répondre à la T3 malgré la persistance d’un allèle *Thra* intacte.

### **b- Protocoles d’exposition des souris**

Pour évaluer l’effet de la photopériode, les souris produisant (CBA/N) ou non (C57BL/6J) de la mélatonine, ont été placées en PL (16hL/8hD) ou en PC (8hL/16hD) pendant 6 semaines (n=6 pour chacun des 4 groupes).

Pour évaluer l'effet d'une administration nocturne de mélatonine exogène chez des souris C57BL/6J mutées ou non pour le TR $\alpha$ , les souris ont été placées en PC (10hL/14hD) avec durant la nuit un biberon contenant soit de la mélatonine (80 mg/l dans une solution aqueuse avec 0.1% d'éthanol) soit du solvant (une solution aqueuse avec 0.1% d'éthanol) et durant le jour un biberon contenant de l'eau pure. La durée de la nuit a été réduite par rapport à l'expérience précédente afin de mieux reproduire la durée du pic de mélatonine observable chez des souris produisant de la mélatonine en PC (8hL/16hD). Le traitement a été appliqué pendant au moins 6 semaines (n=5 à 7 par groupes).

Les souris ont été surveillées chaque jour pendant la durée des expériences, particulièrement les souris mutantes qui étaient agressives, conformément à ce que l'équipe de Lyon générant ce modèle de souris avait observé (Richard et al., 2017).

## **2- Prélèvement des tissus**

### **a- Euthanasie au CO<sub>2</sub>**

A la fin de chaque expérience, les animaux ont été mis à mort le matin dans une cuve contenant des concentrations croissantes de dioxyde de carbone jusqu'à arrêt respiratoire (environ 5 min) selon le protocole validé par le Chronobiotron et le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, et en accord avec la directive 2010/63/UE du Parlement européen du 22 septembre 2010.

### **b- Prélèvements sang, testicules, vésicules séminales**

Prélèvements du sang : après vérification de l'arrêt respiratoire, les animaux ont été pesés avant de procéder à l'ouverture de la cage thoracique. Environ 1ml de sang a été prélevé par ponction intracardiaque à la seringue puis collecté dans des tubes contenant une goutte d'héparine, sur glace afin d'éviter la coagulation du sang et la dégradation des protéines. Ces échantillons de sang ont ensuite été centrifugés à 2000 rpm pendant 20 minutes afin de récupérer le plasma uniquement. Le plasma a été conservé à -20°C pour des dosages ultérieurs.

Prélèvements des testicules et vésicules séminales : Afin d'estimer « l'état physiologique reproducteur » des animaux, les testicules ainsi que les vésicules séminales ont été prélevés puis pesés à l'aide d'une balance de précision.

### **c- Fixation des tissus par perfusion intra-cardiaque et récupération du cerveau dans le fixateur**

La base du ventricule gauche et le haut de l'oreillette droite ont été incisés afin de faire circuler les solutions de rinçage et de fixation dans tout le système vasculaire. A l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille à bout plat, le système vasculaire a été lavé par une infusion intracardiaque de 10ml de

tampon salin phosphate (PBS, la composition de l'ensemble des solutions utilisées est décrite dans le [Tableau 3](#)), puis les tissus ont été fixés par injection de 20 ml de fixateur (periodate-lysine-paraformaldéhyde (PLP)).

Après la perfusion, chaque animal a été guillotiné, la peau et les yeux ont été détachés du crâne, et le cerveau conservé dans la boîte crânienne dans du fixateur pendant 2-4 heures. Ensuite le cerveau extrait délicatement afin de ne pas casser la *pars tuberalis* a été remis dans le fixateur pour 8 à 20 heures à température ambiante (TA).

### **3- Préparation des coupes de cerveau**

Les cerveaux ont été enrobés dans du polyéthylène glycol (PEG, Acros organic) d'après la technique décrite par Clayton and Alvarez-Buylla, 1989 et Klosen et al., 1993. Cet enrobage garantit une très bonne conservation du tissu, permet d'obtenir des coupes très fines au microtome (jusqu'à 8  $\mu\text{m}$ ) et assure une bonne conservation des antigènes et des ARNm permettant l'hybridation *in situ* (HIS) et l'immunohistochimie (IHC).

#### **a- Déshydratation des cerveaux à l'alcool**

Après fixation, les cerveaux ont été déshydratés à TA dans les bains d'alcool de degré croissant: éthanol 50% (2x1h), éthanol 70% (2x1h), éthanol 95% (2x1h), éthoxyéthanol (2x1h), butanol (24h). Ce processus assure une infiltration optimale du produit d'enrobage dans les tissus.

#### **b- Enrobage en PEG**

Les cerveaux, réduits par une coupe frontale à la base du cervelet, ont d'abord été incubés dans 100% de PEG 1000 à 50°C pendant 5 à 8h (jusqu'à ce qu'ils coulent au fond du tube, signalant que l'infiltration du PEG dans les tissus est correcte) puis dans un deuxième bain de 50% PEG 1000 /50% PEG 1500 à 50°C pour une nuit. Finalement ils ont été placés dans des moules d'enrobage remplis avec 5% PEG 1000/ 95% PEG 1500 pendant 4h à 50°C puis refroidis à TA.

#### **c- Coupe des cerveaux au microtome et montage sur lame**

Le cerveau enrobé a été placé dans un microtome (Leica, DMRS) et des coupes de 12 $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées entre l'aire préoptique (hypothalamus antérieur) et l'apparition des noyaux pontins (hypothalamus postérieur), sous forme de rubans d'environ 150 à 200 coupes par cerveau, conservés dans des boîtes en carton dans une pièce à faible taux d'humidité.

Des séries de coupes ont ensuite été montées sur lames (SuperFrost®Plus, Menzel Gläser, ThermoFisher Scientific) en milieu aqueux. Pour chaque animal, une série consiste à prendre dans la direction antéro-postérieure 1 coupe sur 10 pour un cerveau de souris (soit une série de 16 à 18 coupes



couvrant la région d'intérêt du même cerveau par lame). Les lames destinées à l'HIS ont été séchées au four (15 min à 50°C) puis stockées à -80°C et les lames destinées à l'IHC ont été conservées à 4°C dans une solution de tampon tris-salin (TBS) contenant 0,02% d'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>).

#### 4- Hybridation *in situ* non-radioactive

##### a- Principe de l'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* permet de localiser des ARNm exprimés par un gène d'intérêt sur une coupe de tissu en utilisant une sonde ARN (ribosonde) marquée et de faire une semi-quantification de ces ARNm. La ribosonde est créée à partir d'une séquence de nucléotides complémentaires de celle de l'ARNm cible et dans laquelle les bases uridines (UTP) sont marquées par exemple avec un élément radioactif ou de la digoxygénine. Pour garantir une bonne pénétration de la ribosonde, les coupes de tissu subissent un prétraitement, et pour s'assurer de la spécificité de l'hybridation des nucléotides complémentaires entre la ribosonde et l'ARNm cible, les réactions et les lavages sont réalisés dans des milieux de forte stringence (température élevée, faible force ionique). Il est nécessaire de travailler en milieu sans RNase pour éviter la dégradation des brins d'ARN. Selon le type de marquage de la ribosonde, différents protocoles de révélation permettent de visualiser sa localisation après hybridation.

##### b- Fabrication des ribosondes marquées

Des fragments complémentaires des ARNm (ADNc) codant pour *TSH*, *Dio2*, *Dio3*, *Kiss1* et *Rfrp* ont été clonés, vérifiés par séquençage, validés sur du tissu de souris et insérés dans un plasmide qui a ensuite été linéarisé pour la fabrication des ribosondes antisens (étapes réalisées par Matthew Beymer, [Tableau 3](#)).

Les ribosondes ont toutes été marquées à la digoxygénine selon un protocole établi au laboratoire (DIG RNA labeling kit, Boehringer). Les ribosondes ont été synthétisées dans un tube eppendorf stérile sans RNase contenant 4 µl de solution tampon de transcription, 1 µl d'un plasmide linéarisé, 2 µl d'UTP marqués à la digoxygénine et 1 µl d'ARN polymérase pendant 2h à 37°C. Pour que les sondes ne soient pas dégradées, 1 µl d'inhibiteur de RNAases (1 µg/µl) a été ajouté dans le milieu avant une nouvelle incubation (15 min à 37°C). La ribosonde marquée a été précipitée en ajoutant à la solution de transcription 3 µl de tRNA de levure (10 mg/ml), 3 µl de chlorure de lithium 4M à -20°C et 70 µl d'éthanol 100% à -20°C (une nuit, à -20°C). La ribosonde précipitée a été récupérée par centrifugation pendant 45 min à 13400 rotations par minute (rpm) à 4°C. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 150 µl d'éthanol 70% (les 30% d'eau sans RNase permettant de dissoudre les sels

restants) puis le tout a été re-centrifugé 15 min à 13400 rpm à TA. Cette dernière étape de purification a été répétée deux fois avant de laisser sécher le culot à TA. Le culot a été resuspendu dans 100 µl d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC), un inhibiteur de RNAses, et incubé 30 min à 37°C. Les ribosondes prêtes pour utilisation peuvent être utilisées immédiatement ou stockées à -20°C.

Protéine	Gène	Ribosonde
<b>TSHβ</b>	<i>TSH</i>	m TSHβ AS (376 nucléotides)
<b>Dio2</b>	<i>Dio2</i>	m Dio2 AS (451 nucléotides)
<b>Dio3</b>	<i>Dio3</i>	m Dio3 AS (838 nucléotides)
<b>RFRP-3</b>	<i>Rfrp</i>	m RFRP-3 AS (369 nucléotides)
<b>Kp</b>	<i>Kiss1</i>	r Kp AS (300 nucléotides)

**Tableau 3** : Liste des ribosondes utilisées pour l'hybridation *in situ*

#### c- Pré-hybridation des coupes

La composition de l'ensemble des solutions utilisées pour l'HIS est décrite dans le [Tableau 4](#).

Dès leur sortie du congélateur, les coupes ont été séchées au four (15 min, 50°C), refixées au formaldéhyde 4% dans du tampon phosphate (PB 100 mM, [Tableau 1](#) ; 10 min, TA) et rincées au PBS1X (3x5 min, TA). Les coupes ont subi trois étapes de pré-hybridation. La digestion par la protéinase K (PK, Roche) qui, en hydrolysant les liaisons peptidiques, libère l'ARNm des protéines qui lui sont liées permettant ainsi une meilleure hybridation: les lames ont été incubées dans une solution PBS1X contenant 0,5 µg/ml de PK (30 min, 37°C) puis rincées au PBS1X (5 min, TA). La post-fixation arrête la digestion enzymatique de la PK : les lames ont été incubées dans une solution de formaldéhyde 2% dans du PB 100 mM (5 min, sur glace) puis rincées dans du PBS1X contenant 0,01% de DEPC (3x5 min, 1er lavage sur glace puis à TA). L'acétylation du tissu inhibe les RNAases et réduit les hybridations aspécifiques en annulant les charges positives du tissu, ce qui diminue le bruit de fond dû à des associations avec les charges négatives des sondes: les lames ont été incubées dans deux solutions d'acétylation avec 0,25% d'anhydride acétique (10 min, TA), puis avec 0,5% anhydride acétique (10 min, TA), puis rincées dans du PBS1X, 0,01% DEPC (2x5 min, TA).

#### d- Hybridation des ribosondes sur le tissu

Les lames ont été préincubées dans une solution contenant 0,05% de tampon citrate-sodium salin (SSC, [Tableau 1](#)) 5X, 0,05% tween 20 et 0,01% DEPC (2x5 min, TA). Le SSC favorise les hybridations car il neutralise les charges négatives de l'ARNm et des sondes ce qui réduit leur répulsion électrostatique et le tween 20 est un détergent qui perméabilise la membrane pour permettre aux sondes de mieux pénétrer dans les cellules. Les sondes marquées à la digoxigénine ont été diluées à 1/100 dans

un tampon d'hybridation contenant divers produits favorisant une hybridation spécifique (le formamide rompt les liaisons hydrogènes des sondes pour faciliter leur dénaturation à une température moins haute n'altérant pas leur morphologie, le Denharts et l'ADN de sperme de saumon diminuent les associations aspécifiques). Avant d'être déposées sur les coupes, les sondes sont dénaturées à haute température (10 min à 90°C) puis transférées sur glace pour une renaturation lente prévenant la formation de structures secondaires et tertiaires qui limiteraient l'hybridation avec l'ARNm endogène. Sur chaque lame, les coupes de tissu sont recouvertes de 100 µl de solution d'hybridation contenant la sonde dénaturée puis la lame est recouverte d'une lamelle sans RNAase pour répartir la solution de façon homogène sur toute la surface de la lame. Toutes les lames d'une même expérience sont traitées ensemble avec les mêmes solutions et incubées 2 jours à une température adaptée à la nature de la ribosonde (60°C pour les ribosondes *TSH*, *Dio2*, *Dio3*, *Rfrp* et *Kiss1*).

#### e- Post-hybridation et détection de la ribosonde

Après l'hybridation, le surplus de ribosonde a été enlevé par un rinçage des lames dans une solution de SSC 5X, 0,05% tween 20 et 0,01% DEPC (2x5 min, TA) puis un maximum de liaisons non spécifiques a été enlevé par une incubation dans une solution à forte stringence (SSC 0,1X et 0,05% tween 20; 6x10 min, 72°C) afin de réduire le bruit de fond tout en conservant les associations spécifiques ribosonde-ARNm cible. La détection du signal digoxigénine de la ribosonde est réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la digoxygénine (Roche). Pour réduire la quantité des solutions réactives utilisées, elles ont été directement appliquées sur la lame où un contour hydrophobe a été créé autour des coupes avec un crayon DakoPen. Les tissus ont d'abord été traités pour bloquer les sites aspécifiques et ainsi réduire le bruit de fond, puis des réactions antigéniques ont été réalisées pour révéler les ribosondes. Les lames ont été rincées avec une solution de tampon A-DIG1X contenant 0,05% tween 20 (2x5 min, TA), puis incubées en chambre humide avec 300 µl de tampon de blocage (au moins 1 heure, TA). Les lames ont ensuite été incubées avec 350 µl d'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/5000 dans du tampon de blocage (une nuit en chambre humide, TA) puis rincées avec la solution A-DIG contenant 0,05% tween 20 (3x10 min, TA) puis avec le tampon de révélation AP (Tableau1) 1X (2x5 min, TA). La révélation a été faite avec une solution de NBT (nitrobleu tetrazolium, 404 µM) et BCIP (5-Bromo-4-chloro-3- indolyl phosphatase, 381 µM, Tableau1) dans du tampon AP1X. Le rôle de la phosphatase alcaline (liée à l'anticorps anti-digoxigénine de la ribosonde) est de déphosphoryler le BCIP en 5-bromo-4chloro-3- indole qui produit un précipité bleu foncé lorsqu'il est oxydé par le NBT. La révélation a été suivie à la loupe binoculaire pour stopper la réaction par un lavage rapide à l'eau lorsque le signal est optimal (meilleur rapport signal/bruit). Les lames ont été traitées au crystalmount (Sigma) pour préserver le signal en empêchant la dissolution du précipité NBT-BCIP puis montées à l'Eukitt (Chem-Lab) entre lame et lamelle après un bain de toluène (2x5 min, TA).

	solution	Composition
Fixation/ conservation	<b>Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)</b>	Tampon Lysine-phosphate (lysine HCl 200 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM pH 7.4 ; tampon sodium phosphate 100 mM pH 7.4) ; 20% formaldéhyde; NaOH 200 mM
	<b>Solution de Watson</b>	PB 100 mM ; 30% sucrose ; 1% polyvinylpyrrolidone ; 30% éthane-1,2-diol ; 0,9% NaCl
Hybridation <i>In situ</i>	<b>Tampon phosphate salin (PBS)</b>	NaCl 137 mM ; KCl 2.68 mM ; NaHPO <sub>4</sub> 1.47 mM ; pH 7.4 (Roche)
	<b>2% et 4% formaldéhyde</b>	PB 100 mM ; 2% ou 4% formadéhyde
	<b>Solution d'acétylation</b>	1.20% TEA ; 0.25 ou 0.5% anhydride acétique
	<b>Tampon sodium-citrate salin (SSC)</b>	NaCl 3 M ; citrate de Na 300 mM ; pH 7 (Roche)
	<b>Tampon d'hybridation</b>	50% formamide ; SSC 5X ; denhart 5X ; ADN de saumon 1 mg/ml ; 0.1% tween 20 ; 0.04% DEPC
	<b>Tampon A-DIG</b>	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 100 mM ; NaCl 150 mM ; MgCl <sub>2</sub> 5 mM ; pH 7.5
	<b>Tampon AP</b>	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 200 mM ; NaCl 200 mM ; MgCl <sub>2</sub> 10 mM ; pH 9.5
	<b>Tampon phosphate (PB 100mM)</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 81 mM ; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 19 mM ; pH 7.3
	<b>NBT</b>	Dissout à 50 mg/ml dans le diméthylformamide à 70%
	<b>BCIP</b>	Dissout à 50 mg/ml dans le diméthylformamide pur
	<b>Tampon de blocage</b>	0.5% A-DIG ; 0.05% tween 20 ; 0.02% azide dans du Blocking Reagent (Roche)
	<b>Solution de révélation FastBlue PA-PVA</b>	PA-PVA (Pa ; 4% polyvinyl alcool) ; 0.4% NAMP ; 50 mg/ml FastBlue
Immuno- histochimie	<b>Tampon tris-salin (TBS)</b>	Tris 25 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7.6
	<b>Tampon tris-imidazole (TBI)</b>	Tris 50 mM ; imidazole 10 mM ; pH 7.6
	<b>Tampon tris-citrate</b>	Tris 500 mM ; acide citrique 1 mM ; pH 8
	<b>Tampon citrate</b>	Acide citrique 10 mM ; pH 6
	<b>Tampon d'incubation</b>	TBS ; 0.05% tween 20 ; 1% sérum de mule
	<b>Tampon de rinçage</b>	TBS ; 0.05% tween 20
	<b>Tampon d'incubation tertiaire</b>	TBS ; 0.05% tween 20 ; 0.2% gélatine de poisson d'eau froide
	<b>Tampon de blocage Régilait</b>	TBS ; 3% lait en poudre Régilait ; 0.02% azide
	<b>Solution de révélation DAB</b>	TBI ; 1% DAB ; 0.003% UHP
	<b>Solution de revelation tyramide</b>	PBS-imidazole ; 0.001% UHP ; tyramide-fluorophore 1/1000
<b>PBS-imidazole</b>	PBS ; imidazole 100 mM ; pH 7.6	

**Tableau 4** : Composition des solutions utilisées pour la fixation, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie

## 5- Immunohistochimie

### a- Principe de l'immunohistochimie

L'IHC permet de localiser une protéine (ou un antigène) d'intérêt dans un tissu grâce à une détection antigénique avec un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre cet antigène, et éventuellement de réaliser une semi-quantification du marquage antigène-anticorps. L'anticorps primaire, généré dans une autre espèce que celle d'où est issu le tissu étudié, est détecté à l'aide d'un anticorps secondaire dirigé contre cette espèce. L'anticorps secondaire peut-être directement couplé à un système de détection colorimétrique ou fluorescente ou lié à un système d'amplification, comme le

système avidine-biotine, nécessitant l'utilisation d'une incubation dans une solution tertiaire pour la révélation.

#### b- Préparation des coupes pour l'immunohistochimie

La composition de l'ensemble des solutions utilisées pour l'IHC est décrite dans le [Tableau 4](#).

##### *Réactivation antigénique*

L'immunoréactivité du tissu étant généralement perdue lors des étapes de déshydratation pour l'enrobage au PEG et du séchage des lames après montage en milieu aqueux, il est souvent préférable de faire une réactivation antigénique. Les lames ont été rincées à l'eau distillée puis incubées dans du tampon citrate (pH 6) pendant 1h à 95°C. La température élevée et les conditions de pH permettent de dénaturer les protéines. Après ce traitement, les lames sont laissées à refroidir dans leur tampon de réactivation 30 min à TA pour permettre une renaturation lente limitant la formation de structures secondaires et tertiaires pour laisser les épitopes facilement reconnaissables. Un contour hydrophobe au DakoPen a été dessiné autour des lames avant de les rincer au TBS1X (2x5 min, TA).

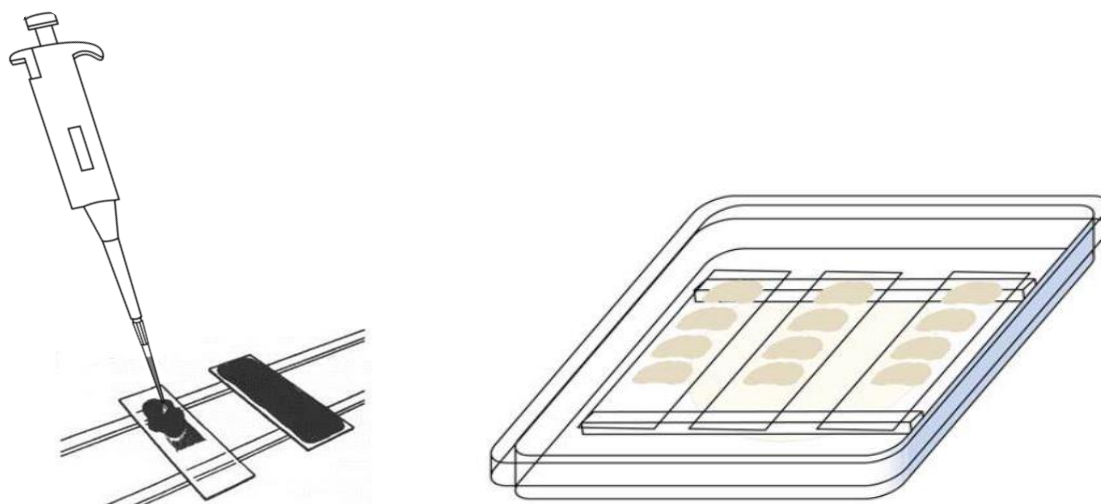
##### *Blocage*

Finalement, pour réduire le bruit de fond, les lames ont été incubées dans un tampon de blocage afin de saturer les sites aspécifiques (3% lait en poudre Régilait; 1h minimum, TA).

#### c- Immunomarquage simple

Pour chaque anticorps utilisé, des tests ont été réalisés au préalable afin de déterminer la concentration d'anticorps la plus appropriée pour un marquage donnant le meilleur rapport signal spécifique/bruit de fond. Les anticorps primaires et secondaires et leurs dilutions sont décrits dans le [Tableau 5](#)).

Pour les IHC sur lames, 350 µL de tampon (TBS 1X, 0,05% Tween20, 0,1% sérum de mule) contenant l'anticorps primaire dilué est déposé sur les coupes et les lames sont incubées pendant une nuit à TA dans des chambres humidifiées avec un papier buvard imbibé d'eau ([Figure 31](#)).



**Figure 31** : Schéma illustrant le dépôt d'anticorps et l'incubation des lames en chambre humide

Anticorps primaires	Espèce	dillution
TSH $\beta$	Lapin	1/65000
RFRP-3	Lapin	1/10000
Kisspeptine	Lapin	1/10000
TR $\alpha$	Lapin	1/250
GFAP	Poulet	1/4000
Vimentine	Chèvre	1/5000
BrdU	Rat	1/2500
Somatostatine	Souris	1/8000
Caspase-3 activée	Lapin	1/400
Anticorps secondaire biotinylés		1/2000
Anticorps secondaire fluorescent		1/1000

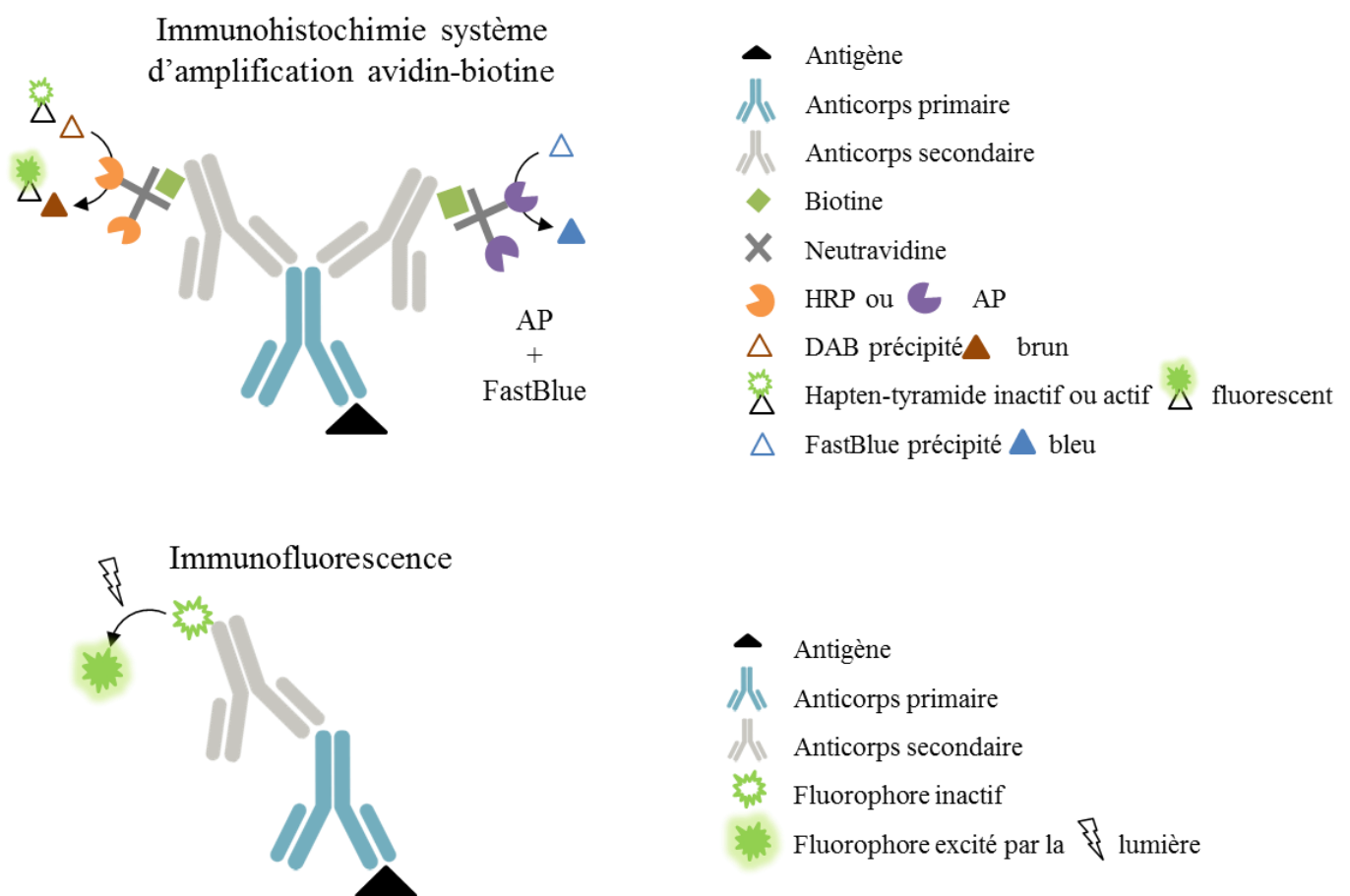
**Tableau 5**: Liste des anticorps utilisés pour l'immunohistochimie et leur dilution

L'immunofluorescence (IF) est une technique rapide produisant un marquage en fluorescence grâce à un anticorps secondaire directement couplé à un fluorophore. Cette technique nécessite néanmoins l'utilisation de concentrations fortes d'anticorps primaire. L'utilisation d'un système d'amplification grâce à des complexes avidine-biotine permet de réduire la quantité d'anticorps nécessaire pour le marquage immunohistochimique (Figure 32).

Les lames ont été rincées dans du tampon de rinçage (TBS 1X, 0,05% Tween20, 3x10 min, TA) puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une biotine (Tableau 5), dilué au 1/2000 dans du tampon d'incubation (TBS 1X, 0,05% Tween20, 0,1% sérum de mule, 1h, TA). Après un nouveau

lavage avec du tampon de rinçage (3x10 min, TA), le complexe d'anticorps a été révélé grâce à la fixation sur la biotine du complexe Neutravidine-HRP ou Neutravidin-AP, dilué au 1/2000 dans un tampon d'incubation tertiaire (TBS 1X, 0,05% Tween20, 0,1%, gélatine de poisson, 1h minimum à TA). Cette étape se termine par un rinçage des lames avec le tampon de rinçage (3x10 min, TA).

La peroxydase de raifort (HRP) a été utilisée dans le cas de marquages à la diaminobenzidine (DAB) qui produit un marquage brun ou avec un complexe haptén-tyramide pour un marquage fluorescent. La phosphatase alcaline (AP) a été utilisée dans le cas d'un marquage à l'aide du FastBlue pour un marquage de couleur bleu (Figure 32).



**Figure 32** : Principe de l'immunohistochimie amplifiée par un système avidin-biotine et de l'immunofluorescence

Pour détecter l'activité de la HRP, les lames ont été lavées dans un tampon tris-imidazole (TBI, 10 min, TA). La révélation a ensuite été réalisée par une incubation dans une solution de révélation contenant de la DAB, qui, oxydée par la peroxydase, produit un précipité stable brun. La révélation est suivie à la loupe binoculaire afin d'arrêter la réaction avec de l'eau distillée (5x2 min, TA) lorsque le



rapport signal/bruit de fond est le meilleur. Les coupes ont été déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70%, 95%, 100%, 100% ; 5min par bain, TA), puis plongées dans du toluène (2x10 min, TA) avant d'être montées à l'Eukitt entre lame et lamelle.

Pour détecter l'activité de l'AP, les lames ont été lavées dans un tampon AP (10 min, TA). La révélation a ensuite été réalisée par une incubation dans une solution de révélation contenant du FastBlue (4-chloro 2-methylbenzene diazonium chloride) et du NAMP (Naphthol-AS-MX Phosphate) qui produisent respectivement un précipité bleu ou rouge. La révélation est suivie à la loupe binoculaire afin d'arrêter la réaction avec de l'eau pure (2x10 min, TA) lorsque le rapport signal/bruit de fond est le meilleur. Les lames sont ensuite pré-montées au crystalmount, séchées une nuit puis plongées dans du toluène (1x5 min, TA) avant d'être montrées à l'Eukitt entre lame et lamelle.

En IF, après l'incubation de l'anticorps secondaire couplé au fluorophore, les lames sont directement rincées, pré-montées au crystalmount et montées à l'Eukitt pour une visualisation au microscope à fluorescence.

## 6- Doubles marquages

Le double (ou triple) marquage permet de localiser deux (ou trois) protéines ou ARNm dans un tissu et d'évaluer leur co-localisation cellulaire. Le marquage multiple peut se faire avec la méthode d'hybridation *in situ* (ARNm) et/ou d'immunohistochimie (protéine), et la révélation peut être colorimétrique ou en fluorescence. Au cours de mes travaux, j'ai fait des doubles marquages des TR $\alpha$  avec *Rfrp* (marqueur de neurone à RFRP-3) ou GFAP (*glial fibrillary acidic protein* ; marqueur de cellule gliale dont les astrocytes particulièrement) ou Vimentine (une protéine des filaments intermédiaires particulièrement exprimée dans les tanocytes)

### a- Marquage TR $\alpha$ et *Rfrp*

Les anticorps anti-TR $\alpha$  ( $\alpha$ 144 de lapin, offert par L.Dufourny, INRA, Tours ; Bismuth et al., 1995) et anti-RFRP-3 (GA197, offert par G. Anderson, Dunedin, New Zealand, Rizwan et al., 2009) disponibles étant tous les deux des anticorps issus du lapin (Tableau 5), une double immunohistochimie peut être délicate car l'anticorps secondaire reconnaît alors les deux anticorps primaires. J'ai donc utilisé une HIS avec une révélation en FastBlue pour le marquage de *Rfrp* couplé à une IHC en DAB pour le marquage des TR $\alpha$ .

Le protocole d'HIS utilisé pour le marquage des neurones exprimant *Rfrp* est le même que celui décrit au-dessus (section 4), excepté pour le système de révélation NBT/BCIP qui est remplacé par un système de révélation FastBlue/NAMP. Dans ce cas, après lavage avec la solution AP1X, les lames sont



incubées dans une solution contenant 0,4% NAMP et FastBlue (50 mg/ml dilués dans du tampon AP1X) jusqu'à l'arrêt de la révélation au TBS1X (3x5 min, TA) lorsque le signal est optimal. Après 3 rinçages au TBS, le marquage des TR $\alpha$  a été réalisé en IHC avec une révélation à la DAB d'après le protocole décrit ci-dessus.

#### b- Marquage TR $\alpha$ et GFAP

Une double IHC a été utilisée pour le co-marquage du TR $\alpha$  et de GFAP. Le marquage TR $\alpha$  a été réalisé avec une révélation HRP-DAB et celui de la GFAP (Tableau 5) avec une révélation en AP-FastBlue/NAMP pour un marquage colorimétrique marron et bleu respectivement. Dans le cas d'une double IHC, une seule étape de réactivation antigénique est nécessaire au début de la première IHC.

#### c- Marquage TR $\alpha$ et Vimentine

Une IF couplée à une IHC avec une révélation en tyramide a été utilisée pour le co-marquage du TR $\alpha$  avec la vimentine ( $\alpha$ -Vim offert par M. Millet, INCI, Strasbourg, Tableau 5), afin de visualiser les 2 marquages en fluorescence.

Un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594 a été utilisé pour l'IF du TR $\alpha$  pour un marquage fluorescent rouge. Pour l'IHC vimentine, le protocole est le même que celui décrit ci-dessus excepté pour la révélation. Pour cette dernière révélation, le lavage au TBI a été remplacé par un lavage au PBS1X (2x5 min TA), puis les lames ont été incubées dans une solution contenant des molécules de tyramides inactives conjuguées à une fluorescéine, diluées au 1/1000 dans une solution de PBS contenant 6,8 g/l d'imidazole et 0,001% d'UHP (peroxyde d'hydrogène urée ; 30 min, TA). L'HRP avec l'UHP, catalyse la transformation du tyramide inactif en tyramide actif résultant en un marquage fluorescent vert. Afin de préserver la fluorescence, comme pour l'HIS les lames sont pré-montées au cristalmount avant d'être montées à l'Eukitt et conservées à l'obscurité.

## 7- Observation et analyse du signal

Toutes les lames ont été traitées « en aveugle », chacune portant un numéro aléatoire pour limiter les biais de mesure liés à l'expérimentateur. Les coupes marquées ont été observées au microscope optique (Leica Microsystems) équipé d'une caméra (Olympus BX41). Pour chaque gène considéré, toutes les lames de tous les animaux d'un même groupe expérimental ont été traitées avec les mêmes paramètres d'observation et d'analyse pour réduire au maximum les différences dues au traitement des images. Deux types de quantification ont été faites selon le profil d'expression du gène d'intérêt. Pour quantifier les niveaux d'expression des gènes codant pour les neuropeptides Kp et RFRP-3, le nombre de neurones marqués en HIS a été compté manuellement au grossissement x40 sur toutes les coupes (entre 16 et 18 pour les souris) de chaque animal. Pour un animal, la valeur du niveau d'expression du

gène d'intérêt est donnée en un nombre N total de cellules marquées mesurées. Pour chacun des groupes expérimentaux, la valeur finale du nombre moyen de neurones marqués est la moyenne  $\pm$  l'erreur standard du nombre de neurones comptés sur 6 à 7 animaux. Pour quantifier les niveaux d'expression de TSH $\beta$ , *Dio2* et *Dio3*, les cellules marquées ne pouvant pas être identifiées, la quantification a été réalisée par une analyse d'intensité de signal dans la zone d'intérêt (PT pour TSH, paroi de la partie basale du 3<sup>ème</sup> ventricule pour *Dio2* et *Dio3*). Des photos de coupes ont été prises au grossissement x20 avec un microscope optique muni d'une caméra (Leica, DMRS). La quantification du signal a été réalisée avec le logiciel ImageJ (Rasband, NIH) en utilisant les mêmes paramètres pour chaque série de lames. Le signal du bruit de fond sur la lame de verre a été mesuré et retranché du signal spécifique afin de s'affranchir des éventuelles irrégularités de bruit de fond. Pour chaque animal, l'intensité du signal a été analysée sur 3 coupes (correspondant à une zone identique de l'hypothalamus pour tous les animaux) et une valeur moyenne de ces 3 mesures a été calculée pour chaque animal. Pour chacun des groupes expérimentaux, la valeur finale de l'intensité moyenne du signal donnée est la moyenne  $\pm$  l'erreur standard des mesures obtenues sur 6 à 7 animaux.

Pour les analyses de co-marquages, les lames ont été observées au microscope optique ou au microscope à fluorescence. Les photos des marquages de TR $\alpha$  en fluorescence rouge et de vimentine en fluorescence verte ont été prises séparément puis superposées grâce au logiciel ImageJ.

## **8- Analyse statistique des résultats**

Les graphes et l'analyse des résultats ont été effectués avec le logiciel GraphPad 6.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Après une vérification de l'homogénéité des variances par un test de Levene et de la normalité par un test de Shapiro-Wilk, un test Mann-Whitney non-paramétrique a été effectué pour déterminer la probabilité de résultats différents entre les groupes expérimentaux et un test de Spearman non-paramétrique a été effectué pour faire des analyses de corrélation. Les valeurs de significativité statistiques ont été définies selon trois niveaux : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## Résultats

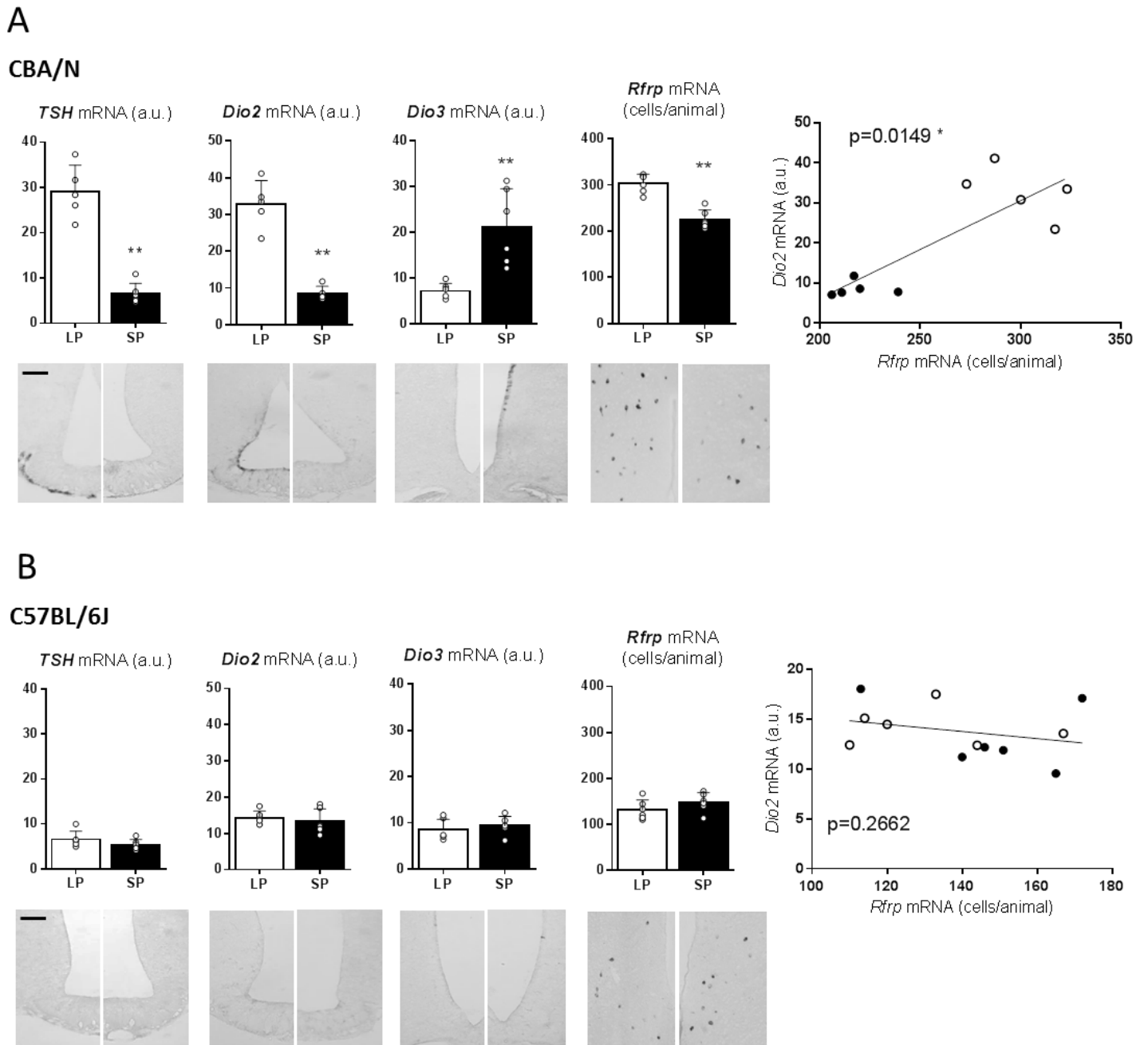
### Variations photopériodiques de la voie TSH $\beta$ /T3/neuropeptides RF-amides chez des souris produisant (CBA) ou non (C57BL/6J) de la mélatonine

L'objectif de cette expérience était d'analyser l'intégration photopériodique dans l'hypothalamus de souris placées 6 semaines en PL ou PC en fonction de leur capacité à produire ou non de la mélatonine.

La masse corporelle et des testicules des animaux, mesurée à la fin des 6 semaines d'exposition photopériodique, n'est pas modifiée par la photopériode chez les deux souches de souris (masse corporelle moyenne de 28g pour les C57BL/6J et 30g pour les CBA; masse testiculaire moyenne de 196mg pour les C57BL/6J et 129mg pour les CBA).

Les expériences d'HIS montrent une localisation similaire pour les deux souches de souris de l'expression des gènes codant pour la TSH $\beta$  dans la *pars tuberalis*, pour les Dio2 et Dio3 dans les corps cellulaires des tanocytes autour du 3<sup>ème</sup> ventricule, pour le RFRP-3 dans des neurones localisés dans le VMH et DMH et pour le Kp dans l'ARC (Figure 33).

Chez les souris CBA adaptées à la PC, l'expression de *Tshb*, *Dio2* et *Rfrp* est réduite et celle de *Dio3* est augmentée en comparaison des souris CBA adaptées à la PL (Figure 33). Par contre chez les souris C57BL/6J l'expression de tous ces gènes ne présente aucune variation photopériodique (Figure 33). Par ailleurs, aucune variation photopériodique de l'expression de *Kiss1* n'a été observée chez les deux souches de souris.



**Figure 33** : Effet de la photopériode sur l’expression de *TSH*, *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris CBA et C57BL/6J

Des souris mâles adultes CBA (A) et C57BL/6J (B) ont été exposées à une photopériode longue (LP : 16hL/8hD, barres blanches) ou courte (SP : 8hL/16hD, barres noires) pour 6 semaines. Les valeurs d’expression de *TSH* dans la *pars tuberalis*, de *Dio2* et *Dio3* dans les tancytes sont données en moyenne du niveau de gris en unité arbitraire (a.u.) et la valeur de *Rfrp* dans l’hypothalamus médiobasalis est donnée en nombre de cellules totales marquées par animal. Les données individuelles sont données ainsi que la moyenne  $\pm$  l’erreur standard moyenne (SEM) de 5-6 souris. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . Le graphique de droite montre la corrélation entre l’expression de *Dio2* et de *Rfrp*. Barre d’échelle des photos : 75 $\mu$ m

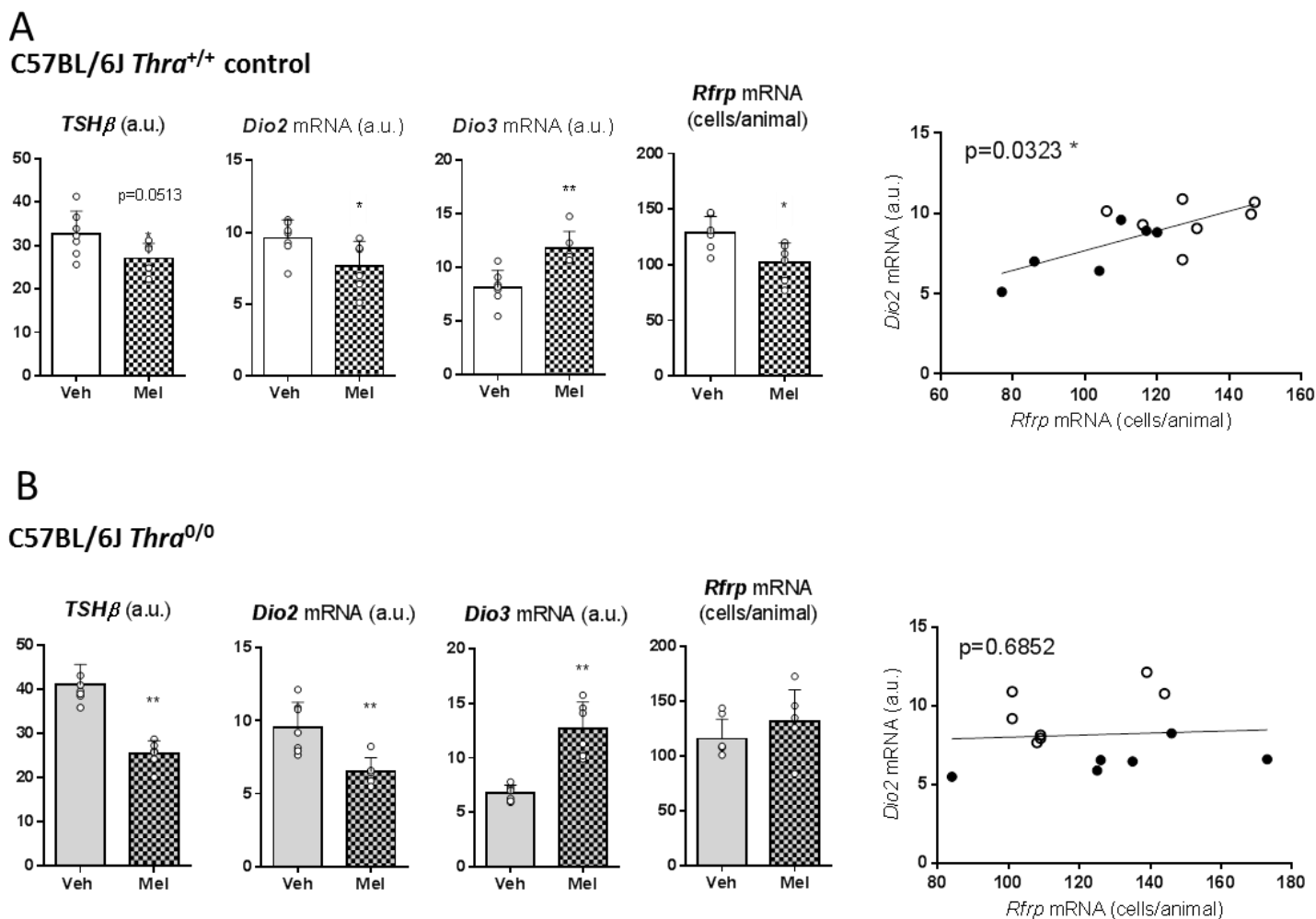
## **Effets de la mélatonine exogène sur la voie TSH $\beta$ /T3/neuropeptides RF-amides chez des souris mutées (*Thra0/0*) ou non (contrôles, *Thra+/+*) pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR $\alpha$ .**

Nous avons évalué si de la mélatonine exogène administrée la nuit dans l'eau de boisson des souris, de façon à mimer une production nocturne de mélatonine en photopériode courte, permet d'induire une réponse photopériodique de la voie TSH/T3/RF-amides chez des souris C57BL/6J, similaire à celle observée chez des souris CBA produisant de la mélatonine endogène. De plus, afin de déterminer si les variations induites par la mélatonine exogène chez les souris C57BL/6J sont médiées par les hormones thyroïdiennes, nous avons étudié leur expression chez des souris C57BL/6J supplémentées en mélatonine et porteuse d'une mutation du TR $\alpha$  (*Thra0/0* mice) ou non (*Thra+/+*).

La mélatonine administrée dans l'eau de boisson la nuit aux souris C57BL/6J mime l'effet d'une production de mélatonine endogène observable chez les souris CBA, puisque l'expression de TSH $\beta$ , *Dio2* et *Rfrp* est diminuée et celle de *Dio3* augmentée chez les souris supplémentées en mélatonine par rapport à des souris n'ayant eu que du solvant (Figure 34).

Chez les souris *Thra0/0*, la mélatonine réduit toujours l'expression de TSH $\beta$  et de *Dio2* et augmente celle de *Dio3* mais elle n'inhibe plus l'expression de *Rfrp* (Figure 34B). Ces résultats suggèrent un rôle clé du TR $\alpha$  pour médier l'effet des variations mélatoninergiques de T3 sur l'expression de *Rfrp*. De plus, chez les souris C57BL/6J contrôles *Thra+/+* comme chez les souris CBA il existe une corrélation positive significative entre l'expression de *Dio2* et le nombre de neurones exprimant le *Rfrp*, qui est perdue chez les souris mutées *Thra0/0* (Figure 34B).

Conformément à ce qui avait été observé chez les souris CBA, la mélatonine administrée aux souris C57BL/6J n'a pas d'effet sur la masse corporelle ni sur celle des testicules et des vésicules séminales. De même, la mélatonine n'altère pas l'expression de *Kiss1*. Comme précédemment rapporté, nous avons observé que les souris *Thra0/0* (Gauthier et al., 2001) sont plus petites (masse corporelle =  $24,6 \pm 2,7$ g, n=13) que les souris contrôles *Thra+/+* (masse corporelle =  $26,2 \pm 4,1$ g, n=13 ; test de Student P= 0,0409) et semblent plus anxieuses.



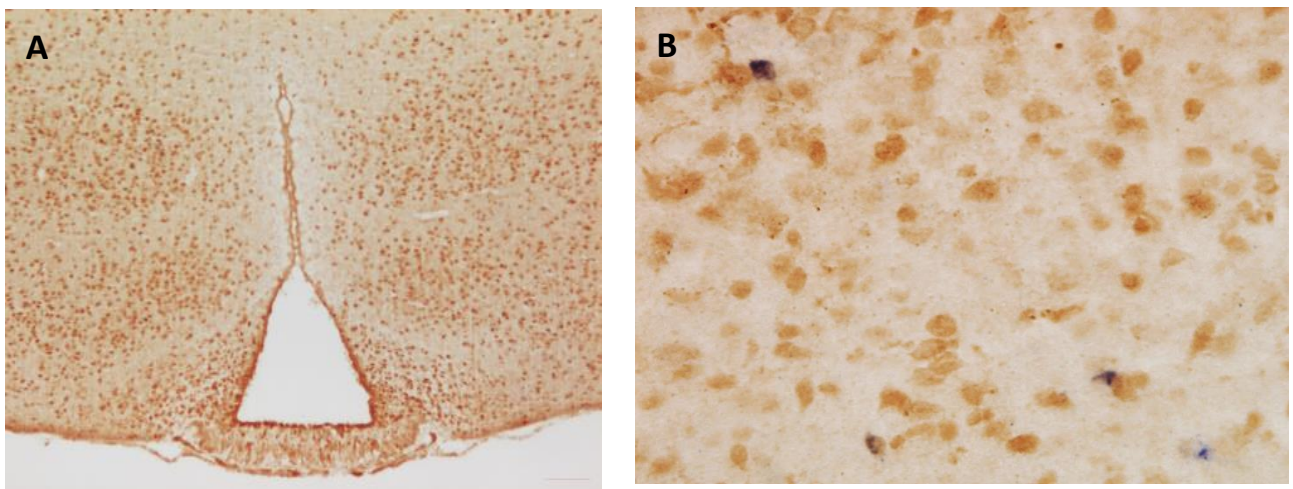
**Figure 34** : Effet de la mélatonine exogène sur l'expression de TSH $\beta$ , *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris C57BL/6J porteuse (*Thra*<sup>0/0</sup>) ou non (*Thra*<sup>+/+</sup>) d'une mutation générale du TR $\alpha$

Des souris mâles adultes C57BL/6J *Thra*<sup>+/+</sup> contrôles (A) et *Thra*<sup>0/0</sup> (B) gardées en photopériode courte (SP : 10hL/14hD) ont reçu soit du véhicule (Veh ; 0,1% éthanol dans de l'eau, barres pleines) soit de la mélatonine (Mel ; 80mg/L mélatonine, 0,1% éthanol dans de l'eau, barres cadrillées) dans l'eau de boisson pendant la nuit et de l'eau normale pendant le jour pendant au moins 6 semaines. Les valeurs d'expression de TSH $\beta$ , *Dio2* et *Dio3* sont données en moyenne du niveau de gris en unité arbitraire (a.u.) et la valeur de *Rfrp* est donnée en nombre de cellules totales marquées par animal. Les données individuelles sont données ainsi que la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne (SEM) de 6-7 souris. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . Le graphique de droite montre la corrélation entre l'expression de *Dio2* et de *Rfrp*.

### Effet direct ou indirect de la T3 sur les neurones à RFRP-3

Etant donné que le TR $\alpha$  est exprimé de façon quasiment ubiquitaire dans le système nerveux central, notamment dans l'hypothalamus (Bernal et al., 2015 ; [Figure 35A](#)), j'ai testé l'hypothèse que les hormones thyroïdiennes agissent directement *via* des TR $\alpha$  localisés dans les neurones à RFRP-3.

Dans un premier temps j'ai observé, par des doubles marquages immunohistochimiques du TR $\alpha$  et de *Rfrp*, qu'environ 43% des neurones à RFRP-3 expriment le TR $\alpha$  ([Figure 35B](#)). De plus, une analyse de la séquence du promoteur du gène *Rfrp* révèle la présence de sites TRE de fixation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans le promoteur du *Rfrp*. Ces résultats indiquent qu'il pourrait y avoir une régulation directe de la T3 sur les neurones à RFRP-3.



**Figure 35:** Expression du TR $\alpha$  dans l'hypothalamus de souris et co-marquage avec le RFRP-3

(A) Marquage immunohistochimique du TR $\alpha$  dans l'hypothalamus de souris (image de gauche, objectif x5) et (B) co-marquage du TR $\alpha$  (en brun) et de RFRP-3 (en bleu) (image de droite, objectif x20).

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai appliqué le même protocole de supplémentation de mélatonine précédemment utilisé chez des souris C57BL/6J portant (*Cre3xThraAMI/+*) ou non (*ThraAMI/+*) une mutation du *Thra* uniquement dans les neurones. Dans les deux groupes de souris, la mélatonine régule l'expression de TSH $\beta$ , de *Dio2* et *Dio3* mais également de *Rfrp*, indépendamment de la présence ([Figure 36A](#)) ou de l'absence ([Figure 36B](#)) de TR $\alpha$  dans les neurones. De plus, la corrélation entre l'expression de *Dio2* et le nombre de neurones exprimant le *Rfrp* est conservée chez les deux groupes de souris ([Figure 36](#)) indiquant que, avec ou sans TR $\alpha$  neuronaux, le lien entre l'expression de ces deux gènes est conservé.

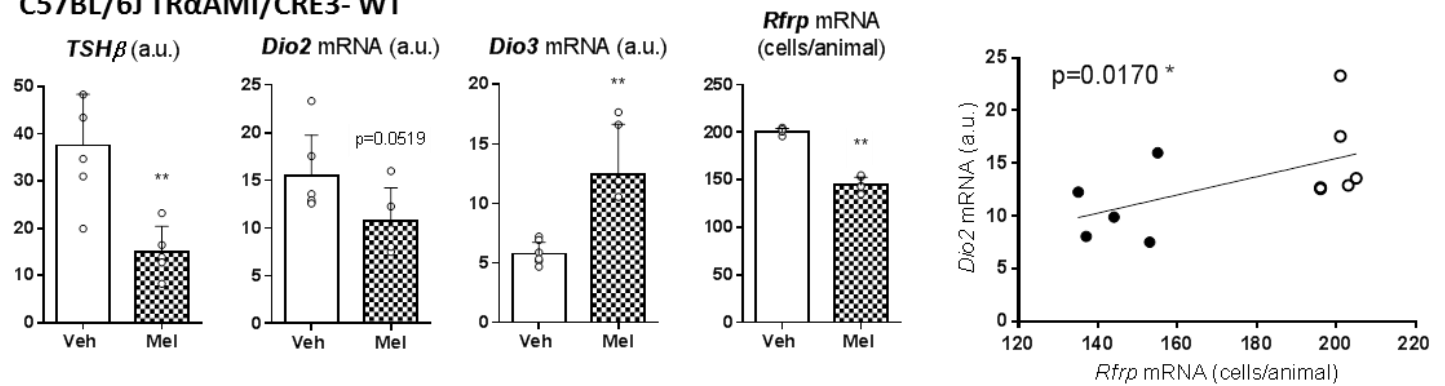


L'inhibition conservée de l'expression de *Rfrp* par la mélatonine chez les souris *Cre3xThraAMI/+* suggère que la T3 n'agirait pas directement sur les neurones à RFRP-3 mais plutôt *via* des récepteurs non-neuronaux pour réguler l'expression de *Rfrp*.

Pour identifier les cibles cellulaires potentielles de la T3 dans le MBH, j'ai réalisé différents doubles marquages avec des marqueurs d'astrocytes et de tanocytes. J'ai observé une forte colocalisation du TR $\alpha$  et de la vimentine, un marqueur des tanocytes (Figure 36C). Cette observation suggère que les tanocytes pourraient jouer un rôle de médiateur entre l'information mélatoninergique et les neurones à RFRP-3 en intégrant le signal de la T3 grâce aux TR $\alpha$ .

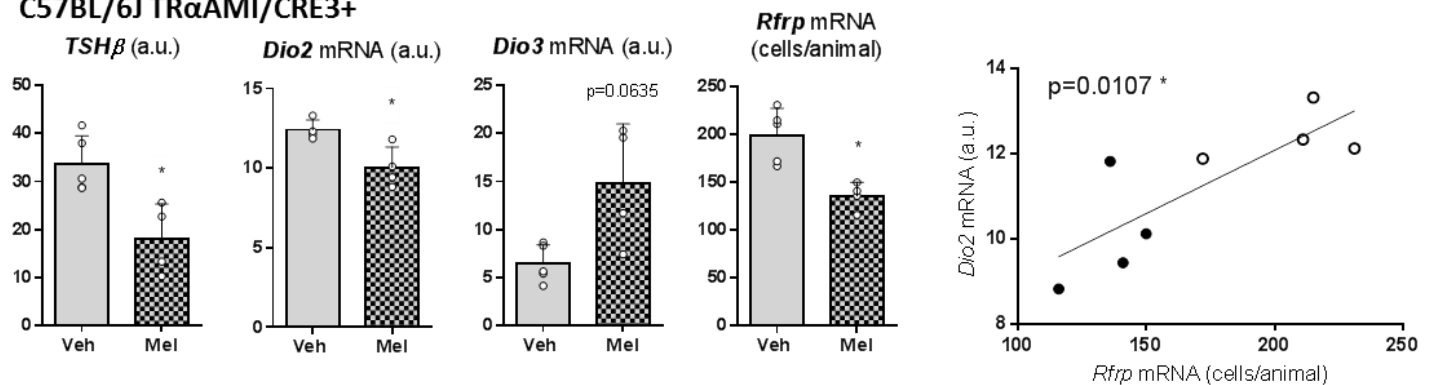
**A**

**C57BL/6J TR $\alpha$ AMI/CRE3- WT**

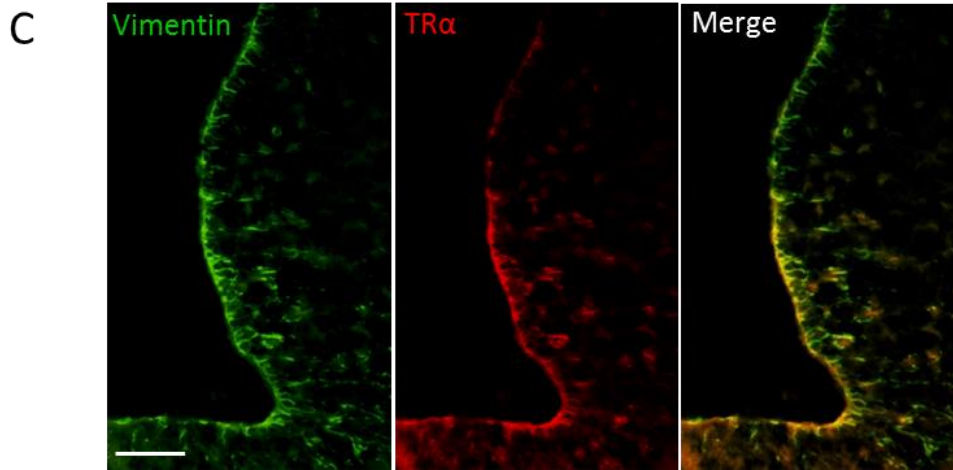


**B**

**C57BL/6J TR $\alpha$ AMI/CRE3+**







**Figure 36:** Effet de la mélatonine exogène sur l'expression de  $TSH\beta$ , *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris C57BL/6J porteuse (*Cre3xThraAMI/+*) ou non (*ThraAMI/+*) d'une mutation restreinte dans les neurones du TR $\alpha$  et double immunohistochimie de TR $\alpha$  et vimentine chez des souris C57BL/6J.

Des souris mâles adultes C57BL/6J *ThraAMI/+* contrôles (A) et *Cre3xThraAMI/+* (B) gardées en photopériode courte (SP : 10hL/14hD) ont reçu soit du véhicule (Veh ; 0,1% éthanol dans de l'eau, barres pleines) soit de la mélatonine (Mel ; 80mg/L mélatonine, 0,1% éthanol dans de l'eau, barres cadrillées) dans l'eau de boisson pendant la nuit et de l'eau normale pendant le jour pendant au moins 6 semaines. Les valeurs d'expression de  $TSH\beta$ , *Dio2* et *Dio3* sont données en moyenne du niveau de gris en unité arbitraire (a.u.) et la valeur de *Rfrp* est donnée en nombre de cellules totales marquées par animal. Les données individuelles sont données ainsi que la moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne (SEM) de 6-7 souris. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . Le graphique de droite montre la corrélation entre l'expression de *Dio2* et de *Rfrp*. (C) Photographie de la détection immunohistochimique de vimentine, un marqueur des tanycytes, en tyramide (vert) et du TR $\alpha$  détecté avec l'Alexa594 (rouge) dans les tanycytes. La superposition des deux images (à droite) montre la colocalisation du signal.

## Discussion

Depuis la découverte du rôle fondamental de la T3 hypothalamique pour véhiculer l'information saisonnière au système nerveux central (Yoshimura et al., 2003), de nombreuses études ont cherché à comprendre les mécanismes moléculaires liant les changements annuels de la photopériode et la régulation saisonnière de l'axe reproducteur. Chez les mammifères, la mélatonine transmet le message photopériodique en régulant la production de TSH par *la pars tuberalis* (Hanon et al., 2008; Wittkowski et al., 1988) qui régule *in fine* la concentration hypothalamique de T3 en agissant sur la balance des *Dio2/Dio3* dans les tanocytes (Dardente et al., 2010; Nishiwaki-Ohkawa and Yoshimura, 2016; Yasuo et al., 2005). Plusieurs études ont proposé que les changements photopériodiques de TSH/T3 pourraient réguler la reproduction saisonnière en agissant sur les neurones à Kp et/ou à RFRP-3 connus pour moduler l'activité des neurones à GnRH (Angelopoulou et al., 2019; Freeman et al., 2007; Henson et al., 2013; Klosen et al., 2013; Simonneaux, 2020). Cependant, la compréhension des mécanismes d'action de la T3 et l'identification de ses cibles cellulaires est limitée par le manque de modèles saisonniers génétiquement modifiés disponibles.

Dans cette étude, nous avons montré que malgré son absence de phénotype saisonnier, la souris peut être utilisée comme modèle pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'intégration du signal mélatoninergique dans le système nerveux central. Ainsi, nous avons montré que, contrairement aux souris C57BL/6J déficientes en mélatonine, les souris CBA, qui produisent de la mélatonine, présentent des variations photopériodiques de l'expression de *TSH* dans la *pars tuberalis*, de *Dio2* et *Dio3* dans les tanocytes ainsi qu'une réduction significative en PC du nombre de neurones exprimant le *Rfrp*. De façon intéressante, chez la CBA dont la reproduction ne dépend pas de la photopériode, il ne semble pas y avoir de variations photopériodiques de *Kiss1* dans l'ARC comme celles observées chez les modèles saisonniers. L'ensemble de ces résultats suggèrent que chez la souris CBA qui produit de la mélatonine, le signal photopériodique véhiculé par la mélatonine est intégré dans l'hypothalamus au niveau des neurones à RFRP-3 comme chez toutes les espèces saisonnières étudiées, tandis que l'expression de *Kiss1* ne semble pas dépendre des variations environnementales de la photopériode chez la souris.

Bien que la souris C57BL/6J soit déficiente en mélatonine, elle conserve des récepteurs MT1 fonctionnels (Yasuo et al., 2009) et une étude a montré que des injections de mélatonine exogène régulent l'expression de *TSH*, *Dio2* et *Dio3* (Ono et al., 2008b). Dans cette étude nous avons montré, grâce à un protocole d'administration de mélatonine exogène mimant le pic nocturne de mélatonine endogène en PC (Kasahara et al., 2010; Ribelayga et al., 2000), que les variations de *Dio2/Dio3* induites

par la mélatonine sont associées à une réduction significative du nombre de neurones exprimant le *Rfrp* comme observée chez les souris CBA. Ces résultats indiquent que la supplémentation nocturne de mélatonine chez les C57BL/6J est capable de restaurer des variations de l'expression des gènes impliqués dans la saisonnalité, faisant de ces souris un modèle pertinent pour étudier les mécanismes moléculaires de l'intégration photopériodique dans l'hypothalamus des rongeurs. Chez les CBA et C57BL/6J, la réponse du *Rfrp* à la mélatonine semble plus faible que celle des autres gènes. Cet effet pourrait être lié au phénotype saisonnier étant donné que l'inhibition de *Rfrp* par la mélatonine (ou la PC) est plus forte chez les hamsters (Revel et al., 2008) et la souris MSM semi-sauvage (Sáenz de Miera et al., 2020).

Des études ont montré que des infusions intracérébroventriculaires de TSH chez des hamsters gardés en PC, peuvent restaurer les niveaux de *Rfrp* de PL, suggérant que les variations photopériodiques du nombre de neurones exprimant le *Rfrp* seraient régulées par la T3 (Klosen et al., 2013). Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons évalué l'effet d'une supplémentation nocturne de mélatonine chez des souris C57BL/6J portant une mutation générale du gène *Thra* codant pour le TR $\alpha$ . Chez les souris *Thra0/0*, la mélatonine n'inhibe plus l'expression de *Rfrp* mais continue de réguler l'expression de TSH $\beta$ , *Dio2* et *Dio3*. De plus, la corrélation entre l'expression de *Dio2* et *Rfrp* observée chez les souris CBA et les souris C57BL/6J supplémentée en mélatonine, est perdue chez les souris mutées pour le TR $\alpha$ . L'inhibition de l'expression de *Rfrp* par la mélatonine semble donc impliquer une action de la T3 sur son récepteur TR $\alpha$  tandis que la régulation saisonnière de TSH $\beta$  dans la *pars tuberalis* et des *Dio2/Dio3* tanycytaires semble indépendante de la régulation T3-TR $\alpha$ .

Le TR $\alpha$  est largement distribué dans le système nerveux central (Bernal et al., 2015; Bradley et al., 1989; Wallis et al., 2010), particulièrement dans l'hypothalamus (Dufourny et al., 2016; Herwig et al., 2008) suggérant que la T3 pourrait agir directement sur les neurones à RFRP-3. Cependant, nous avons observé que la supplémentation nocturne en mélatonine chez des souris C57BL/6J portant une mutation du TR $\alpha$  spécifiquement dans les neurones (Quignodon et al., 2007), est toujours capable de réduire le nombre de neurones exprimant le *Rfrp*, et la corrélation entre l'expression de *Dio2* et *Rfrp* est conservée chez ces souris comme chez les contrôles. La conservation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'expression de *Rfrp* en l'absence de TR $\alpha$  neuronaux suggère que la T3 agit *via* des récepteurs TR $\alpha$  exprimés par des cellules non-neurales.

Des études rapportent que les astrocytes expriment des transporteurs des hormones thyroïdiennes comme le MCT8 et les OATPs (Warner and Mittag, 2012) mais n'expriment pas de TR $\alpha$  (Carlson et al., 1994; Wallis et al., 2010), suggérant que les astrocytes ne seraient pas responsables de la transmission du signal de la T3 aux neurones à RFRP-3. Grâce à des co-marquages immunohistochimiques, nous avons montré une colocalisation du TR $\alpha$  dans les tanycytes marqués par la vimentine. Cette observation avait déjà été faite dans une étude par Wallis et collaborateurs montrant

que les tanocytes sont les seules cellules marquées par la GFAP qui expriment le récepteur TR $\alpha$  dans l'hypothalamus des souris (Wallis et al., 2010).

Les tanocytes sont des cellules épendymales spéciales qui étendent des prolongements dans le MBH, notamment dans la région où sont localisés les neurones à RFRP-3 (Prevot et al., 2018, Figure 52). Ces cellules non-neuronales qui expriment le TR $\alpha$  pourraient donc être impliquées dans la régulation de l'expression de *Rfrp* par la mélatonine en transmettant indirectement le signal de la T3 aux neurones à RFRP-3. Récemment, les tanocytes ont été reconnus comme niche neurogénique dont les cellules progénitrices/souches se différencient en neurones et cellules gliales s'intégrant dans les réseaux hypothalamiques (Kokoeva et al., 2005a, 2007; Xu et al., 2005). Chez le hamster et le mouton, la prolifération cellulaire dans l'hypothalamus suit un rythme saisonnier et le blocage de cette néogenèse saisonnière chez la brebis induit un décalage de leur période de reproduction (Batailler et al., 2018). En considérant le rôle de la T3 dans la néogenèse chez l'adulte (Gomes et al., 1999; Kapoor et al., 2015), nous faisons l'hypothèse qu'une altération des TR $\alpha$  tanocytaires pourrait modifier la néogenèse hypothalamique et empêcher la régulation photopériodique du nombre de neurones à RFRP-3.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que la mélatonine exogène ou endogène régule l'expression de TSH $\beta$ , *Dio2* et *Dio3* mais également le nombre de neurones exprimant le *Rfrp* chez la souris. De plus, en utilisant des souris C57BL/6J génétiquement modifiées, nous avons démontré le rôle clé de la signalisation de la T3 *via* son récepteur TR $\alpha$  dans la régulation des neurones à RFRP-3 par la mélatonine. Cependant, la mutation des TR $\alpha$  uniquement dans les neurones n'altérant pas la régulation de *Rfrp* par la mélatonine, nous faisons l'hypothèse que la T3 pourrait agir sur des TR $\alpha$  exprimés par les tanocytes, potentiellement *via* des processus de néogenèse hypothalamique pour réguler les variations saisonnières du nombre de neurones à RFRP-3.

## **PROJET 2**

---

La néogenèse saisonnière hypothalamique  
chez le hamster syrien

Dans cette seconde partie de ma thèse j'ai testé l'hypothèse selon laquelle les mécanismes de neurogenèse saisonnière dans l'hypothalamus pourraient être à l'origine des variations du nombre de neurones exprimant le *Rfrp* observés dans l'hypothalamus entre une PC et une PL.

En effet, que ce soit par IHC ou par HIS, le nombre de neurones exprimant le RFRP-3 diminue en PC de façon conservée chez toutes les espèces saisonnières étudiées, qu'elles se reproduisent en PC ou en PL. A ce jour, il a été considéré que cette diminution serait due à la baisse d'expression du peptide dans certains neurones les rendant par conséquent indétectables en PC. Cependant, quelques études récentes proposent que ces variations pourraient également faire intervenir des processus de neurogenèse et/ou d'apoptose dépendants de la photopériode (Batailler et al., 2018; Helfer et al., 2019).

Afin d'évaluer l'implication possible de phénomènes de neurogenèse et/ou apoptose dans les variations photopériodiques des neurones exprimant le RFRP-3, j'ai dans un premier temps évalué les profils de prolifération cellulaire et de mort cellulaire dans l'hypothalamus de hamsters syriens lors des transitions de PC vers PL et de PL vers PC. Dans un second temps, j'ai tenté, par des expériences de doubles marquages IHC, d'identifier le phénotype des cellules nouvellement formées qui se différencient et s'intègrent dans les réseaux hypothalamiques lors des transitions photopériodiques.

L'étude de la prolifération cellulaire et du profil des cellules néoformées a été faite grâce à des injections de 5-Bromo 2' désoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine s'incorporant dans l'ADN des cellules en division, détecté ensuite par IHC. L'analyse de la mort cellulaire a été réalisée en quantifiant en IHC la présence de la caspase-3 clivée qui constitue la forme active de la protéine induisant l'apoptose.

# Matériel et méthodes

Toutes les expériences du projet 2 ont fait l'objet d'une saisine et ont été validées par le Chronobiotron et le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, et ont été réalisées en accord avec la directive 2010/63/UE du Parlement européen du 22 septembre 2010 (#21433- 2019071019083626).

## 1- Animaux

### a- Stabulation et protocoles d'exposition des hamsters

Des **hamsters syriens** mâles âgés de 2 à 6 mois ont été placés dans des cages de type I, à raison de 2 à 3 animaux par cage, avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. La température dans la pièce était de  $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , la lumière était allumée pendant la période diurne et de la lumière rouge tamisée non active sur l'horloge circadienne était allumée pendant la période nocturne.

La moitié des hamsters ont été placés en PC (10hL/14hD ; n=53) et l'autre moitié en PL (14hL/10hD ; n=65) pendant 12 semaines. Après avoir vérifié le statut reproducteur des animaux par palpation des testicules, les animaux ont été transférés en photopériode opposée, puis sacrifiés à différents moments après avoir reçu de la BrdU.

### b- Protocole d'injection de la BrdU

La BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division. Dans chacun des deux groupes photopériodiques, les animaux ont été soumis à deux protocoles d'injection de BrdU. Les protocoles d'injections ont été adaptés pour l'espèce du hamster syrien et pour notre expérience, en tenant compte des protocoles utilisés dans plusieurs articles différents. Afin d'établir un profil de prolifération cellulaire lors du passage d'une photopériode à l'autre, 6 groupes d'animaux (n=6-7 par groupe) ont reçu une injection intra-péritonéale (IP) de BrdU (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni, #ab142567 ; 100 mg/kg dilué dans du Ringer (NaCl 0.9%)) à différents moments après le transfert de photopériode, puis ont été euthanasiés 24h après l'injection (voir protocole ci-dessous ; [Figure 36 et 37](#)). Afin d'identifier le phénotype des cellules nouvellement formées et différenciées dans l'hypothalamus lors du passage d'une photopériode à l'autre, 3 ou 4 groupes d'animaux (n=4-6 par groupe) ont reçu 3 injections IP de BrdU (50 mg/kg, 1 fois toutes les 24h pendant 3 jours) à différents moments après le transfert de photopériode, puis ont été euthanasiés 5 semaines après l'injection (voir protocole ci-dessous ; [Figure 36 et 37](#)).



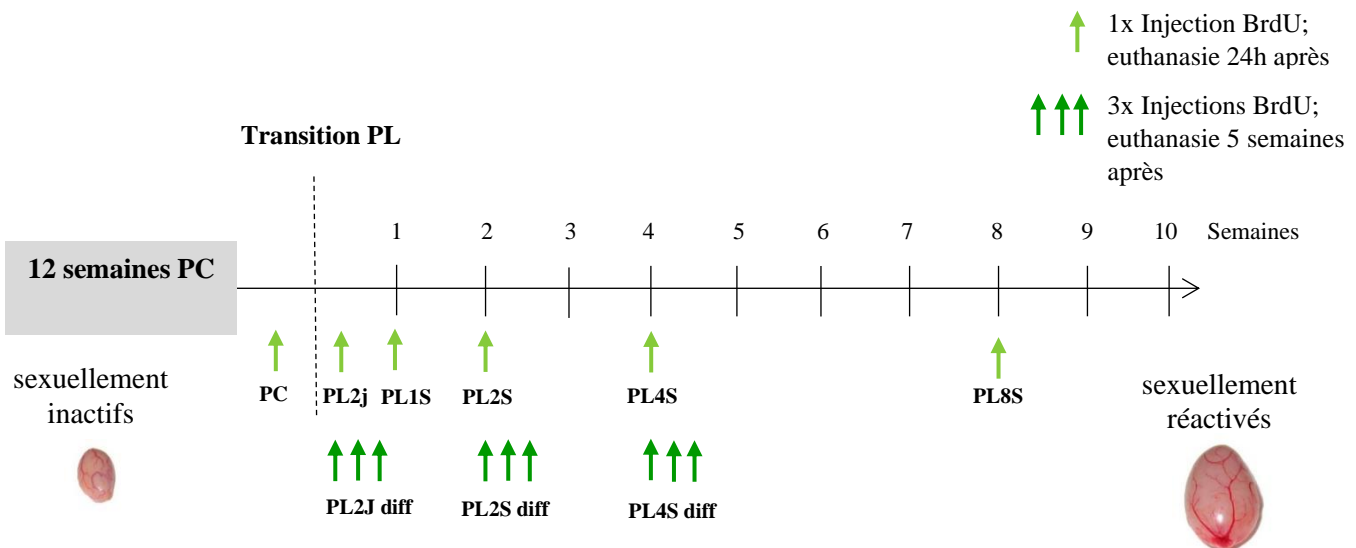
Pour l'expérience de passage de PC à PL (Figure 37) :

**Profil de prolifération cellulaire** - animaux recevant une injection de BrdU et euthanasiés après 24h (n=6-7 par groupe) :

- Injection après 12 semaines en PC, 2 jours après PL (PL2J), 1 semaine après PL (PL1S), 2 semaines après PL (PL2S), 4 semaines après PL (PL4S), 8 semaines après PL (PL8S).

**Identification des cellules différenciées** - animaux recevant 3 injections de BrdU sur 3 jours et euthanasiés après 5 semaines (n=4-6 par groupe) :

- Injections 2-4 jours après PL (PL2J diff), 14-16 jours après PL (PL2S diff), 28-30 jours après PL (PL4S diff).



**Figure 37:** Protocole d'injection de BrdU chez des hamsters mâles transférés d'une photopériode courte (PC, 10hL/14hD) à une photopériode longue (PL, 14hL/10hD)

Six groupes d'animaux (n=6-7 par groupe) ont reçu une injection unique de BrdU soit en PC, soit 2 jours (PL2j), 1, 2, 4 ou 8 semaines (PL1S, PL2S, PL4S et PL 8S) après le passage en PL et ont été euthanasiés 24h après l'injection.

Trois groupes d'animaux (n=4-6 par groupe) ont reçu 3 injections de BrdU à 24h d'intervalle pendant 3 jours, 2 jours (PL2J diff), 2 ou 4 semaines (PL2S diff, PL4S diff) après le passage en PL et ont été euthanasiés 5 semaines après la dernière injection.

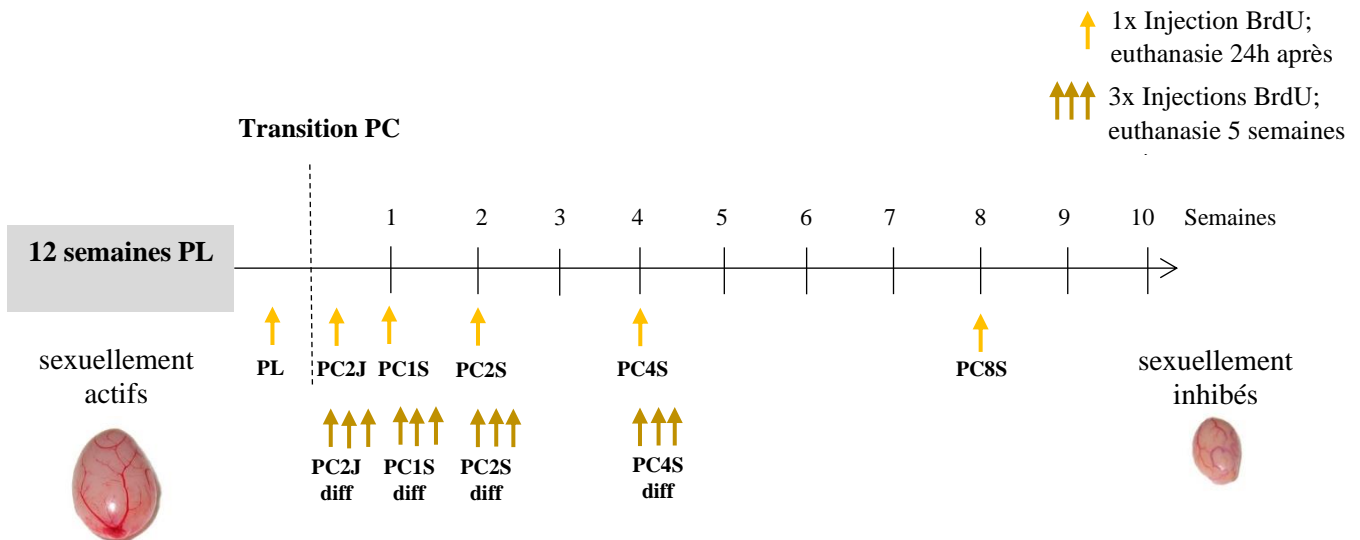
Pour l'expérience de passage de PL à PC (Figure 38):

**Profil de prolifération cellulaire** - animaux recevant une injection de BrdU et euthanasiés après 24h (n=6-7 par groupe) :

- Injection après 12 semaines en PL, 2 jours après PC (PC2J), 1 semaine après PC (PC1S), 2 semaines après PC (PC2S), 4 semaines après PC (PC4S), 8 semaines après PC (PC8S).

**Identification des cellules différenciées** - animaux recevant 3 injections de BrdU sur 3 jours et euthanasiés après 5 semaines (n=6 par groupe) :

- Injections 2-4 jours après PC (PC2J diff), 7-9 jours après PC (PC1S diff), 14-16 jours après PC (PC2S diff), 28-30 jours après PC (PC4S diff).



**Figure 38:** Protocole d'injection de BrdU chez des hamsters mâles transférés d'une photopériode longue (PL) à une photopériode courte (PC)

6 groupes d'animaux (n=6-7) ont reçu une injection unique de BrdU soit en PL, soit 2 jours (PC2j), 1, 2, 4 ou 8 semaines (PC1S, PC2S, PC4S et PC8S) après le passage en PC et ont été euthanasiés 24h après l'injection. 4 groupes d'animaux (n=6) ont reçu 3 injections de BrdU à 24h d'intervalle pendant 3 jours 2 jours (PC2J diff), 2 ou 4 semaines (PC2S diff, PC4S diff) après le passage en PL et ont été euthanasiés 5 semaines après la dernière injection.

## 2- Prélèvement des tissus

Les protocoles d'euthanasie au CO<sub>2</sub>, de prélèvements de sang, testicules et vésicules séminales, de perfusion intra-cardiaque et d'extraction du cerveau de la boîte crânienne sont identiques à ceux décrits dans le projet 1 (projet 1, section 2) à l'exception du volume de fixateur injecté en intracardiaque qui est de 50 ml pour le hamster syrien. De plus l'extraction du cerveau des hamsters a été réalisée de façon très soignée de façon à ne pas casser la *pars tuberalis* qui est particulièrement fine chez cette espèce.

### **3- Traitement et préparation des coupes de cerveau**

#### **a- Traitement des cerveaux pour l'étude de la prolifération et mort cellulaire**

Les cerveaux utilisés pour l'étude du profil de prolifération cellulaire ont été cryoconservés et coupés au cryostat afin d'obtenir des coupes plus épaisses que celles obtenues au microtome, et en accord avec ce qui est généralement décrit dans la littérature pour les études de prolifération (Kokoeva et al., 2007; Smith et al., 2010a).

#### *Enrobage et conservation des cerveaux*

Après fixation, les cerveaux passent par un bain de sucrose 10% pendant environ 2h puis dans un bain de sucrose 30% pendant 48h jusqu'à ce qu'ils tombent au fond des pots. Le passage en sucrose avant la congélation des cerveaux permet de les protéger des cristaux de glace qui pourraient endommager le tissu. Le passage court dans le sucrose 10% avant le transfert en sucrose 30% permet de réduire la pression causée par la différence d'osmolarité très forte de la solution de sucrose 30%.

Après un rinçage de 5min au PBS afin de retirer l'excès de sucrose, les cerveaux sont congelés rapidement en les déposant sur une feuille de papier aluminium placée sur de la carboglace. Après 1h de congélation sur carboglace, les cerveaux entourés de papier aluminium sont conservés dans une boîte hermétique à -80°C en attendant d'être coupés au cryostat.

#### *Découpe au cryostat*

Pour chaque cerveau, des coupes de 30µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20°C dans les régions de la zone sub-ventriculaire (SVZ), de l'hippocampe et de l'hypothalamus. Les coupes sont séparées en 4 séries (une série consiste à prendre 1 coupe sur 4 dans la direction antéro-postérieure, soit un total de 10-12 coupes pour la région SVZ, 8-10 coupes pour l'hippocampe et 12-14 coupes pour l'hypothalamus) et placées dans du PBS dans des boîtes de 12 puits. Les séries de coupes sont ensuite conservées dans des tubes Eppendorf contenant de la solution de Watson de cryoprotection (Tableau 4) et placées à -20°C jusqu'à utilisation.

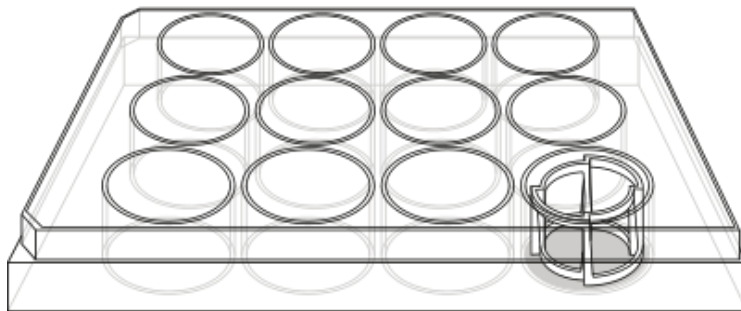
#### **b- Traitement des cerveaux pour l'étude de la différenciation cellulaire**

Les cerveaux utilisés pour identifier le profil cellulaire des cellules différenciées ont été soumis au même protocole de déshydratation, d'enrobage au PEG et de découpe des cerveaux au microtome que celui décrit dans le projet 1 (section 3) afin de réaliser des doubles marquages en IHC. L'enrobage au PEG permet de faire des coupes très fines (12 µm) ce qui permet de tester de nombreux co-marquages. Pour chaque cerveau, l'hypothalamus a été entièrement coupé dans la direction antéro-postérieure, et

des séries indépendantes, consistant à prélever 1 coupe sur 14 (soit 12 à 14 coupes), ont été montées sur lame.

#### 4- Immunohistochimie BrdU et Caspase-3

L'IHC des coupes de 30  $\mu\text{m}$  de tissu cryoprotégé a été réalisée en coupes flottantes pour permettre une pénétration optimale de l'anticorps des 2 côtés de la coupe. Les coupes sont incubées directement dans des puits de plaque à 12 puits et transférées d'un puits à l'autre grâce à un système d'épuisettes (Figure 39) excepté pour les étapes d'incubation d'anticorps pour lesquelles les coupes sont incubées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml dans un souci d'économie d'anticorps. Le protocole est proche de celui utilisé pour l'IHC sur lame (Projet 1, section 5) mais certaines étapes de préparation du tissu sont différentes.



**Figure 39:** Schéma illustrant le système d'épuisette sur des plaques à 12 puits utilisées pour l'immunohistochimie en coupes flottantes

##### a- Préparation des coupes pour l'IHC

###### *Inhibition de l'activité enzymatique endogène*

La déshydratation des cerveaux et l'inclusion en PEG inhibe une grande partie des activités phosphatase et peroxydase endogènes du tissu, diminuant l'immunoréactivité du tissu, ce qui nécessite une réactivation antigénique (voir Projet 1, section 5b).

Dans le cas de tissus congelés, la réactivation antigénique n'est pas nécessaire mais, il est conseillé d'inhiber l'activité endogène de la phosphatase et/ou de la peroxydase afin de diminuer le risque de signal aspécifique. Pour inhiber l'activité phosphatase, les coupes ont été passées dans 3 bains rapides d'eau distillée puis 5min dans un bain de 15% acide acétique, rincées 4 fois 2 min à l'eau distillée et une fois au TBS 1X. Pour inhiber l'activité peroxydase, les coupes ont été incubées dans une solution contenant 0,1%  $\text{NaN}_3$ , 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans du TBS 1X pendant 30 min à TA puis rincées 2 fois 5 min au TBS.

### *Hydrolyse de l'ADN*

Une étape d'hydrolyse de l'ADN est nécessaire pour que l'anticorps détecte efficacement le BrdU inséré dans l'ADN. L'hydrolyse de l'ADN a été réalisée en incubant les coupes dans une solution de chlorure d'hydrogène (HCl) 2 M pendant 30 min à 37°C puis dans un bain de 0,1 M de tampon borate à pH 8,5 pendant 20 min à TA afin de neutraliser l'HCl. Cette étape n'est pas nécessaire pour la détection de la Caspase-3.

### *Perméabilisation et blocage*

Afin d'assurer une bonne pénétration des anticorps dans le tissu, une perméabilisation a été réalisée en incubant les coupes pendant 20 min à TA dans une solution de PBS contenant 0,25% de tritonX100, un agent détergent. Après un rinçage au PBS, les sites aspécifiques ont été saturés dans un tampon de blocage (3% lait en poudre Régilait; 1h minimum à TA) afin de réduire les risques de bruit de fond.

#### **b- Immunomarquage simple**

Les coupes ont été incubées dans des tubes Eppendorf sous agitation avec 750 µL de tampon (PBS 1X, 0,2% triton X-100, 0,1% sérum de mule) contenant l'anticorps primaire. L'anticorps anti-BrdU (Abcam, #ab6326) a été dilué au 1/2500 et incubé pendant 40h à 4°C. L'anticorps anti-Caspase-3 activée (Merck, Darmstadt, Allemagne, #AB3623) a été dilué à 1/400 et incubé une nuit à TA.

Les marquages du BrdU et de la Caspase-3 ont été réalisés avec un protocole d'amplification utilisant le système avitine-biotine et une révélation HRP-DAB selon le protocole décrit pour le projet 1 (Figure 32, section 5.c). La réaction de révélation a été arrêtée après 30 min par des bains d'eau distillée (5x2 min, TA). Les coupes ont ensuite été montées au pinceau sur lames puis laissées à sécher une nuit. Le lendemain, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 95%, 100%, 100% ; 5min par bain, TA), puis plongées dans du toluène (2x10 min, TA) avant d'être montées à l'Eukitt entre lame et lamelle.

## **5- Doubles marquages BrdU et protéines candidates**

Afin d'identifier les cellules néoformées et différenciées qui s'intègrent dans les réseaux hypothalamiques, j'ai réalisé des co-marquages de BrdU avec plusieurs protéines candidates.

Les IHC sur coupes de cerveau enrobées au PEG ont été faites sur lames en suivant le même protocole que celui décrit dans le projet 1 (section 5). L'IHC pour le peptide candidat (RFRP-3, Kp, Somatostatine, Tableau 5) a été réalisée en premier avec une révélation HRP-DAB (Projet 1, section 5.c, Figure 32). Le marquage a ensuite été fixé par un bain de 10min dans une solution de PBS1X, 4% PFA, afin de prévenir la détérioration possible du marquage par l'étape d'hydrolyse nécessaire à la détection

du BrdU. Après 4 rinçages de PBS (4x5min, TA), le marquage BrdU a été réalisé en ajoutant simplement l'étape d'hydrolyse de l'ADN avant le blocage et en utilisant une révélation AP-NAMP/FastBlue (Projet 1, section 5.c, [Figure 32](#)).

## **6- Observation et analyse du signal**

Toutes les lames ont été traitées « en aveugle ». Les cellules BrdU positives ont été comptées manuellement au microscope optique (Leica Microsystems) au grossissement x20 en gardant les mêmes paramètres d'observation pour chacune des zones d'intérêt analysées. Pour chaque animal, le marquage BrdU a été quantifié sur 3 coupes pour la SVZ, 8 à 12 coupes pour le gyrus denté, et 12 à 15 coupes pour l'hypothalamus. Pour chacun des groupes expérimentaux, la valeur finale donnée est la moyenne par coupe  $\pm$  l'erreur standard (SEM) du nombre de cellules BrdU positives comptés sur 6 à 7 animaux.

Des photos des lames contenant le marquage caspase-3 ont été prises au Hamamatsu NanoZoomer S260 permettant de photographier la lame entière avec des paramètres d'acquisition standardisés pour l'ensemble des lames. Les photos ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel NDP.view.2. Pour chaque animal, le marquage caspase-3 a été quantifié en comptant le nombre de cellules marquées dans un carré de 0.1 mm<sup>2</sup> sur 5 coupes d'hypothalamus par animal choisies selon les mêmes repères anatomiques pour tous les animaux ([Figure 43](#)). Pour chaque groupe expérimental, la valeur finale donnée est la moyenne par coupe  $\pm$  l'erreur standard du nombre de cellules positive par 0.1 mm<sup>2</sup> comptés sur 4-7 animaux.

Pour le phénotypage des cellules BrdU positives différenciées, les co-marquages pour chaque peptide candidat ont été fait dans une étude pilote sur des lames provenant de 8 animaux en PC (2 x SP2J, 2 x SP1S, 2 x SP2S, 2 x SP4S). Toutes les coupes de chaque lame ont été observées au microscope optique (objectif x10) pour observer d'éventuelles colocalisations.

## **7- Analyses statistiques des résultats**

Les graphes et l'analyse des résultats ont été effectués avec le logiciel GraphPad 6.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA).

Après une vérification de l'homogénéité des variances par un test de Levene et de la normalité par un test de Shapiro-Wilk, une ANOVA à 1 facteur a été effectuée pour déterminer la probabilité de résultats différents entre les groupes expérimentaux. Pour évaluer la significativité des variations de la masse des testicules et des vésicules séminales, la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe d'animaux est comparé avec celle du groupe correspondant aux animaux avant la transition de photopériode (12

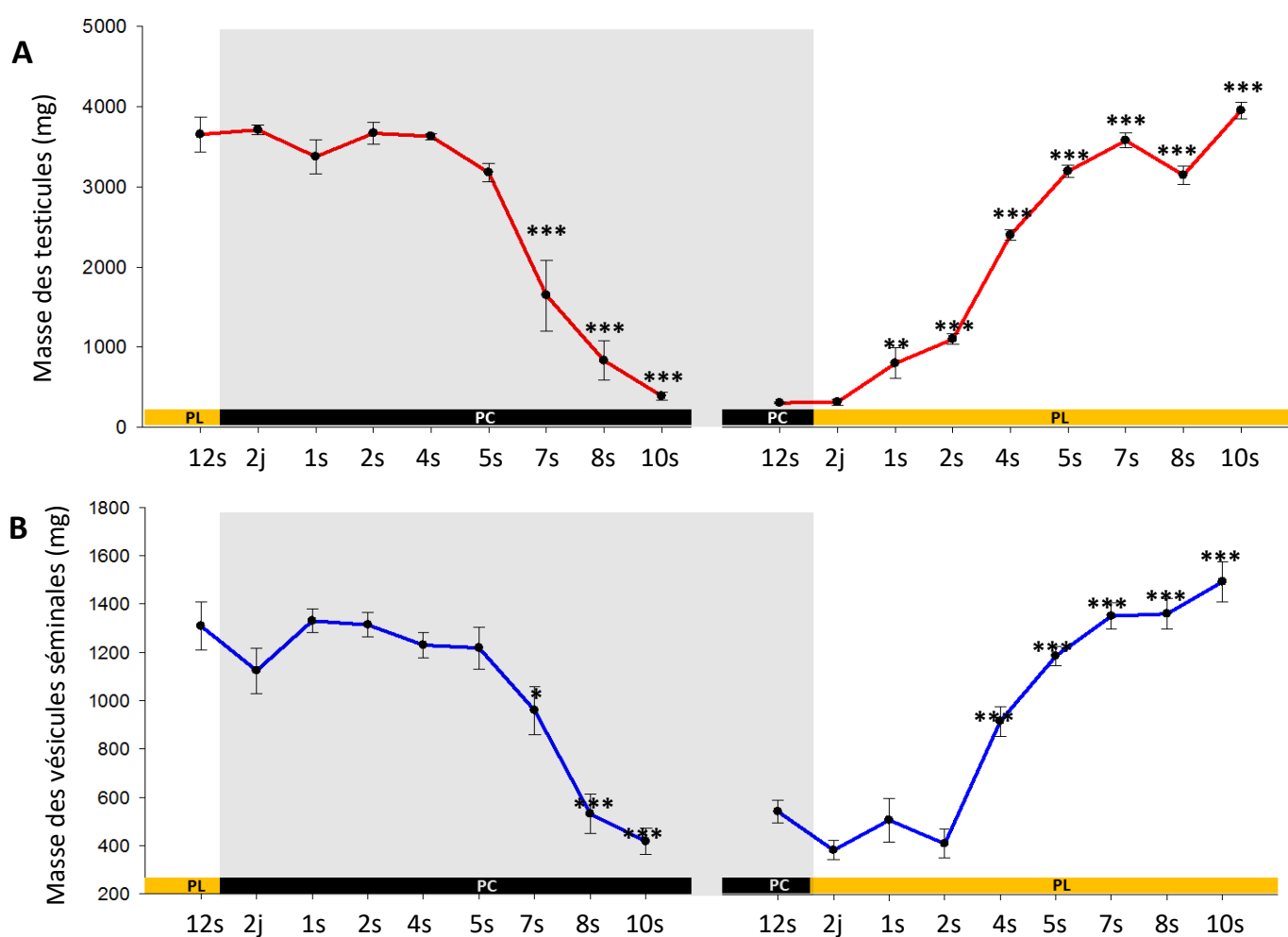
semaines de PC ou PL) et les valeurs de significativité statistique ont été définies selon trois niveaux : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Pour évaluer la significativité des variations du nombre de cellules exprimant la BrdU dans la SVZ, la SGZ et l'hypothalamus, la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe d'animaux est comparée avec l'ensemble des autres groupes et des lettres (a, b, c) ont été données pour chaque valeur significativement différente des autres.

## Résultats

### Evaluation de la réponse physiologique des hamsters syriens au changement de photopériode

La masse des vésicules séminales et des testicules a été mesurée dans les différents groupes lors de la transition entre photopériodes. Elle sert d'indicateur pour évaluer la réponse physiologique de l'animal au changement de photopériode.

Lors du passage d'une PL à une PC, la masse des vésicules séminales et des testicules diminue progressivement jusqu'à la 10<sup>ème</sup> semaine de PC et inversement lors du passage d'une PC à une PL, la masse des vésicules séminales et testicules augmente rapidement à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine de PL (Figure 40). Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Helfer et al., 2019; Milesi et al., 2017) et indiquent que tous les hamsters de cette étude répondent bien au changement de photopériode.



**Figure 40** : Masse des testicules (A) et des vésicules séminales (B) de hamsters syriens à différents temps après la transition d'une photopériode courte (PC) à une photopériode longue (PL) et inversement.

Des hamsters syriens mâles ont été exposés à une PL (14hL/10hD) ou PC (10hL/14hD) pendant 12 semaines (12s) puis transférés dans la photopériode opposée. La masse (en mg) des testicules (A, ligne rouge) et des vésicules séminales (B, ligne bleu) a été mesurée à différents moments de la transition (9 groupes de 4-7 animaux : PC/PL, 2jours (2j), 1 semaine (1s), 2s, 4s, 5s, 7s, 8s, 10s). La moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe d'animaux est comparée avec celle du groupe d'animaux avant le changement de photopériode (PC/PL 12s). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$



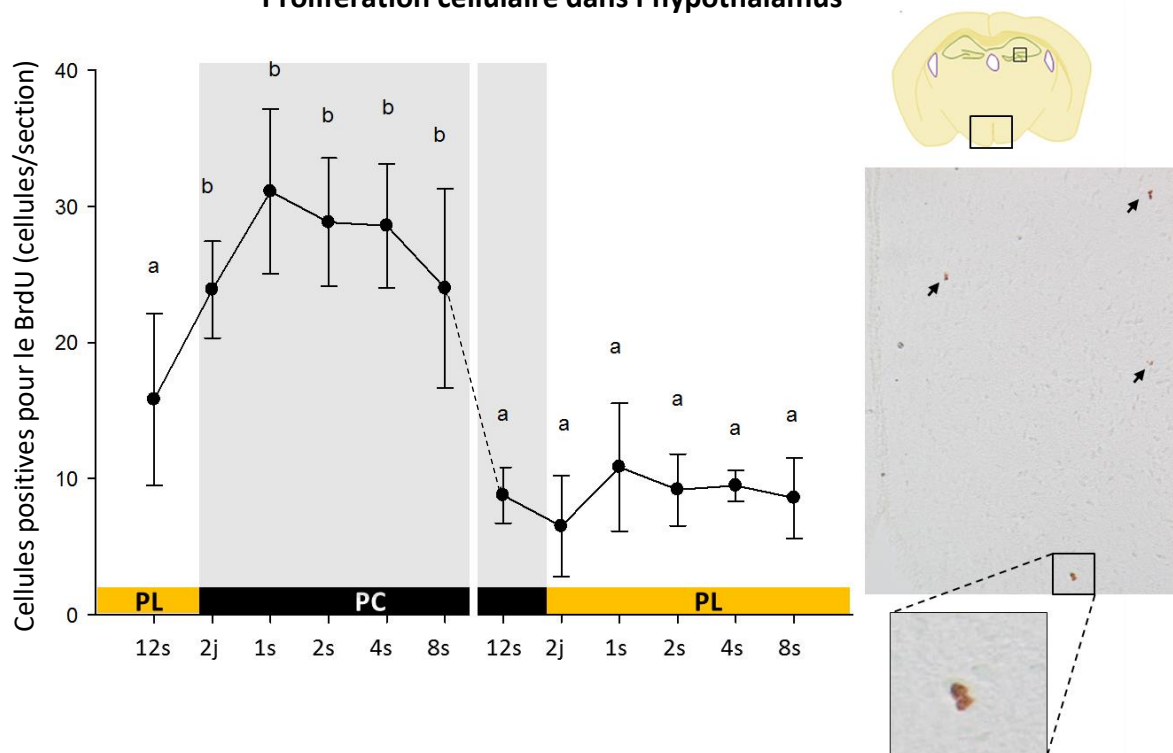
## **Evaluation de la prolifération cellulaire dans la SVZ, la SGZ et l'hypothalamus au cours d'une transition entre deux photopériodes chez le hamster syrien**

L'objectif de cette expérience est d'étudier le profil de prolifération cellulaire dans l'hypothalamus lors de la transition d'une photopériode à une autre, et de le comparer à celui des 2 principales niches neurogéniques, la SVZ et la SGZ du gyrus denté.

Lors de la transition de PL à PC, de façon similaire pour chacune des 3 zones étudiées (hypothalamus (Figure 41), SVZ (Figure 42A), SGZ (Figure 42B)), le nombre de cellules marquées par le BrdU augmente dès le 2<sup>ème</sup> jour après la transition en PC et atteint un maximum 1 semaine après la transition (avec environ 2 fois plus de cellules marquées qu'en PL). Ensuite le taux de prolifération cellulaire reste stable jusqu'à 8 semaines en PC même si une diminution non significative s'observe à 8 semaines. Cette initiation de la diminution est cependant confirmée par le faible taux de prolifération observé chez les animaux adaptés à la PC depuis 12 semaines qui n'est pas différent de celui observé chez les animaux en PL.

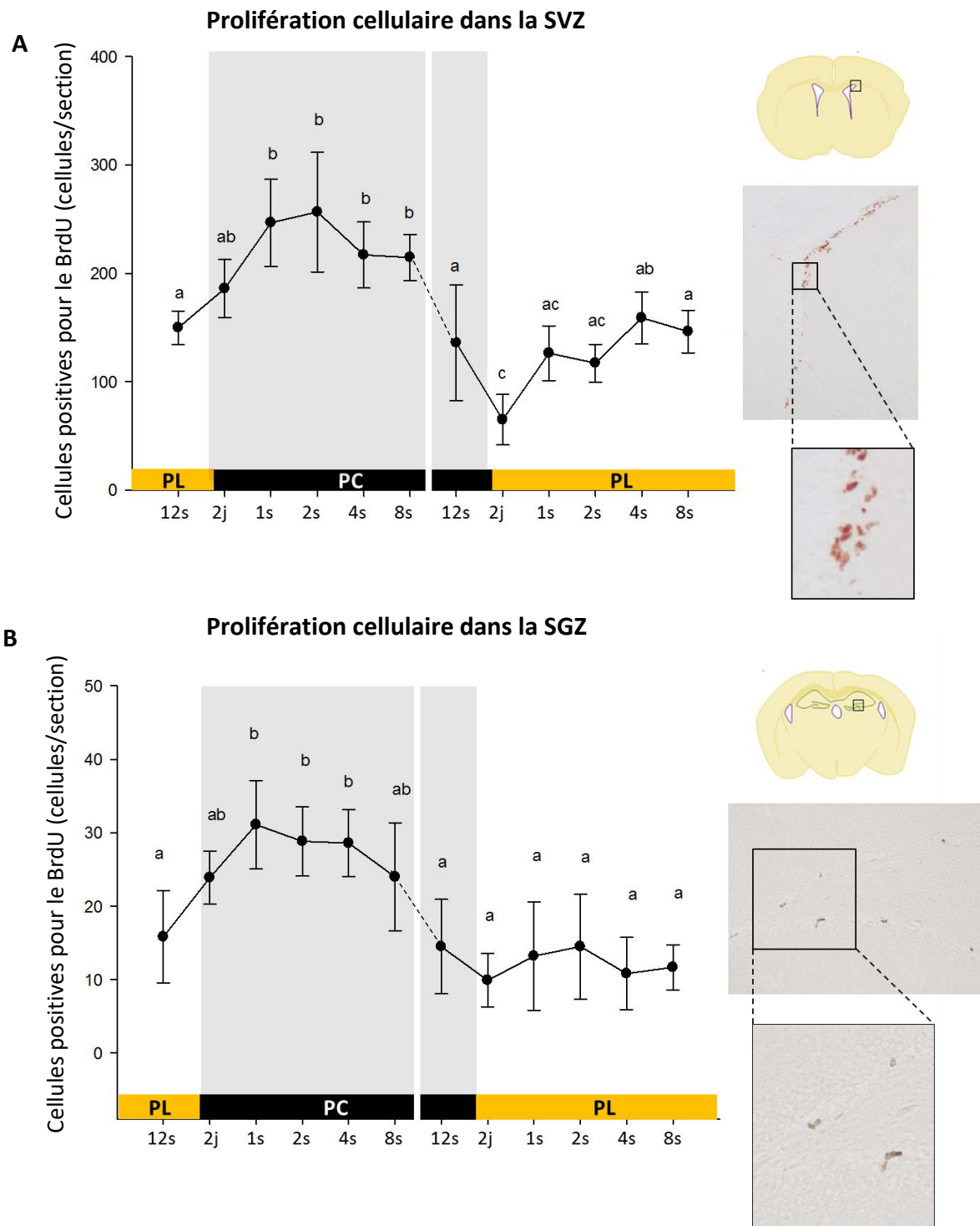
Lors d'une transition de PC à PL, le faible taux de prolifération cellulaire mesurée en PC à 12 semaines reste identique pendant les 8 semaines de transition en PL (Figure 41 pour l'hypothalamus, Figure 42B pour le SGZ), à l'exception de la SVZ où le nombre de cellules BrdU positives diminue légèrement après 2 jours de PL puis remonte après 1 semaine avant de se stabiliser jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine de PL, au niveau observé en PC (Figure 42B).

## Prolifération cellulaire dans l'hypothalamus



**Figure 41** : Prolifération cellulaire dans l'hypothalamus au cours d'une transition photopériodique chez le hamster syrien

Des hamsters syriens mâles ont été exposés à une PL (14hL/10hD) ou PC (10hL/14hD) pour 12 semaines (12s) puis transférés dans la photopériode opposée. Des injections de BrdU ont été réalisées chez 9 groupes de 4-7 animaux : PL/PC, 2 jours (2j), 1 semaine (1s), 2s, 4s, 5s, 7s, 8s, 10s. Panneau de gauche : graphe montrant la quantification du signal immunohistochimique de BrdU dans l'hypothalamus avec les valeurs données en nombre moyen de cellules par coupe  $\pm$  SEM. La valeur de chaque groupe d'animaux est comparée avec celle de l'ensemble des autres groupes et des lettres différentes (a, b, c) indiquent des valeurs significativement différentes des autres. Panneau de droite : photographie montrant des cellules de l'hypothalamus marquées au BrdU et un agrandissement.



**Figure 42** : Prolifération cellulaire dans la zone sub-ventriculaire (SVZ) et sub-granulaire (SGZ) au cours des transitions photopériodiques chez le hamster syrien

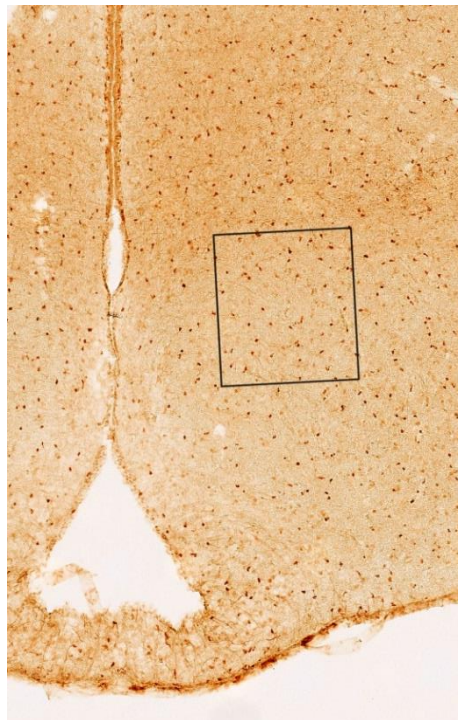
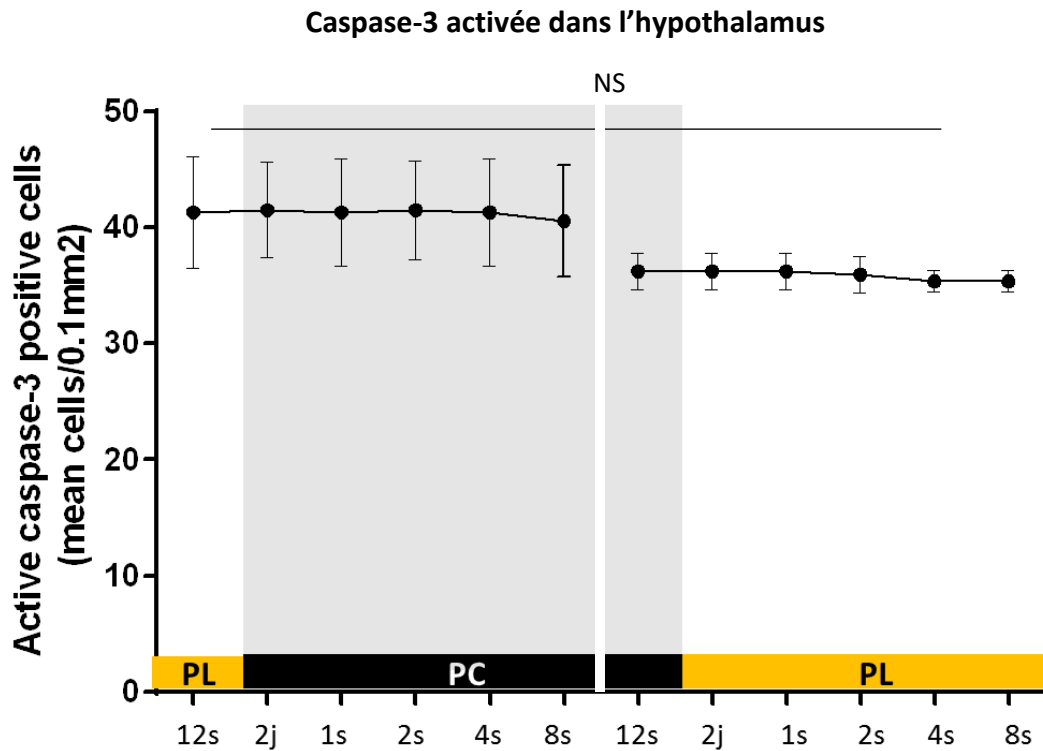
Des hamsters syriens mâles ont été exposés à une PL (14hL/10hD) ou PC (10hL/14hD) pour 12 semaines (12s) puis transférés dans la photopériode opposée. Des injections de BrdU ont été réalisées chez 9 groupes de 4-7 animaux : PL/PC, 2jours (2j), 1 semaine (1s), 2s, 4s, 5s, 7s, 8s, 10s. Panneau de gauche : graphe montrant la quantification du signal immunohistochimique de BrdU dans la SVZ (A) et la SGZ (B) du gyrus denté avec les valeurs données en nombre moyen de cellules marquées par coupe  $\pm$  SEM ; la valeur moyenne de chaque groupe d'animaux est comparée avec celle de l'ensemble des autres groupes et des lettres différentes (a, b, c) indiquent des valeurs significativement différentes des autres. Panneau de droite : photographie montrant la localisation des cellules de la SVZ (A) et la SGZ (B) marquées au BrdU et agrandissement.

## **Evaluation de l'apoptose dans l'hypothalamus au cours d'une transition entre deux photopériodes chez le hamster syrien**

L'objectif de cette expérience est d'étudier le profil de mort cellulaire dans l'hypothalamus afin de savoir s'il existe des variations de l'apoptose entre les saisons et lors de la transition d'une photopériode à l'autre. Les données présentées sont des quantifications préliminaires réalisées sur une petite surface de l'hypothalamus. D'autres analyses seront nécessaires afin de confirmer ces résultats.

L'analyse par comparaison multiple des moyennes du nombre de cellules positives pour la caspase par groupe ne montre aucune différence significative entre les différents groupes d'animaux au cours de la transition de photopériode. L'ANOVA montre néanmoins une valeur statistique F,

( $F = \frac{\text{Variabilité inter-groupes}}{\text{Variabilité à l'intérieur des groupes}}$ ) de 3,591 ( $p < 0.001$ ) suggérant une augmentation de l'apoptose en PC dans l'hypothalamus des hamsters (Figure 43).



**Figure 43** : Expression de la caspase-3 activée dans l'hypothalamus au cours d'une transition photopériodique chez le hamster syrien

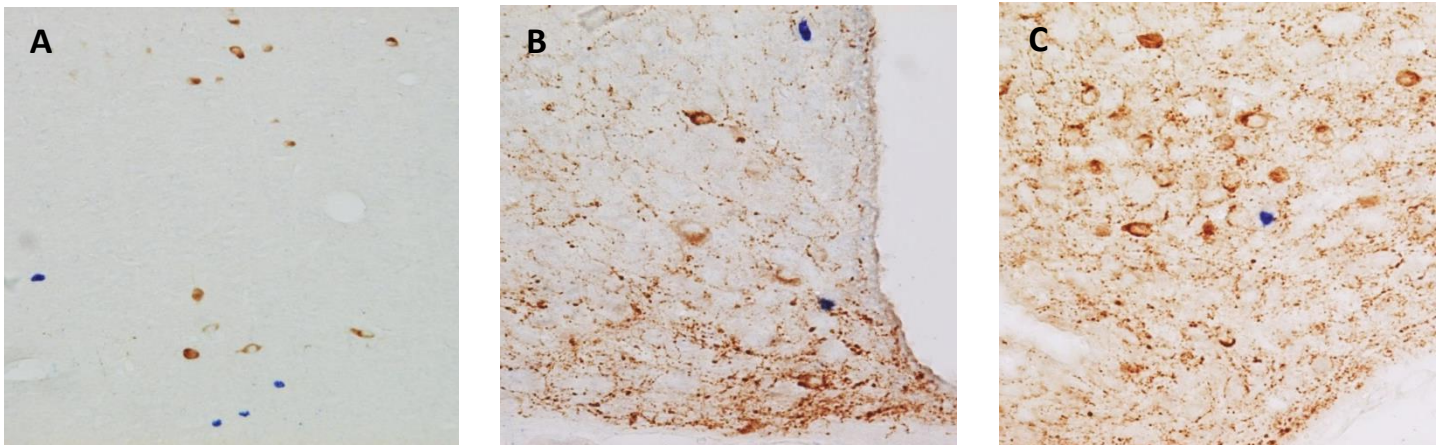
Des hamsters syriens mâles ont été exposés à une PL (14hL/10hD) ou PC (10hL/14hD) pour 12 semaines (12s) puis transférés dans la photopériode opposée. Le signal immunohistochimique de la caspase-3 a été quantifié dans l'hypothalamus. Panneau du haut : graphe indiquant les valeurs données en nombre moyen de cellules dans une surface de 0.1mm<sup>2</sup> par coupe  $\pm$  SEM. La valeur de chaque groupe d'animaux est comparée avec celle de l'ensemble des autres groupes. Panneau du bas : photographie de la région hypothalamique avec le carré indiquant la zone de quantification du signal caspase-3.

## Identification des cellules néoformées intégrées dans les réseaux hypothalamiques

Des co-marquages ont été réalisés par double IHC pour essayer de phénotyper les cellules néoformées (positives au BrdU 5 semaines après l'injection).

Des co-marquages du BrdU avec la Kp, le RFRP-3 et la somatostatine ont été réalisés sur 8 animaux tests à plusieurs moments après le transfert de PL en PC (2 jours, 1 semaine, 2 semaines et 4 semaines après le passage en PC, 2 animaux par groupe) car c'est à cette période qu'il y a une augmentation importante des cellules BrdU positives. Les co-marquages ont été réalisés avec des anticorps Kp, RFRP-3 et somatostatine et l'anticorps BrdU dans l'hypothalamus (Projet 1, [Tableau 5](#)).

Aucune colocalisation n'a été trouvée pour aucune des 3 protéines testées.



**Figure 44** : Doubles marquages immunohistochimiques de la BrdU avec RFRP-3, la Kp et la somatostatine (C)

Photographies de la détection immunohistochimique en bleu de la BrdU et en brun du RFRP-3 (A) dans le VMH, de la Kp (B) et de la somatostatine (C) dans l'ARC.

## Discussion

Depuis l'observation de variations photopériodiques du nombre de neurones exprimant le RFRP-3 par IHC ou en HIS (Bentley et al., 2003; Revel et al., 2008; Ubuka et al., 2005), il a été supposé que la réduction du marquage en PC serait due à la diminution d'expression du peptide dans certains neurones les rendant indétectables. Cependant, quelques études récentes ainsi que les résultats de mon Projet 1, suggèrent que ces variations pourraient également faire intervenir des processus de neurogenèse et/ou d'apoptose dépendants de la photopériode dans l'hypothalamus (Batailler et al., 2018; Helfer et al., 2019; Quignon et al., 2020).

Dans cette étude, nous avons montré que chez des hamsters syriens mâles adaptés à la PL, la transition vers une PC induit une augmentation significative de la prolifération cellulaire dès le deuxième jour avec un maximum atteint en une semaine de façon similaire dans les trois zones analysées, l'hypothalamus, la SVZ et la SGZ. Nos résultats confirment les observations de Huang et collaborateurs (1998) qui montraient une augmentation de l'incorporation de nouveaux neurones dans ces trois zones 7 semaines après le transfert en PC (Huang et al., 1998), mais nous montrons en plus que ce processus de prolifération induit par la PC est très rapide et transitoire.

En effet, la prolifération cellulaire induite par la transition de PL à PC dans les trois niches neurogéniques est transitoire puisqu'après 12 semaines de PC, le niveau de prolifération cellulaire est diminué à des valeurs identiques à celles observées chez animaux en PL. Par conséquent, le passage de la PC à la PL, n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire puisque les animaux maintenus 12 semaines en PC ont déjà un niveau de prolifération diminué, similaires à celui des animaux en PL. Chez le mouton également la prolifération cellulaire augmente en PC et diminue avant la fin de la PC dans l'hypothalamus (Batailler et al., 2018). Ce phénomène d'échappement à la photopériode, ou état photoréfractaire, s'observe également sur la régulation de l'activité de reproduction chez le hamster. En effet, lorsque les hamsters syriens ou sibériens sont maintenus plus de 20 semaines en PC, il y a une recrudescence spontanée de l'activité gonadique malgré la PC inhibitrice. Or, des travaux récents ont montré que le déclenchement de la période photoréfractaire est beaucoup plus précoce puisque qu'il y a par exemple une diminution marquée de l'expression de la *Dio3* tanycytaire dès 14 semaines de PC (Milesi et al., 2017). Cet article montre également que l'expression de la *Dio3* varie très rapidement en réponse à un changement de photopériode et pourrait donc induire l'augmentation de la prolifération cellulaire après 2 jours de PC chez le hamster syrien. Chez le mouton comme chez le hamster, la prolifération cellulaire augmente en PC, suggérant qu'elle serait régulée par la mélatonine chez les reproducteurs de jours courts et de jours longs.



Récemment, Helfer et collaborateurs ont émis l'hypothèse que les variations saisonnières de la prolifération cellulaire dans l'hypothalamus ne seraient pas directement régulées par la photopériode mais par un mécanisme de compensation de l'apoptose (Helfer et al., 2019). Ils suggèrent que la diminution de T3 hypothalamique en PC induirait la mort de certaines populations neuronales dans l'hypothalamus, ce qui stimulerait la prolifération cellulaire en PC pour compenser cette déplétion neuronale. Cependant, nos résultats montrant d'une part une augmentation rapide des cellules progénitrices/souches après la transition en PC, et d'autre part l'absence de variations photopériodiques de marqueur d'apoptose, vont à l'encontre de cette hypothèse.

Chez le mouton l'administration centrale d'un bloqueur de la division cellulaire en PC stimulatrice au moment du pic de prolifération, réduit la neurogenèse hypothalamique et altère le moment de la reproduction, suggérant que la neurogenèse hypothalamique en PC participe à la synchronisation saisonnière de la période de reproduction chez la brebis (Batailler et al., 2018). Il serait intéressant de déterminer si la neurogenèse photopériodique est également impliquée dans la synchronisation de la reproduction du hamster en bloquant la prolifération cellulaire au moment de la transition en PC. Cependant, le profil similaire de variations de la prolifération dans l'hypothalamus associée à une période de reproduction saisonnière opposée entre le hamster syrien et la brebis, suggère que cette neurogenèse a des effets et/ou mécanismes différents entre les deux espèces.

Afin d'établir un lien entre la neurogenèse hypothalamique et la reproduction saisonnière du hamster syrien, nous avons tenté de colocaliser la BrdU avec des peptides reproducteurs RFRP-3 et à Kp, mais aucun double marquage de la BrdU avec ces neuropeptides n'a été observé. Si le rôle de la neurogenèse hypothalamique dans la reproduction a été très peu étudié, plusieurs études ont montré son implication dans la régulation de la prise alimentaire et des fonctions métaboliques. En effet, des neurones à agouti-related peptide et neuropeptide Y, impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, peuvent être intégrés *de novo* dans les réseaux hypothalamiques, et le blocage de la prolifération cellulaire entraîne des modifications de la prise alimentaire et du poids corporel chez des souris (Kokoeva et al., 2005a; Lee et al., 2012; Pierce and Xu, 2010). Ainsi, il a été proposé que la neurogenèse hypothalamique pourrait être impliquée dans la régulation saisonnière du poids corporel de certains rongeurs (Bolborea and Dale, 2013; Helfer et al., 2019). Parmi les protéines impliquées dans la régulation du poids corporel chez le hamster, l'expression de la somatostatine augmente en PC (Klosen et al., 2013; Mercer et al., 2000; Petri et al., 2016). Cependant, aucune colocalisation entre la BrdU et la somatostatine n'a été trouvée en IHC. Les co-marquages du BrdU avec le RFRP-3, la Kp et la somatostatine n'ont été réalisés que sur un nombre réduit d'animaux uniquement en PC, aussi des études sur un plus grand nombre d'animaux en PC et en PL sont nécessaires afin de confirmer l'absence de colocalisation de la BrdU avec ces trois neuropeptides. De plus, il faudrait tester d'autres candidats impliqués dans les fonctions métaboliques ou reproductives afin d'identifier le profil des cellules



nouvellement formées dans l'hypothalamus et leur implication possible dans des mécanismes de régulation saisonnière.

La majorité des cellules progénitrices/souches de la SVZ migrent vers les bulbes olfactifs où elles s'insèrent sous forme d'interneurones (Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Chez le rongeur, cette plasticité dans le bulbe olfactif pourrait participer à un ajustement des circuits olfactifs en réponse aux changements saisonniers des odeurs et des phéromones dans l'environnement comme suggéré par Walton et collaborateurs qui montrent que l'augmentation en PC de la neurogenèse dans la région olfactive chez des souris à pattes blanches est associé à une adaptation rapide à l'urine de congénères mâles (Walton et al., 2012). L'augmentation en PC de la prolifération dans la SVZ chez le hamster pourrait donc être impliquée dans une plasticité du système olfactif liée à des changements saisonniers de la reconnaissance des congénères ou des prédateurs. Par ailleurs, une ablation des bulbes olfactifs bloque la régression des gonades en PC chez le hamster syrien (Pieper and Loboeki, 1993) alors qu'elle n'a pas d'effet sur la réponse photopériodique des gonades chez le mouton (Jansen and Jackson, 1993) dont la prolifération cellulaire dans la SVZ ne varie pas ainsi que chez le hamster sibérien (Prendergast et al., 2009). Il serait intéressant de comparer les variations de la prolifération cellulaire chez le hamster sibérien afin d'étudier un lien potentiel entre la plasticité neuronale dans les bulbes olfactifs liée à la neurogenèse dans la SVZ et l'intégration photopériodique du système reproducteur.

Finalement, dans la SGZ, la neurogenèse est souvent associée à des adaptations comportementales, liées à l'apprentissage et à la mémoire (Gonçalves et al., 2016). Il n'est donc pas surprenant que les changements saisonniers dans l'environnement induisent des variations de la prolifération cellulaire dans la SVZ afin d'adapter la réponse comportementale des espèces aux contraintes exercées par les changements de saisons.

En conclusion, nos travaux confirment l'occurrence d'une néogenèse saisonnière dans l'hypothalamus, mais aussi les autres niches neurogéniques (la SVZ et la SGZ) chez le hamster syrien. L'augmentation rapide et transitoire de la prolifération cellulaire lors du transfert en PC suggère que ce processus pourrait être impliqué dans des mécanismes précoces voir d'anticipation pour initier la réponse adaptative aux changements saisonniers de l'environnement. Cependant, l'augmentation de la prolifération cellulaire en PC lorsque le nombre de neurones exprimant le RFRP-3 dans l'hypothalamus est diminué ainsi que l'absence de colocalisation entre la BrdU et le RFRP-3, suggèrent que les variations saisonnières des neurones à RFRP-3 ne seraient pas dépendantes de processus de neurogenèse hypothalamique. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer les mécanismes responsables des variations photopériodiques de la prolifération cellulaire, d'identifier le devenir des cellules néoformées, notamment dans l'hypothalamus, et d'établir le rôle de la neurogenèse dans les mécanismes de régulation saisonnière des fonctions métaboliques et/ou reproductives.

## **PROJET 3**

---

Développement de modèles génétiquement  
modifiés pour l'étude des rythmes saisonniers

Les études sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la rythmicité saisonnière sont limitées par le manque de modèles animaux génétiquement modifiés. En effet les modifications génétiques sont généralement réalisées sur des modèles conventionnels de laboratoire (la souris C57BL/6J, et plus récemment le rat) dont les fonctions biologiques ne présentent pas de rythmes saisonniers. C'est pourquoi, en parallèle des deux projets décrits précédemment, j'ai travaillé sur un projet visant à développer et tester des modèles non-conventionnels génétiquement modifiés dans l'objectif de proposer de nouveaux outils d'investigation des rythmes saisonniers.

En collaboration avec l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL, Lyon, France), nous avons généré un modèle de souris hybrides MSMxC57BL/6J afin d'avoir des souris produisant de la mélatonine endogène capables de porter une mutation génétique. J'ai étudié la capacité de ces souris à intégrer l'information photopériodique afin d'évaluer leur potentiel pour l'étude des mécanismes moléculaires induits pas les variations saisonnières de la mélatonine.

J'ai également été activement impliquée dans le nouveau projet d'équipe visant à générer un modèle de hamster syrien génétiquement modifié à l'aide du système CRISPR/Cas9. L'édition de génome de hamster syrien par la méthode CRISPR/Cas9 n'a été utilisée que par deux équipes au monde (Dong et al., 2018; Fan et al., 2014). J'ai participé à la mise au point des premières étapes techniques qui nécessitent d'adapter le protocole utilisé couramment chez la souris et le rat au hamster syrien, notamment pour les étapes de manipulations embryonnaires, qui s'avèrent limitantes chez cette espèce.

## ***Matériel et méthodes***

### **1- Animaux**

Toutes les expériences ont été validées par le Chronobiotron et le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, et ont été réalisées en accord avec la directive 2010/63/UE du Parlement européen du 22 septembre 2010.

Des souris hybrides ont été générées à l'IGFL de Lyon en croisant des souris **MSM** qui produisent de la mélatonine endogène et des souris **C57BL/6J (MSMxC57BL/6J)**. Les mâles adultes (âgés de 6 à 12 semaines) issus de la génération F1 ont été placés par groupes de 1 à 5 dans des cages adaptées (type II), avec de la nourriture (Safe) et de l'eau *ad libitum*. La température dans la pièce était de 20°C±1°C, la lumière était allumée pendant la période diurne (L) et de la lumière rouge tamisée non active sur l'horloge circadienne était allumée pendant la période nocturne (D). La moitié des souris MSMxC57 (n=6) a été placée en PL (16hL/8hD) et l'autre moitié (n=6) en PC (8hL/16hD) pour une durée de 6 semaines.

### **2- Prélèvement des tissus, préparation des coupes de cerveau**

Les procédures d'euthanasie, de prélèvement du sang et des tissus, de fixation des tissus, de traitement des cerveaux pour un enrobage en PEG et la préparation des coupes de cerveaux et montage sur lames pour des marquages HIS ont été strictement identiques à celles utilisées et décrites pour le projet 1 (voir Projet 1, section 2 et 3).

### **3- HIS et IHC, analyse du signal**

L'analyse de l'intégration neuroendocrine du signal photopériodique a été faite en regardant l'expression de la TSH $\beta$  par IHC et des gènes *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* par HIS selon les mêmes protocoles que ceux utilisés pour le projet 1 (Projet 1, sections 4 et 5).

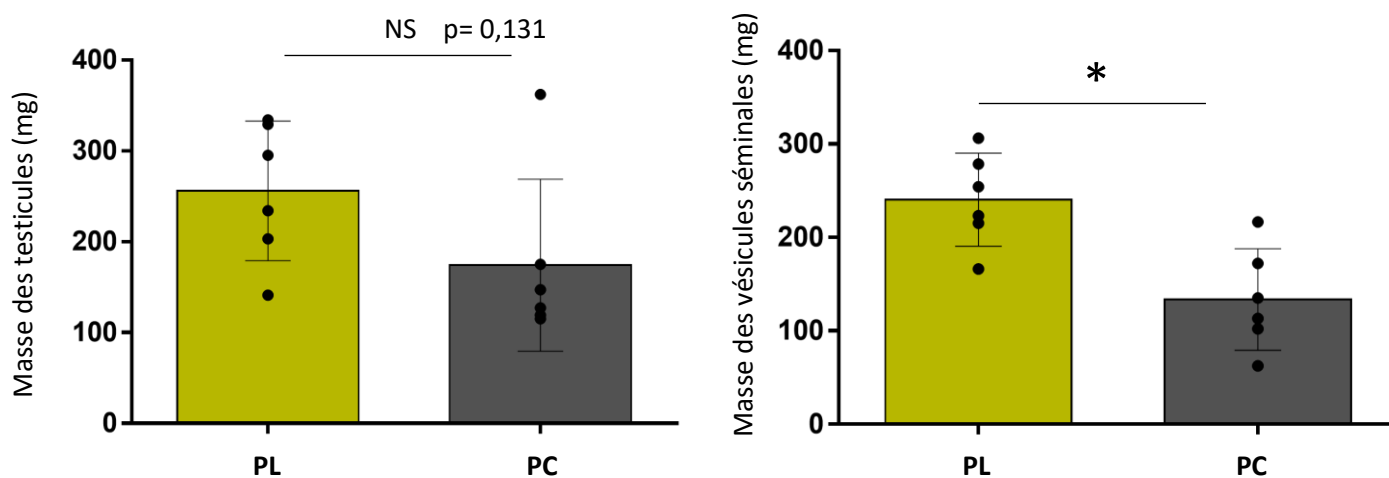
L'observation et l'analyse du signal ainsi que l'analyse statistique des résultats ont également été faites de la même manière que celle décrite dans le projet 1 (Projet 1, sections 7 et 8).

## Résultats

### Intégration photopériodique physiologique et neuroendocrine chez les souris MSMxC57

L'objectif de cette expérience était d'analyser l'intégration photopériodique centrale (hypothalamus) et périphérique (gonades) du système reproducteur chez les souris hybrides MSMxC57 placées 6 semaines en PL ou PC.

La masse corporelle et la masse des testicules et des vésicules séminales ont été mesurées à la fin des 6 semaines d'exposition. La masse corporelle des animaux ne varie pas entre la PL ( $34,7 \pm 5,6$  g) et la PC ( $31,6 \pm 5,6$  g,  $p=0,394$ ). La masse des vésicules séminales est significativement réduite chez les souris en PC par rapport aux souris en PL ( $p=0,015$ ) mais la masse des testicules n'est pas significativement différente entre les deux groupes malgré une tendance à la baisse en PC ( $p=0,132$ ) (Figure 44).

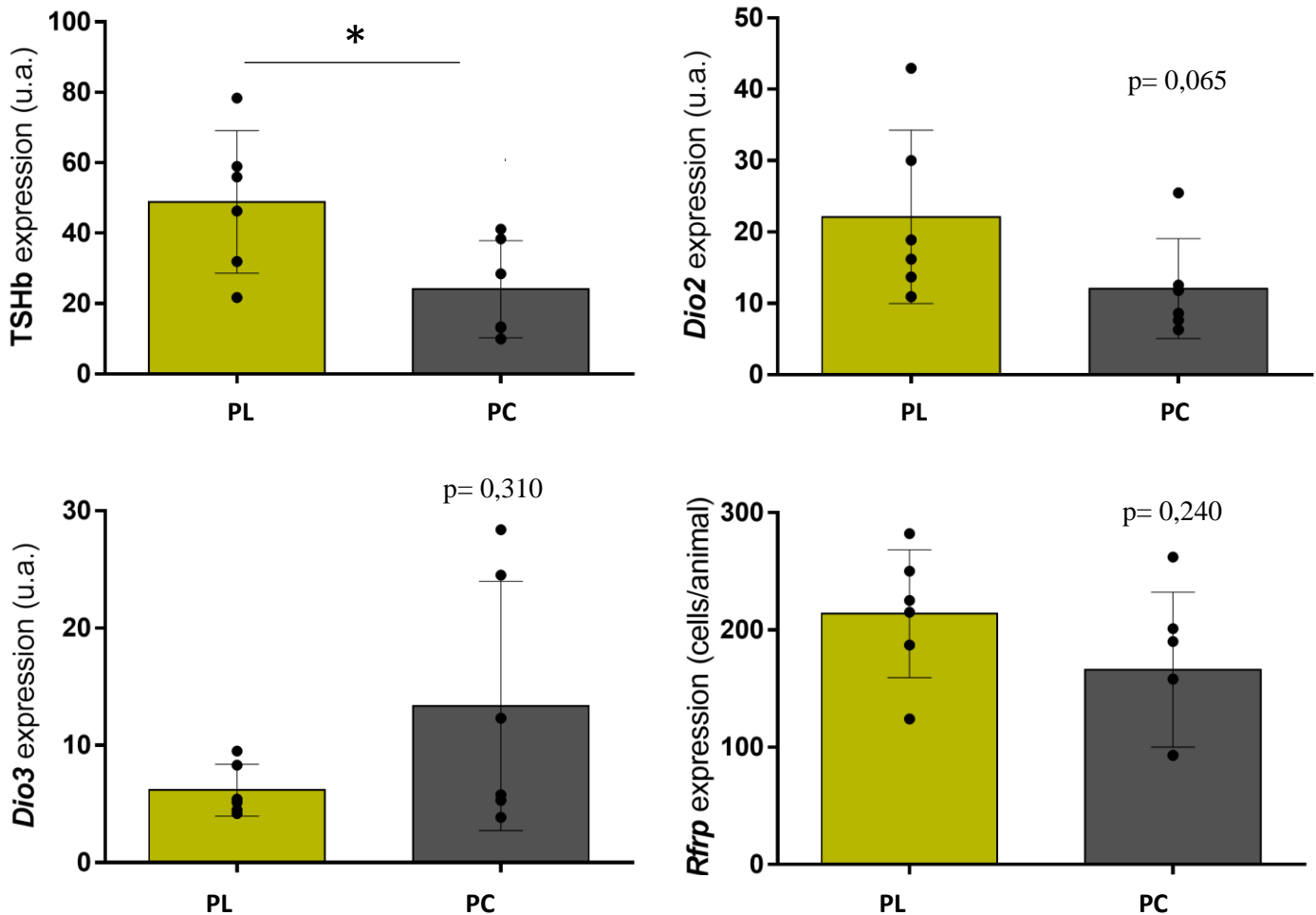


**Figure 45** : Effet de la photopériode sur la masse des testicules et des vésicules séminales chez des souris MSMxC57

La masse (en mg) des testicules (à gauche) et des vésicules séminales (à droite) de souris MSMxC57 a été mesurée après une exposition de 6 semaines à une photopériode longue (PL:14hL/10hD) ou courte (PC : 10hL/14hD). Les données individuelles sont données ainsi que la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe ( $n=6$ ). \* $P < 0,05$  indique une différence significative entre les valeurs PL et PC.

L'expression de TSH $\beta$  est plus faible chez les souris adaptées à la PC que chez les souris adaptées à la PL ( $p=0,041$ ). Il y a une tendance à une diminution de l'expression de *Dio2* ( $p= 0,065$ ), une augmentation de l'expression de *Dio3* ( $p=0,310$ ) dans les tanocytes et une réduction du nombre de neurones exprimant le *Rfrp* dans l'hypothalamus ( $p= 0,240$ ) en PC par rapport à la PL, mais les

moyennes ne sont pas significativement différentes, notamment à cause d'une grande dispersion des valeurs individuelles (Figure 45).



**Figure 46** : Effet de la photopériode sur l'expression de TSH $\beta$ , *Dio2*, *Dio3* et *Rfrp* chez des souris MSMxC57BL/6J

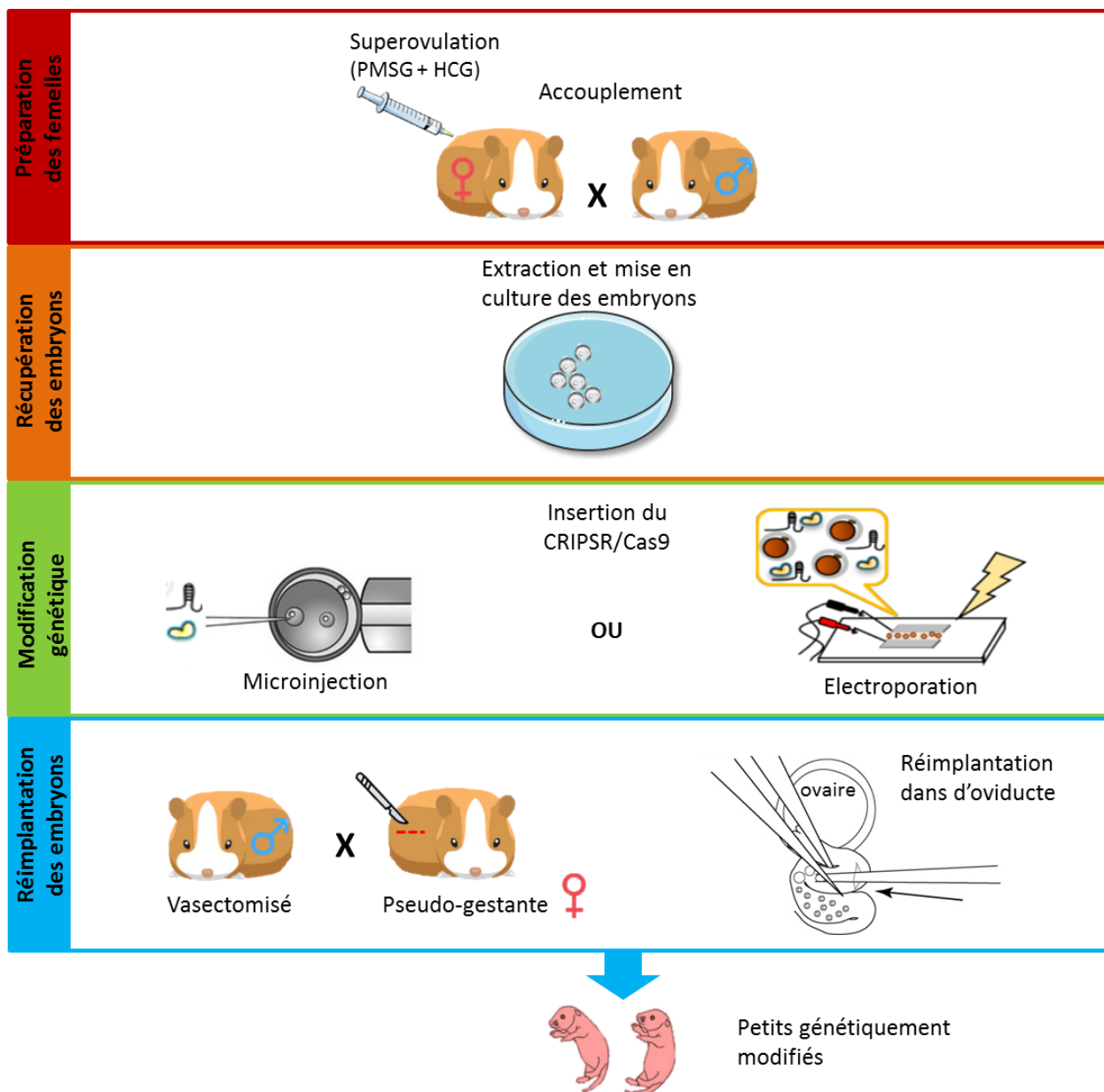
Des souris MSMxC57 ont été exposées 6 semaines à une photopériode longue (PL : 14hL/10hD) ou courte (PC : 10hL/14hD). Les valeurs d'expression de TSH $\beta$ , *Dio2* et *Dio3* sont données en moyenne du niveau de gris en unité arbitraire (a.u.) et la valeur de *Rfrp* est donnée en nombre de cellules marquées par animal. Les données individuelles sont données ainsi que la moyenne  $\pm$  SEM de chaque groupe (n=6). \* $P < 0,05$  indique une différence significative entre les valeurs PL et PC.

## **PROJET 3B : Premières étapes de développement d'un modèle de hamster syrien génétiquement modifié**

### ***Matériel et méthodes***

#### **1- Théorie de la technique d'édition de génome par CRISPR/Cas9**

Pour générer un animal portant la mutation dans toutes les cellules (sans mosaïcisme), il est nécessaire d'insérer le système CRISPR/Cas9 lorsque les embryons sont au stade une cellule, avant la première division. Le protocole de base de cette technique comprend quatre étapes principales à adapter selon l'espèce et le besoin (Figure 46) : 1) Afin de collecter un maximum d'embryons fertilisés, les femelles doivent être traitées pour produire une super-ovulation avant d'être accouplées avec des mâles; 2) les embryons récupérés quelques heures après l'accouplement doivent être placés dans un milieu de culture adapté à 37°C afin de préserver leur viabilité ; 3) le système CRISPR/Cas9 doit être inséré dans les embryons par micro-injection dans le pronucléus ou par électroporation ; 4) les embryons génétiquement modifiés doivent être réimplantés chirurgicalement dans l'oviducte de femelles pseudo-gestantes (préparées à la gestation grâce à un accouplement avec des mâles vasectomisés).



**Figure 47** : Protocole de la technique d'édition de génome par CRISPR/Cas9 chez le hamster syrien

La génération d'animaux génétiquement modifiés par CRISPR/Cas9 nécessite 4 étapes principales : la préparation des femelles, la récupération des embryons fécondés, la modification génétique des embryons par insertion du système CRISPR/Cas9 et la réimplantation des embryons modifiés chez des femelles pseudo-gestantes.

En collaboration avec Philippe André, de l'Institut Clinique de la Souris (ICS) de Strasbourg, nous avons adapté chaque étape du protocole au modèle du hamster syrien en nous basant sur le protocole décrit par la première équipe ayant réussi à générer des modèles de hamsters syriens KO (Fan et al., 2014; Li et al., 2018). Dans ce projet j'ai participé à la mise au point des étapes de préparation des femelles, de récupération et de réimplantation des embryons. En effet, préalablement à la modification génétique des embryons, la première étape a été de vérifier que des femelles pseudo-gestantes, réimplantées avec des embryons collectés chez une autre femelle et placés en culture quelques heures, soient capables de porter des petits jusqu'à leur naissance.



## 2- Animaux

Les expériences de ce projet ont fait l'objet d'une saisine (#13920-2018030114383381) validée par le Chronobiotron et le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, et ont été réalisées en accord avec la directive 2010/63/UE du Parlement européen du 22 septembre 2010.

Des **hamsters syriens** ont été placés dans des cages adaptées (type II) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. La température dans la pièce était de  $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , et la photopériode était de 14hL/10hD, avec de la lumière blanche pendant la période diurne (L) et de la lumière rouge tamisée non active sur l'horloge circadienne pendant la période nocturne (D).

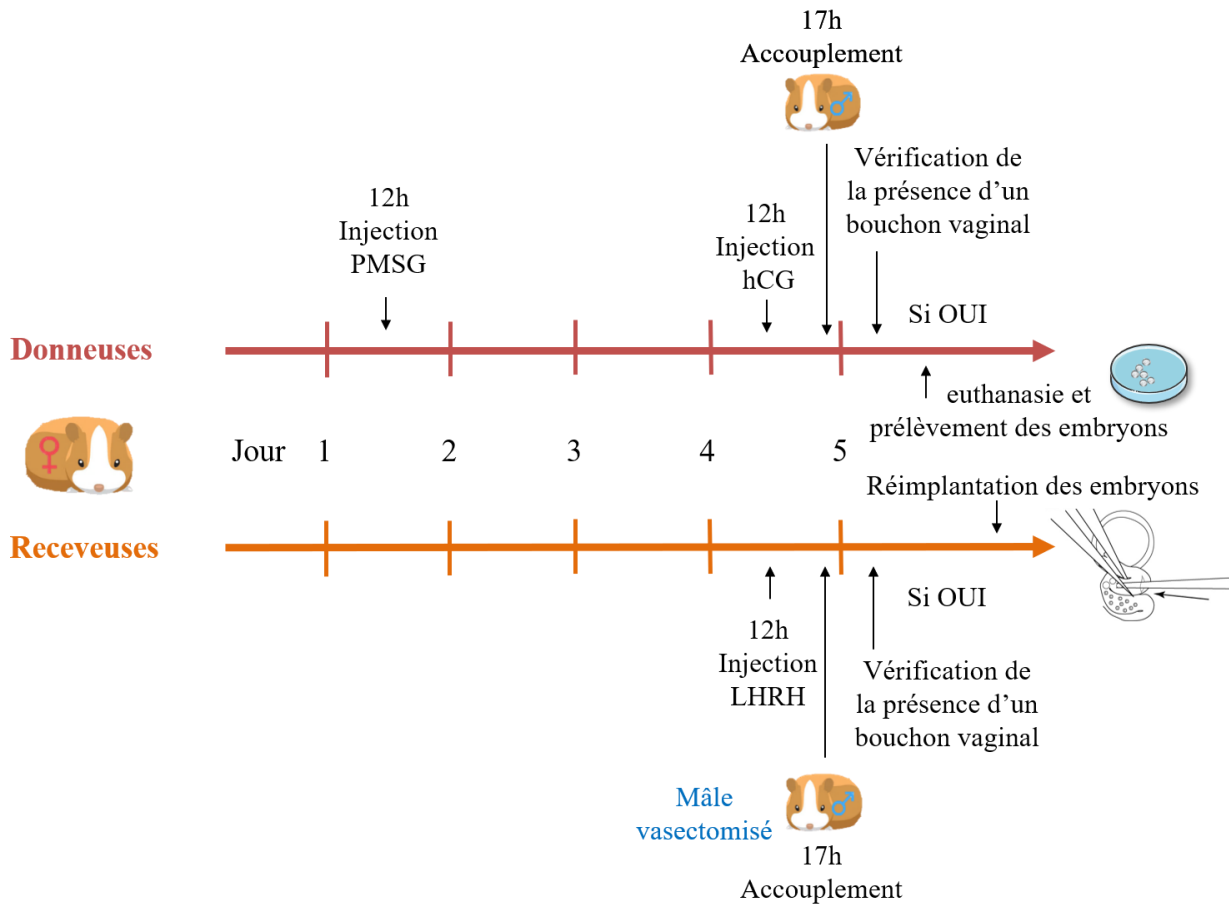
Pour ce développement technique, des femelles nullipares de 6 semaines ont été utilisées pour la récupération des embryons fécondés (femelles donneuses) et des femelles de 12 semaines ayant déjà eu au moins une gestation ont été utilisées pour la réimplantation des embryons (femelles receveuses). Des mâles intacts ou vasectomisés (âgés de moins de 12 mois) ont été utilisés pour l'accouplement avec les femelles donneuses ou receveuses respectivement.

## 3- Préparation des femelles

Pour stimuler la production d'ovocytes et obtenir de nombreux embryons, les femelles donneuses ont été soumises à un protocole de super-ovulation par injection de deux hormones : la pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Centravet, Dinan, France), une gonadotropine sérique qui mime l'effet de la FSH en stimulant le développement folliculaire, et la human chorionic gonadotropin (hCG, Centravet) qui mime l'effet de la LH en stimulant la maturation des follicules et en favorisant l'ovulation. Plusieurs doses et moments d'injection ont été testés afin d'optimiser le protocole de super-ovulation et de récupérer le plus grand nombre d'embryons (jusqu'à 25 par oviducte). Le meilleur protocole a consisté à faire une injection IP de PMSG (10 unités internationales (UI)/200 $\mu$ L) le jour 1 à 12h puis une injection IP d'hCG (5 UI/200 $\mu$ L) le jour 4 à 12h, puis de mettre la femelle en présence d'un mâle fertile au jour 4 à 17h pour accouplement. Les comportements d'accouplement ont été observés visuellement et vérifiés en constatant la présence d'un bouchon vaginal le matin du jour 5. Les femelles ayant un bouchon vaginal le matin du jour 5 sont considérées gestantes et utilisées comme femelles donneuses d'embryons (Figure 47).

En parallèle, des femelles receveuses de 12 semaines ont été préparées à la gestation par injection de LH releasing hormone (LH-RH, Sigma) et placées dans des cages avec des mâles vasectomisés (préparés en avance par l'ingénieur de notre équipe) le jour 4 à 17h. Les femelles ayant un

bouchon vaginal le matin du jour 5 sont considérées pseudo-gestantes et sont utilisées comme mère-porteuses pour le transfert des embryons (Figure 47).



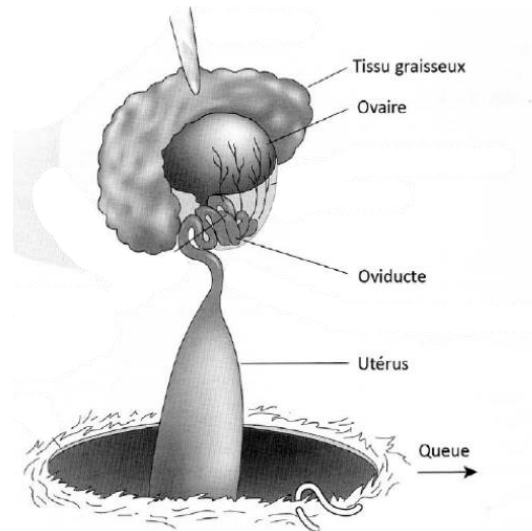
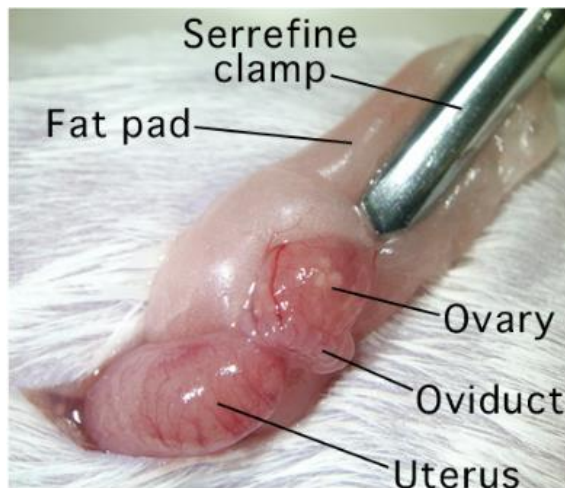
**Figure 48** : Protocole de préparation des femelles donneuses et receveuses d'embryons chez le hamster syrien

Les femelles donneuses d'embryons (ligne rouge) reçoivent une injection de PMSG à 12h le jour 1 puis de hCG à 12h le jour 4 avant d'être accouplées avec un mâle intact à 17h le jour 4. Le matin du jour 5, les femelles ayant un bouchon vaginal sont considérées gestantes et sont euthanasiées pour récupérer les embryons dans leurs oviductes. Les femelles receveuses (ligne orange) reçoivent une injection de LHRH à 12h le jour 4 et sont accouplées à 17h avec des mâles vasectomisés. Le matin du jour 5, les femelles ayant un bouchon vaginal sont considérées pseudo-gestantes et servent de mère-porteuses pour la réimplantation des embryons.

#### 4- Prélèvement des embryons

Les embryons de hamsters sont extrêmement sensibles à la lumière blanche et aux variations de température. L'ensemble des procédures de manipulation embryonnaire a donc été réalisé en lumière rouge ou blanche tamisée et les milieux de culture ont été conservés à 37,5°C dans un incubateur avec 5% d'O<sub>2</sub> et 10% de CO<sub>2</sub>.

Les femelles donneuses présentant un bouchon vaginal, ont été mises à mort entre 9 et 11h le jour 5, par inhalation de concentrations croissantes de CO<sub>2</sub> jusqu'à l'arrêt cardio-respiratoire de l'animal. L'abdomen a été ouvert et les ovaires, l'oviducte et une partie de l'utérus ont été prélevés (Figure 48), puis immédiatement placés dans du milieu de culture.



**Figure 49** : Photographie et représentation schématique de la région péri-ovarienne du rongeur

Chez le rongeur, l'ovaire, entouré de tissu graisseux, débouche sur l'oviducte qui connecte l'ovaire à la corne utérine et où sont localisés les embryons pendant les premières heures de gestation avant de migrer pour la nidation dans l'utérus.

Le milieu utilisé pour la culture des embryons de hamster est le HECM-9 (Hamster Embryo culture Medium -9) dont les composants, décrits dans l'article (Li et al., 2018), sont donnés dans le **Tableau 6**. Ce milieu a été préparé quelques heures avant l'utilisation et équilibré une nuit au préalable dans l'incubateur à 37,5°C avec 5% d'O<sub>2</sub> et 10% de CO<sub>2</sub>.

Composants	mMol/L
Human Serum Albumin (HAS)	0.5mg/ml
NaCl	113.6
KCl	3.0
CaCl <sub>2</sub>	1.9
MgCl <sub>2</sub>	0.5
NaHCO <sub>3</sub>	25.0
DL-Na-lactate	4.5
HCL 1mol/L	1.4 µl/ml
Taurine	0.50
Asparagine	0.01
Cysteine	0.01
Histidine	0.01
Lysine	0.01
Proline	0.01
Serine	0.01
Aspartic acid	0.01
Glycine	0.01
Glutamic acid	0.01
Glutamine	0.20
Pantothenate	0.003

**Tableau 6** : Composition du milieu de culture des embryons de hamsters HECM-9 (d'après Li et al., 2018)

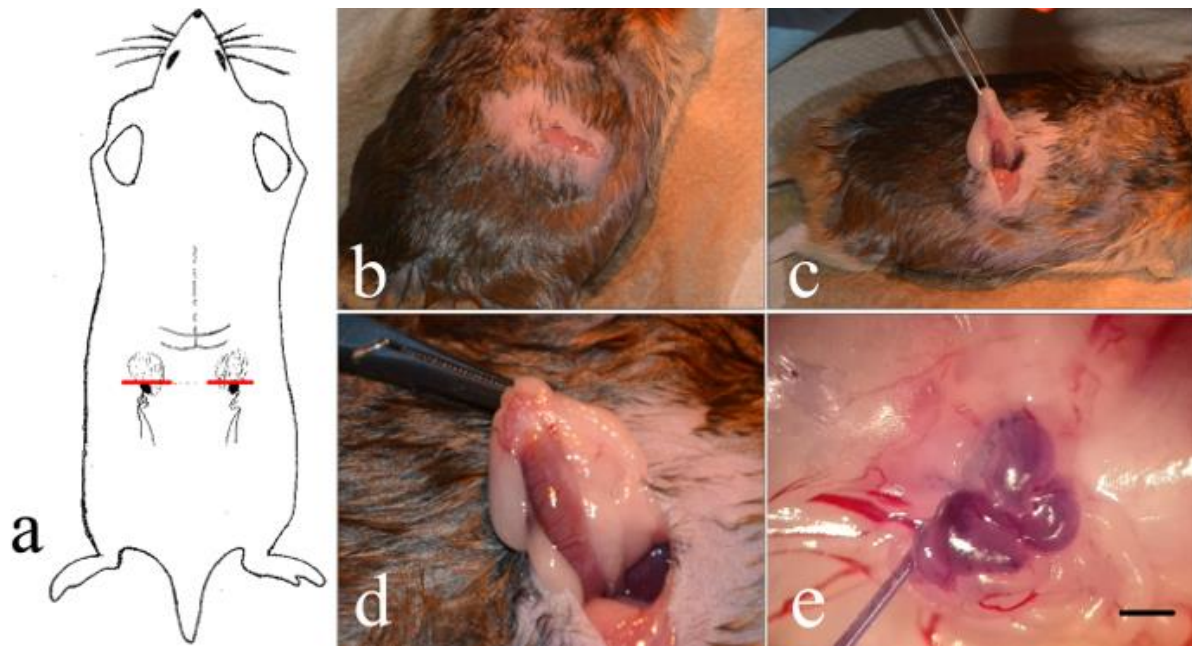
Les embryons sont localisés dans l'ampoule, qui est la partie enflée de l'oviducte. Elle a été dilacérée et les embryons ont été séparés du cumulus de cellules folliculaires grâce à une incubation avec la hyaluronidase (de 10 à 30µl de hyaluronidase (Sigma) pour 1 à 5min selon la densité du cumulus). Les embryons isolés ont ensuite été collectés avec une pipette hématocrite étirée à la flamme montée sur un porte-pipette souple à embout buccal équipé d'un filtre. L'aspiration de quelques bulles d'air séparées par du milieu permet d'éviter la montée du liquide trop rapide par capillarité dans le capillaire de la pipette et de contrôler le flux d'aspiration des embryons afin de récupérer un maximum de 10µL de solution avec les embryons (Figure 50).

Les embryons ont été lavés plusieurs fois dans des gouttes de milieu HECM-9 sous binoculaire équipée d'une plaque chauffante à 37,5°C et triés afin de ne garder que les embryons présentant deux pronucléus puis conservés dans un incubateur à 37,5°C avec 5% d'O<sub>2</sub> et 10% de CO<sub>2</sub> jusqu'à la réimplantation. Ce protocole permet de récupérer une moyenne de 30 embryons par femelle. Une vingtaine d'embryons a été réimplantée chez une femelle et le reste des embryons a été conservé dans l'incubateur 24-48h afin d'évaluer la viabilité des embryons en observant d'éventuelles divisions cellulaires.

## **5- Réimplantation des embryons**

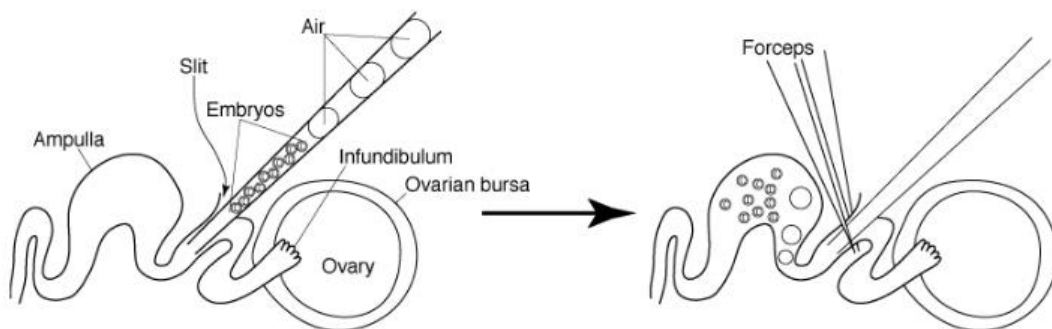
Afin de réimplanter les embryons chez une mère porteuse, une femelle pseudo-gestante a été anesthésiée à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) et injectée avec un mélange de lurocaïne et bupivacaïne (2mg/kg) au niveau du site d'incision pour produire une anesthésie locale. Une petite incision sur un des flancs de l'animal a été réalisée, le volet musculaire a été ouvert et l'extraction de l'ovaire et l'oviducte a été faite en tirant sur le tissu graisseux péri-ovarien (Figure 49). Les tissus exposés à l'air libre ont été régulièrement hydratés au NaCl 0,9% et la réimplantation est faite sous loupe binoculaire avec une lumière tamisée.

A l'aide d'une pince fine, un trou a été percé juste en amont de l'ampoule avec le bout d'une pointe d'aiguille. Une vingtaine d'embryons stockés dans l'incubateur a été chargée dans le capillaire de la pipette juste avant l'insertion dans le trou fait par l'aiguille et maintenu avec une pince fine. Les embryons ont ensuite été expulsés doucement du capillaire dans l'oviducte en soufflant dans le dispositif jusqu'à la sortie des bulles qui empêchent le reflux du liquide (Figure 49).



**Figure 50** : Incision et extraction de l’oviducte chez des hamsters femelles pseudo-gestantes anesthésiées pour une réimplantation embryonnaire

Une incision des volets cutané et musculaire est réalisée au niveau du flanc d’une femelle pseudo-gestante (a et b) ; l’ovaire, l’oviducte et une partie de l’utérus est sortie en tirant sur le tissu graisseux péri-ovarien (c et d) afin de réimplanter les embryons dans l’ampoule (colorée en bleu sur l’image e). Images issues de Li et al., 2018 ; barre d’échelle = 1 mm.



**Figure 51** : Implantation des embryons dans l’ampoule des femelles pseudo-gestantes à l’aide d’un capillaire

Un capillaire de pipette hématocrite étiré à la flamme est chargé avec un chapelet d’embryons précédé de quelques bulles d’air servant à contrôler le flux d’aspiration des embryons. Le capillaire est inséré en direction de l’ovaire dans un trou réalisé en amont de l’ampoule de la femelle receveuse grâce à une aiguille de seringue 1ml. Le système est maintenu avec des pinces fines et les embryons sont expulsés délicatement dans l’ampoule. Les bulles d’air dans le capillaire sont expulsées à la fin afin d’éviter un reflux du liquide.

Pour finir, l’oviducte a été replacé dans l’abdomen de la femelle, le volet musculaire a été suturé et une goutte de buprénorphine (50µg/kg) a été déposée sur l’incision avant de refermer le volet cutané avec des agrafes.

La femelle a ensuite été placée dans une cage propre et surveillée jusqu’à son réveil complet. Les animaux sortant de chirurgie ont reçu une injection sous-cutanée de buprénorphine les 3 premiers jours post-opératoires et sont suivis quotidiennement pour déceler des signes d’infection ou de gestation.

## Résultats

Les protocoles de super-ovulation, d'accouplement et de collecte des embryons ont été optimisés chez les femelles donneuses ainsi que celui de pseudo-gestation des femelles receveuses. Nous avons réduit considérablement le temps d'exposition des embryons à la lumière et les variations de température en nous équipant de matériel adapté et en améliorant notre capacité technique de manipulation des embryons. Environ 50% des embryons conservés dans du milieu de culture HECM-9 dans l'incubateur se sont divisés après quelques heures et ont atteint le stade deux cellules mais aucun n'a atteint le stade quatre cellules. A ce jour, aucune gestation n'a été décelée chez les femelles réimplantées mais le développement d'un modèle de hamster syrien génétiquement modifié par la technique de CRISPR/Cas9 est un projet technique à long terme qui est en cours de développement dans l'équipe en collaboration avec les équipes des Dr Dardente et Pailloux (INRAE, Nouzilly, France) dans le cadre du projet GMO Phen financé par l'ANR.

## Discussion des résultats des projets 3A et 3B

L'étude des mécanismes moléculaires d'adaptation saisonnière est depuis longtemps limitée par le manque de modèles génétiquement modifiés disponibles chez les espèces saisonnières comme le hamster ou le mouton. Une alternative, pour pallier à ce déficit est d'utiliser des souris qui produisent de la mélatonine endogène avec un phénotype saisonnier modéré, comme les souris MSM ou C3H (Kasahara et al., 2010; Ono et al., 2008a; Sáenz de Miera et al., 2020), et de les croiser avec des souches de souris conventionnelles de laboratoire, comme la C57BL/6J, qui sont déficientes en mélatonine (à cause de mutations sur les gènes codant pour deux enzymes de synthèse de mélatonine, la AANAT et l'HIOMT) mais chez lesquelles de nombreux modèles génétiquement modifiés sont disponibles.

Certains articles suggèrent que la pénétrance des allèles codant pour l'HIOMT et la AANAT des souris qui produisent de la mélatonine pourrait suffire à générer des souris F1 capables de produire de la mélatonine (Kasahara et al., 2010; Klosen et al., 2019). C'est pourquoi, nous avons croisé des souris MSM avec des souris C57BL/6J afin d'évaluer la réponse gonadique et neuroendocrine aux variations de la photopériode de ces souris hybrides. Les mâles issus de la génération F1 présentent une forte variabilité de leur réponse photopériodique avec des valeurs individuelles très dispersées, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. En effet, les souris placées en PC présentent une diminution significative de l'expression de la TSH $\beta$  dans la PT, et de la masse des vésicules séminales mais pas de différence significative de l'expression de *Dio2/Dio3* et *Rfrp* et de la masse des testicules. Il est attendu que les souris MSMxC57BL/6J de la génération F1 soient hétérozygotes pour les gènes codant l'HIOMT



et la AANAT avec un allèle « sauvage » provenant des MSM et l'allèle muté des C57BL/6J. La variabilité des réponses individuelles à la photopériode suggère qu'il existerait une hétérogénéité dans la production de la mélatonine causée par une dominance incomplète de l'allèle des MSM comme démontré auparavant par Ebihara et collaborateurs chez une autre souche de souris produisant de la mélatonine (Ebihara 1986). Dans notre étude, il aurait été utile d'avoir un nombre plus important d'individus afin d'analyser la production de mélatonine nocturne chez les hybrides MSMxC57BL/6J de la génération F1, et d'évaluer la corrélation entre la production de mélatonine et l'intégration photopériodiques centrale et gonadique. Générer des souris produisant de la mélatonine et portant une mutation nécessite donc de récroiser, génotyper et sélectionner les souris sur plusieurs générations afin d'obtenir des homozygotes pour l'allèle codant l'HIOMT et la AANAT ainsi que le gène d'intérêt muté. C'est un protocole long et fastidieux mais qui peut néanmoins produire des modèles très intéressants comme la souris CBAxC57BL/6J produisant de la mélatonine générée récemment par l'équipe de Ribelayga (Zhang et al., 2018).

L'utilisation d'outils modernes d'édition du génome comme le CRISPR/Cas 9 chez des souris comme les MSM, CBA ou C3H, permettrait de réduire le temps nécessaire à l'obtention de modèles en insérant une mutation dirigée directement dans le génome de ces souris produisant de la mélatonine. En effet, la technique du CRISPR/Cas9 découverte par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, qui ont reçu le prix Nobel de chimie 2020 pour cette invention, est actuellement largement utilisée chez la souris et le rat en laboratoire (Doudna and Charpentier, 2014). Si cette technique est pour l'instant majoritairement appliquée chez des espèces conventionnelles de laboratoire, elle ouvre des perspectives pour son application chez des espèces non-conventionnelles comme le hamster ou le mouton afin de générer des modèles saisonniers génétiquement modifiés.

Ainsi, en 2014, Fan et collaborateurs ont été pionniers dans l'adaptation de cette technique chez le hamster syrien (Fan et al., 2014). Dans notre équipe, nous souhaitons également développer des modèles de hamsters syriens génétiquement modifiés afin d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes d'intégration du message saisonnier par les organismes, et plus précisément sur le rôle du RFRP-3 dans ce phénomène. A ce jour, nous avons optimisé les premières étapes du protocole et amélioré nos techniques de prélèvement et de réimplantation des embryons (réduction du temps de prélèvement et d'exposition des embryons à la lumière blanche, diminution des variations de températures). Le fait que 50% des embryons se divisent jusqu'au stade deux cellules dans l'incubateur indique qu'au moins une partie des embryons réimplantés sont toujours viables. Cependant, lorsque les embryons sont incubés plusieurs jours dans du milieu de culture dans l'incubateur, les embryons ne poursuivent pas leur division au-delà du stade deux cellules, alors qu'ils devraient être capables de se diviser jusqu'au stade blastula (Bavister and Poole, 2005; Gao et al., 2014; McKiernan and Bavister, 2000). Aussi, à ce jour, aucune gestation à terme n'a encore été obtenue chez les mère-porteuses. Ces observations suggèrent que les conditions de prélèvement et de manipulation des embryons de hamster

syrien (milieu HECM-9, température, lumière, gaz, etc...) ne sont pas encore optimales et que nous devons sans doute encore améliorer ces paramètres qui sont très limitants pour la survie des embryons d'après Fan et collaborateurs (Fan et al., 2014).

Ainsi, la chirurgie de réimplantation est une des étapes qui peut encore être améliorée dans notre protocole. Nous pourrions envisager de réaliser la chirurgie de réimplantation entièrement sous lumière rouge. La rapidité d'exécution pourrait être améliorée car il est essentiel de réduire le temps d'exposition des oviductes à l'air libre et à la lumière. Des chirurgies contrôles « sham », avec des femelles gestantes seront nécessaires afin de vérifier que l'acte chirurgical n'empêche pas la gestation. De plus, l'endroit de la réimplantation dans l'oviducte doit être très précis, le volume injecté avec les embryons doit être faible afin de ne pas pousser les embryons hors de l'oviducte et il faut s'assurer que des bulles empêchent bien le reflux du liquide. Par conséquent, pour une réimplantation d'embryons réussie, il est nécessaire d'être rapide, précis et rigoureux, des qualités techniques qui ne peuvent être acquises que par de l'entraînement.

A ces étapes déjà compliquées à maîtriser, il faut également ajouter l'étape de modification du génome des embryons que nous n'avons pas encore testée. Le système CRISPR/Cas9 peut être inséré dans les embryons par injection pronucléaire ou par électroporation (Alghadban et al., 2020). Ces techniques sont invasives pour les embryons et nous ne connaissons pas encore le taux de survie à la suite de l'injection du système par l'une ou l'autre de ces méthodes.

Finalement, la technique d'édition de génome par CRISPR/Cas9 est déjà complexe à maîtriser chez les espèces conventionnelles, mais elle semble l'être encore plus chez le hamster syrien dont les embryons sont particulièrement sensibles. Une alternative qui permettrait de supprimer les étapes de manipulation des embryons en dehors de l'oviducte, est l'utilisation de la technique GONAD. Cette variante de la technique classique d'édition de génome par CRISPR/Cas9 consiste à insérer le système CRISPR/Cas9 dans les embryons *in vivo* en l'injectant dans l'oviducte de femelles gestantes et de réaliser une électroporation directement sur l'oviducte (Kiyohara et al., 2017; Kobayashi et al., 2018). Le GONAD permet donc d'éviter les étapes de prélèvement et de réimplantation des embryons qui sont limitantes chez le hamster syrien et pourrait donc être une solution particulièrement intéressante pour l'édition de génome chez cette espèce.

Si le développement de modèles de hamsters génétiquement modifiés pour l'étude des mécanismes saisonniers n'est pas encore au point, d'autres modèles saisonniers génétiquement modifiés pourraient rapidement voir le jour, chez le mouton (Kalds et al., 2019) ou chez des souches de souris produisant de la mélatonine, chez lesquelles il serait plus facile d'adapter l'utilisation des nouvelles techniques d'édition de génome. Ces modèles permettraient une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des grandes fonctions saisonnières comme la reproduction.





## *Discussion générale, perspectives et conclusion*



**Parc des Laurentides, Québec**

-

**Automne**

## *Discussion générale et perspectives*

Depuis les études pionnières de RJ Reiter dans les années 1960, montrant, par des pinéalectomies, le lien entre la mélatonine et les rythmes saisonniers chez les rongeurs (Hoffman and Reiter, 1965; Reiter, 1968), de nombreuses études ont entrepris de décrypter les mécanismes sous-tendant la régulation saisonnière des grandes fonctions biologiques telles que la reproduction. D'immenses avancées ont été réalisées depuis. Il est aujourd'hui établi 1) que la régulation par la photopériode de la production de mélatonine forme un calendrier neuroendocrine permettant au système nerveux central d'intégrer les variations saisonnières des conditions environnementales (années 80'), 2) que la *pars tuberalis* est le principal site d'action de la mélatonine pour le contrôle de l'activité de l'axe reproducteur (années 90'-2000), 3) que la régulation de la balance des hormones thyroïdiennes par les déiodinases tancytaires permet une intégration hypothalamique du message saisonnier véhiculé par la mélatonine (2000-2010), 4) que les effecteurs hypothalamiques en amont de la GnRH, tels que le RFRP-3 et la Kp permettent une régulation fine de l'axe reproducteur en intégrant ces informations photopériodiques (2000-2020). Cependant, le manque de modèles génétiquement modifiés, en particulier chez les espèces saisonnières, limite nos moyens d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires et d'élucider le rôle précis de certains neuropeptides comme le RFRP-3 ou la Kp dans la régulation de l'axe reproducteur par la mélatonine. Mon travail de thèse s'est donc articulé autour de deux axes principaux : poursuivre l'investigation des mécanismes d'action de la mélatonine et des hormones thyroïdiennes dans la régulation des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la modulation de l'axe reproducteur, et tester et développer des nouveaux modèles adaptés à l'étude de l'intégration du message photopériodique dans le système nerveux central.

### *I- L'étude des cibles hypothalamiques des hormones thyroïdiennes*

Chez les mammifères, il est maintenant admis que les variations annuelles de la sécrétion nocturne de mélatonine par la glande pinéale forment un calendrier neuroendocrine des saisons. La mélatonine agit sur ses récepteurs MT1 localisés sur des cellules thyrotropes de la *pars tuberalis* pour réguler la production de TSH $\beta$  qui, en agissant sur ses récepteurs tancytaires, régule la balance des Dio2/Dio3 et par conséquent les concentrations intra-hypothalamiques d'hormones thyroïdiennes. Ainsi en PC, le pic long de mélatonine inhibe la sécrétion de TSH $\beta$ , ce qui induit une diminution de la Dio2 et une augmentation de la Dio3 résultant en une réduction des niveaux de T3 bioactive dans l'hypothalamus (Dardente et al., 2014; Hazlerigg and Simonneaux, 2014 pour revues).

Chez les reproducteurs de jours longs comme le hamster syrien, la faible concentration de T3 hypothalamique en PC est associée à une inhibition de l'axe reproducteur et un comportement sexuel inactif. Chez les reproducteurs de jours courts comme le mouton, elle est associée à une stimulation de l'axe reproducteur et un comportement sexuel actif (Hazlerigg and Simonneaux, 2014).

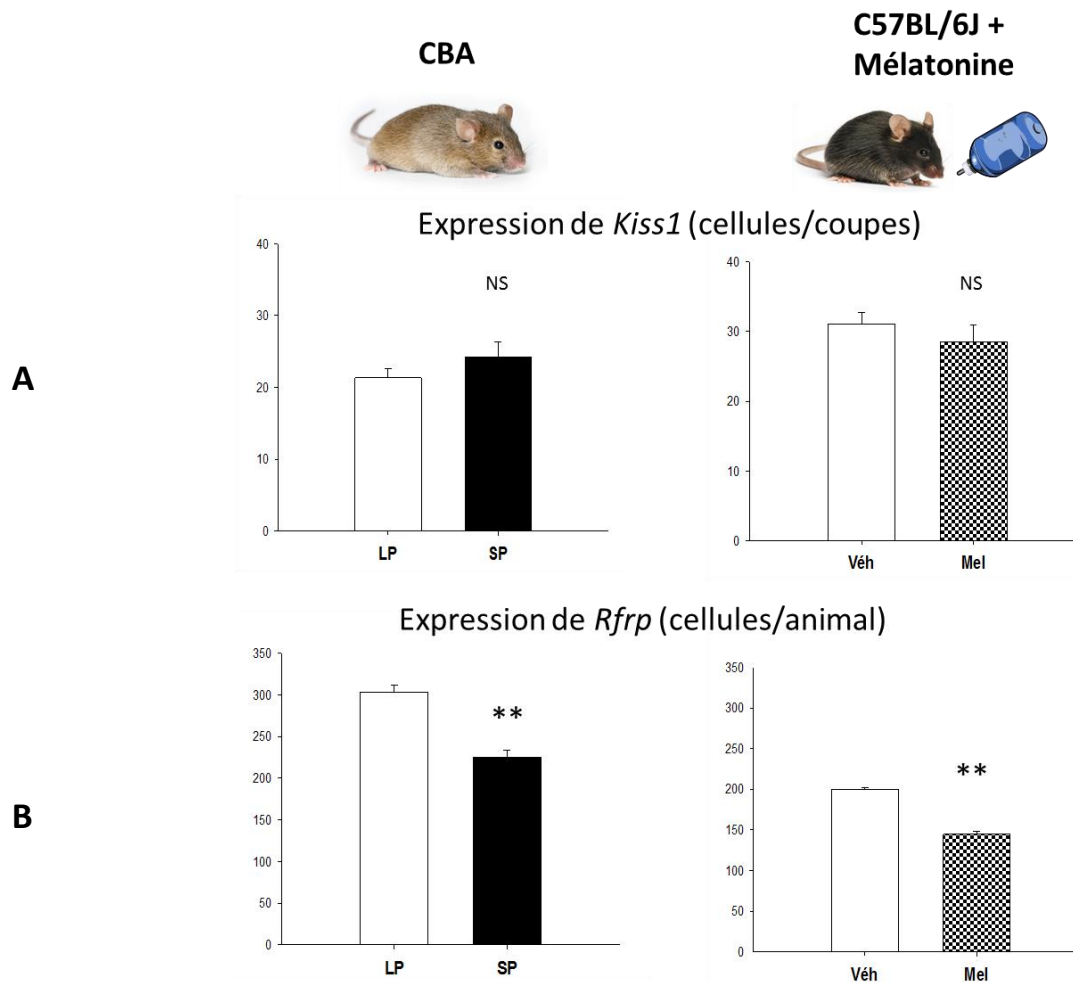
Il a été proposé que la T3 puisse agir *via* les neurones à Kp et/ou à RFRP-3 pour réguler l'activité de reproduction en fonction de la saison. En effet, ces deux neuropeptides hypothalamiques capables de moduler l'activité des neurones à GnRH ont une expression qui varie avec la photopériode et il a été montré que des infusions chroniques centrales de Kp (Revel et al., 2006) et de RFRP-3 (Ancel et al., 2012; Henningsen et al., 2017) peuvent réactiver l'activité gonadique de hamsters gardés en PC inhibitrice. Par ailleurs il a été montré qu'une administration centrale de TSH augmente l'expression de Kp et RFRP-3 et l'activité testiculaire de hamsters gardés en PC (Klosen et al., 2013). A partir de ces observations, nous avons fait l'hypothèse que les variations photopériodiques de la T3 intra-hypothalamique pourraient agir directement sur les neurones à Kp et à RFRP-3 pour réguler la reproduction saisonnière. Afin d'étudier cette hypothèse j'ai travaillé avec un modèle de souris C57BL/6J supplémentées en mélatonine qui nous a permis d'étudier l'effet d'une mutation du récepteur TR $\alpha$  sur l'intégration hypothalamique du signal mélatoninergique.

#### 1- L'expression de *Rfrp* mais pas celle de *Kiss1* est régulée par la mélatonine chez la souris

Dans une première partie de ma thèse j'ai montré qu'une administration exogène de mélatonine chez des souris C57BL/6J restaure des variations de l'expression de *Rfrp* similaires à celle observées chez des souris CBA produisant de la mélatonine endogène, faisant de ce modèle un outil approprié pour étudier l'action de la mélatonine pour réguler les circuits hypothalamiques de la reproduction.

De façon intéressante, chez les souris C57BL/6J supplémentées en mélatonine comme chez les CBA l'expression de *Kiss1* n'est pas régulée par la mélatonine (Figure 51) et la taille des gonades ne varie pas avec la photopériode (Quignon et al., 2020) tandis que chez les espèces ayant des variations saisonnières marquées du phénotype reproducteur (hamster, mouton), l'expression de *Kiss1* varie avec la photopériode (Revel et al., 2006; Smith et al., 2008). De plus, chez la souris MSM qui a un phénotype saisonnier modéré, une tendance non-significative à la variation de *Kiss1* a été observée (Sáenz de Miera et al., 2020). Ensemble, ces observations suggèrent l'existence d'un couplage entre les variations photopériodiques de *Kiss1* régulées par la mélatonine et le phénotype reproducteur saisonnier. Chez les espèces non-saisonnières, la mélatonine ne régule plus l'expression de la Kp, il n'y a donc plus d'inhibition de l'axe reproducteur en PC et ces espèces peuvent alors se reproduire indépendamment des conditions de photopériode.

Chez la souris, les variations de *Rfrp* dépendantes de la mélatonine (Figure 51) indiquent que ce neuropeptide n'est pas directement corrélé au phénotype reproducteur mais que les neurones à RFRP-3 intègrent l'information photopériodique et pourraient donc jouer un rôle d'indicateur temporel pour synchroniser des fonctions biologiques avec la saison.



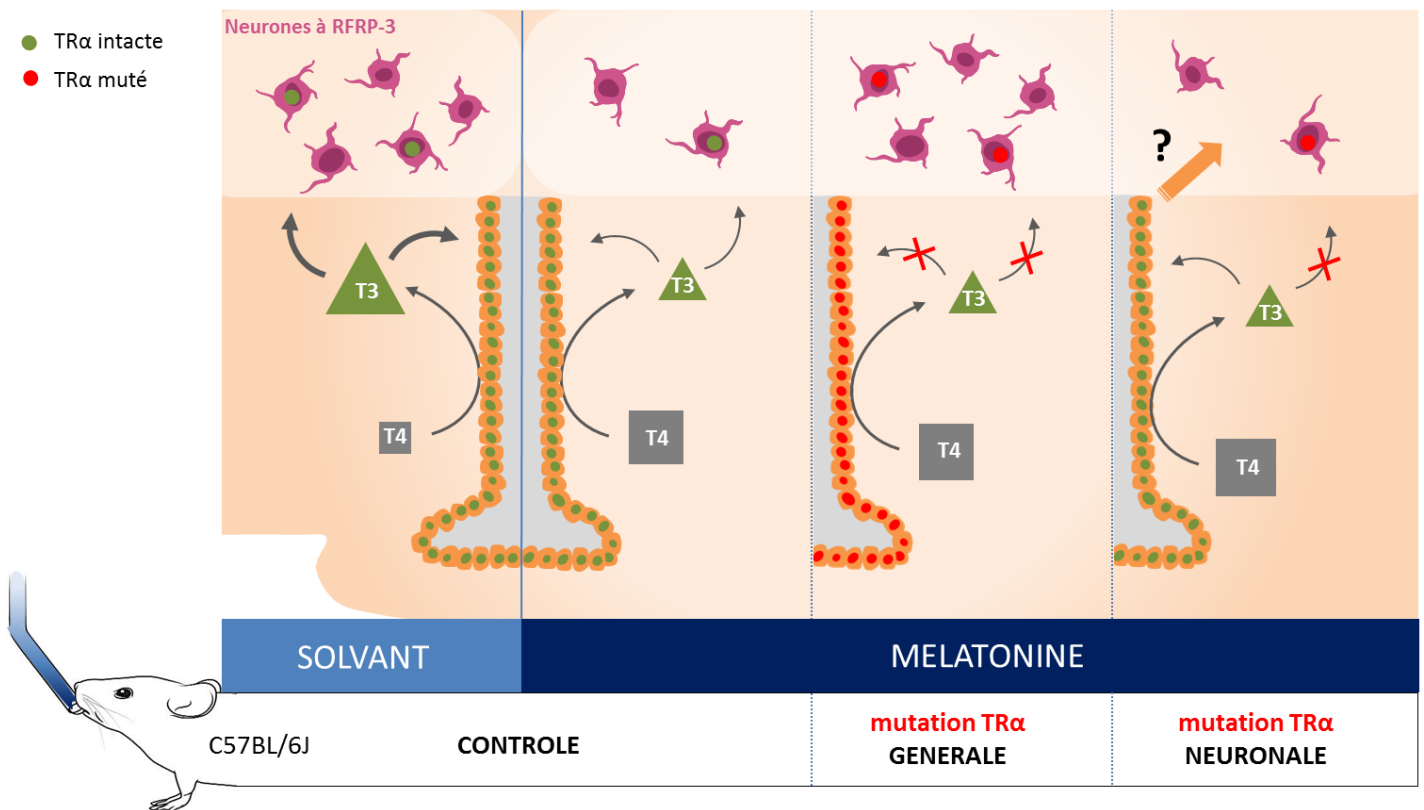
L'expression de *Kiss1* (A) dans le noyau arqué ne varie pas entre la photopériode longue (LP) et courte (SP) chez la CBA et n'est pas inhibée par la mélatonine chez la souris C57BL/6J supplémentée en mélatonine (Mel) dans l'eau de boisson pendant 6 semaines. A l'inverse, l'expression de *Rfrp* (B) dans l'hypothalamus dorso- et ventro-médian est inhibée en SP chez la CBA et par la mélatonine chez la C57BL/6J.

## 2- L'expression de *Rfrp* est régulée par la mélatonine *via* des récepteurs TR $\alpha$ non-neuronaux



Grâce au modèle de la souris C57BL/6J supplémentée en mélatonine, nous avons pu étudier l'effet d'une altération de la transmission du signal thyroïdien sur la régulation de l'expression de *Rfrp* par la mélatonine chez des souris portant une mutation générale ou spécifique dans les neurones du récepteur TR $\alpha$ .

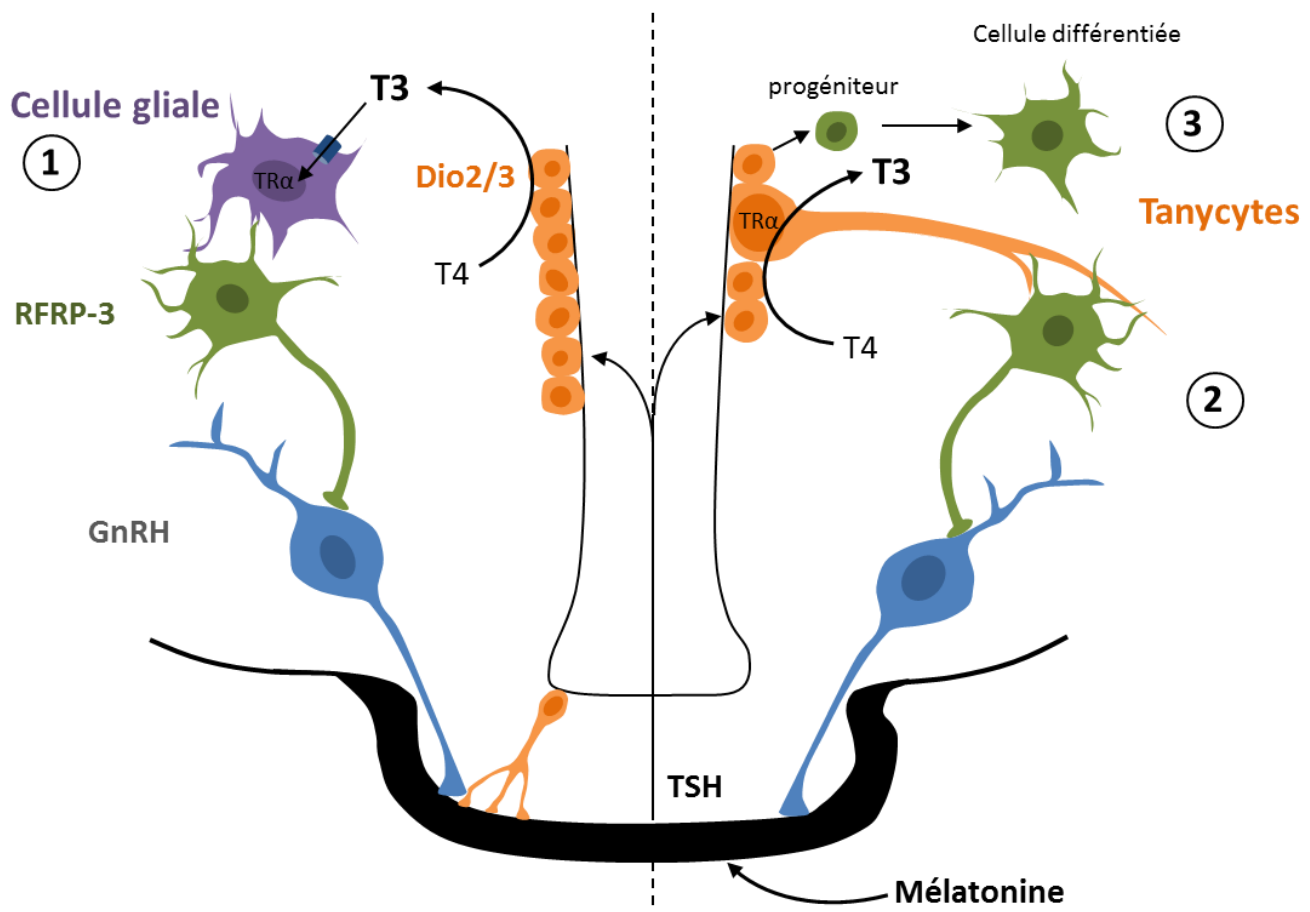
Nous avons ainsi montré qu'une mutation générale du TR $\alpha$ , contrairement à une mutation neuronale, supprime l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'expression de *Rfrp* (Figure 52).



**Figure 53** : Figure récapitulative des résultats du Projet 1 chez les souris C57BL/6J mutée ou non pour le TR $\alpha$ .

Chez les souris C57BL/6J contrôles, le nombre de neurones à RFRP-3 dans l'hypothalamus diminue chez les souris supplémentées en mélatonine dans l'eau de boisson la nuit. Chez des souris C57BL/6J portant une mutation générale du TR $\alpha$ , contrairement aux souris portant une mutation uniquement dans les neurones, la mélatonine n'inhibe plus le nombre de neurones à RFRP-3.

Ces résultats démontrent pour la première fois que les variations de T3 dépendantes de la mélatonine dans l'hypothalamus régulent l'expression de *Rfrp* en agissant *via* des récepteurs TR $\alpha$  non-neuronaux. A partir de ce résultat, j'ai envisagé plusieurs hypothèses pour expliquer la régulation de *Rfrp* par les hormones thyroïdiennes (Figure 53).



**Figure 54 :** Figure illustrant les différentes hypothèses proposées pour expliquer la régulation des neurones à RFRP-3 par la T3 via les TRα

Trois hypothèses sont proposées pour expliquer la régulation du nombre de neurones à RFRP-3 par la T3 dans l'hypothalamus médiobasal des souris supplémentées en mélatonine. 1) la T3 pourrait réguler indirectement l'expression de *Rfrp* en agissant sur des TRα localisés dans des cellules gliales avoisinantes. 2) La T3 pourrait agir sur les TRα tanycytaires pour réguler l'expression de *Rfrp* via la plasticité des prolongements tanycytaires. 3) L'action de la T3 sur les TRα tanycytaires pourrait induire des mécanismes de prolifération cellulaire régulant le nombre de neurones à RFRP-3 par des processus de neurogenèse hypothalamique saisonnière.

#### a- Une compensation par le TRβ ?

Etant donné que les hormones thyroïdiennes peuvent agir sur plusieurs cibles, il est important de se poser la question de possibles phénomènes compensatoires à la mutation du TRα.

En effet, la plupart des neurones expriment à la fois le TRα et le TRβ (Bernal, 2000; Zhang et al., 2014) et des études ont montré que ces deux isotypes peuvent avoir des rôles redondants, voire compensatoires dans des cas de KO d'un des isotypes de TR (Bernal, 2000; Fauquier et al., 2011; Gil-Ibañez et al., 2013; Yen et al., 2003). Par ailleurs, si le TRα est l'isotype le plus répandu dans le système nerveux central, la distribution du TRβ est plus restreinte mais localisée à certaines zones dont

l'hypothalamus (Bernal, 2000; Flamant et al., 2006). Ainsi il n'est pas impossible qu'un mécanisme de compensation par le TR $\beta$  se mette en place chez nos modèles de souris mutées pour le TR $\alpha$  qui ne suffirait pas à réguler l'expression de *Rfrp* dans le cas d'une mutation générale mais qui suffirait à induire l'inhibition de *Rfrp* par la mélatonine dans le cas d'une mutation sélective dans les neurones. Afin de s'assurer qu'un mécanisme de compensation par le TR $\beta$  ne vienne pas biaiser nos résultats, il serait intéressant de faire une étude similaire d'analyse de l'expression de *Rfrp* chez des souris C57BL/6J supplémentées en mélatonine portant une mutation du TR $\beta$ . Cependant les modèles de souris KO TR $\beta$  ou de doubles KO TR $\alpha$  et TR $\beta$  sont à utiliser avec précaution car ces mutations peuvent déréguler l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien résultant en une augmentation des niveaux de base de TSH et de T3 (Flamant and Samarut, 2003).

b- Une régulation *via* des cellules gliales avoisinant les neurones à RFRP-3 ?  
(Figure 53-1)

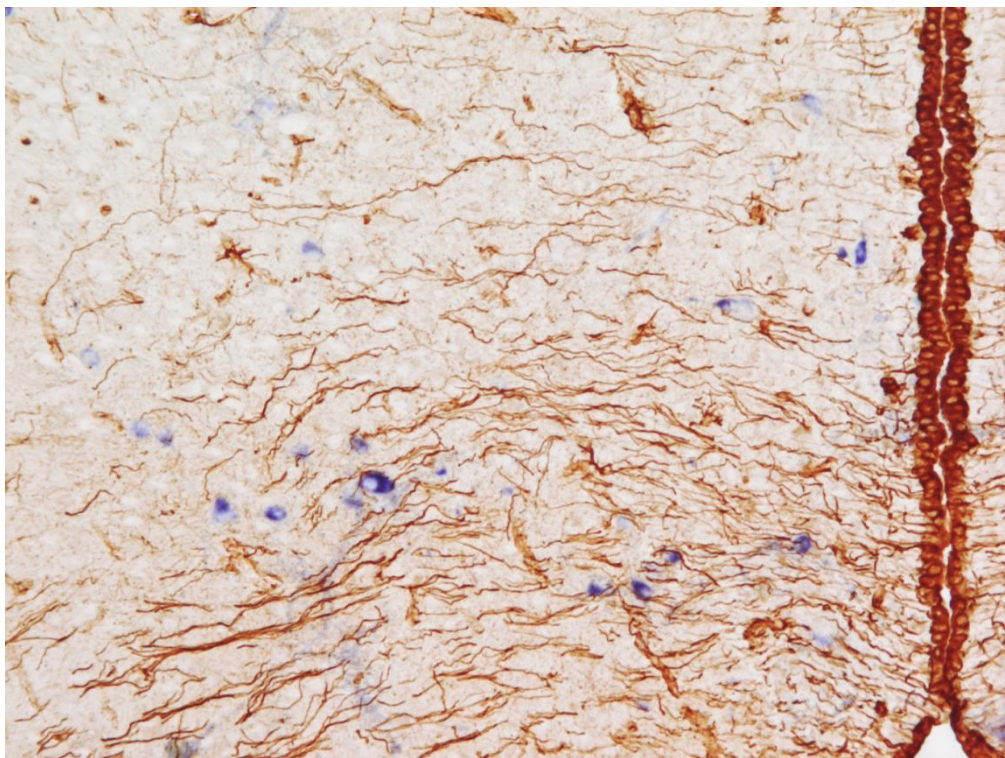
La T3 pourrait véhiculer le message mélatoninergique aux neurones exprimant le *Rfrp* indirectement en agissant sur des cellules gliales dans l'hypothalamus qui réguleraient ensuite l'activité des neurones à RFRP-3. En effet, les astrocytes et oligodendrocytes expriment des transporteurs aux hormones thyroïdiennes (Braun et al., 2010; Müller and Heuer, 2014; Warner and Mittag, 2012), en revanche si les oligodendrocytes expriment des récepteurs TR $\alpha$ , ce n'est pas le cas des astrocytes qui exprimeraient plutôt le TR $\beta$  (Bernal, 2000; Carlson et al., 1994; Wallis et al., 2010). Dans l'hypothalamus des souris, une étude a montré que les oligodendrocytes peuvent répondre par des phénomènes de plasticité pour véhiculer des signaux métaboliques circulants aux centres neuronaux hypothalamiques (Kohnke et al., 2019). De plus, une ablation des oligodendrocytes altère le fonctionnement des neurones exprimant les récepteurs à la leptine induisant une résistance à la leptine et l'obésité chez la souris (Djogo et al., 2016). Si un lien a donc déjà été établi entre les oligodendrocytes et le fonctionnement des neurones impliqués dans la régulation énergétique (Freire-Regatillo et al., 2017), aucune étude n'a encore étudié l'interaction entre ces cellules gliales et les neurones de l'axe reproducteur. Une hypothèse serait donc que les oligodendrocytes en périphérie des neurones à RFRP-3 puissent intégrer le signal saisonnier médié par la T3 *via* des récepteurs TR $\alpha$  et réguleraient *in fine* l'expression de *Rfrp*. Il serait donc intéressant d'étudier la régulation de la voie TSH/T3/RFRP-3 par la mélatonine chez un modèle de souris portant une mutation spécifique de TR $\alpha$  dans les oligodendrocytes.

c- Une régulation *via* la plasticité des prolongements tanycytaires? (Figure 53-2)

En étudiant la distribution des TR $\alpha$  nous avons observé une forte densité de récepteurs dans les tanycytes, ce qui avait déjà été rapporté auparavant par Wallis et collaborateurs (Wallis et al., 2010). Les tanycytes étendent des prolongements dans le MBH au voisinage des neurones à RFRP-3 (Figure 54). De plus, il existe une plasticité saisonnière des prolongements tanycytaires avec une densité plus grande observée en PL chez le hamster sibérien (Bolborea et al., 2011) et en PC chez le mouton (Migaud et al., 2015). Il est donc envisageable que les tanycytes contactent directement les neurones à RFRP-3



pour réguler différemment leur activité en fonction de la stratégie de reproduction de l'espèce et que la T3 agisse sur les récepteurs TR $\alpha$  localisés dans les tanocytes pour moduler cette interaction en fonction des saisons *via* des phénomènes de plasticité des prolongements tanocytaires. Afin d'étudier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la structure des tanocytes chez des souris C57/BL6J supplémentées en mélatonine ou non, afin de voir si la mélatonine est aussi capable de réguler la plasticité tanocytaire chez cette espèce et de regarder l'effet d'un KO du TR $\alpha$  sur cette plasticité induite par la mélatonine si elle a lieu. Le modèle de souris TansActivator of Transcription (TAT)-Cre permettrait d'étudier l'effet d'une délétion spécifique du TR $\alpha$  dans les tanocytes sur la plasticité saisonnière des prolongements tanocytaires et la régulation de l'expression de *Rfrp*. En effet, le modèle TAT-Cre utilise une protéine de recombinaison capable de pénétrer dans les cellules. Grâce à la localisation spécifique des tanocytes autour du troisième ventricule, une infusion de TAT-Cre dans le système ventriculaire permet donc la délétion par recombinaison d'un gène d'intérêt spécifiquement dans les cellules tanocytaires (Langlet, 2020; Parkash et al., 2015).



**Figure 55** : Photographie d'un double marquage immunohistochimique de vimentine et RFRP-3

Les tanocytes (en brun, marqués par la vimentine) étendent des prolongements dans l'hypothalamus médiobasal où sont localisés les neurones à RFRP-3 (en bleu).

#### d- Une régulation *via* des phénomènes de neurogenèse ? (Figure 53-3)

Les tanycytes constituent également une niche neurogénique dont les cellules progénitrices/souches peuvent s'intégrer dans les réseaux hypothalamiques (Chaker et al., 2016; Lee and Blackshaw, 2012). Une autre alternative serait donc que la T3 se fixe sur les récepteurs TR $\alpha$  des tanycytes pour réguler des mécanismes de neurogenèse saisonnière à l'origine de la différence du nombre de neurones exprimant le *Rfrp* entre la PC et la PL. Une étude chez le mouton a récemment appuyé cette hypothèse en indiquant que la neurogenèse hypothalamique suit un rythme saisonnier dépendant des variations de mélatonine et que le blocage du pic de prolifération cellulaire induit des décalages de la période de reproduction des femelles (Batailler et al., 2018). Parmi ces hypothèses, j'ai testé celle d'une régulation des neurones à RFRP-3 par des mécanismes de neurogenèse hypothalamique dépendants de la photopériode.

## II- *L'étude de la neurogenèse hypothalamique saisonnière chez le hamster syrien*

### 1- *La prolifération cellulaire augmente en PC chez le hamster syrien*

Chez le hamster syrien, la prolifération cellulaire augmente rapidement dans l'hypothalamus après une transition d'une PL à une PC et diminue après 12 semaines de PC pour revenir à un niveau bas similaire à celui observé en PL. La prolifération cellulaire hypothalamique induite par la PC est donc un mécanisme qui intervient en quelques jours, pour induire la mise en place des adaptations saisonnières. Chez le mouton, la prolifération cellulaire hypothalamique augmente également en PC. Ce profil similaire des variations de la prolifération chez les reproducteurs de jours courts et de jours longs suggère une régulation de la neurogenèse hypothalamique sous le contrôle de la mélatonine, plutôt qu'un phénomène lié au phénotype reproducteur.

Chez le mouton, la pinéalectomie empêche l'augmentation de la prolifération cellulaire (Batailler et al., 2018) indiquant que c'est l'allongement du pic nocturne de mélatonine en PC qui induit l'augmentation de la prolifération cellulaire. Etant donné le rôle de la mélatonine sur la production d'hormones thyroïdiennes par les tanycytes hypothalamiques (Dardente et al., 2014; Hazlerigg and Simonneaux, 2014; Yasuo et al., 2005), il serait intéressant d'évaluer si les variations photopériodiques de la prolifération cellulaire sont contrôlées par les variations dépendantes de la mélatonine des hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus en étudiant le profil de la prolifération cellulaire chez des animaux transférés en PC avec des implants de T3 (mimant une PL). Il faudrait également étudier la vitesse de la réponse des déiodinases tanycytaire lors du passage d'une PL à une PC chez le hamster afin de déterminer si les variations intra-hypothalamiques de T3 sont suffisamment rapides pour induire l'augmentation de la prolifération dès le deuxième jour de PC. Chez la caille des variations des déiodinases en moins de 24h ont été observées lors d'une transition en PC (Yasuo et al., 2005) et chez

le hamster l'expression de Dio3 diminue très rapidement lors du passage d'une PC à une PL (Milesi et al., 2017). De façon intéressante, lors de la transition d'une PC à une PL nous n'avons pas observé de changement de la prolifération. Cependant, après 12 semaines de PC le niveau de prolifération cellulaire des hamsters est bas et similaire à celui observé chez les animaux en PL. L'augmentation forte et rapide de la prolifération cellulaire en PC est transitoire, suggérant un phénomène photoréfractaire qui pourrait intervenir après 12 semaines de PC pour initier la réactivation des fonctions reproductives. En effet l'état photoréfractaire consiste en une recrudescence spontanée de l'activité des gonades, observée chez le hamster après 16 à 20 semaines de PC (Schlatt et al., 1995; Urbanski et al., 1983), selon des mécanismes encore inconnus. Des études en laboratoire (Milesi et al., 2017) et en lumière naturelle (Petri et al., 2016) montrent que parmi les gènes de la voie TSH/déiodinases/neuropeptides hypothalamiques, la Dio3 est la seule à présenter des variations précoces en aval des changements phénotypiques liés à l'activation photoréfractaire. Avec cette étude sur la prolifération cellulaire hypothalamique chez le hamster nous montrons un deuxième facteur qui échappe à la régulation photopériodique de façon précoce après plusieurs semaines de PC, il serait par conséquent intéressant d'étudier ce lien entre les variations de la prolifération cellulaire et celle de la Dio3 dans le contexte de l'état photoréfractaire. Il serait également intéressant d'étudier l'effet d'une transition en PL après une stabulation courte (moins de 5 semaines) en PC, au moment où la prolifération est forte, afin de voir si cette prolifération cellulaire pourrait être régulée par la PL en l'absence de phénomènes photoréfractaires.

Finalement, d'autres facteurs tels que l'acide rétinoïque, la Dct et la molécule sonic hedgehog (Shh), pourraient être impliqués dans la régulation saisonnière de la prolifération et/ou de la différenciation cellulaire. En effet, bien que la fonction exacte de l'acide rétinoïque dans la neurogenèse ne soit pas encore bien compris, plusieurs études ont montré qu'il joue un rôle dans la prolifération cellulaire ainsi que dans la différenciation (Jacobs et al., 2006; Mishra et al., 2018; Mosher and Schaffer, 2018). Par ailleurs, l'expression de la rétinaldéhyde déshydrogénase 1 (RALDH1), une enzyme de synthèse de l'acide rétinoïque, augmente dans les tanocytes en PL chez des rats F344 (Shearer et al., 2012) et est également augmentée par injection périphérique de T3 chez le rat (Stoney et al., 2016). De plus, Ross et collaborateurs ont montré que les variations photopériodiques du RXR sont abolies par une pinéalectomie (Ross et al., 2004). Ces observations concordent pour suggérer que l'acide rétinoïque pourrait être régulé par les hormones thyroïdiennes et jouer un rôle dans la régulation saisonnière de la neurogenèse hypothalamique. Chez le mouton en revanche, aucune variation des gènes impliqués dans la signalisation rétinoïque entre la PL et la PC n'a été mise en évidence à ce jour (Lomet et al., 2018). De façon similaire, la Dct est une protéine qui semble avoir un rôle stimulateur de la prolifération cellulaire (Jiao et al., 2006) et dont l'expression dans les tanocytes varie chez la brebis entre la PL et la PC avec une augmentation en PL qui est inhibée chez des brebis thyroïdectomisées (Dardente and Lomet, 2018; Lomet et al., 2018). La protéine Shh exprimée dans les tanocytes est également impliquée dans des mécanismes de prolifération et de différenciation neuronale (Komada, 2012; Lai et al., 2003)

et l'expression de son gène chez la brebis augmente en PL (Lomet et al., 2018). En revanche, contrairement à l'acide rétinoïque et la Dct, son expression ne semble pas dépendre des hormones thyroïdiennes (Lomet et al., 2018) et chez le hamster syrien, aucune différence photopériodique de Shh n'a été détectée (Milesi, résultats non publiées).

Finalement l'acide rétinoïque, la Dct et le Shh sont trois facteurs qui pourraient être impliqués dans la neurogenèse hypothalamique (Jacobs et al., 2006; Jiao et al., 2006; Lai et al., 2003). En particulier, l'expression de certains composants de la signalisation rétinoïque et la Dct sont régulées par les hormones thyroïdiennes et pourraient donc intervenir dans la régulation saisonnière de la prolifération cellulaire. En revanche, la synthèse de l'ensemble de ces gènes augmente en PL et pourrait donc être régulée par la T3 *via* les TR $\alpha$  tanycytaires mais ne coïncide pas avec l'augmentation de la prolifération cellulaire en PC.

Le modèle de Helfer et collaborateurs propose que l'augmentation de la neurogenèse en PC est une réponse à une hausse de l'apoptose induite par la baisse de T3 dans l'hypothalamus en PC (Helfer et al., 2019). Cependant, nos résultats de marquages de la caspase-3 activée pendant les changements de photopériode contredisent cette hypothèse puisque chez le hamster syrien, nous observons au contraire, que les niveaux de caspase ne sont pas significativement modifiés par les changements de la photopériode.

Des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre comment la neurogenèse hypothalamique est régulée par la photopériode dans l'hypothalamus et quel est son rôle dans la reproduction saisonnière. Dans ce contexte, nous avons cherché à phénotyper les cellules néoformées afin d'évaluer leur implication possible dans la régulation des fonctions saisonnières.

## 2- Y a-t-il un rôle de la neurogenèse dans le contrôle des fonctions saisonnières de la reproduction et/ou du métabolisme ?

Etant donné que la BrdU qui s'insère dans les cellules en division est encore détectable dans les cellules plusieurs semaines après l'injection, nous avons essayé de phénotyper les cellules contenant de la BrdU 5 semaines après les injections. Les cellules positives pour la BrdU étaient principalement localisées dans l'ARC et le VMH/DMH.

Afin d'établir si des neuropeptides impliqués dans le contrôle saisonnier de la reproduction sont régulés par des processus de neurogenèse hypothalamique, nous avons réalisé des co-marquages de BrdU avec la Kp et le RFRP-3. Aucune colocalisation n'a été trouvée avec ces deux neuropeptides candidats. Néanmoins, les co-marquages ont été réalisés sur des tissus tests provenant de 8 animaux en PC, puisque c'est dans cette photopériode que la prolifération cellulaire est la plus forte. Or, l'expression

de RFRP-3 et Kp augmente en PL chez le hamster syrien. Il serait par conséquent judicieux de réaliser des co-marquages supplémentaires en incluant des tissus provenant d'animaux adaptés en PL. La somatostatine est un neuropeptide impliqué dans la régulation du poids corporel et l'expression du gène codant pour la somatostatine augmente en PC chez le hamster sibérien (Klosen et al., 2013; Mercer et al., 2000; Petri et al., 2016). Bien que le poids corporel ne varie que très peu avec la photopériode chez le hamster syrien en comparaison avec le hamster sibérien (Bartness and Wade, 1985; Horton et al., 2000) nous avons également réalisé des co-marquages avec la somatostatine, mais aucune colocalisation de ce neuropeptide avec la BrdU n'a été trouvée.

Chez le mouton et le rongeur, des études ont montré qu'un petit pourcentage (< 20% dans la plupart des études) de cellules néoformées dans l'hypothalamus adoptent un phénotype neuronal, et que certaines cellules progénitrices/souches se différencient en oligodendrocytes et astrocytes (Lévy et al., 2017). Chez le hamster, Huang et collaborateurs ont montré que certaines cellules positives pour la BrdU expriment le marqueur neuronal NeuN (Huang et al., 1998) mais le devenir neuronal ou glial des cellules issues de la neurogenèse tanycytaire n'a encore jamais été analysé quantitativement.

Plusieurs études ont montré que certaines cellules nouvellement intégrées dans l'hypothalamus expriment des protéines impliquées dans la régulation énergétique et la prise alimentaire (Haan et al., 2013; Kokoeva et al., 2005b; Lee and Blackshaw, 2012; Pierce and Xu, 2010). En revanche, leur implication dans la régulation des fonctions reproductives reste très peu étudiée à ce jour. Des études complémentaires sont nécessaires pour phénotyper les cellules nouvellement intégrées dans l'hypothalamus du hamster syrien et déterminer si les variations saisonnières de la neurogenèse pourrait participer à l'élaboration de la réponse adaptative aux changements photopériodiques. Chez le hamster syrien, il serait intéressant d'injecter un bloqueur de la division cellulaire lors du passage en PC afin d'étudier si l'inhibition de la neurogenèse à la transition de cette photopériode altère le moment de réactivation de la reproduction, comme observé chez la brebis (Batailler et al., 2018).

### ***III- Le rôle du RFRP-3 dans le contrôle saisonnier de la reproduction***

#### ***1- Le RFRP-3 est impliqué dans la synchronisation de la reproduction***

Le rôle du RFRP-3 dans le contrôle central de la reproduction est encore largement discuté. De nombreuses études ont rapporté l'effet inhibiteur du RFRP-3 sur la concentration et la fréquence de pulsativité de la LH (Clarke et al., 2008; Ducret et al., 2009; Johnson et al., 2007; Kriegsfeld et al., 2006; Murakami et al., 2008; Pineda et al., 2010; Sari et al., 2009). Cependant chez les rongeurs saisonniers qui se reproduisent en PL, l'expression du RFRP-3 dans le MBH augmente en PL chez toutes les espèces

étudiées (Ancel et al., 2012; Piekarski et al., 2014; Revel et al., 2008; Talbi et al., 2016a; Ubuka et al., 2012a). De plus, une administration aigue centrale de RFRP-3 augmente l'activité des neurones à GnRH et les concentrations circulantes de LH chez des hamsters syriens (Ancel et al., 2012) et des souris (Ancel et al., 2017) mâles. En revanche l'injection aigue de RFRP-3 a un effet inhibiteur chez les hamsters syriens (Henningsen et al., 2017) et les souris (Ancel et al., 2017) femelles s'il est administré juste avant le pic de LH le jour du proœstrus et diminue la concentration de LH chez des femelles ovariectomisées lorsqu'il est administré l'après-midi mais pas le matin (Gotlieb et al., 2019). Chez des hamsters syriens mâles et femelles adaptés en PC, une administration centrale chronique de RFRP-3, restaure le phénotype reproducteur de PL (Ancel et al., 2012; Henningsen et al., 2017; Ubuka et al., 2012a). Finalement, chez la souris, une étude récente a montré qu'une activation chronique des neurones à RFRP-3 induit un délai pubertaire chez le mâle et une altération des cycles ovariens chez la femelle sans altérer leur fertilité (Mamgain et al., 2021).

L'ensemble de ces résultats suggère que le rôle du RFRP-3 ne serait pas lié directement à la régulation par l'axe HPG de l'activité des gonades mais plutôt lié à une régulation fine du contrôle temporel de l'activation de cet axe. La délétion du gène codant pour le RFRP-3 chez des espèces saisonnières, grâce à l'utilisation d'outils d'édition de génome comme le CRISPR/Cas9, permettrait de déterminer le rôle exact de ce neuropeptide dans le contrôle saisonnier de la reproduction.

Le contrôl temporel de la fonction de reproduction est particulièrement important dans le contexte saisonnier afin que les petits naissent au moment le plus propice à leur survie, mais également afin de réguler la dépense énergétique en fonction des besoins de l'organisme qui varient en fonction des conditions environnementales.

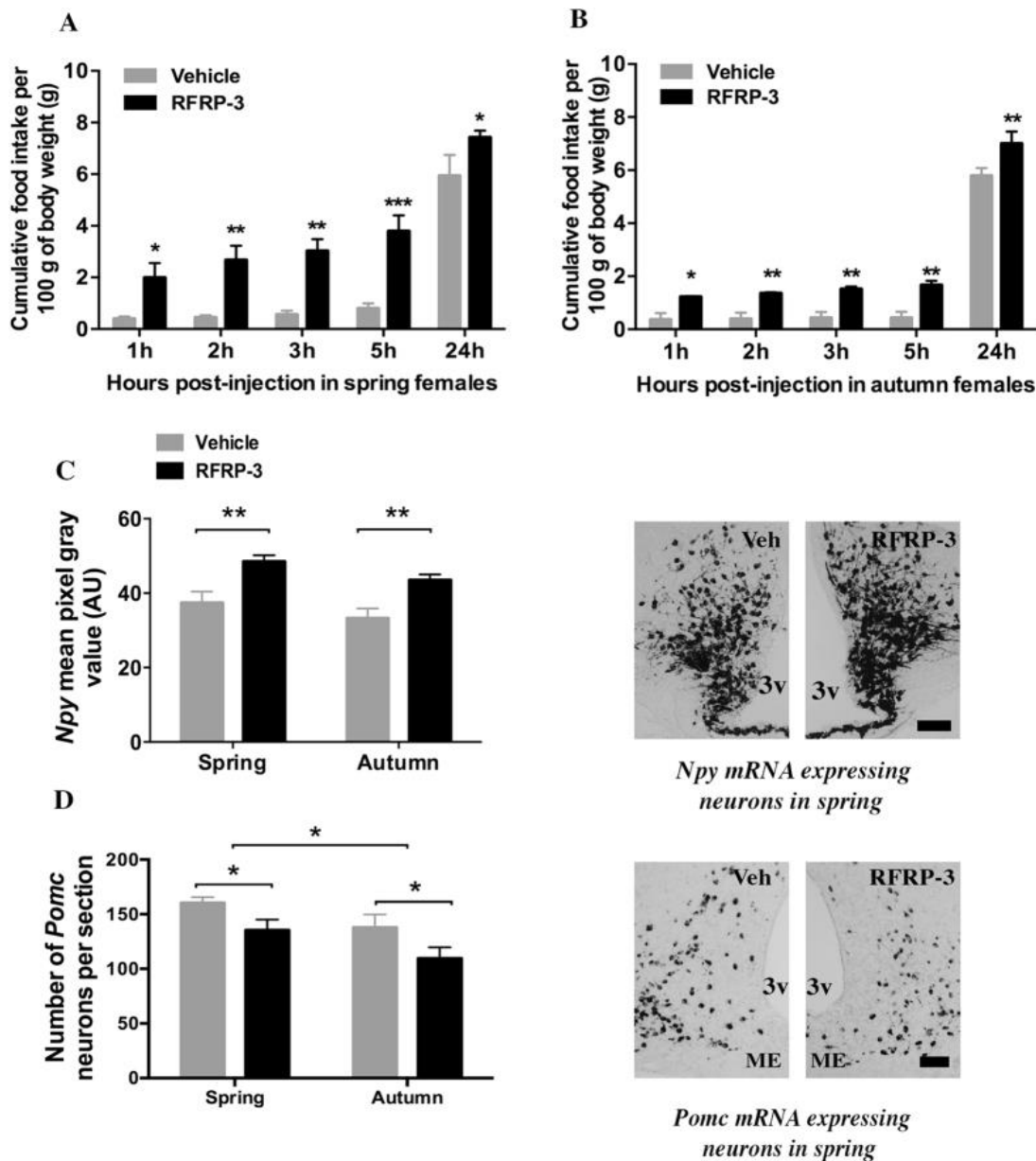
## 2- Le rôle potentiel du RFRP-3 dans l'interaction entre la reproduction et le métabolisme

L'axe reproducteur est sensible aux changements métaboliques (Boland et al., 2001 pour revue). Ce lien, entre la reproduction et la balance énergétique est particulièrement important chez les espèces dépendantes des changements saisonniers de la disponibilité alimentaire dans l'environnement. Ainsi chez le hamster sibérien, une restriction alimentaire à la fin de l'hiver empêche l'apparition de l'état photoréfractaire (Dooley and Prendergast, 2012). Chez le hamster syrien, une étude a montré que lorsque les femelles sont nourries *ad libitum* et soumises à un test de préférence entre de la nourriture et un mâle, elles se dirigent vers les mâles quel que soit le moment du cycle, mais , après 8 jours de restriction alimentaire modérée (75% du régime *ad libitum*), elles se dirigent vers la nourriture, à l'exception du jour de l'œstrus où elles conservent une préférence pour le mâle (Benton et al., 2018). De façon intéressante, dans cette étude, Benton et collaborateurs observent que l'expression de RFRP-3 est augmentée avec la restriction alimentaire sauf le jour de l'œstrus et qu'une administration centrale de



RFRP-3 inhibe la motivation sexuelle des femelles nourries *ad libitum* au profit de la motivation alimentaire (Benton et al., 2018). Chez le hamster sibérien dont la masse corporelle varie avec la saison, une administration centrale chronique de RFRP-3 chez des mâles adaptés en PC induit une augmentation de la masse corporelle (Cázarez-Márquez et al., 2019). A l'inverse, chez le hamster syrien l'administration chronique de RFRP-3 en PC n'a pas d'effet sur la masse corporelle (Ancel et al., 2012). De plus, une injection centrale aigüe de RFRP-3 augmente la prise alimentaire des hamsters sibériens femelles au moment du diœstrus en PL et PC mais n'a pas d'effet chez les femelles en PL au moment du prœstrus, et chez le mâle quelle que soit la photopériode, suggérant un effet orexigénique sexe dépendant du RFRP-3, régulé par le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels (Cázarez-Márquez et al., 2020).

Chez le rat, le RFRP-3 a un rôle orexigénique. Ainsi, des études ont montré qu'une administration centrale (Johnson et al., 2007; Moriwaki et al., 2020; Murakami et al., 2008) ou périphérique (Huo et al., 2020) de RFRP-3 augmente la prise alimentaire des animaux en plus de réduire la concentration de LH. De plus, chez la gerboise femelle, dont le poids corporel augmente en automne, l'administration centrale aigüe de RFRP-3 augmente la prise alimentaire et l'expression du gène codant pour le neuropeptide Y orexigénique et diminue l'expression du gène codant pour la proopiomélanocortine anorexigène quelle que soit la saison (Talbi et al., 2016b, [Figure 55](#)).



**Figure 56** : Effet orexigénique d’une injection centrale de RFRP-3 chez la gerboise

Chez la gerboise femelle, une injection centrale de RFRP-3 augmente la prise alimentaire (A et B) et l’expression du gène codant pour le neuropeptide Y (Npy, C) et diminue l’expression du gène codant pour la proopiomélanocortine (Pomc, D) au printemps et en automne. Image issue de Talbi et al., 2016b.

Pour finir, il a été montré chez la brebis, que les neurones à RFRP-3 projettent sur des neurones à neuropeptide Y et à proopiomélanocortine impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Qi et al., 2009).

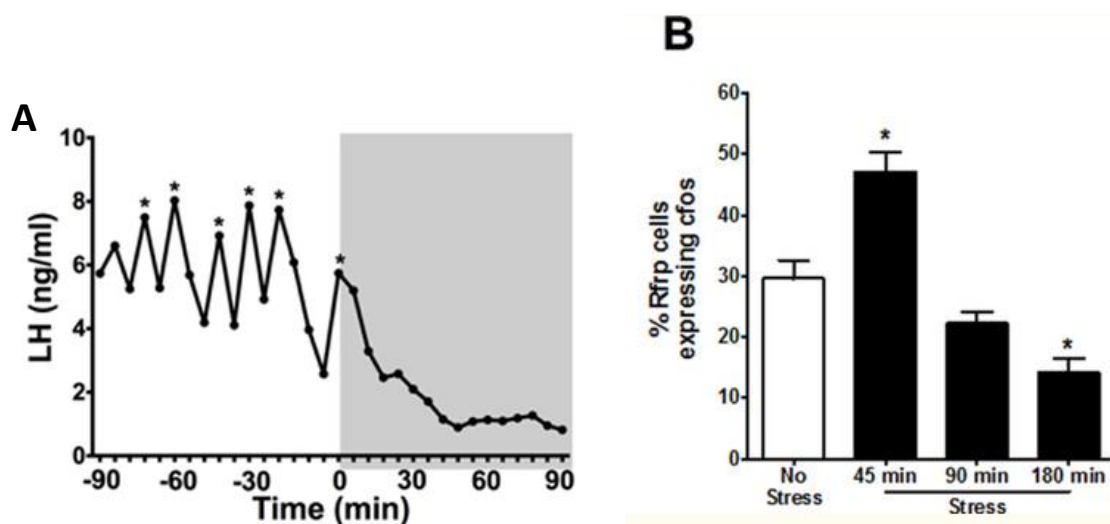
Ensemble, ces résultats suggèrent que le RFRP-3 pourrait réguler la prise alimentaire. Par conséquent, il est possible que ce neuropeptide puisse participer à l’interaction entre le métabolisme et la reproduction (Anjum et al., 2021 pour revue). Les neurones à RFRP-3 pourraient intégrer des signaux



métaboliques et réguler la reproduction en fonction de la balance énergétique, un mécanisme particulièrement pertinent dans le contexte de l'adaptation des fonctions biologiques aux variations saisonnières de l'environnement.

### 3- Le rôle potentiel du RFRP-3 dans l'effet du stress sur le contrôle de la reproduction ?

Un stress aigu peut également altéré la reproduction en diminuant la sécrétion de LH et induisant des perturbations de l'axe reproducteur de même qu'un stress chronique peut conduire à l'infertilité de l'individu (Ferin, 1999; Geraghty and Kaufer, 2015; Iwasa et al., 2017; Rivier and Rivest, 1991 pour revues). Plusieurs études suggèrent que le RFRP-3 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'axe reproducteur par le stress. En effet, lors d'un stress aigu (Kaewwongse et al., 2011; Kirby et al., 2009; Yang et al., 2018) ou chronique (Geraghty et al., 2015; Kirby et al., 2009), la concentration plasmatique et la fréquence de la pulsativité de LH diminuent tandis que l'expression de RFRP-3 et/ou l'activation des neurones à RFRP-3 augmentent. De façon intéressante, Yang et collaborateurs ont montré qu'il y a une diminution significative de l'activation des neurones à Kp 3h après un stimulus stressant aigu tandis qu'il y a une activation rapide des neurones à RFRP-3 (45 minutes après le stress) mais qui ne dure pas dans le temps (Yang et al., 2018, [Figure 56](#)), suggérant que le RFRP-3 serait impliqué dans l'inhibition à court terme de l'axe reproducteur et la Kp dans des effets à plus long terme lors d'un stress aigu.



**Figure 57** : L'activation des neurones à RFRP-3 augmente ponctuellement lors d'un stress aigu

Chez la souris mâle, un stress aigu inhibe rapidement la fréquence et l'amplitude de la pulsativité de la sécrétion de LH et augmente l'activation des neurones à RFRP-3 45 minutes après le stress. L'activation des neurones à RFRP-3 ne dure pas au-delà de 90 minutes après le stress, indiquant un rôle de ce dernier dans l'inhibition à court terme de l'axe reproducteur. Image issue de Yang et al., 2018.

Par ailleurs, Kirby et collaborateurs ont montré que 53% des neurones à RFRP-3 expriment des récepteurs aux glucocorticoïdes et qu'une adrénalectomie bloque l'augmentation de l'expression de RFRP-3 par le stress chez le rat mâle (Kirby et al., 2009). Chez la femelle, l'inhibition génique de RFRP-3 par des shRNA pendant l'exposition à un stress chronique prévient les dysfonctions reproductives liées au stress (Geraghty et al., 2015).

Finalement un article récent montre que chez des souris mâles et femelles, l'ablation des neurones à RFRP-3 prévient l'inhibition des concentrations et de la fréquence de pulsativité de la LH par le stress ou par un traitement chronique aux glucocorticoïdes (Mamgain et al., 2021).

L'ensemble de ces résultats indiquent que, comme pour les signaux métaboliques, les neurones à RFRP-3 sont capables de moduler l'axe reproducteur en réponse à des situations de stress aigu ou chronique. Dans une situation de stress, la dépense énergétique est redirigée afin de privilégier la production d'une réponse adéquate au stimulus stressant plutôt que la fonction de reproduction. Cette capacité des neurones à RFRP-3 à inhiber l'axe reproducteur en réponse à un stress est particulièrement pertinente dans le contexte saisonnier où le changement des conditions environnementales peut induire des situations de stress énergétique pour l'animal. Néanmoins il faut noter que dans la nature, l'hiver est souvent associé à une période de stress pour l'animal considérant la diminution des ressources alimentaires et l'augmentation de la prédation. C'est aussi la période pendant laquelle les rongeurs sont au repos sexuel, pourtant l'expression de RFRP-3 diminue en PC chez l'ensemble des espèces. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle du RFRP-3 dans la modulation du système reproducteur par le stress chez les espèces saisonnières.

#### 4- Conclusion

Pour conclure, le RFRP-3 est un peptide ayant de multiples fonctions, qui est à la fois impliqué dans la synchronisation de la reproduction et dans le contrôle de la reproduction en fonction des stimuli métaboliques et stressants. Toutes ces fonctions sont finement liées afin que l'activation du système reproducteur intervienne lorsque les conditions énergétiques sont optimales. Dans un milieu de vie dont les conditions climatiques changent au cours de l'année, les neurones à RFRP-3 semblent donc particulièrement importants pour intégrer des informations environnementales afin de produire une réponse reproductive appropriée au bon moment.

Les modèles saisonniers génétiquement modifiés mutés pour le gène codant le RFRP-3 permettront d'étudier le rôle exact de ce neuropeptide dans le contrôle de la reproduction saisonnière. Mais ces études ne devront pas se faire dans de simples conditions de stabulation photopériodiques mais devraient tester la réponse du système reproducteur lors de challenges énergétiques imposés à l'animal

puisque le RFRP-3 semble impliqué dans une adaptation dynamique des fonctions saisonnières en réponse aux variations des contraintes imposées par l'environnement.

## Conclusion générale

Chez de nombreux mammifères, les variations annuelles de l'environnement, notamment de la photopériode, exercent un contrôle sur l'axe reproducteur pour le synchroniser avec les saisons afin que la naissance des petits ait lieu au moment le plus favorable à leur survie (Hastings et al., 1985). Pendant ma thèse j'ai étudié les mécanismes neuroendocrines qui sous-tendent l'intégration des signaux saisonniers dans l'hypothalamus et leur rôle synchronisateur pour la reproduction animale.

Les variations photopériodiques de la production nocturne de mélatonine par la glande pinéale, assurent la représentation centrale des saisons en régulant indirectement les concentrations locales d'hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus (Dardente et al., 2014; Yasuo et al., 2005). A l'heure actuelle, les cibles moléculaires et cellulaires de la T3 sont encore mal décrites mais des études récentes montrent que les neuropeptides hypothalamiques Kp et RFRP-3 sont impliqués dans la régulation photopériodique de la reproduction (Angelopoulou et al., 2019; Simonneaux, 2020), suggérant que la T3 pourrait agir sur les neurones à Kp et/ou à RFRP-3 pour synchroniser l'activité du système reproducteur avec les saisons.

Dans un premier projet de thèse, j'ai testé l'hypothèse que la signalisation des hormones thyroïdiennes serait nécessaire pour la régulation mélatoninergique de l'expression de Kp et/ou de RFRP-3. Ainsi, j'ai démontré que l'expression de *Rfrp* n'est plus inhibée par la mélatonine chez des souris portant une mutation générale du TR $\alpha$  alors que la mélatonine continue d'inhiber l'expression de *Rfrp* chez des souris portant une mutation spécifique dans les neurones. Ces résultats suggèrent que les variations saisonnières de la T3 hypothalamique régulent l'expression de *Rfrp* via des récepteurs TR $\alpha$  non-neuronaux. La présence du TR $\alpha$  dans les tancytes, m'a amené à poser l'hypothèse d'une régulation saisonnière du nombre de neurones à RFRP-3 impliquant un effet des hormones thyroïdiennes sur des processus de neurogenèse.

En effet, les tancytes constituent une niche neurogénique de cellules progénitrices/souches qui, en réponse à des changements de l'environnement, ont la capacité de proliférer et de se différencier pour former de nouvelles cellules s'intégrant ensuite dans les réseaux hypothalamiques (Kokoeva et al., 2005; Lee and Blackshaw, 2012; Xu et al., 2005). Pendant la deuxième partie de ma thèse, j'ai montré que, dans l'hypothalamus du hamster syrien, la prolifération cellulaire augmente rapidement et de façon transitoire lors du passage d'une PL à une PC. L'augmentation de la prolifération cellulaire en PC lorsque la T3 hypothalamique et l'expression de *Rfrp* est basse, combinée à l'absence de colocalisation du RFRP-3 avec un marqueur de prolifération cellulaire, suggèrent que les neurones à RFRP-3 ne seraient pas régulés par la T3 via des processus de neurogenèse.

Les hormones thyroïdiennes pourraient néanmoins agir sur les récepteurs TR $\alpha$  tanycytaires pour transmettre le message mélatoninergique aux neurones à RFRP-3, grâce à des phénomènes de plasticité des prolongements tanycytaires qui projettent dans l'hypothalamus médiobasal.

Finalement le rôle du RFRP-3 dans le contrôle saisonnier de la reproduction est encore largement discuté, notamment parce que les études rapportent des effets différents de ce neuropeptide selon le sexe, le moment du cycle ovarien, la photopériode et les conditions expérimentales. Des outils modernes d'édition de génome comme le CRISPR/Cas9 pourraient être la clé pour élucider le rôle précis du RFRP-3 dans la régulation des fonctions saisonnières grâce à l'utilisation de modèles animaux saisonniers génétiquement modifiés.

Il ressort de la littérature et de mes travaux de thèse que le RFRP-3 est un puissant modulateur de l'axe reproducteur qui pourrait intégrer des informations environnementales afin d'exercer une régulation temporelle sur l'axe HPG. Ainsi, il est possible que le RFRP-3 puisse intégrer des informations métaboliques ou des signaux de stress pour induire une inhibition de la reproduction et privilégier une réponse adaptative appropriée en fonction de la saison.

Un tel mécanisme serait particulièrement important chez les espèces dépendantes des fluctuations saisonnières de l'environnement afin de réguler la balance des dépenses énergétiques en fonction du besoin de l'organisme. En effet si le concept d'homéostasie est crucial afin de maintenir un équilibre interne chez les espèces animales, ce concept ne tient pas compte des variations à long terme de l'environnement qui nécessitent des adaptations physiologiques de plus grande amplitude. Ces ajustements à long terme des processus homéostatiques en réponse aux challenges énergétiques environnementaux font partie d'un processus appelé rhéostasie auquel participent les mécanismes d'adaptations saisonnières.

# *Bibliographie*



**Petite France, Strasbourg**

-

**Hiver**



## Références bibliographiques

Abrieux, A., Xue, Y., Cai, Y., Lewald, K.M., Nguyen, H.N., Zhang, Y., and Chiu, J.C. (2020). EYES ABSENT and TIMELESS integrate photoperiodic and temperature cues to regulate seasonal physiology in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *117*, 15293–15304.

Ainani, H., El Bousmaki, N., Poirel, V.-J., Achaâban, M.R., Ouassat, M., Piro, M., Klosen, P., Simonneaux, V., and El Allali, K. (2020). The dromedary camel displays annual variation in hypothalamic kisspeptin and Arg-Phe-amide-related peptide-3 according to sex, season, and breeding activity. *J Comp Neurol* *528*, 32–47.

Alghadban, S., Bouchareb, A., Hinch, R., Hernandez-Pliego, P., Biggs, D., Preece, C., and Davies, B. (2020). Electroporation and genetic supply of Cas9 increase the generation efficiency of CRISPR/Cas9 knock-in alleles in C57BL/6J mouse zygotes. *Sci Rep* *10*, 17912.

Ambrogini, P., Cuppini, R., Ferri, P., Mancini, C., Ciaroni, S., Voci, A., Gerdoni, E., and Gallo, G. (2005). Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology* *81*, 244–253.

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

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

Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Billings, H.J., Connors, J.M., and Goodman, R.L. (2003). Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology* *144*, 2892–2901.

Andolz, P., Bielsa, M.A., and Andolz, A. (2001). Circannual variation in human semen parameters. *Int J Androl* *24*, 266–271.

Angelopoulou, E., Quignon, C., Kriegsfeld, L.J., and Simonneaux, V. (2019). Functional Implications of RFRP-3 in the Central Control of Daily and Seasonal Rhythms in Reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* *10*, 183.

Anjum, S., Khattak, M.N.K., Tsutsui, K., and Krishna, A. (2021). RF-amide related peptide-3 (RFRP-3): a novel neuroendocrine regulator of energy homeostasis, metabolism, and reproduction. *Mol Biol Rep* *48*, 1837–1852.

Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A.H., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2010). Differential regulation of *kiss1* expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* *25*, 81–91.

- Ansel, L., Bentsen, A.H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2011). Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GNRH release. *Reproduction* 142, 417–425.
- Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H., and Takahashi, J.S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655–667.
- Arendt, J., Symons, A.M., Laud, C.A., and Pryde, S.J. (1983). Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *J Endocrinol* 97, 395–400.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25, 11–28.
- Aschoff, J. (1965). CIRCADIAN RHYTHMS IN MAN. *Science* 148, 1427–1432.
- Aubrecht, T.G., Weil, Z.M., and Nelson, R.J. (2014). Dim light at night interferes with the development of the short-day phenotype and impairs cell-mediated immunity in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 321, 450–456.
- Aujard, F., Cayetanot, F., Terrien, J., and Van Someren, E.J.W. (2007). Attenuated effect of increased daylength on activity rhythm in the old mouse lemur, a non-human primate. *Exp Gerontol* 42, 1079–1087.
- Axelrod, J., Wurtman, R.J., and Snyder, S.H. (1965). Control of Hydroxyindole O-Methyltransferase Activity in the Rat Pineal Gland by Environmental Lighting. *Journal of Biological Chemistry* 240, 949–954.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., et al. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* 19, 293–301.
- Barrell, G.K., Moenter, S.M., Caraty, A., and Karsch, F.J. (1992). Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 46, 1130–1135.
- Barrell, G.K., Ridgway, M.J., Wellby, M., Pereira, A., Henry, B.A., and Clarke, I.J. (2016). Expression of regulatory neuropeptides in the hypothalamus of red deer (*Cervus elaphus*) reveals anomalous relationships in the seasonal control of appetite and reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 229, 1–7.
- Barrett, P., Ivanova, E., Graham, E.S., Ross, A.W., Wilson, D., Plé, H., Mercer, J.G., Ebling, F.J., Schuhler, S., Dupré, S.M., et al. (2006). Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol* 191, 687–698.
- Barrett, P., Ebling, F.J.P., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A.W., Warner, A., Jethwa, P., Boelen, A., Visser, T.J., Ozanne, D.M., et al. (2007). Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148, 3608–3617.
- Bartness, T.J., and Wade, G.N. (1985). Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci Biobehav Rev* 9, 599–612.



- Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., and Goldman, B.D. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J. Pineal Res.* *15*, 161–190.
- Bartzen-Sprauer, J., Klosen, P., Ciofi, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2014). Photoperiodic co-regulation of kisspeptin, neurokinin B and dynorphin in the hypothalamus of a seasonal rodent. *J Neuroendocrinol* *26*, 510–520.
- Batailler, M., Chesneau, D., Derouet, L., Butruille, L., Segura, S., Cognié, J., Dupont, J., Pillon, D., and Migaud, M. (2018). Pineal-dependent increase of hypothalamic neurogenesis contributes to the timing of seasonal reproduction in sheep. *Sci Rep* *8*, 6188.
- Bavister, B.D., and Poole, K.A. (2005). Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development. *Reprod Biomed Online* *10*, 124–129.
- Bedrosian, T.A., Fonken, L.K., Walton, J.C., and Nelson, R.J. (2011). Chronic exposure to dim light at night suppresses immune responses in Siberian hamsters. *Biol Lett* *7*, 468–471.
- Bentley, G.E., Perfito, N., Ukena, K., Tsutsui, K., and Wingfield, J.C. (2003). Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 794–802.
- Benton, N.A., Russo, K.A., Brozek, J.M., Andrews, R.J., Kim, V.J., Kriegsfeld, L.J., and Schneider, J.E. (2018). Food restriction-induced changes in motivation differ with stages of the estrous cycle and are closely linked to RFamide-related peptide-3 but not kisspeptin in Syrian hamsters. *Physiol Behav* *190*, 43–60.
- Bernal, J. (2000). Thyroid Hormones in Brain Development and Function. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, G. Kaltsas, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Bernal, J. (2007). Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* *3*, 249–259.
- Bernal, J., Guadaño-Ferraz, A., and Morte, B. (2015). Thyroid hormone transporters--functions and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* *11*, 406–417.
- Berria, M., DeSantis, M., and Mead, R.A. (1989). Lesions to the anterior hypothalamus prevent the melatonin-induced lengthening of delayed implantation. *Endocrinology* *125*, 2897–2904.
- Bittman, E.L., and Karsch, F.J. (1984). Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod* *30*, 585–593.
- Bittman, E.L., Kaynard, A.H., Olster, D.H., Robinson, J.E., Yellon, S.M., and Karsch, F.J. (1985). Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* *40*, 409–418.
- Blank, J.L., and Freeman, D.A. (1991). Differential reproductive response to short photoperiod in deer mice: role of melatonin. *J Comp Physiol A* *169*, 501–506.

- Bockmann, J., Böckers, T.M., Vennemann, B., Niklowitz, P., Müller, J., Wittkowski, W., Sabel, B., and Kreutz, M.R. (1996). Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* *137*, 1804–1813.
- Boland, M.P., Lonergan, P., and O’Callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* *55*, 1323–1340.
- Bolborea, M., and Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* *36*, 91–100.
- Bolborea, M., Laran-Chich, M.-P., Rasri, K., Hildebrandt, H., Govitrapong, P., Simonneaux, V., Pévet, P., Steinlechner, S., and Klosen, P. (2011). Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* *152*, 3871–3883.
- Boon, P., Visser, G.H., and Daan, S. (2000). Effect of photoperiod on body weight gain, and daily energy intake and energy expenditure in Japanese quail (*Coturnix c. japonica*). *Physiol Behav* *70*, 249–260.
- Bowlin, M.S., Bisson, I.-A., Shamoun-Baranes, J., Reichard, J.D., Sapir, N., Marra, P.P., Kunz, T.H., Wilcove, D.S., Hedenström, A., Guglielmo, C.G., et al. (2010). Grand challenges in migration biology. *Integr Comp Biol* *50*, 261–279.
- Bradley, D.J., Young, W.S., and Weinberger, C. (1989). Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 7250–7254.
- Bradshaw, W.E., and Holzapfel, C.M. (2008). Genetic response to rapid climate change: it’s seasonal timing that matters. *Mol Ecol* *17*, 157–166.
- Brainard, G.C., Richardson, B.A., King, T.S., Matthews, S.A., and Reiter, R.J. (1983). The suppression of pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity by different light irradiances in the Syrian hamster: a dose-response relationship. *Endocrinology* *113*, 293–296.
- Braun, D., Wirth, E.K., and Schweizer, U. (2010). Thyroid hormone transporters in the brain. *Rev Neurosci* *21*, 173–186.
- Bronson, F.H. (1995). Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *Q Rev Biol* *70*, 141–164.
- Brown, G.M., Seggie, J., and Grota, L.J. (1985). Serum melatonin response to melatonin administration in the Syrian hamster. *Neuroendocrinology* *41*, 31–35.
- Bruce, V.G., and Pittendrigh, C.S. (1957). Endogenous Rhythms in Insects and Microorganisms. *The American Naturalist* *91*, 179–195.
- Bünning, E. (1935). Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primarblättern von *Phaseolus multiZorus*. *Jahrb. Wiss. Botan* *81*, 411–418.
- Butruille, L., Batailler, M., Mazur, D., Prévot, V., and Migaud, M. (2018). Seasonal reorganization of hypothalamic neurogenic niche in adult sheep. *Brain Struct Funct* *223*, 91–109.

- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Saïd, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., and Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* *148*, 5258–5267.
- Carlson, D.J., Strait, K.A., Schwartz, H.L., and Oppenheimer, J.H. (1994). Immunofluorescent localization of thyroid hormone receptor isoforms in glial cells of rat brain. *Endocrinology* *135*, 1831–1836.
- Carter, D.S., and Goldman, B.D. (1983a). Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* *113*, 1261–1267.
- Carter, D.S., and Goldman, B.D. (1983b). Progonadal role of the pineal in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*): mediation by melatonin. *Endocrinology* *113*, 1268–1273.
- Castellano, J.M., and Tena-Sempere, M. (2013). Metabolic regulation of kisspeptin. *Adv Exp Med Biol* *784*, 363–383.
- Cázarez-Márquez, F., Milesi, S., Laran-Chich, M.-P., Klosen, P., Kalsbeek, A., and Simonneaux, V. (2019). Kisspeptin and RFRP3 modulate body mass in *Phodopus sungorus* via two different neuroendocrine pathways. *J. Neuroendocrinol.* *31*, e12710.
- Cázarez-Márquez, F., Laran-Chich, M.-P., Klosen, P., Kalsbeek, A., and Simonneaux, V. (2020). RFRP3 increases food intake in a sex-dependent manner in the seasonal hamster *Phodopus sungorus*. *J Neuroendocrinol* *32*, e12845.
- Chaker, Z., George, C., Petrovska, M., Caron, J.-B., Lacube, P., Caillé, I., and Holzenberger, M. (2016). Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiol Aging* *41*, 64–72.
- Chalivoix, S., Bagnolini, A., Caraty, A., Cognié, J., Malpoux, B., and Dufourny, L. (2010). Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol* *22*, 110–118.
- Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., and Samarut, J. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the *c-erbA* alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol* *11*, 1278–1290.
- Chemineau, P. (1983). Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil* *67*, 65–72.
- Chen, Z., Godfrey-Bailey, L., Schiff, I., and Hauser, R. (2004). Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience. *J Exp Clin Assist Reprod* *1*, 2.
- Choe, H.K., Kim, H.-D., Park, S.H., Lee, H.-W., Park, J.-Y., Seong, J.Y., Lightman, S.L., Son, G.H., and Kim, K. (2013). Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 5677–5682.
- Chu, J., Tu, Y., Chen, J., Tan, D., Liu, X., and Pi, R. (2016). Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells. *Mol Cell Endocrinol* *420*, 169–179.

- Cinzano, P., and Falchi, F. (2020). Toward an atlas of the number of visible stars.
- Cissé, Y.M., Russart, K., and Nelson, R.J. (2020). Exposure to dim light at night prior to conception attenuates offspring innate immune responses. *PLoS One* *15*, e0231140.
- Clarke, I.J. (1988). Gonadotrophin-releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen. *J Endocrinol* *117*, 355–360.
- Clarke, I.J., Thomas, G.B., Yao, B., and Cummins, J.T. (1987). GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology* *46*, 82–88.
- Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., et al. (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* *149*, 5811–5821.
- Clarkson, J., and Herbison, A.E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* *147*, 5817–5825.
- Clayton, D.F., and Alvarez-Buylla, A. (1989). In situ hybridization using PEG-embedded tissue and riboprobes: increased cellular detail coupled with high sensitivity. *J. Histochem. Cytochem.* *37*, 389–393.
- Cook, L.M. (2003). The rise and fall of the Carbonaria form of the peppered moth. *Q Rev Biol* *78*, 399–417.
- Crandall, J., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W.E., and McCaffery, P. (2004). 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5111–5116.
- van Dalum, J., Melum, V.J., Wood, S.H., and Hazlerigg, D.G. (2019). Maternal Photoperiodic Programming: Melatonin and Seasonal Synchronization Before Birth. *Front Endocrinol (Lausanne)* *10*, 901.
- Dardente, H. (2012). Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the pars tuberalis: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 249–266.
- Dardente, H., and Lomet, D. (2018). Photoperiod and thyroid hormone regulate expression of I-dopachrome tautomerase (Dct), a melanocyte stem-cell marker, in tanycytes of the ovine hypothalamus. *J Neuroendocrinol* *30*, e12640.
- Dardente, H., Klosin, P., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2003). MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 778–786.
- Dardente, H., Birnie, M., Lincoln, G.A., and Hazlerigg, D.G. (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 1252–1259.
- Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupré, S.M., Loudon, A.S.I., Lincoln, G.A., and Hazlerigg, D.G. (2010). A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr. Biol.* *20*, 2193–2198.

- Dardente, H., Hazlerigg, D.G., and Ebling, F.J.P. (2014). Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 19.
- Dardente, H., Wood, S., Ebling, F., and Sáenz de Miera, C. (2019). An integrative view of mammalian seasonal neuroendocrinology. *J. Neuroendocrinol.* 31, e12729.
- Dark, J., Zucker, I., and Wade, G.N. (1983). Photoperiodic regulation of body mass, food intake, and reproduction in meadow voles. *Am J Physiol* 245, R334-338.
- Dauchy, R.T., Sauer, L.A., Blask, D.E., and Vaughan, G.M. (1997). Light contamination during the dark phase in “photoperiodically controlled” animal rooms: effect on tumor growth and metabolism in rats. *Lab Anim Sci* 47, 511–518.
- De Mairan, J. (1729). *Observation Botanique*. Hist. L’Academie R. Sci. Paris 1729, 35.
- Decourt, C., Anger, K., Robert, V., Lomet, D., Bartzen-Sprauer, J., Caraty, A., Dufourny, L., Anderson, G., and Beltramo, M. (2016). No Evidence That RFamide-Related Peptide 3 Directly Modulates LH Secretion in the Ewe. *Endocrinology* 157, 1566–1575.
- Demas, G.E., and Nelson, R.J. (1998). Exogenous melatonin enhances cell-mediated, but not humoral, immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 13, 245–252.
- Derouin-Tochon, F., Beltramo, M., Decourt, C., Fleurot, R., GÉRARD, N., Pinet-Charvet, C., Martinet, S., Robert, V., Taragnat, C., Tillet, Y., et al. (2019). L’ovulation chez les mammifères. *INRAE Productions Animales* 32, 445–460.
- Desouza, L.A., Ladiwala, U., Daniel, S.M., Agashe, S., Vaidya, R.A., and Vaidya, V.A. (2005). Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 29, 414–426.
- Diedrich, V., Hagg, E., Dreier, C., and Herwig, A. (2020). What can seasonal models teach us about energy balance? *J Endocrinol* 244, R17–R32.
- Dingle, H. (2014). *Migration: The Biology of Life on the Move* (Oxford University Press).
- Dixit, A.S., and Singh, N.S. (2020). Circadian versus circannual rhythm in the photoperiodic programming of seasonal responses in Eurasian tree sparrow (*Passer montanus*). *Photochem Photobiol Sci* 19, 371–381.
- Djogo, T., Robins, S.C., Schneider, S., Kryzskaya, D., Liu, X., Mingay, A., Gillon, C.J., Kim, J.H., Storch, K.-F., Boehm, U., et al. (2016). Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell Metab* 23, 797–810.
- Dominoni, D., Quetting, M., and Partecke, J. (2013). Artificial light at night advances avian reproductive physiology. *Proc Biol Sci* 280, 20123017.
- Dong, Z., Shi, H., Zhao, M., Zhang, X., Huang, W., Wang, Y., Zheng, L., Xian, X., and Liu, G. (2018). Loss of LCAT activity in the golden Syrian hamster elicits pro-atherogenic dyslipidemia and enhanced atherosclerosis. *Metabolism* 83, 245–255.
- Dooley, J.C., and Prendergast, B.J. (2012). Photorefractoriness and energy availability interact to permit facultative timing of spring breeding. *Behav Ecol* 23, 1049–1058.

- Dopico, X.C., Evangelou, M., Ferreira, R.C., Guo, H., Pekalski, M.L., Smyth, D.J., Cooper, N., Burren, O.S., Fulford, A.J., Hennig, B.J., et al. (2015). Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun* 6, 7000.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Ducret, E., Anderson, G.M., and Herbison, A.E. (2009). RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 150, 2799–2804.
- Dufourny, L., Gennetay, D., Martinet, S., Lomet, D., and Caraty, A. (2016). The Content of Thyroid Hormone Receptor  $\alpha$  in Ewe Kisspeptin Neurones is not Season-Dependent. *J. Neuroendocrinol.* 28, 12344.
- Durrant, J., Michaelides, E.B., Rupasinghe, T., Tull, D., Green, M.P., and Jones, T.M. (2015). Constant illumination reduces circulating melatonin and impairs immune function in the cricket *Teleogryllus commodus*. *PeerJ* 3, e1075.
- Ebenhöh, O., and Hazlerigg, D. (2013). Modelling a molecular calendar: The seasonal photoperiodic response in mammals. *Chaos, Solitons & Fractals* 50, 39–47.
- Ebihara, S., Marks, T., Hudson, D.J., and Menaker, M. (1986). Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231, 491–493.
- Ebling, F.J.P., and Lewis, J.E. (2018). Tanycytes and hypothalamic control of energy metabolism. *Glia* 66, 1176–1184.
- El Allali, K., Achaaban, M.R., Vivien-Roels, B., Bothorel, B., Tligui, N.S., and Pévet, P. (2005). Seasonal variations in the nycthemeral rhythm of plasma melatonin in the camel (*Camelus dromedarius*). *J Pineal Res* 39, 121–128.
- El Allali, K., Achaâban, M.R., Bothorel, B., Piro, M., Bouâouda, H., El Allouchi, M., Ouassat, M., Malan, A., and Pévet, P. (2013). Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (*Camelus dromedarius*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304, R1044-1052.
- El Allali, K., El Bousmaki, N., Ainani, H., and Simonneaux, V. (2017). Effect of the Camelid's Seminal Plasma Ovulation-Inducing Factor/ $\beta$ -NGF: A Kisspeptin Target Hypothesis. *Front Vet Sci* 4, 99.
- Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M.J., Oyarce, K.A., Carril, C.A., and García-Robles, M.A. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med* 19, 1471–1482.
- Elliott, J.A. (1976). Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. In *Federation Proceedings*, pp. 2339–2346.
- Ellison, N., Weller, J.L., and Klein, D.C. (1972). Development of a circadian rhythm in the activity of pineal serotonin N-acetyltransferase. *J Neurochem* 19, 1335–1341.
- Eskes, G.A. (1983). Gonadal responses to food restriction in intact and pinealectomized male golden hamsters. *J Reprod Fertil* 68, 85–90.
- Evans, J.A., Elliott, J.A., and Gorman, M.R. (2007). Circadian effects of light no brighter than moonlight. *J Biol Rhythms* 22, 356–367.

- Ezzat, A., Pereira, A., and Clarke, I.J. (2015). Kisspeptin is a component of the pulse generator for GnRH secretion in female sheep but not the pulse generator. *Endocrinology* *156*, 1828–1837.
- Fail, P.A., and Whitsett, J.M. (1988). Influence of photoperiod, ambient temperature and melatonin on testosterone synthesis and release during reproductive maturation in male deer mice. *J Androl* *9*, 21–30.
- Fan, Z., Li, W., Lee, S.R., Meng, Q., Shi, B., Bunch, T.D., White, K.L., Kong, I.-K., and Wang, Z. (2014). Efficient gene targeting in golden Syrian hamsters by the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One* *9*, e109755.
- Fanibunda, S.E., Desouza, L.A., Kapoor, R., Vaidya, R.A., and Vaidya, V.A. (2018). Thyroid Hormone Regulation of Adult Neurogenesis. *Vitam. Horm.* *106*, 211–251.
- Fauquier, T., Romero, E., Picou, F., Chatonnet, F., Nguyen, X.-N., Quignodon, L., and Flamant, F. (2011). Severe impairment of cerebellum development in mice expressing a dominant-negative mutation inactivating thyroid hormone receptor alpha1 isoform. *Dev Biol* *356*, 350–358.
- Fenn, A.M., Fonken, L.K., and Nelson, R.J. (2011). Sustained melatonin treatment blocks body mass, pelage, reproductive, and fever responses to short day lengths in female Siberian hamsters. *J Pineal Res* *51*, 180–186.
- Ferin, M. (1999). Clinical review 105: Stress and the reproductive cycle. *J Clin Endocrinol Metab* *84*, 1768–1774.
- Ferreira, S.A., Rollag, M.D., and Glass, J.D. (1996). Pharmacokinetics of extracellular melatonin in Siberian hamster forebrain. *Brain Res* *733*, 318–320.
- Flamant, F., and Gauthier, K. (2013). Thyroid hormone receptors: the challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochim Biophys Acta* *1830*, 3900–3907.
- Flamant, F., and Samarut, J. (2003). Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* *14*, 85–90.
- Flamant, F., Baxter, J.D., Forrest, D., Refetoff, S., Samuels, H., Scanlan, T.S., Vennström, B., and Samarut, J. (2006). International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* *58*, 705–711.
- Flamant, F., Gauthier, K., and Richard, S. (2017). Genetic Investigation of Thyroid Hormone Receptor Function in the Developing and Adult Brain. *Curr Top Dev Biol* *125*, 303–335.
- Florant, G.L., and Tamarkin, L. (1984). Plasma melatonin rhythms in euthermic marmots (*Marmota flaviventris*). *Biol Reprod* *30*, 332–337.
- Fonken, L.K., Workman, J.L., Walton, J.C., Weil, Z.M., Morris, J.S., Haim, A., and Nelson, R.J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18664–18669.
- Freeman, D.A., Teubner, B.J.W., Smith, C.D., and Prendergast, B.J. (2007). Exogenous T3 mimics long day lengths in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *292*, R2368–2372.
- Freire-Regatillo, A., Argente-Arizón, P., Argente, J., García-Segura, L.M., and Chowen, J.A. (2017). Non-Neuronal Cells in the Hypothalamic Adaptation to Metabolic Signals. *Front Endocrinol (Lausanne)* *8*, 51.



- Galea, L.A., and McEwen, B.S. (1999). Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience* 89, 955–964.
- Gao, M., Zhang, B., Liu, J., Guo, X., Li, H., Wang, T., Zhang, Z., Liao, J., Cong, N., Wang, Y., et al. (2014). Generation of transgenic golden Syrian hamsters. *Cell Res* 24, 380–382.
- García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., et al. (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 86, 709–724.
- Garner, W.W., and Allard, H.A. (1922). PHOTOPERIODISM, THE RESPONSE OF THE PLANT TO RELATIVE LENGTH OF DAY AND NIGHT. *Science* 55, 582–583.
- Gaston, K.J., Bennie, J., Davies, T.W., and Hopkins, J. (2013). The ecological impacts of nighttime light pollution: a mechanistic appraisal. *Biological Reviews* 88, 912–927.
- Gauthier, K., Plateroti, M., Harvey, C.B., Williams, G.R., Weiss, R.E., Refetoff, S., Willott, J.F., Sundin, V., Roux, J.P., Malaval, L., et al. (2001). Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4748–4760.
- Geraghty, A.C., and Kaufer, D. (2015). Glucocorticoid Regulation of Reproduction. *Adv Exp Med Biol* 872, 253–278.
- Geraghty, A.C., Muroy, S.E., Zhao, S., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., and Kaufer, D. (2015). Knockdown of hypothalamic RFRP3 prevents chronic stress-induced infertility and embryo resorption. *ELife* 4, e04316.
- Gern, W.A., Owens, D.W., and Ralph, C.L. (1978). Plasma melatonin in the trout: day-night change demonstrated by radioimmunoassay. *Gen Comp Endocrinol* 34, 453–458.
- Gibbs, F.P., and Vriend, J. (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 109, 1796–1798.
- Gil-Ibañez, P., Morte, B., and Bernal, J. (2013). Role of thyroid hormone receptor subtypes  $\alpha$  and  $\beta$  on gene expression in the cerebral cortex and striatum of postnatal mice. *Endocrinology* 154, 1940–1947.
- Goldman, B.D., and Darrow, J.M. (1983). The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology* 37, 386–396.
- Gomes, F.C., Maia, C.G., de Menezes, J.R., and Neto, V.M. (1999). Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 25, 247–255.
- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., and Gage, F.H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914.
- Goodman, R.L., Maltby, M.J., Millar, R.P., Hileman, S.M., Nestor, C.C., Whited, B., Tseng, A.S., Coolen, L.M., and Lehman, M.N. (2012). Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrous ewes. *Endocrinology* 153, 5918–5927.
- Gorman, M.R., and Zucker, I. (1997). Pattern of change in melatonin duration determines testicular responses in Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. *Biol Reprod* 56, 668–673.

- Gotlieb, N., Baker, C.N., Moeller, J., and Kriegsfeld, L.J. (2019). Time-of-day-dependent sensitivity of the reproductive axis to RFamide-related peptide-3 inhibition in female Syrian hamsters. *J Neuroendocrinol* *31*, e12798.
- Goto, M., and Ebihara, S. (1990). The influence of different light intensities on pineal melatonin content in the retinal degenerate C3H mouse and the normal CBA mouse. *Neurosci Lett* *108*, 267–272.
- Goto, M., Oshima, I., Tomita, T., and Ebihara, S. (1989). Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J. Pineal Res.* *7*, 195–204.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* *145*, 4073–4077.
- Greives, T.J., Mason, A.O., Scotti, M.-A.L., Levine, J., Ketterson, E.D., Kriegsfeld, L.J., and Demas, G.E. (2007). Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology* *148*, 1158–1166.
- Grøntved, L., Waterfall, J.J., Kim, D.W., Baek, S., Sung, M.-H., Zhao, L., Park, J.W., Nielsen, R., Walker, R.L., Zhu, Y.J., et al. (2015). Transcriptional activation by the thyroid hormone receptor through ligand-dependent receptor recruitment and chromatin remodelling. *Nat Commun* *6*, 7048.
- Guerrero, H.Y., Gauer, F., Schuster, C., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2000). Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* *71*, 163–169.
- Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C.M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S., and Hajihosseini, M.K. (2013). Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci* *33*, 6170–6180.
- Hammond, J., Kirkpatrick, C.M., and Leopold, A.C. (1953). Photoperiodicity in Animals: The Role of Darkness. *Science* *117*, 389–391.
- Hanon, E.A., Lincoln, G.A., Fustin, J.-M., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P.J., and Hazlerigg, D.G. (2008). Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr. Biol.* *18*, 1147–1152.
- Hastings, M.H., Herbert, J., Martensz, N.D., and Roberts, A.C. (1985). Annual reproductive rhythms in mammals: mechanisms of light synchronization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *453*, 182–204.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., and Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci* *19*, 453–469.
- Hawley, A.W., and Aleksyuk, M. (1976). The influence of photoperiod and temperature on seasonal testicular recrudescence in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* *53*, 215–221.
- Hazlerigg, D.G., and Lincoln, G.A. (2011). Hypothesis: Cyclical Histogenesis Is the Basis of Circannual Timing. *Journal of Biological Rhythms* *26*, 471–485.
- Hazlerigg, D.G., and Simonneaux, V. (2014). Seasonal reproduction in mammals. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* 4th Ed., pp. 1575–1660.

- Heideman, P.D., and Sylvester, C.J. (1997). Reproductive photoresponsiveness in unmanipulated male Fischer 344 laboratory rats. *Biol Reprod* 57, 134–138.
- Helfer, G., Barrett, P., and Morgan, P.J. (2019). A unifying hypothesis for control of body weight and reproduction in seasonally breeding mammals. *Journal of Neuroendocrinology* 31, e12680.
- Hengeveld, R. (2002). MacArthur, R.H. and E.O. Wilson (1967, reprinted 2001). *The Theory of Island Biogeography*. *Acta Biotheor* 50, 133–136.
- Henningsen, J.B., Poirel, V.-J., Mikkelsen, J.D., Tsutsui, K., Simonneaux, V., and Gauer, F. (2016). Sex differences in the photoperiodic regulation of RF-Amide related peptide (RFRP) and its receptor GPR147 in the syrian hamster. *J. Comp. Neurol.* 524, 1825–1838.
- Henningsen, J.B., Ancel, C., Mikkelsen, J.D., Gauer, F., and Simonneaux, V. (2017). Roles of RFRP-3 in the Daily and Seasonal Regulation of Reproductive Activity in Female Syrian Hamsters. *Endocrinology* 158, 652–663.
- Henson, J.R., Carter, S.N., and Freeman, D.A. (2013). Exogenous T<sub>3</sub> elicits long day-like alterations in testis size and the RFamides Kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone in short-day Siberian hamsters. *J. Biol. Rhythms* 28, 193–200.
- Herbison, A.E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol* 12, 452–466.
- Herwig, A., Ross, A.W., Nilaweera, K.N., Morgan, P.J., and Barrett, P. (2008). Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts* 1, 71–79.
- Heuer, H., Maier, M.K., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E.C.H., Visser, T.J., and Bauer, K. (2005). The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146, 1701–1706.
- Hileman, S.M., Kuehl, D.E., and Jackson, G.L. (1994). Effect of anterior hypothalamic area lesions on photoperiod-induced shifts in reproductive activity of the ewe. *Endocrinology* 135, 1816–1823.
- Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., et al. (2000). New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2, 703–708.
- Hoffman, R.A., and Reiter, R.J. (1965). PINEAL GLAND: INFLUENCE ON GONADS OF MALE HAMSTERS. *Science* 148, 1609–1611.
- Hoffmann, K., Illnerová, H., and Vaněček, J. (1986). Change in duration of the nighttime melatonin peak may be a signal driving photoperiodic responses in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett* 67, 68–72.
- Hong, S.M., and Stetson, M.H. (1986). Functional maturation of the gonads of Turkish hamsters under various photoperiods. *Biol Reprod* 35, 858–862.
- Horton, T.H., Buxton, O.M., Losee-Olson, S., and Turek, F.W. (2000). Twenty-four-hour profiles of serum leptin in siberian and golden hamsters: photoperiodic and diurnal variations. *Horm Behav* 37, 388–398.

- Huang, L., DeVries, G.J., and Bittman, E.L. (1998). Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J. Neurobiol.* *36*, 410–420.
- Huo, K., Li, X., Hu, W., Song, X., Zhang, D., Zhang, X., Chen, X., Yuan, J., Zuo, J., and Wang, X. (2020). RFRP-3, the Mammalian Ortholog of GnIH, Is a Novel Modulator Involved in Food Intake and Glucose Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* *11*.
- Liams, S.E., Lugena, A.B., Zhang, Y., Hayden, A.N., and Merlin, C. (2019). Photoperiodic and clock regulation of the vitamin A pathway in the brain mediates seasonal responsiveness in the monarch butterfly. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 25214–25221.
- Ikeno, T., Weil, Z.M., and Nelson, R.J. (2014). Dim light at night disrupts the short-day response in Siberian hamsters. *Gen. Comp. Endocrinol.* *197*, 56–64.
- Illnerová, H., Hoffmann, K., and Vaněček, J. (1984). Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* *38*, 226–231.
- Inouye, D.W., Barr, B., Armitage, K.B., and Inouye, B.D. (2000). Climate change is affecting altitudinal migrants and hibernating species. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 1630–1633.
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* *80*, 264–272.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., and Irahara, M. (2017). Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)* *8*, 62.
- Jacobs, S., Lie, D.C., DeCicco, K.L., Shi, Y., DeLuca, L.M., Gage, F.H., and Evans, R.M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3902–3907.
- Janati, A., Talbi, R., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., Magoul, R., Simonneaux, V., and El Ouezzani, S. (2013). Distribution and seasonal variation in hypothalamic RF-amide peptides in a semi-desert rodent, the jerboa. *J Neuroendocrinol* *25*, 402–411.
- Jansen, H.T., and Jackson, G.L. (1993). Olfactory bulb removal does not prevent gonadotropin or prolactin responses to changing photoperiod in the ewe. *Neuroendocrinology* *57*, 448–456.
- Jansen, H.T., Lubbers, L.S., Macchia, E., DeGroot, L.J., and Lehman, M.N. (1997). Thyroid hormone receptor (alpha) distribution in hamster and sheep brain: colocalization in gonadotropin-releasing hormone and other identified neurons. *Endocrinology* *138*, 5039–5047.
- Jansen, H.T., Cutter, C., Hardy, S., Lehman, M.N., and Goodman, R.L. (2003). Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology* *144*, 3663–3676.
- Jiao, Z., Zhang, Z.G., Hornyak, T.J., Hozeska, A., Zhang, R.L., Wang, Y., Wang, L., Roberts, C., Strickland, F.M., and Chopp, M. (2006). Dopachrome tautomerase (Dct) regulates neural progenitor cell proliferation. *Dev Biol* *296*, 396–408.

- John, D. (2005). ANNUAL LIPID CYCLES IN HIBERNATORS: Integration of Physiology and Behavior. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 469–497.
- Johnson, M.A., Tsutsui, K., and Fraley, G.S. (2007). Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51, 171–180.
- de Jong, M., Caro, S.P., Gienapp, P., Spoelstra, K., and Visser, M.E. (2017). Early Birds by Light at Night: Effects of Light Color and Intensity on Daily Activity Patterns in Blue Tits. *J Biol Rhythms* 32, 323–333.
- Kaewwongse, M., Takayanagi, Y., and Onaka, T. (2011). Effects of RFamide-related peptide (RFRP)-1 and RFRP-3 on oxytocin release and anxiety-related behaviour in rats. *J Neuroendocrinol* 23, 20–27.
- Kalds, P., Zhou, S., Cai, B., Liu, J., Wang, Y., Petersen, B., Sonstegard, T., Wang, X., and Chen, Y. (2019). Sheep and Goat Genome Engineering: From Random Transgenesis to the CRISPR Era. *Front. Genet.* 10.
- Kameda, Y., Arai, Y., and Nishimaki, T. (2003). Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res* 314, 251–262.
- Kapoor, R., van Hogerlinden, M., Wallis, K., Ghosh, H., Nordstrom, K., Vennstrom, B., and Vaidya, V.A. (2010). Unliganded thyroid hormone receptor alpha1 impairs adult hippocampal neurogenesis. *FASEB J* 24, 4793–4805.
- Kapoor, R., Desouza, L.A., Nanavaty, I.N., Kernie, S.G., and Vaidya, V.A. (2012). Thyroid hormone accelerates the differentiation of adult hippocampal progenitors. *J Neuroendocrinol* 24, 1259–1271.
- Kapoor, R., Fanibunda, S.E., Desouza, L.A., Guha, S.K., and Vaidya, V.A. (2015). Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. *J. Neurochem.* 133, 599–616.
- Karsch, F.J., Malpoux, B., Wayne, N.L., and Robinson, J.E. (1988). Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 28, 459–472.
- Kasahara, T., Abe, K., Mekada, K., Yoshiki, A., and Kato, T. (2010). Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6412–6417.
- Kempnaers, B., Borgström, P., Loës, P., Schlicht, E., and Valcu, M. (2010). Artificial night lighting affects dawn song, extra-pair siring success, and lay date in songbirds. *Curr Biol* 20, 1735–1739.
- Kennaway, D.J. (2019). Melatonin research in mice: a review. *Chronobiol Int* 36, 1167–1183.
- Kennaway, D.J., Sanford, L.M., Godfrey, B., and Friesen, H.G. (1983). Patterns of progesterone, melatonin and prolactin secretion in ewes maintained in four different photoperiods. *J Endocrinol* 97, 229–242.
- Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., and Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *PNAS* 106, 11324–11329.

- Kirn, J.R., and Schwabl, H. (1997). Photoperiod regulation of neuron death in the adult canary. *J Neurobiol* *33*, 223–231.
- Kirn, J.R., Alvarez-Buylla, A., and Nottebohm, F. (1991). Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. *J Neurosci* *11*, 1756–1762.
- Kiyohara, M., Son, Y.L., and Tsutsui, K. (2017). Involvement of gonadotropin-inhibitory hormone in pubertal disorders induced by thyroid status. *Sci Rep* *7*, 1042.
- Klein, D.C., and Moore, R.Y. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* *174*, 245–262.
- Klosen, P., Maessen, X., and van den Bosch de Aguilar, P. (1993). PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J. Histochem. Cytochem.* *41*, 455–463.
- Klosen, P., Bienvenu, C., Demarteau, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2002). The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* *50*, 1647–1657.
- Klosen, P., Sébert, M.-E., Rasri, K., Laran-Chich, M.-P., and Simonneaux, V. (2013). TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* *27*, 2677–2686.
- Klosen, P., Lapmanee, S., Schuster, C., Guardiola, B., Hicks, D., Pevet, P., and Felder-Schmittbuhl, M.P. (2019). MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *J Pineal Res* *67*, e12575.
- Kobayashi, T., Namba, M., Koyano, T., Fukushima, M., Sato, M., Ohtsuka, M., and Matsuyama, M. (2018). Successful production of genome-edited rats by the rGONAD method. *BMC Biotechnol* *18*, 19.
- Kohnke, S., Lam, B., Buller, S., Zhao, C., Nuzzaci, D., Tadross, J., Holmqvist, S., Ridley, K., Hathaway, H., Macklin, W., et al. (2019). Nutritional signals rapidly activate oligodendrocyte differentiation in the adult hypothalamic median eminence. *BioRxiv* 751198.
- Köhrle, J. (2018). Thyroid Hormones and Derivatives: Endogenous Thyroid Hormones and Their Targets. *Methods Mol Biol* *1801*, 85–104.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005a). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* *310*, 679–683.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005b). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* *310*, 679–683.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2007). Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* *505*, 209–220.
- Komada, M. (2012). Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex. *Congenit Anom (Kyoto)* *52*, 72–77.

- Korf, H.-W. (2018). Signaling pathways to and from the hypophysial pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. *Gen Comp Endocrinol* 258, 236–243.
- Kriegsfeld, L.J., Ranalli, N.J., Bober, M.A., and Nelson, R.J. (2000). Photoperiod and temperature interact to affect the GnRH neuronal system of male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J Biol Rhythms* 15, 306–316.
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., and Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2410–2415.
- Kriegsfeld, L.J., Jennings, K.J., Bentley, G.E., and Tsutsui, K. (2018). Gonadotrophin-inhibitory hormone and its mammalian orthologue RFamide-related peptide-3: Discovery and functional implications for reproduction and stress. *J Neuroendocrinol* 30, e12597.
- Kuhlmann, M.T., Clemen, G., and Schlatt, S. (2003). Molting in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus* Pallas): seasonal or continuous process? *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 295, 160–171.
- Kurlansik, S.L., and Ibay, A.D. (2012). Seasonal affective disorder. *Am Fam Physician* 86, 1037–1041.
- Kuzmenko, N.V., Tsyrlin, V.A., Pliss, M.G., and Galagudza, M.M. (2021). Seasonal variations in levels of human thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones: a meta-analysis. *Chronobiol Int* 1–17.
- Kyba, C.C.M., Kuester, T., Sánchez de Miguel, A., Baugh, K., Jechow, A., Hölker, F., Bennie, J., Elvidge, C.D., Gaston, K.J., and Guanter, L. (2017). Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. *Sci Adv* 3, e1701528.
- La Sorte, F.A., and Horton, K.G. (2021). Seasonal variation in the effects of artificial light at night on the occurrence of nocturnally migrating birds in urban areas. *Environ Pollut* 270, 116085.
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., and Schaffer, D.V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6, 21–27.
- Langlet, F. (2014). Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 26, 753–760.
- Langlet, F. (2020). Targeting Tanycytes: Balance between Efficiency and Specificity. *Neuroendocrinology* 110, 574–581.
- Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., et al. (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab* 17, 607–617.
- Larkin, J.E., Jones, J., and Zucker, I. (2002). Temperature dependence of gonadal regression in Syrian hamsters exposed to short day lengths. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R744-752.
- Lazcano, I., Hernández-Puga, G., Robles, J.P., and Orozco, A. (2019). Alternative ligands for thyroid hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* 493, 110448.
- Leadem, C.A. (1988). Photoperiodic sensitivity of prepubertal female Fisher 344 rats. *J Pineal Res* 5, 63–70.

- Lee, D.A., and Blackshaw, S. (2012). Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *Int J Dev Neurosci* 30, 615–621.
- Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., et al. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 15, 700–702.
- Lehman, M.N., Goodman, R.L., Karsch, F.J., Jackson, G.L., Berriman, S.J., and Jansen, H.T. (1997). The GnRH system of seasonal breeders: anatomy and plasticity. *Brain Res Bull* 44, 445–457.
- Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prévot, O., Samarut, J., Levi, G., and Demeneix, B.A. (2005). Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J* 19, 863–865.
- Leon, S., and Tena-Sempere, M. (2015). Dissecting the Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Mammals: Studies Using Pharmacological Tools and Genetically Modified Mouse Models. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 189.
- León, S., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Roa, J., Vázquez, M.J., Gaytan, F., Blomenrohr, M., et al. (2014). Physiological roles of gonadotropin-inhibitory hormone signaling in the control of mammalian reproductive axis: studies in the NPF1 receptor null mouse. *Endocrinology* 155, 2953–2965.
- LeTallec, T., Théry, M., and Perret, M. (2015). Effects of light pollution on seasonal estrus and daily rhythms in a nocturnal primate. *Journal of Mammalogy* 96, 438–445.
- Levitas, E., Lunenfeld, E., Weisz, N., Friger, M., and Har-Vardi, I. (2013). Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a plausible explanation of a seasonal birth pattern. *Am J Obstet Gynecol* 208, 406.e1-6.
- Lévy, F., Batailler, M., Meurisse, M., and Migaud, M. (2017). Adult Neurogenesis in Sheep: Characterization and Contribution to Reproduction and Behavior. *Front Neurosci* 11.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J., and Smith, J.T. (2011). Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J Neuroendocrinol* 23, 871–882.
- Li, R., Miao, J., Fan, Z., Song, S., Kong, I.-K., Wang, Y., and Wang, Z. (2018). Production of Genetically Engineered Golden Syrian Hamsters by Pronuclear Injection of the CRISPR/Cas9 Complex. *J Vis Exp*.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Lincoln, G.A., and Clarke, I.J. (1994). Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 6, 251–260.
- Lincoln, G.A., and Maeda, K.I. (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J. Endocrinol.* 132, 201–215.
- Lindsay, D.R., Cognie, Y., Pelletier, J., and Signoret, J.P. (1975). Influence of the presence of rams on the timing of ovulation and discharge of LH in ewes. *Physiol Behav* 15, 423–426.



- Liu, X., Lee, K., and Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* *149*, 4605–4614.
- Lomet, D., Cognié, J., Chesneau, D., Dubois, E., Hazlerigg, D., and Dardente, H. (2018). The impact of thyroid hormone in seasonal breeding has a restricted transcriptional signature. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 905–919.
- Lomet, D., Druart, X., Hazlerigg, D., Beltramo, M., and Dardente, H. (2020). Circuit-level analysis identifies target genes of sex steroids in ewe seasonal breeding. *Mol Cell Endocrinol* *512*, 110825.
- Longcore, T. (2010). Sensory ecology: night lights alter reproductive behavior of blue tits. *Curr Biol* *20*, R893-895.
- López-Juárez, A., Remaud, S., Hassani, Z., Jolivet, P., Pierre Simons, J., Sontag, T., Yoshikawa, K., Price, J., Morvan-Dubois, G., and Demeneix, B.A. (2012). Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* *10*, 531–543.
- Magnusson, A. (2000). An overview of epidemiological studies on seasonal affective disorder. *Acta Psychiatr Scand* *101*, 176–184.
- Mamgain, A., Sawyer, I.L., Timajo, D.A.M., Rizwan, M.Z., Evans, M.C., Ancel, C.M., Inglis, M.A., and Anderson, G.M. (2021). RFamide-Related Peptide Neurons Modulate Reproductive Function and Stress Responses. *J. Neurosci.* *41*, 474–488.
- Mason, A.O., Greives, T.J., Scotti, M.-A.L., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E.D., Demas, G.E., and Kriegsfeld, L.J. (2007). Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. *Horm Behav* *52*, 492–498.
- Mason, A.O., Duffy, S., Zhao, S., Ubuka, T., Bentley, G.E., Tsutsui, K., Silver, R., and Kriegsfeld, L.J. (2010). Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms* *25*, 176–185.
- Masson-Pévet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N., and Pévet, P. (1994). An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* *278*, 97–106.
- Masumoto, K.-H., Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T., Nagano, M., Uno, K.D., Tsujino, K., Horikawa, K., Shigeyoshi, Y., and Ueda, H.R. (2010). Acute induction of *Eya3* by late-night light stimulation triggers TSH $\beta$  expression in photoperiodism. *Curr Biol* *20*, 2199–2206.
- Matsuda, N., Numata, H., and Udaka, H. (2020). Transcriptomic changes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Effects of the seasonal timer and photoperiod. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* *36*, 100740.
- Matsui, H., and Asami, T. (2014). Effects and therapeutic potentials of kisspeptin analogs: regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Neuroendocrinology* *99*, 49–60.
- Maxwell, S.L., Fuller, R.A., Brooks, T.M., and Watson, J.E.M. (2016). Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature* *536*, 143–145.

- Maywood, E.S., Bittman, E.L., and Hastings, M.H. (1996). Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol. Reprod.* *54*, 470–477.
- McKiernan, S.H., and Bavister, B.D. (2000). Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Hum Reprod* *15*, 157–164.
- McNeilly, A.S., Tay, C.C., and Glasier, A. (1994). Physiological mechanisms underlying lactational amenorrhea. *Ann N Y Acad Sci* *709*, 145–155.
- Mendoza, A., and Hollenberg, A.N. (2017). New Insights into Thyroid Hormone Action. *Pharmacol Ther* *173*, 135–145.
- Mercer, J.G., Moar, K.M., Ross, A.W., Hoggard, N., and Morgan, P.J. (2000). Photoperiod regulates arcuate nucleus POMC, AGRP, and leptin receptor mRNA in Siberian hamster hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *278*, R271-281.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., et al. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 1761–1766.
- Migaud, H., Davie, A., and Taylor, J.F. (2010a). Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *J Fish Biol* *76*, 27–68.
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I., and Pillon, D. (2010b). Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci* *32*, 2042–2052.
- Migaud, M., Batailler, M., Pillon, D., Franceschini, I., and Malpoux, B. (2011). Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J. Biol. Rhythms* *26*, 486–496.
- Migaud, M., Butrille, L., and Batailler, M. (2015). Seasonal regulation of structural plasticity and neurogenesis in the adult mammalian brain: focus on the sheep hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* *37*, 146–157.
- Milesi, S., Simonneaux, V., and Klosen, P. (2017). Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters. *Sci Rep* *7*, 17739.
- Mills, L.S., Zimova, M., Oyler, J., Running, S., Abatzoglou, J.T., and Lukacs, P.M. (2013). Camouflage mismatch in seasonal coat color due to decreased snow duration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 7360–7365.
- Milsom, W.K., Zimmer, M.B., and Harris, M.B. (1999). Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *124*, 383–391.
- Mishra, S., Kelly, K.K., Rumian, N.L., and Siegenthaler, J.A. (2018). Retinoic Acid Is Required for Neural Stem and Progenitor Cell Proliferation in the Adult Hippocampus. *Stem Cell Reports* *10*, 1705–1720.
- Moenter, S.M., Woodfill, C.J., and Karsch, F.J. (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology* *128*, 1337–1344.

- Moffatt, C.A., DeVries, A.C., and Nelson, R.J. (1993). Winter adaptations of male deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and prairie voles (*Microtus ochrogaster*) that vary in reproductive responsiveness to photoperiod. *J Biol Rhythms* *8*, 221–232.
- Montero-Pedrazuela, A., Venero, C., Lavado-Autric, R., Fernández-Lamo, I., García-Verdugo, J.M., Bernal, J., and Guadaño-Ferraz, A. (2006). Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* *11*, 361–371.
- Moore, R.Y., and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* *42*, 201–206.
- Moore, R.Y., and Klein, D.C. (1974). Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* *71*, 17–33.
- Moore, R.Y., and Lenn, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* *146*, 1–14.
- Moore-Ede, M.C. (1983). The circadian timing system in mammals: two pacemakers preside over many secondary oscillators. *Fed Proc* *42*, 2802–2808.
- Morgan, P.J. (2000). The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *J Neuroendocrinol* *12*, 287–295.
- Moriwaki, K., Miyashita, N., Mita, A., Gotoh, H., Tsuchiya, K., Kato, H., Mekada, K., Noro, C., Oota, S., Yoshiki, A., et al. (2009). Unique inbred strain MSM/Ms established from the Japanese wild mouse. *Exp Anim* *58*, 123–134.
- Moriwaki, S., Narimatsu, Y., Fukumura, K., Iwakoshi-Ukena, E., Furumitsu, M., and Ukena, K. (2020). Effects of Chronic Intracerebroventricular Infusion of RFamide-Related Peptide-3 on Energy Metabolism in Male Mice. *Int J Mol Sci* *21*.
- Mosher, K.I., and Schaffer, D.V. (2018). Proliferation versus Differentiation: Redefining Retinoic Acid's Role. *Stem Cell Reports* *10*, 1673–1675.
- Müller, J., and Heuer, H. (2014). Expression pattern of thyroid hormone transporters in the postnatal mouse brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* *5*, 92.
- Muñoz, A.L., Aroña, R.M., Bedos, M., Hernández, H., Keller, M., Chemineau, P., and Delgadillo, J.A. (2019). Presence of a sexually active goat buck enhances ovulation occurrence in seasonally anestrous does after ovulation and luteolysis induction in hormonally-treated goats in seasonal anestrus. *Anim Reprod Sci* *211*, 106209.
- Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., and Tsutsui, K. (2008). Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol* *199*, 105–112.
- Murphy, M., Jethwa, P.H., Warner, A., Barrett, P., Nilaweera, K.N., Brameld, J.M., and Ebling, F.J.P. (2012). Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in Siberian hamsters. *Endocrinology* *153*, 101–112.
- Nakane, Y., Ikegami, K., Iigo, M., Ono, H., Takeda, K., Takahashi, D., Uesaka, M., Kimijima, M., Hashimoto, R., Arai, N., et al. (2013). The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length. *Nat Commun* *4*, 2108.

- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., et al. (2008). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452, 317–322.
- Nakayama, T., and Yoshimura, T. (2018). Seasonal Rhythms: The Role of Thyrotropin and Thyroid Hormones. *Thyroid* 28, 4–10.
- Navara, K.J., and Nelson, R.J. (2007). The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J Pineal Res* 43, 215–224.
- Navarro, V.M. (2020). Metabolic regulation of kisspeptin - the link between energy balance and reproduction. *Nat Rev Endocrinol* 16, 407–420.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KISS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KISS-1 peptide. *Endocrinology* 145, 4565–4574.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (1990). Mammalian hibernation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326, 669–685, discussion 685–686.
- Nelson, R.J., and Chbeir, S. (2018). Dark matters: effects of light at night on metabolism. *Proc Nutr Soc* 77, 223–229.
- Nelson, R.J., and Demas, G.E. (1996). Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol* 71, 511–548.
- Nelson, R.J., Dark, J., and Zucker, I. (1983). Influence of photoperiod, nutrition and water availability on reproduction of male California voles (*Microtus californicus*). *J Reprod Fertil* 69, 473–477.
- Nicholls, T.J., Follett, B.K., Goldsmith, A.R., and Pearson, H. (1988). Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reprod Nutr Dev* 28, 375–385.
- Niles, L.P., Armstrong, K.J., Rincón Castro, L.M., Dao, C.V., Sharma, R., McMillan, C.R., Doering, L.C., and Kirkham, D.L. (2004). Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC Neurosci* 5, 41.
- Nishiwaki-Ohkawa, T., and Yoshimura, T. (2016). Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *J. Endocrinol.* 229, R117-127.
- Nottebohm, F., O'Loughlin, B., Gould, K., Yohay, K., and Alvarez-Buylla, A. (1994). The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7849–7853.
- Novaira, H.J., Sonko, M.L., Hoffman, G., Koo, Y., Ko, C., Wolfe, A., and Radovick, S. (2014). Disrupted kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotropic hypogonadism. *Mol Endocrinol* 28, 225–238.
- Okamura, H., Tsukamura, H., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., and Maeda, K. (2013). Kisspeptin and GnRH pulse generation. *Adv Exp Med Biol* 784, 297–323.

- Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., Ebihara, S., Korf, H.-W., and Yoshimura, T. (2008a). Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 18238–18242.
- Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., Ebihara, S., Korf, H.-W., and Yoshimura, T. (2008b). Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 18238–18242.
- Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J., and Volland-Nail, P. (1988). Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust J Biol Sci* *41*, 69–85.
- Ozgul, A., Childs, D.Z., Oli, M.K., Armitage, K.B., Blumstein, D.T., Olson, L.E., Tuljapurkar, S., and Coulson, T. (2010). Coupled dynamics of body mass and population growth in response to environmental change. *Nature* *466*, 482–485.
- Pajunen, I. (1974). Body temperature, heart rate, breathing pattern, weight loss and periodicity of hibernation in the French garden dormouse, *Eliomys quercinus* L., at  $4.2 \pm 0.5$  °C. *Annales Zoologici Fennici* *11*, 107–119.
- Parkash, J., Messina, A., Langlet, F., Cimino, I., Loyens, A., Mazur, D., Gallet, S., Balland, E., Malone, S.A., Pralong, F., et al. (2015). Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat Commun* *6*, 6385.
- Parmesan, C., and Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* *421*, 37–42.
- Paul, M.J., Pyter, L.M., Freeman, D.A., Galang, J., and Prendergast, B.J. (2009). Photic and nonphotic seasonal cues differentially engage hypothalamic kisspeptin and RFamide-related peptide mRNA expression in Siberian hamsters. *J Neuroendocrinol* *21*, 1007–1014.
- Perkins, A., and Fitzgerald, J.A. (1994). The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim Sci* *72*, 51–55.
- Petri, I., Diedrich, V., Wilson, D., Fernández-Calleja, J., Herwig, A., Steinlechner, S., and Barrett, P. (2016). Orchestration of gene expression across the seasons: Hypothalamic gene expression in natural photoperiod throughout the year in the Siberian hamster. *Sci Rep* *6*, 29689.
- Pévet, P. (1988). The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev* *28*, 443–458.
- Piekarski, D.J., Jarjisian, S.G., Perez, L., Ahmad, H., Dhawan, N., Zucker, I., and Kriegsfeld, L.J. (2014). Effects of Pinealectomy and Short Day Lengths on Reproduction and Neuronal RFRP-3, Kisspeptin, and GnRH in Female Turkish Hamsters. *J. Biol. Rhythms* *29*, 181–191.
- Pieper, D.R., and Lobocki, C.A. (1993). Olfactory bulbectomy induces reproductive recrudescence in golden hamsters on short photoperiod. *Neurosci Lett* *155*, 227–229.
- Pierce, A.A., and Xu, A.W. (2010). De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. *J Neurosci* *30*, 723–730.
- Piersma, T. (1998). Phenotypic Flexibility during Migration: Optimization of Organ Size Contingent on the Risks and Rewards of Fueling and Flight? *Journal of Avian Biology* *29*, 511–520.

- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blumenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., et al. (2010). Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E39-46.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 92, 1235–1316.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25, 159–184.
- Poling, M.C., Kim, J., Dhamija, S., and Kauffman, A.S. (2012). Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 153, 1827–1840.
- Pollock, A.M. (1975). Seasonal changes in appetite and sexual condition in red deer stags maintained on a six-month photoperiod. *J Physiol* 244, 95P-96P.
- Post, E., and Forchhammer, M.C. (2008). Climate change reduces reproductive success of an Arctic herbivore through trophic mismatch. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2369–2375.
- Prendergast, B.J., Pyter, L.M., Galang, J., and Kay, L.M. (2009). Reproductive responses to photoperiod persist in olfactory bulbectomized Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Behav Brain Res* 198, 159–164.
- Prevot, V., Dutoit, S., Croix, D., Tramu, G., and Beauvillain, J.C. (1998). Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84, 177–191.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G.B., and Beauvillain, J.C. (1999). Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 94, 809–819.
- Prevot, V., Langlet, F., and Dehouck, B. (2013). Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain. *Aging (Albany NY)* 5, 332–334.
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., and Clasadonte, J. (2018). The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.* 39, 333–368.
- Qi, Y., Oldfield, B.J., and Clarke, I.J. (2009). Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 21, 690–697.
- Quaynor, S., Hu, L., Leung, P.K., Feng, H., Mores, N., Krsmanovic, L.Z., and Catt, K.J. (2007). Expression of a functional g protein-coupled receptor 54-kisspeptin autoregulatory system in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 21, 3062–3070.
- Quignodon, L., Vincent, S., Winter, H., Samarut, J., and Flamant, F. (2007). A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Mol. Endocrinol.* 21, 2350–2360.

- Quignon, C., Beymer, M., Gauthier, K., Gauer, F., and Simonneaux, V. (2020). Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of Rfrp gene expression in mice. *FASEB J.*
- Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., and Simonin, F. (2016). RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol. Ther.* *160*, 84–132.
- Radchuk, V., Reed, T., Teplitsky, C., van de Pol, M., Charmantier, A., Hassall, C., Adamík, P., Adriaensen, F., Ahola, M.P., Arcese, P., et al. (2019). Adaptive responses of animals to climate change are most likely insufficient. *Nat Commun* *10*, 3109.
- Rajaratnam, S.M., and Redman, J.R. (1998). Entrainment of activity rhythms to temperature cycles in diurnal palm squirrels. *Physiol Behav* *63*, 271–277.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* *247*, 975–978.
- Rasika, S., Nottebohm, F., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7854–7858.
- Rasri-Klosen, K., Simonneaux, V., and Klosen, P. (2017). Differential response patterns of kisspeptin and RFamide-related peptide to photoperiod and sex steroid feedback in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Neuroendocrinol.* *29*.
- Ratto, M.H., Berland, M., Silva, M.E., and Adams, G.P. (2019). New insights of the role of  $\beta$ -NGF in the ovulation mechanism of induced ovulating species. *Reproduction* *157*, R199–R207.
- Réale, D., McAdam, A.G., Boutin, S., and Berteaux, D. (2003). Genetic and plastic responses of a northern mammal to climate change. *Proc Biol Sci* *270*, 591–596.
- Reiter, R.J. (1968). The pineal gland and gonadal development in male rats and hamsters. *Fertil Steril* *19*, 1009–1017.
- Reiter, R.J., Tan, D.-X., Korkmaz, A., Erren, T.C., Piekarski, C., Tamura, H., and Manchester, L.C. (2007). Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog* *13*, 303–328.
- Remaud, S., Gothié, J.-D., Morvan-Dubois, G., and Demeneix, B.A. (2014). Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)* *5*, 62.
- Renfree, M.B., and Fenelon, J.C. (2017). The enigma of embryonic diapause. *Development* *144*, 3199–3210.
- Reppert, S.M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* *12*, 528–531.
- Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2006). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr. Biol.* *16*, 1730–1735.
- Revel, F.G., Saboureau, M., Pévet, P., Simonneaux, V., and Mikkelsen, J.D. (2008). RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* *149*, 902–912.

- Ribelayga, C., Pévet, P., and Simonneaux, V. (2000). HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *278*, R1339-1345.
- Richard, S., Aguilera, N., Thévenet, M., Dkhissi-Benyahya, O., and Flamant, F. (2017). Neuronal expression of a thyroid hormone receptor  $\alpha$  mutation alters mouse behaviour. *Behav. Brain Res.* *321*, 18–27.
- Riegel, K.W. (1973). Light Pollution: Outdoor lighting is a growing threat to astronomy. *Science* *179*, 1285–1291.
- Riley, W.D., Bendall, B., Ives, M.J., Edmonds, N.J., and Maxwell, D.L. (2012). Street lighting disrupts the diel migratory pattern of wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolts leaving their natal stream. *Aquaculture* *330–333*, 74–81.
- Rivier, C., and Rivest, S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* *45*, 523–532.
- Rizwan, M.Z., Porteous, R., Herbison, A.E., and Anderson, G.M. (2009). Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* *150*, 1413–1420.
- Rizwan, M.Z., Poling, M.C., Corr, M., Cornes, P.A., Augustine, R.A., Quennell, J.H., Kauffman, A.S., and Anderson, G.M. (2012). RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* *153*, 3770–3779.
- Robert, K.A., Lesku, J.A., Partecke, J., and Chambers, B. (2015). Artificial light at night desynchronizes strictly seasonal reproduction in a wild mammal. *Proc Biol Sci* *282*, 20151745.
- Roberts, A.C., Martensz, N.D., Hastings, M.H., and Herbert, J. (1985). Changes in photoperiod alter the daily rhythms of pineal melatonin content and hypothalamic beta-endorphin content and the luteinizing hormone response to naloxone in the male Syrian hamster. *Endocrinology* *117*, 141–148.
- Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Pastor, F.E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., and Amat, P. (2005). Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. In *International Review of Cytology*, (Academic Press), pp. 89–164.
- Rose, J., Stormshak, F., Oldfield, J., and Adair, J. (1984). Induction of winter fur growth in mink (*Mustela vison*) with melatonin. *J Anim Sci* *58*, 57–61.
- Roseboom, P.H., Namboodiri, M.A., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Rodriguez, I.R., Gastel, J.A., and Klein, D.C. (1998). Natural melatonin “knockdown” in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *63*, 189–197.
- Rosenwasser, A.M., and Turek, F.W. (2015). *Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation*. *Sleep Med Clin* *10*, 403–412.
- Rosmalen, L. van, Dalum, J. van, Hazlerigg, D.G., and Hut, R.A. (2020). Gonads or body? Differences in gonadal and somatic photoperiodic growth response in two vole species. *BioRxiv* 2020.06.12.147777.
- Ross, A.W., Webster, C.A., Mercer, J.G., Moar, K.M., Ebling, F.J., Schuhler, S., Barrett, P., and Morgan, P.J. (2004). Photoperiodic regulation of hypothalamic retinoid signaling: association of retinoid X receptor gamma with body weight. *Endocrinology* *145*, 13–20.



- Ross, A.W., Helfer, G., Russell, L., Darras, V.M., and Morgan, P.J. (2011). Thyroid hormone signalling genes are regulated by photoperiod in the hypothalamus of F344 rats. *PLoS One* 6, e21351.
- Rouméas, L., Humbert, J.-P., Schneider, S., Doebelin, C., Bertin, I., Schmitt, M., Bourguignon, J.-J., Simonin, F., and Bihel, F. (2015). Effects of systematic N-terminus deletions and benzoylations of endogenous RF-amide peptides on NPFF1R, NPFF2R, GPR10, GPR54 and GPR103. *Peptides* 71, 156–161.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., and Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10972–10976.
- Rushton, J.P. (1985). Differential K theory: The sociobiology of individual and group differences. *Personality and Individual Differences* 6, 441–452.
- Rydell, J. (1991). Seasonal Use of Illuminated Areas by Foraging Northern Bats *Eptesicus-Nilssoni*. *Holarctic Ecology* 14, 203–207.
- Sáenz de Miera, C., Monecke, S., Bartzen-Sprauer, J., Laran-Chich, M.-P., Pévet, P., Hazlerigg, D.G., and Simonneaux, V. (2014). A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr. Biol.* 24, 1500–1506.
- Sáenz de Miera, C., Bothorel, B., Jaeger, C., Simonneaux, V., and Hazlerigg, D. (2017). Maternal photoperiod programs hypothalamic thyroid status via the fetal pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 8408–8413.
- Sáenz de Miera, C., Sage-Ciocca, D., Simonneaux, V., Pévet, P., and Monecke, S. (2018). Melatonin-independent Photoperiodic Entrainment of the Circannual TSH Rhythm in the Pars Tuberalis of the European Hamster. *J Biol Rhythms* 33, 302–317.
- Sáenz de Miera, C., Beymer, M., Routledge, K., Król, E., Selman, C., Hazlerigg, D.G., and Simonneaux, V. (2020). Photoperiodic regulation in a wild-derived mouse strain. *J. Exp. Biol.* 223.
- Sari, I.P., Rao, A., Smith, J.T., Tilbrook, A.J., and Clarke, I.J. (2009). Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 150, 5549–5556.
- Schlatt, S., De Geyter, M., Kliesch, S., Nieschlag, E., and Bergmann, M. (1995). Spontaneous recrudescence of spermatogenesis in the photoinhibited male Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Biol Reprod* 53, 1169–1177.
- Schuster, C., Gauer, F., Guerrero, H., Lakhdar-Ghazal, N., Pevet, P., and Masson-Pevet, M. (2000). Photoc regulation of mt1 melatonin receptors in the Siberian hamster pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet. *J Neuroendocrinol* 12, 207–216.
- Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., et al. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349, 1614–1627.
- Sha, J.C.M., Du, H., Deng, J., Chen, Z., Wu, Q., and Chen, W. (2020). Differential responses of non-human primates to seasonal temperature fluctuations. *Primates* 61, 455–464.

- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., and Plant, T.M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 2129–2134.
- Shearer, K.D., Goodman, T.H., Ross, A.W., Reilly, L., Morgan, P.J., and McCaffery, P.J. (2010). Photoperiodic regulation of retinoic acid signaling in the hypothalamus. *J Neurochem* *112*, 246–257.
- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Nanescu, S.E., Helfer, G., Barrett, P., Ross, A.W., Morgan, P.J., and McCaffery, P. (2012). Photoperiodic expression of two RALDH enzymes and the regulation of cell proliferation by retinoic acid in the rat hypothalamus. *J Neurochem* *122*, 789–799.
- Shinomiya, A., Shimmura, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., and Yoshimura, T. (2014). Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone. *Front Endocrinol (Lausanne)* *5*, 12.
- Shuboni, D., and Yan, L. (2010). Nighttime dim light exposure alters the responses of the circadian system. *Neuroscience* *170*, 1172–1178.
- Siffre, M. (1965). *Beyond Time* (Chatto and Windus).
- Silver, R., and Rainbow, M. (2013). The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timekeeping System of the Body. In *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, D.W. Pfaff, ed. (New York, NY: Springer), pp. 1847–1888.
- Simonneaux, V. (2020). A Kiss to drive rhythms in reproduction. *Eur. J. Neurosci.* *51*, 509–530.
- Simonneaux, V., and Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* *55*, 325–395.
- Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V.J., and Gauer, F. (2013). Kisspeptins and RFRP-3 Act in Concert to Synchronize Rodent Reproduction with Seasons. *Front Neurosci* *7*, 22.
- Smith, J.M., Hechtman, A., and Swann, J. (2010a). Fluctuations in cellular proliferation across the light/dark cycle in the subgranular zone of the dentate gyrus in the adult male Syrian hamster. *Neurosci. Lett.* *473*, 192–195.
- Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2006). KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* *18*, 298–303.
- Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., and Clarke, I.J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* *148*, 1150–1157.
- Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., et al. (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* *149*, 5770–5782.
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., and Clarke, I.J. (2011). Kisspeptin Is Essential for the Full Preovulatory LH Surge and Stimulates GnRH Release from the Isolated Ovine Median Eminence. *Endocrinology* *152*, 1001–1012.

- Smith, J.T., Young, I.R., Veldhuis, J.D., and Clarke, I.J. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) secretion into the ovine hypophyseal portal system. *Endocrinology* *153*, 3368–3375.
- Smith, M.S., True, C., and Grove, K.L. (2010b). The neuroendocrine basis of lactation-induced suppression of GnRH: role of kisspeptin and leptin. *Brain Res* *1364*, 139–152.
- Smith, R.A., Gagné, M., and Fraser, K.C. (2021). Pre-migration artificial light at night advances the spring migration timing of a trans-hemispheric migratory songbird. *Environ Pollut* *269*, 116136.
- Song, C.K., and Bartness, T.J. (1996). The effects of anterior hypothalamic lesions on short-day responses in Siberian hamsters given timed melatonin infusions. *J Biol Rhythms* *11*, 14–26.
- Southwood, A.L., Darveau, C.A., and Jones, D.R. (2003). Metabolic and cardiovascular adjustments of juvenile green turtles to seasonal changes in temperature and photoperiod. *J Exp Biol* *206*, 4521–4531.
- St Germain, D.L., Galton, V.A., and Hernandez, A. (2009). Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* *150*, 1097–1107.
- Staples, J.F. (2016). Metabolic Flexibility: Hibernation, Torpor, and Estivation. *Compr Physiol* *6*, 737–771.
- Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *69*, 1583–1586.
- Stetson, M.H., and Watson-Whitmyre, M. (1986). Effects of exogenous and endogenous melatonin on gonadal function in hamsters. *J Neural Transm Suppl* *21*, 55–80.
- Stetson, M.H., Rollag, M.D., Watson-Whitmyre, M., and Tate-Ostroff, B. (1983). The effect of daily injections and constant release implants of melatonin on the endogenous pineal melatonin rhythm in golden hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med* *174*, 119–122.
- Stevenson, T.J., Bernard, D.J., McCarthy, M.M., and Ball, G.F. (2013). Photoperiod-dependent regulation of gonadotropin-releasing hormone 1 messenger ribonucleic acid levels in the songbird brain. *Gen Comp Endocrinol* *190*, 81–87.
- Stoney, P.N., Helfer, G., Rodrigues, D., Morgan, P.J., and McCaffery, P. (2016). Thyroid hormone activation of retinoic acid synthesis in hypothalamic tanycytes. *Glia* *64*, 425–439.
- Sulzman, F.M., Ellman, D., Fuller, C.A., Moore-Ede, M.C., and Wassmer, G. (1984). Neurospora circadian rhythms in space: a reexamination of the endogenous-exogenous question. *Science* *225*, 232–234.
- Suttie, J.M., Fennessy, P.F., Corson, I.D., Laas, F.J., Elgar, H.J., and Lapwood, K.R. (1989). LH and testosterone responses to GnRH in red deer (*Cervus elaphus*) stags kept in a manipulated photoperiod. *J Reprod Fertil* *85*, 213–219.
- Suzuki, T., and Abe, T. (2008). Thyroid hormone transporters in the brain. *Cerebellum* *7*, 75–83.
- Talbi, R., Klosen, P., Laran-Chich, M.-P., El Ouezzani, S., and Simonneaux, V. (2016a). Coordinated seasonal regulation of metabolic and reproductive hypothalamic peptides in the desert jerboa. *J. Comp. Neurol.* *524*, 3717–3728.

Talbi, R., Laran-Chich, M.-P., Magoul, R., El Ouezzani, S., and Simonneaux, V. (2016b). Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa. *Sci Rep* 6, 36057.

Tamarkin, L., Westrom, W.K., Hamill, A.I., and Goldman, B.D. (1976). Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology* 99, 1534–1541.

Tamarkin, L., Hollister, C.W., Lefebvre, N.G., and Goldman, B.D. (1977). Melatonin induction of gonadal quiescence in pinealectomized Syrian hamsters. *Science* 198, 953–955.

Tavolaro, F.M., Thomson, L.M., Ross, A.W., Morgan, P.J., and Helfer, G. (2015). Photoperiodic Effects on Seasonal Physiology, Reproductive Status and Hypothalamic Gene Expression in Young Male F344 Rats. *J Neuroendocrinol* 27, 79–87.

Tendler, A., Bar, A., Mendelsohn-Cohen, N., Karin, O., Korem Kohanim, Y., Maimon, L., Milo, T., Raz, M., Mayo, A., Tanay, A., et al. (2021). Hormone seasonality in medical records suggests circannual endocrine circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.

Thrun, L.A., Dahl, G.E., Evans, N.P., and Karsch, F.J. (1997). A critical period for thyroid hormone action on seasonal changes in reproductive neuroendocrine function in the ewe. *Endocrinology* 138, 3402–3409.

Tournois, J. (1912). Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre déterminées par des semis haitifs. *CR Acad. Sci. Paris* 155, 297–300.

Travaglio, M., and Ebling, F.J.P. (2019). Role of hypothalamic tanycytes in nutrient sensing and energy balance. *Proc Nutr Soc* 78, 272–278.

Tsutsui, K. (2009). A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol* 88, 76–88.

Tsutsui, K., and Ubuka, T. (2020). Discovery of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), progress in GnIH research on reproductive physiology and behavior and perspective of GnIH research on neuroendocrine regulation of reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 514, 110914.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., and Sharp, P.J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 661–667.

Turkowska, E., Majewski, P.M., Rai, S., and Skwarlo-Sonta, K. (2014). Pineal oscillator functioning in the chicken--effect of photoperiod and melatonin. *Chronobiol Int* 31, 134–143.

Ubuka, T., Bentley, G.E., Ukena, K., Wingfield, J.C., and Tsutsui, K. (2005). Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3052–3057.

Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., and Tsutsui, K. (2012a). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153, 373–385.

Ubuka, T., Son, Y.L., Tobari, Y., and Tsutsui, K. (2012b). Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 148.

- Urban, M.C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science* 348, 571–573.
- Urbanski, H.F., Simpson, S.M., Ellis, D.H., and Follett, B.K. (1983). Secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in castrated golden hamsters during exposure to various photoperiods and to natural daylengths. *J Endocrinol* 99, 379–386.
- Urbanski, H.F., Doan, A., and Pierce, M. (1991). Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol Reprod* 44, 687–692.
- Van Doren, B.M., Horton, K.G., Dokter, A.M., Klinck, H., Elbin, S.B., and Farnsworth, A. (2017). High-intensity urban light installation dramatically alters nocturnal bird migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 11175–11180.
- Varpe, Ø. (2017). Life History Adaptations to Seasonality. *Integrative and Comparative Biology* 57, 943–960.
- Verin, M., Bourg, S., Menu, F., and Rajon, E. (2017). The Biased Evolution of Generation Time. *Am Nat* 190, E28–E39.
- Viguié, C., Battaglia, D.F., Krasa, H.B., Thrun, L.A., and Karsch, F.J. (1999). Thyroid hormones act primarily within the brain to promote the seasonal inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology* 140, 1111–1117.
- Visser, M.E., Gienapp, P., Husby, A., Morrissey, M., de la Hera, I., Pulido, F., and Both, C. (2015). Effects of spring temperatures on the strength of selection on timing of reproduction in a long-distance migratory bird. *PLoS Biol* 13, e1002120.
- Vuarin, P., and Henry, P.-Y. (2014). Field evidence for a proximate role of food shortage in the regulation of hibernation and daily torpor: a review. *J Comp Physiol B* 184, 683–697.
- Vukovic, J., Blackmore, D.G., Jhaveri, D., and Bartlett, P.F. (2011). Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. *Neurochem Int* 59, 341–346.
- Wade, G.N., and Bartness, T.J. (1984). Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight, and body composition in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 246, R26–30.
- Wade, G.N., Bartness, T.J., and Alexander, J.R. (1986). Photoperiod and body weight in female Syrian hamsters: skeleton photoperiods, response magnitude, and development of photorefractoriness. *Physiol Behav* 37, 863–868.
- Wagner, G.C., Johnston, J.D., Tournier, B.B., Ebling, F.J.P., and Hazlerigg, D.G. (2007). Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* 25, 485–490.
- Walker, J.M., and Berger, R.J. (1980). Sleep as an adaptation for energy conservation functionally related to hibernation and shallow torpor. *Prog Brain Res* 53, 255–278.
- Walker, W.H., Meléndez-Fernández, O.H., Nelson, R.J., and Reiter, R.J. (2019). Global climate change and invariable photoperiods: A mismatch that jeopardizes animal fitness. *Ecology and Evolution* 9, 10044–10054.

- Wallis, K., Dudazy, S., van Hogerlinden, M., Nordström, K., Mittag, J., and Vennström, B. (2010). The thyroid hormone receptor alpha1 protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1904–1916.
- Walton, J.C., Pyter, L.M., Weil, Z.M., and Nelson, R.J. (2012). Photoperiod mediated changes in olfactory bulb neurogenesis and olfactory behavior in male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *PLoS One* *7*, e42743.
- Warner, A., and Mittag, J. (2012). Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *J. Mol. Endocrinol.* *49*, R29-35.
- Watanabe, M., Yasuo, S., Watanabe, T., Yamamura, T., Nakao, N., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2004). Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* *145*, 1546–1549.
- Weaver, D.R. (1998). The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms* *13*, 100–112.
- Weaver, D.R., Liu, C., and Reppert, S.M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* *10*, 1478–1487.
- Webster, J.R., Moenter, S.M., Barrell, G.K., Lehman, M.N., and Karsch, F.J. (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* *129*, 1635–1643.
- Wehr, T.A. (1991). The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J Clin Endocrinol Metab* *73*, 1276–1280.
- Wever, R. (1975a). Autonomous circadian rhythms in man. Singly versus collectively isolated subjects. *Naturwissenschaften* *62*, 443–444.
- Wever, R. (1975b). The circadian multi-oscillatory system of man. *Int J Chronobiol* *3*, 19–55.
- Wilkins, M.B. (1960). The Effect of Light upon Plant Rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* *25*, 115–129.
- Williams, G.R. (2000). Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  Isoforms. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 8329–8342.
- Williams, L.M., and Morgan, P.J. (1988). Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J. Endocrinol.* *119*, R1-3.
- Willmott, N.J., Henneken, J., Selleck, C.J., and Jones, T.M. (2018). Artificial light at night alters life history in a nocturnal orb-web spider. *PeerJ* *6*, e5599.
- Winkler, D., Pjrek, E., Iwaki, R., and Kasper, S. (2006). Treatment of seasonal affective disorder. *Expert Rev Neurother* *6*, 1039–1048.
- Wittkowski, W., Bergmann, M., Hoffmann, K., and Pera, F. (1988). Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res.* *251*, 183–187.

- Wolfson, A. (1947). Fat deposition as a response to photoperiodism in migratory birds. *Anat Rec* 99, 600.
- Wolfson, A., and Winn, H.S. (1948). Summation of day lengths as the external stimulus for photoperiodic responses in birds. *Anat Rec* 101, 720.
- Wood, S., and Loudon, A. (2014). Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *J Endocrinol* 222, R39-59.
- Wurtman, R.J., Axelrod, J., and Phillips, L.S. (1963). Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Control by Light. *Science* 142, 1071–1073.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., and Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol.* 192, 251–264.
- Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2004). Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology* 145, 4264–4267.
- Yamamura, T., Yasuo, S., Hirunagi, K., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2006). T(3) implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res* 324, 175–179.
- Yang, J.A., Hughes, J.K., Parra, R.A., Volk, K.M., and Kauffman, A.S. (2018). Stress rapidly suppresses in vivo LH pulses and increases activation of RFRP-3 neurons in male mice. *J Endocrinol* 239, 339–350.
- Yasuo, S., Watanabe, M., Nakao, N., Takagi, T., Follett, B.K., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2005). The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology* 146, 2551–2554.
- Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Nakamura, T.J., Watanabe, T., Takagi, T., Ono, H., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2007). Differential response of type 2 deiodinase gene expression to photoperiod between photoperiodic Fischer 344 and nonphotoperiodic Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R1315-1319.
- Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., and Korf, H.-W. (2009). Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J. Neurosci.* 29, 2885–2889.
- Yeates, N.T.M. (1949). The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *The Journal of Agricultural Science* 39, 1–43.
- Yen, P.M., Feng, X., Flamant, F., Chen, Y., Walker, R.L., Weiss, R.E., Chassande, O., Samarut, J., Refetoff, S., and Meltzer, P.S. (2003). Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep* 4, 581–587.
- Yeo, S.-H., Kyle, V., Morris, P.G., Jackman, S., Sinnott-Smith, L.C., Schacker, M., Chen, C., and Colledge, W.H. (2016). Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J Neuroendocrinol* 28.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., and Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426, 178–181.

Young, R.A. (1976). Fat, Energy and Mammalian Survival. *Am Zool* 16, 699–710.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O’Keeffe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34, 11929–11947.

Zhang, Z., Silveyra, E., Jin, N., and Ribelayga, C.P. (2018). A congenic line of the C57BL/6J mouse strain that is proficient in melatonin synthesis. *J. Pineal Res.* 65, e12509.

Zimova, M., Mills, L.S., and Nowak, J.J. (2016). High fitness costs of climate change-induced camouflage mismatch. *Ecol Lett* 19, 299–307.

Zimova, M., Hackländer, K., Good, J.M., Melo-Ferreira, J., Alves, P.C., and Mills, L.S. (2018). Function and underlying mechanisms of seasonal colour moulting in mammals and birds: what keeps them changing in a warming world? *Biol Rev Camb Philos Soc* 93, 1478–1498.



# Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of *Rfrp* gene expression in mice

Clarisse Quignon<sup>1</sup> | Matthew Beymer<sup>1</sup> | Karine Gauthier<sup>2</sup> | François Gauer<sup>1</sup> |

Valérie Simonneaux<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (CNRS UPR 3212), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, Univ Lyon, ENS de Lyon, INRAE, CNRS, Lyon, France

## Correspondence

Valérie Simonneaux, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Université de Strasbourg, 8 allée du général Rouvillois, Strasbourg 67000, France.

Email: [simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr)

## Funding information

Agence Nationale de la Recherche (ANR), Grant/Award Number: ANR-13-BSV1-001

## Abstract

Mammals adapt to seasons using a neuroendocrine calendar defined by the photoperiodic change in the nighttime melatonin production. Under short photoperiod, melatonin inhibits the *pars tuberalis* production of TSH $\beta$ , which, in turn, acts on tanycytes to regulate the deiodinase 2/3 balance resulting in a finely tuned seasonal control of the intra-hypothalamic thyroid hormone T3. Despite the pivotal role of this T3 signaling for synchronizing reproduction with the seasons, T3 cellular targets remain unknown. One candidate is a population of hypothalamic neurons expressing *Rfrp*, the gene encoding the RFRP-3 peptide, thought to be integral for modulating rodent's seasonal reproduction. Here we show that nighttime melatonin supplementation in the drinking water of melatonin-deficient C57BL/6J mice mimics photoperiodic variations in the expression of the genes *Tshb*, *Dio2*, *Dio3*, and *Rfrp*, as observed in melatonin-proficient mammals. Notably, we report that this melatonin regulation of *Rfrp* expression is no longer observed in mice carrying a global mutation of the T3 receptor, TR $\alpha$ , but is conserved in mice with a selective neuronal mutation of TR $\alpha$ . In line with this observation, we find that TR $\alpha$  is widely expressed in the tanycytes. Altogether, our data demonstrate that the melatonin-driven T3 signal regulates RFRP-3 neurons through non-neuronal, possibly tanycytic, TR $\alpha$ .

## KEYWORDS

deiodinase, neuropeptides, seasonal rhythms, tanycytes, TSH

## 1 | INTRODUCTION

Most species adjust biological and behavioral functions to align with the seasonal variations of their environment. This adaptive process is particularly critical to ensure that birth and weaning of the offspring occur around springtime when

environmental conditions are optimal for survival. Early studies, mostly performed on seasonal breeders such as Syrian or Siberian hamsters, and sheep, have highlighted the pivotal role of the hormone melatonin in synchronizing physiology with the seasons.<sup>1,2</sup> Indeed, under the control of the master hypothalamic clock, melatonin synthesis occurs at night only

**Abbreviations:** a.u., arbitrary unit; DEPC, diethyl pyrocarbonate; Dio2/3, deiodinase 2/3; DMH, dorsomedial hypothalamus; KO, knock-out; Kp, kisspeptin; L/D, light/dark; LP, long photoperiod; NaN<sub>3</sub>, sodium azide; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; RFRP-3, (Arg)-(Phe)-related peptide 3; SEM, standard error of the mean; SP, short photoperiod; SSC, saline sodium citrate; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; TBI, tris imidazole buffer; TBS, tris-buffered saline; TR $\alpha$ , thyroid hormone receptor alpha; TSH $\beta$ , thyroid-stimulating hormone beta subunit.

© 2020 Federation of American Societies for Experimental Biology

so that in long winter nights (or short photoperiod, SP) melatonin production is longer than in short summer nights (or long photoperiod, LP). Numerous experiments of pineal lesions or exogenous melatonin administration have formally demonstrated that it is the duration of nocturnal melatonin release which triggers the physiological response to seasonal change.<sup>3</sup>

In the last 15 years, major progress has been made in determining how this melatonin signal is integrated.<sup>3,4</sup> The long SP melatonin peak inhibits the expression of the  $\beta$  subunit of thyroid-stimulating hormone gene (*Tshb*) in the pituitary *pars tuberalis* so that the melatonin signal is decoded into photoperiodic changes in TSH production with higher levels in LP compared to SP.<sup>5,6</sup> *Pars tuberalis* TSH, in turn, binds to receptors located on the tanycytes, specific glial cells lining the basal part of the third ventricle, triggering an increase in *deiodinase 2* (*Dio2*), and a decrease in *deiodinase 3* (*Dio3*) gene expression.<sup>7-14</sup> As *Dio2* converts thyroxine (T4) to the bioactive triiodothyronine (T3) and *Dio3* inactivates T3, the melatonin-driven TSH-induced switch in *Dio2/Dio3* leads to higher level of intra-hypothalamic T3 in LP as compared to SP. This photoperiodic change in the TSH/T3 signal is pivotal for the seasonal synchronization of reproduction along with body weight and temperature.<sup>10,14-16</sup> However, until now the cellular targets through which T3 synchronizes reproductive and metabolic functions have not yet been established.

Our previous studies have demonstrated the pivotal role of two neuropeptides known to regulate the activity of the GnRH neurons: kisspeptin (Kp), expressed in neurons of the arcuate nuclei, and arginine-phenylalanine-amide-related peptide 3 (RFRP-3), expressed by neurons in the dorsomedial hypothalamus (DMH).<sup>17,18</sup> Both neuropeptides exhibit robust photoperiodic variations, with a highly conserved SP-inhibition of RFRP-3 expression across seasonal species. Chronic central infusion of Kp<sup>19,20</sup> or RFRP-3<sup>21,22</sup> is able to restore the gonadal activity of hamsters kept under inhibitory SP conditions. Furthermore, chronic central administration of TSH in SP-adapted hamsters not only restores the LP-phenotype of gonadal activity but also that of Kp and RFRP-3 expression.<sup>14</sup> From these observations, we hypothesized that the melatonin-controlled hypothalamic T3 could act directly on Kp or RFRP-3 neurons to regulate seasonal reproduction.

The lack of genetically modifiable seasonal models such as hamsters or sheep has strongly hampered the investigation into the cellular and molecular mechanisms of seasonality. Unfortunately, the classic mouse models using C57BL/6J mice are melatonin-deficient and melatonin proficient strains of mice such as CBA/N and C3H do not express overt seasonal phenotype. C57BL/6J mice, however, express melatonin receptors and acute melatonin administration have been shown to regulate *Tshb* and *Dio2/3* expression.<sup>11</sup> In this study, we hypothesized that genetically modified C57BL/6J mice may help us better understand the molecular mechanism

underlying melatonin action on the hypothalamic circuits regulating reproduction. We first showed that the expression of *Tshb* and *Dio2/3* as well as *Rfrp*, the gene encoding RFRP-3, are regulated by the exogenous administration of melatonin with nighttime (SP-like) in C57BL/6J mice, in a similar way as in CBA mice exposed to SP. Further, we demonstrated that a global, but not a neuron-specific, mutation of the thyroid-hormone receptor alpha (*TR $\alpha$* ) in C57BL/6J mice, selectively abolishes the melatonin regulation of *Rfrp* expression, but not that of *Tshb* and *Dio2/Dio3*. Finally, we found that *TR $\alpha$*  is widely co-expressed with vimentin in the tanycytes. Altogether our studies indicate that non-neuronal T3 signaling, possibly in the *TR $\alpha$* -expressing tanycytes, is required for the melatonin regulation of *Rfrp* expressing neurons.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals

Adult male mice of different strains were used in this study: CBA/N and C57BL/6J wild type (WT) (purchased from Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), C57BL/6J with a global knock-out (KO) of *Thra*, the gene encoding *TR $\alpha$*  (*Thra*<sup>0/0</sup>) or their control littermate (*Thra*<sup>+/+</sup>)<sup>23</sup> and C57BL/6J with a neuronal-specific expression of *TR $\alpha$* <sup>L400R</sup>, a dominant-negative form of *TR $\alpha$*  (*Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup>) or their control littermates (*Thra*<sup>AMI/+</sup>)<sup>24,25</sup>, both provided by the Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon. The *Cre3* mouse line<sup>26</sup> presents *Cre* expression and activity in neurons but not in glial cells, and the percentage of neurons expressing *Cre* depends on the brain areas with a particularly high level in the hypothalamus.<sup>25</sup> In the *Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup> mice, the *Thra* modification induces the expression of the *TR $\alpha$* <sup>L400R</sup> mutant receptor, and despite the persistence of an intact *Thra* allele, the dominant-negative influence of *TR $\alpha$* <sup>L400R</sup> eliminates any capacity of the cells to respond to T3.<sup>24</sup> In order to verify the phenotype of the mutated mice, we performed dual immunohistochemistry of *TR $\alpha$*  and RFRP-3 in two *Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup> and observed, as expected, a strikingly low expression of *TR $\alpha$*  in the mediobasal hypothalamus and no colocalization of *TR $\alpha$*  with RFRP-3 (data not shown).

Mice were housed in approved type II cages with food and water ad libitum, at 20°C  $\pm$  1°C, under 12 hours white light/12 hours red light (12 hours L/12 hours D) photoperiod for at least 1 week before experimentation. The first experiment investigated the effect of photoperiod in melatonin proficient and deficient mice: CBA/N and C57BL/6J WT were kept in LP (16 hours L/8 hours D) or SP (8 hours L/16 hours D) for 6 weeks (n = 6 for each of the 4 groups). The second experiment investigated the effect of nighttime exposure to exogenous melatonin in mice mutated for *TR $\alpha$*  (*Thra*<sup>0/0</sup> and *Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup>) or their negative littermates (*Thra*<sup>+/+</sup>)

and *Thra*<sup>AMI/+</sup>): mice (n = 5-7 per group) were placed in SP (10 hours L/14 hours D; here SP night was reduced to 14 hours to obtain a melatonin peak duration similar to that observed in 8 hours L/16 hours D adapted Syrian hamsters and melatonin proficient mice<sup>27,28</sup>) and were given drinking water containing either melatonin (80 mg/L in 0.1% ethanol) or vehicle (0.1% ethanol) during the night and pure water during the day for at least 6 weeks. This protocol allowed a 4-fold higher nighttime circulating melatonin concentration in mice drinking melatonin as compared to mice drinking vehicle (337,89 pg/mL vs 85,97 pg/mL,  $P = .0386$ , measured by radioimmunoassay<sup>29</sup>). Although our preliminary data confirmed those of Ono et al.<sup>11</sup> that acute injection of melatonin per day is sufficient to trigger a response in the PT and hypothalamus (data not shown), we decided to perform the long term melatonin administration in the drinking water for physiological and practical reasons. Experiments were conducted in accordance with the French National Law implementing the European Communities Council Directive 2010/63/EU and the French Directive 2013-118. All procedures were validated by the Animal Welfare Committee of the Animal Resource and Experimentation platform (Chronobiotron UMS 3415) of the Strasbourg Institute of Neuroscience.

## 2.2 | Tissue sampling

At the end of the experiment, animals were euthanized in the morning (from 1 to 4 hours after lights on) by CO<sub>2</sub> inhalation. Body weight was measured and testis were dissected and weighed, animals were then transcardiacally perfused first with 10 mL of phosphate-buffered saline (PBS) then 20 mL of periodate-lysine-paraformaldehyde fixative solution.<sup>30</sup> Brains were extracted, conserved in the fixative solution for 12 hours then dehydrated through an ethanol gradient, and embedded in polyethylene glycol.<sup>31</sup> Serial 12  $\mu$ m-thin coronal sections were made with a microtome from the preoptic area to the posterior hypothalamus. For each animal, serial sections were dispatched on 10 SuperFrost Plus slides (Thermo Scientific, MA, USA) in order to have 14 to 18 sections spanning the area of interest per slide. Brain sections were dried 15 minutes at 60°C and stored either at -80°C for in situ hybridization or at 4°C in Tris-buffered saline (TBS) with 0.02% sodium azide (NaN<sub>3</sub>) for immunohistochemistry.

## 2.3 | Non-radioactive in situ hybridization

In situ hybridization was performed with 300 to 400 nucleotide-long antisense riboprobes selective for mouse *Tshb* (NM\_009432.2), *Dio2* (NM\_010050.4), *Dio3* (NM\_172119.2), *Rfrp* (NM\_021892.1) and rat *kiss1* (NM\_181692.1) validated on mouse tissue and labeled with

digoxigenin (DIG RNA labeling kit, Roche, Meylan, France) according to Klosen et al.<sup>14</sup> Briefly, brain sections were post-fixed in formaldehyde 4% in phosphate buffer (PB) for 10 minutes at room temperature, washed with PBS, treated by 0.5  $\mu$ g/mL of proteinase K (Roche) for 30 minutes at 37°C, washed with cold PBS, post-fixed in formaldehyde 2% in PB, washed in PBS + 0.01% diethyl pyrocarbonate (DEPC), acetylated twice for 10 minutes in 100 mM triethanolamine with, respectively, 0.25% and 0.5% acetic anhydride, washed with PBS + 0.01% DEPC, equilibrated in 5X saline sodium citrate (SSC) + 0.05% Tween 20 + 0.01% DEPC twice for 5 minutes at room temperature, and finally incubated for 48 hours at 60°C with 1% (about 200 ng/mL) riboprobes in a hybridization buffer containing 50% formamide + 5X SSC + 5X Denhardt's solution + 1 mg/mL of salmon DNA + 0.1% Tween 20 + 0.04% DEPC. Slides were then washed once in 5X SSC + 0.05% Tween 20 + 0.01% DEPC buffer, and post-hybridization was performed at high stringency to reduce non-specific labeling in a 0.01X SSC + 0.05% Tween 20 solution at 72°C for 6  $\times$  10 minutes. Slides were washed once in A-DIG + 0.05% Tween 20 solution, incubated with blocking buffer (Roche) + 0.02% azide (BBT) for 1 hour, and riboprobe labeling was detected by an overnight incubation with an anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (AP, Roche; 1/5000 in BBT). Thereafter, slides were washed once in A-DIG + 0.05% Tween 20 solution then equilibrated in AP buffer. AP activity was visualized with a mixture of nitro blue tetrazolium (NBT)/bromo-chloro-indolyl phosphate (BCIP) in AP buffer for 1 to 7 hours depending on the probes and stopped with pure water before the staining intensity reached saturation. Slides were then covered with Crystal Mount premounting media (Sigma Aldrich, MO, USA) and coverslipped with Eukitt (Sigma Aldrich).

## 2.4 | Immunohistochemistry

The *Tshb* mRNA level being very low in the C57BL/6J mice *pars tuberalis*, we performed the immunohistochemical detection of the TSH $\beta$  protein to study melatonin-dependent variations of TSH $\beta$  expression in these mouse strains, given the tight correlation between *Tshb* mRNA and protein levels.<sup>6</sup> Immunolabeling of TSH $\beta$  was performed at room temperature using an avidin-biotin system of detection. Brain sections were pretreated with a blocking reagent (TBS + 3% powder milk + 0.02% NaN<sub>3</sub>) for 1 hour, incubated overnight with the primary TSH $\beta$  antibody (rabbit anti-TSH $\beta$  antibody; National Hormone and Pituitary Program AFP-12747891; diluted at 1/65 000 in TBS + 0.05% Tween 20 + 1% donkey serum), washed in TBS + 0.02% Tween 20, and finally incubated with a biotinylated secondary antibody (donkey anti-rabbit bio; Jackson ImmunoResearch, PA, USA; diluted at 1/2000 in

TBS + 0.05% Tween 20 + 1% donkey serum) for 1 hour. After washing in TBS + 0.02% Tween 20, the signal was amplified by a 1 hour incubation of neutravidin-horseradish peroxidase solution (HRP; Thermo Scientific; 1/2000 in TBS + 0.02% Tween 20 + 0.2% cold water fish gelatin). Sections were washed twice in TBS + 0.02% Tween 20, then once in Tris-Imidazole buffer (TBI) buffer and then HRP activity was detected with a 30 minutes incubation in 1% diaminobenzidine (DAB) + 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBI buffer. Finally, brain sections were dehydrated by 5 minutes incubation in solutions of increasing alcohol concentration (from 70% to 100%), and coverslipped with Eukitt.

In order to look for TR $\alpha$  localization in tanycytes, we performed dual immunohistochemical labeling of TR $\alpha$  with the tanycyte marker vimentin in C57BL/6J mice. Brain sections were first treated for an antigen reactivation in citrate buffer (pH 6.0) for 1 hour at 95°C, washed twice in PBS, pretreated with the blocking reagent for 1 hour, and incubated with the primary TR $\alpha$  antibody (rabbit anti-TR $\alpha$  antibody; tested<sup>32</sup> and kindly provided by Dr L. Dufourny (INRA, Nouzilly); diluted at 1/250 in TBS + 0.20% triton X100 + 1% donkey serum) for 48 hours at 4°C, washed in TBS + 0.02% Tween 20, and finally incubated with an Alexa 594 secondary antibody (donkey anti-rabbit Alexa594; Invitrogen, CA, USA; diluted at 1/1000 in TBS + 0.05% Tween 20 + 1% donkey serum) for 1 hour. After two washing with TBS, the vimentin labeling was performed following the same protocol than for TSH $\beta$  immunolabeling using a vimentin primary antibody (chicken anti-vimentin antibody; Merck, Darmstadt, Germany; diluted at 1/5000), a biotinylated anti-chicken secondary antibody (anti-chicken bio; Jackson ImmunoResearch; diluted at 1/2000), and HRP activity detection was performed by hapten-conjugated tyramides (diluted at 1/500 in PBS + 100 mM imidazole + 0.001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Slides were washed with PBS, covered with Crystal Mount, and coverslipped with Eukitt.

Labeling of both TSH $\beta$  and TR $\alpha$ /vimentin was observed with an optic microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) equipped with a fluorescent lamp (Leica Microsystems) to visualize fluorescent staining.

## 2.5 | Data analysis and statistics

For each gene/protein investigated, brain sections of all animals of a given experimental group were processed similarly (treatments for labeling, optical microscope setting, and analysis). Signal quantification was performed by a person unaware of the animal's experimental condition.

For the quantification of *Kiss1* and *Rfrp* expression, the total number of labeled neurons in all sections of an individual hypothalamus was counted manually with an optic microscope (Leica Microsystems), equipped with

an Olympus camera (Olympus France, Rungis, France, x20). For each animal, data are given as the total number of counted labeled neurons. For the quantification of *Tshb*, *Dio2*, and *Dio3*, the intensity of the signal was quantified with the ImageJ software (W. S. Rasband, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), on pictures taken with an optic microscope equipped with camera (Leica Microsystems, x10). All pictures for a given gene were taken with the same microscope and camera setting parameters and a background image without section was taken for each slide and subtracted to overcome any irregularities of illumination of the picture field. Signal intensity was measured by calculating the mean pixel grey value (arbitrary unit) of a line covering the entire *pars tuberalis* for *Tshb*, and the  $\beta$  and  $\alpha$  tanycytes for *Dio2* and *Dio3*, respectively. For each animal, data result from the mean of signal intensity measured on three selected sections of the area of interest.

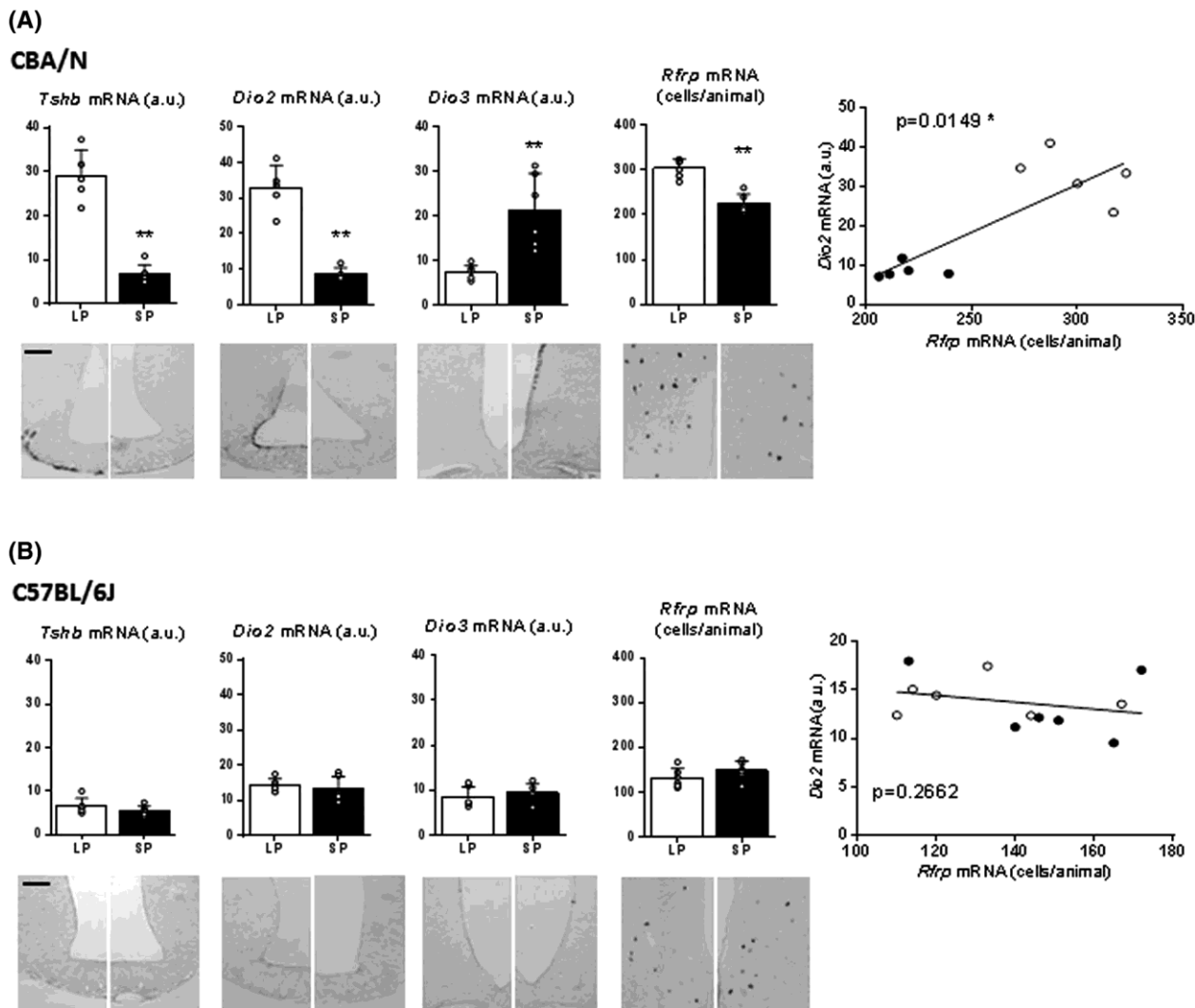
All data are presented as mean  $\pm$  SEM of four to seven animals per experimental group. Graphs and statistical analysis were performed with GraphPad 6.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Variance homogeneity and normality were tested and an adapted Mann-Whitney non-parametric test was performed to analyze the mean differences of expression for each gene and a non-parametric Spearman test was performed to analyze the correlation between *Dio2* and *Rfrp* expression.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Differential photoperiodic gene regulation between melatonin-proficient (CBA/N) and melatonin-deficient (C57BL/6J) mice

In order to assess how photoperiod regulates expression of *Tshb* in the *pars tuberalis*, *Dio2* and *Dio3* in the tanycytes, and *Rfrp* and *Kiss1* in the hypothalamus of both melatonin proficient and melatonin deficient mice, both CBA/N and C57BL/6J were exposed to either LP (16L/8D) or SP (8L/16D) conditions for 6 weeks. SP exposed CBA/N mice exhibited robust inhibition of *Tshb*, *Dio2*, and *Rfrp* expression, and induction of *Dio3* expression as compared to LP exposed CBA/N mice (Figure 1A). In contrast, in the C57BL/6J mice, none of these genes showed a photoperiodic change in their expression (Figure 1B). Moreover, in CBA/N mice *Dio2* expression is strongly correlated with the number of *Rfrp* expressing neurons whereas there is no such correlation in C57BL/6J mice (Figure 1A,B). No photoperiodic change in *Kiss1* expression and the weight of body, testis, and seminal vesicles have been observed in the two mouse strains (data not shown).





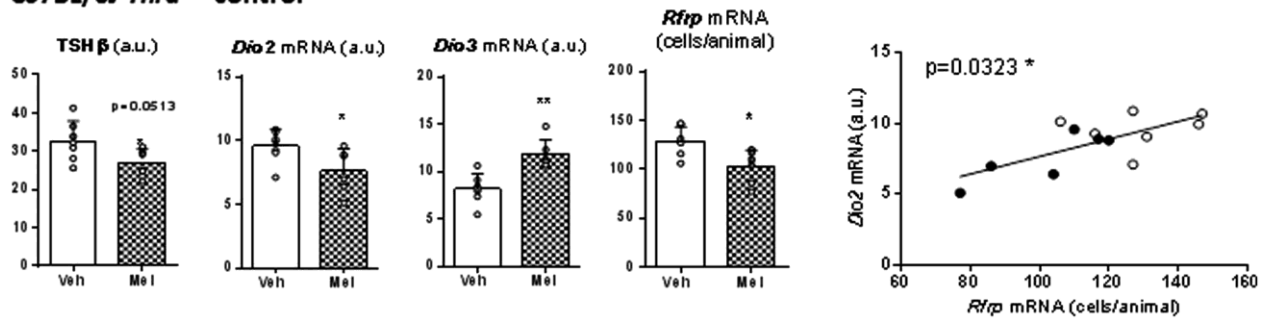
**FIGURE 1** Effect of photoperiod on *Tshb* in the *pars tuberalis*, *Dio2*, and *Dio3* in the tanycytes, and *Rfrp* in the dorsomedial hypothalamus of melatonin proficient CBA/N and melatonin deficient C57BL/6J mice. CBA/N (A) and C57BL/6J (B) adult male mice were exposed to either long (LP: 16h light/8h dark, white bars) or short (SP: 8h light/16h dark, black bars) photoperiod for 6 weeks. Expression of *TSHβ*, *Dio2*, *Dio3*, and *Rfrp* were assessed by non-radioactive in situ hybridization. *TSHβ*, *Dio2*, and *Dio3* values are given as the mean level of grey value in arbitrary unit (a.u.), and *Rfrp* value is given as the total number of labeled cells counted per animal. Data are given as individual values and mean values ± SEM of 5-6 mice; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . Right panels are scatterplot showing the positive correlation between *Dio2* expression and the number of *Rfrp* neurons in CBA/N mice ( $r = .7576$ ;  $r^2 = .5740$ ;  $P = .0149$ ) and lack of correlation in C57BL/6J mice ( $r = -.3497$ ;  $r^2 = .1223$ ;  $P = .2662$ ). Representative photomicrographs of in situ hybridization for *Tshb*, *Dio2*, *Dio3*, and *Rfrp* in SP an LP CBA/N and C57BL/6J are presented under each corresponding plot. Scale bars = 75 μm

### 3.2 | Exogenous melatonin restores SP inhibition of *Rfrp* expression in control *Thra*<sup>+/+</sup> but not *Thra*<sup>0/0</sup> C57BL/6J mice

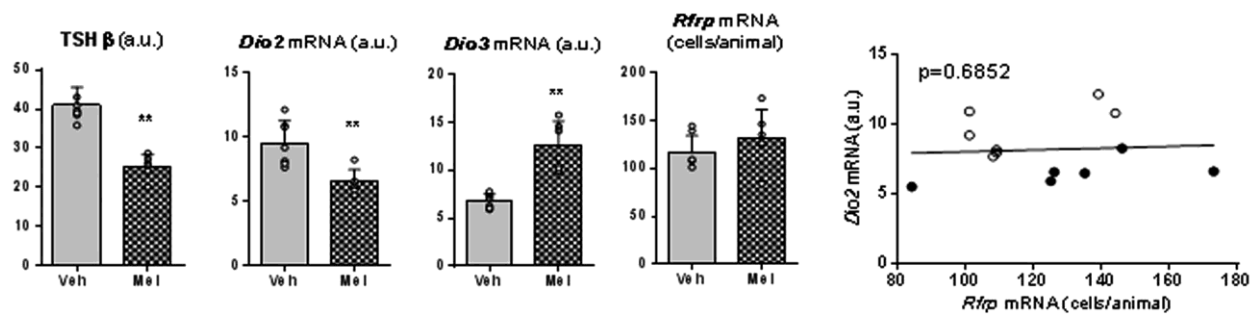
In order to investigate whether melatonin is able to regulate pituitary and hypothalamic gene expression in C57BL/6J mice, exogenous melatonin or vehicle was provided in the drinking water during the dark period. Nighttime melatonin induced a significant decrease in *TSHβ*, *Dio2*, and *Rfrp* expression and a significant increase in *Dio3* expression (Figure 2A), therefore, mimicking the effect of SP in

melatonin proficient CBA/N mice (Figure 1A). To assess whether this melatonin signal integration requires functional TRα, a similar melatonin supplementation was given to mice bearing a complete mutation of TRα. In *Thra*<sup>0/0</sup> mice, melatonin still reduced *TSHβ* and *Dio2* and increased *Dio3* expression but was no longer able to inhibit *Rfrp* expression (Figure 2B). Moreover, while there was a significant correlation between *Dio2* and the number of *Rfrp* expressing neurons in the C57BL/6J WT mice, this correlation no longer existed in the *Thra*<sup>0/0</sup> mice (Figure 2A,B). This result demonstrates the key role of TRα in mediating

(A)

C57BL/6J *Thra*<sup>+/+</sup> control

(B)

C57BL/6J *Thra*<sup>0/0</sup>

**FIGURE 2** Effect of exogenous melatonin on TSHβ in the *pars tuberalis*, *Dio2* and *Dio3* in the tanycytes and *Rfrp* in the dorsomedial hypothalamus in C57BL/6J mice with (*Thra*<sup>0/0</sup>) or without (*Thra*<sup>+/+</sup>) global TRα mutation. C57BL/6J *Thra*<sup>+/+</sup> control (A) and *Thra*<sup>0/0</sup> (B) adult male mice, kept in short photoperiod (SP: 10 hours light/14 hours dark), were given either vehicle (0.1% ethanol in water, plain bars) or melatonin (80 mg/L melatonin, 0.1% ethanol in water, gridded bars) in the drinking water during the dark period and normal water during the light period for at least 6 weeks. Expression of TSHβ was assessed by immunohistochemistry and *Dio2*, *Dio3*, and *Rfrp* by non-radioactive in situ hybridization. TSHβ, *Dio2*, and *Dio3* values are given as the mean level of grey value in arbitrary unit (a.u.), and *Rfrp* value is given as the total number of labeled cells counted per animal. Data are given as individual values and mean values ± SEM of 6-7 mice; \**P* < .05; \*\**P* < .01. Right panels are scatterplot showing the positive correlation between *Dio2* expression and the number of *Rfrp* neurons in C57BL/6J *Thra*<sup>+/+</sup> control mice ( $r = .6025$ ;  $r^2 = .3630$ ;  $P = .0323$ ) and lack of correlation in C57BL/6J *Thra*<sup>0/0</sup> mice ( $r = .1240$ ;  $r^2 = .0154$ ;  $P = .6852$ )

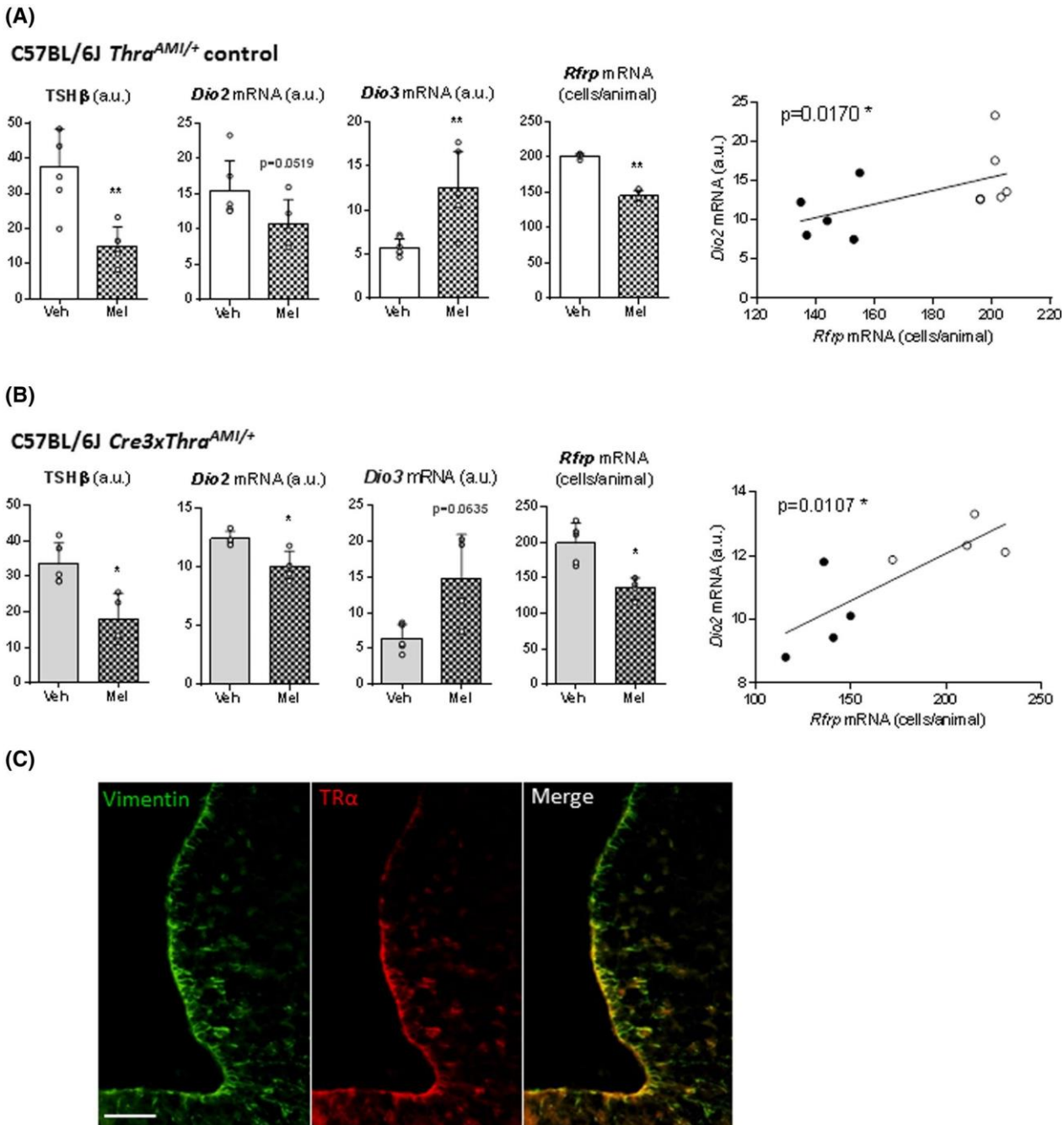
the melatonin-dependent thyroid hormone effects on *Rfrp* expression. As previously observed for the photoperiod experiment, melatonin administration had no effect on *Kiss1* expression and on the weight of body, testis, and seminal vesicles in the two mouse strains (data not shown). Of note, however, and in agreement with earlier observations,<sup>33</sup> *Thra*<sup>0/0</sup> mice appeared more anxious and slightly smaller (body weight =  $24.6 \pm 2.7$ g,  $n = 13$ ) than their control littermate (body weight =  $26.2 \pm 4.1$ g,  $n = 13$ ; Student *t* test  $P = .0409$ ).

### 3.3 | Melatonin inhibits *Rfrp* expression through non-neuronal TRα

As TRα is expressed by various cell types in the nervous system,<sup>34</sup> we further investigated whether TRα-expressing neurons mediate the inhibitory effect of melatonin on *Rfrp*

expression in the DMH RFRP-3 neurons. Nighttime melatonin supplementation in drinking water was thus provided in C57BL/6J mice carrying a selective mutation of *Thra* in neurons (*Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup>) or their control littermate (*Thra*<sup>AMI/+</sup>). In both groups, melatonin similarly regulated TSHβ, *Dio2/3* but also *Rfrp* expression, independently of the presence (Figure 3A) or absence (Figure 3B) of neuronal TRα. Moreover, both groups kept a significant correlation between the expression of *Dio2* and the number of *Rfrp* expressing neurons (Figure 3A,B) therefore indicating a conserved link between *Dio2* and *Rfrp* expression with or without neuronal TRα.

Considering the non-neuronal effect of TRα on *Rfrp* expression, we investigated whether TRα could be expressed in the tanycytes, visualized by a specific vimentin labeling. The dual labeling of TRα and vimentin showed a strong co-localization of both proteins, suggesting that tanycytes could integrate the T3 signal through TRα receptors (Figure 3C).



**FIGURE 3** Effect of exogenous melatonin on TSHβ in the *pars tuberalis*, *Dio2* and *Dio3* in the tanycytes and *Rfrp* in the dorsomedial hypothalamus in C57BL/6J mice with (*Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup>) or without (*Thra*<sup>AMI/+</sup> control) selective neuronal TRα mutation, and dual immunolabeling of TRα with the tanycytic marker vimentin in C57BL/6J mice. C57BL/6J *Thra*<sup>AMI/+</sup> control (A) and *Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup> (B), adult male mice kept in short (SP: 10h light/14h dark) photoperiod, were given either vehicle (0.1% ethanol in water, plain bars) or melatonin (80 mg/L melatonin, 0.1% ethanol in water, gridded bars) in the drinking water during the dark period and normal water during the light period for at least 6 weeks. Expression of TSHβ was assessed by immunohistochemistry and expression of *Dio2*, *Dio3*, and *Rfrp* by non-radioactive in situ hybridization. TSHβ, *Dio2*, and *Dio3* values are given as level of labeling intensity in the region of interest in arbitrary unit (a.u.), and *Rfrp* value is given as the total number of labeled cells counted per animal. Values are given as mean ± SEM of 4-7 mice; \**P* < .05; \*\**P* < .01. Right panels are scatterplot showing the positive correlation between *Dio2* expression and the number of *Rfrp* neurons in C57BL/6J *Thra*<sup>AMI/+</sup> control mice (*r* = .7123; *r*<sup>2</sup> = .5074; *P* = .0323) and in C57BL/6J *Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup> mice (*r* = .8571; *r*<sup>2</sup> = .7346; *P* = .6852). (C) Photomicrographs of immunohistochemical detection of vimentin detected with tyramide (green) and TRα detected with Alexa594 (red) in the tanycyte with the co-labeling shown on the merged image; Scale bar = 50 μm

## 4 | DISCUSSION

Since the discovery of the fundamental role of hypothalamic T3 in relaying seasonal cues to the central nervous system,<sup>7</sup> numerous studies have sought to understand the neuroendocrine pathways linking the annual changes in photoperiod with the central reproductive network. In mammals, melatonin is key to this adaptive process since it drives the seasonal changes in the *pars tuberalis* TSH<sup>13,35</sup> which in turn regulates hypothalamic T3 via a switch in the tancytic *Dio2/Dio3* ratio.<sup>36-38</sup> Further studies then demonstrated that the photoperiodic change in the TSH/T3 signal drives seasonal reproduction through a specific action on Kp and/or RFRP-3 neurons known to regulate GnRH neuronal activity.<sup>14,18,39-41</sup> Despite these major advances in seasonal reproductive physiology, our understanding of the underlying molecular mechanisms involved has been hampered by the lack of relevant genetically modified seasonal animal models.

In this study, we show that mice, although showing no overt seasonal phenotype, can be used to investigate the molecular pathway involved in the melatonin signal integration into the central nervous system. Thus, we reveal that melatonin-proficient CBA/N mice, but not melatonin-deficient C57BL/6J mice, exhibit significant photoperiodic variations in the *pars tuberalis* *Tshb*, tancytic *Dio2* and *Dio3* gene expression (as already reported<sup>11</sup>), and also a significant SP-induced reduction in the number of neurons expressing *Rfrp* gene. In contrast, however, *Kiss1* expression does not show photoperiodic variation in CBA/N mice which is in line with the absence of overt photoperiodic changes in their reproductive activity. Altogether, these data indicate that in the melatonin-proficient CBA/N mice, the photoperiodic signal carried by melatonin is integrated down to the hypothalamic *Rfrp* expressing neurons, as reported in all other seasonal species investigated so far,<sup>18</sup> while *Kiss1* expression appears unaffected by the environmental photoperiod in mice. Although C57BL/6J mice are deficient in melatonin, they have functional melatonin<sup>42</sup> and TSH<sup>11</sup> receptors and an acute injection of exogenous melatonin regulate *Tshb* and *Dio2/Dio3* gene expression. Here, using a protocol mimicking an SP-melatonin pattern<sup>28,43</sup> in C57BL/6J mice, we found that the melatonin-induced switch in the *Dio2/Dio3* ratio is associated with a significant reduction in the number of *Rfrp* expressing neurons, as observed in CBA/N mice. These results demonstrate that nighttime melatonin supplementation in C57BL/6J mice is able to restore photoperiodic like variations in the genes involved in seasonal timing, indicating that this animal model is suitable to tackle the molecular mechanisms underlying photoperiodic integration into the rodent hypothalamus. Of note, in C57BL/6J and CBA/N mice, *Rfrp* response to melatonin appears smaller than that of the other melatonin-driven genes. This might be related to

species-dependent seasonal phenotype as *Rfrp*'s inhibition by melatonin (or SP) is larger in hamsters<sup>44</sup> and MSM mice.<sup>45</sup>

Earlier studies reported that the central administration of TSH in SP-adapted hamsters restores the LP level of *Rfrp* expression, suggesting that the number of RFRP-3 expressing neurons is regulated by T3.<sup>14</sup> In order to address this hypothesis, we investigated the effect of nighttime melatonin supplementation in C57BL/6J mice carrying a global *Thra* knock-out. Melatonin in *Thra*<sup>0/0</sup> mice is no longer able to inhibit the number of *Rfrp* expressing neurons while it still regulates *Tshb*, and *Dio2/Dio3* expression. Furthermore, the significant correlation between *Dio2* and *Rfrp* expression observed in melatonin-proficient CBA/N and in melatonin-supplemented C57BL/6J mice is lost in mice lacking TR $\alpha$ . Therefore, the melatonin inhibition of *Rfrp* expression appears to involve T3 signaling on TR $\alpha$ , whereas the seasonal regulation of *Tshb* in the *pars tuberalis* and *Dio2/Dio3* in the tancytes is independent of this T3-TR $\alpha$  pathway.

TR $\alpha$  is widely distributed in the central nervous system,<sup>34,46-48</sup> especially in the hypothalamic region<sup>32,49</sup> suggesting that T3 may act directly on RFRP-3 neurons. However, we observed that nighttime melatonin supplementation in C57BL/6J mice lacking TR $\alpha$  signaling in neurons only<sup>24</sup> is still able to reduce the number of *Rfrp* expressing neurons, with a conserved correlation between *Dio2* and *Rfrp* expression, as it does in their control littermates. Preservation of the melatonin inhibition of *Rfrp* expression in absence of TR $\alpha$  signaling in neurons suggests that T3 is acting through non-neuronal cells expressing TR $\alpha$ . Earlier studies reported that astrocytes express thyroid hormone transporters such as MCT-8 and OATPs<sup>50</sup> but not TR $\alpha$ ,<sup>34,51</sup> suggesting that astrocytes do not mediate the T3 regulation of RFRP-3 expressing-neurons. Here, we show that TR $\alpha$  is widely expressed in the vimentin-expressing tancytes, as already reported by Wallis and collaborators who found that tancytes are the only GFAP-labeled cells expressing the TR $\alpha$ 1 receptor in the mouse hypothalamus.<sup>34</sup>

Tancytes are ependymal-like glial cells which play a crucial role as hypothalamic integrators of reproduction and energy metabolism<sup>52</sup> and exhibit cellular extensions in the mediobasal hypothalamus, and notably in the area where RFRP-3 neurons are located (<sup>52</sup> unpublished observations). Those non-neuronal TR $\alpha$ -expressing cells could, therefore, indirectly mediate the melatonin-driven regulation of *Rfrp* expression by delivering a messenger molecule regulated by T3 to the RFRP-3 neurons. Tancytes are also recognized as a putative niche of stem cells able to divide and create newborn neurons and glial cells invading the neighboring hypothalamus during development but also in adult.<sup>53-55</sup> A photoperiodic/seasonal regulation of hypothalamic neurogenesis has been reported in adult Syrian hamster<sup>56</sup> and sheep,<sup>57,58</sup> which could originate in the tancytes.<sup>52,59,60</sup> Notably, blocking seasonal neurogenesis in



sheep has been demonstrated to alter the timing of annual reproduction.<sup>59</sup> Since T3 is involved in adult neurogenesis,<sup>61,62</sup> we can hypothesize that disruption of the tanycytic TR $\alpha$  signaling could impair hypothalamic neurogenesis, which, in turn, would prevent photoperiodic regulation of the number of RFRP-3 neurons.

In conclusion, our results have established that endogenous or exogenous nighttime melatonin not only regulates TSH $\beta$  and Dio2/Dio3, but also the number of *Rfrp* expressing neurons in mice. Further, using genetically modified C57BL/6J mice, we have demonstrated the pivotal role of T3 signaling through TR $\alpha$  in the melatonin-driven regulation of *Rfrp* neurons. Finally, because the selective inactivation of TR $\alpha$  signaling in neurons does not impair *Rfrp* regulation by melatonin, we hypothesized that T3 may act through the tanycytes, which express a high level of TR $\alpha$ . Considering the role of hypothalamic neurogenesis in the seasonal reproduction,<sup>55</sup> future studies should now investigate whether the melatonin-driven regulation of RFRP-3 neurons involves neurogenesis processes initiated by a T3 action on the tanycytes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the staff of the Animal Resource and Experimentation platform of Strasbourg (Chronobiotron) for their help with animal care, Laurence Dufourny, and Marion Millet for the generous gift of antibodies and Béatrice Bothorel for the melatonin assay.

#### CONFLICT OF INTEREST

Authors have no conflict of interest.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

C. Quignon designed, performed research, and wrote the manuscript; M. Beymer provided probes and CBA/N tissue;

K. Gauthier provided the C57BL/6J *Thra*<sup>0/0</sup>, *Thra*<sup>+/+</sup>, *Cre3xThra*<sup>AMI/+</sup> and *Thra*<sup>AMI/+</sup>; F. Gauer discussed data significance; V. Simonneaux designed the experimental studies, discussed data significance, and corrected the manuscript. All co-authors have read and approved the manuscript.

#### REFERENCES

- Reiter RJ. Photoperiod: its importance as an impeller of pineal and seasonal reproductive rhythms. *Int J Biometeorol.* 1980;24:57-63.
- Rollag MD, Panke ES, Reiter RJ. Pineal melatonin content in male hamsters throughout the seasonal reproductive cycle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1980;165:330-334.
- Hazlerigg DG, Simonneaux V. Seasonal reproduction in mammals. In: TM Plant, AJ Zeleznic, eds. *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* 4th ed., Vol. 34; 2014:1575-1660.
- Dardente H, Wood S, Ebling F, Sáenz de Miera C. An integrative view of mammalian seasonal neuroendocrinology. *J Neuroendocrinol.* 2019;31:e12729.
- Bockmann J, Böckers TM, Vennemann B, et al. Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology.* 1996;137:1804-1813.
- Dardente H, Klosen P, Pévet P, Masson-Pévet M. MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol.* 2003;15:778-786.
- Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, et al. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature.* 2003;426:178-181.
- Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, et al. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology.* 2004;145:1546-1549.
- Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux. Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology.* 2006;147:4680-4687.
- Barrett P, Ebling FJP, Schuhler S, et al. Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology.* 2007;148:3608-3617.
- Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, et al. Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:18238-18242.
- Nakao N, Ono H, Yamamura T, et al. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature.* 2008;452:317-322.
- Hanon EA, Lincoln GA, Fustin J-M, et al. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol.* 2008;18:1147-1152.
- Klosen P, Sébert M-E, Rasri K, Laran-Chich M-P, Simonneaux. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* 2013;27:2677-2686.
- Murphy M, Jethwa PH, Warner A, et al. Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in Siberian hamsters. *Endocrinology.* 2012;153:101-112.
- Bank JHH, Wilson D, Rijntjes E, Barrett P, Herwig A. Alternation between short- and long photoperiod reveals hypothalamic gene regulation linked to seasonal body weight changes in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol.* 2017;29:1-11.
- Simonneaux V. A Kiss to drive rhythms in reproduction. *Eur J Neurosci.* 2020;51:509-530.
- Angelopoulou E, Quignon C, Kriegsfeld LJ, Simonneaux V. Functional implications of RFRP-3 in the central control of daily and seasonal rhythms in reproduction. *Front Endocrinol.* 2019;10:183.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol.* 2006;16:1730-1735.
- Cázar-Márquez F, Milesi S, Laran-Chich M-P, Klosen P, Kalsbeek A, Simonneaux V. Kisspeptin and RFRP3 modulate body mass in *Phodopus sungorus* via two different neuroendocrine pathways. *J Neuroendocrinol.* 2019;31:e12710.
- Ancel C, Bentsen AH, Sébert M-E, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology.* 2012;153:1352-1363.
- Henningesen JB, Ancel C, Mikkelsen JD, Gauer F, Simonneaux. Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female syrian hamsters. *Endocrinology.* 2017;158:652-663.

23. Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, et al. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol Cell Biol.* 2001;21:4748-4760.
24. Quignodon L, Vincent S, Winter H, Samarut J, Flamant F. A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Mol Endocrinol.* 2007;21:2350-2360.
25. Richard S, Aguilera N, Thévenet M, Dkhissi-Benyahya O, Flamant F. Neuronal expression of a thyroid hormone receptor  $\alpha$  mutation alters mouse behaviour. *Behav Brain Res.* 2017;321:18-27.
26. Banares S, Zeh K, Krajewska M, et al. Novel pan-neuronal Cre-transgenic line for conditional ablation of genes in the nervous system. *Genesis.* 2005;42:6-16.
27. Maywood ES, Hastings MH, Max M, Ampleford E, Menaker M, Loudon AS. Circadian and daily rhythms of melatonin in the blood and pineal gland of free-running and entrained Syrian hamsters. *J Endocrinol.* 1993;136:65-73.
28. Kasahara T, Abe K, Mekada K, Yoshiki A, Kato T. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:6412-6417.
29. Bothorel B, Barassin S, Saboureau M, et al. In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur J Neurosci.* 2002;16:1090-1098.
30. McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1974;22:1077-1083.
31. Klosen P, Maessen X, van den Bosch de Aguilar, P. PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:455-463.
32. Dufourny L, Gennetay D, Martinet S, Lomet D, Caraty A. The content of thyroid hormone receptor  $\alpha$  in Ewe Kisspeptin neurones is not season-dependent. *J Neuroendocrinol.* 2016;28:12344.
33. Guadaño-Ferraz A, Benavides-Piccione R, Venero C, et al. Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry.* 2003;8:30-38.
34. Wallis K, Dudazy S, van Hogerlinden M, Nordström K, Mittag J, Vennström B. The thyroid hormone receptor alpha1 protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Mol Endocrinol.* 2010;24:1904-1916.
35. Wittkowski W, Bergmann M, Hoffmann K, Pera F. Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res.* 1988;251:183-187.
36. Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, et al. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol.* 2010;20:2193-2198.
37. Yasuo S, Watanabe M, Nakao N, et al. The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology.* 2005;146:2551-2554.
38. Nishiwaki-Ohkawa T, Yoshimura T. Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *J Endocrinol.* 2016;229:R117-R127.
39. Simonneaux V. A Kiss to drive rhythms in reproduction. *Eur J Neurosci.* 2020;51(1):509-530.
40. Henson JR, Carter SN, Freeman DA. Exogenous T<sub>3</sub> elicits long day-like alterations in testis size and the RFamides Kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone in short-day Siberian hamsters. *J Biol Rhythms.* 2013;28:193-200.
41. Freeman DA, Teubner BJW, Smith CD, Prendergast BJ. Exogenous T<sub>3</sub> mimics long day lengths in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:R2368-R2372.
42. Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf H-W. Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci.* 2009;29:2885-2889.
43. Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R1339-R1345.
44. Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology.* 2008;149:902-912.
45. Sáenz de Miera C, Beymer M, Routledge K, et al. Photoperiodic regulation in a wild-derived mouse strain. *J Exp Biol.* 2020;223:JEB217687.
46. Bradley DJ, Young WS, Weinberger C. Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:7250-7254.
47. Bradley DJ, Towle HC, Young WS. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 1992;12:2288-2302.
48. Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. Thyroid hormone transporters—functions and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11:406-417.
49. Herwig A, Ross AW, Nilaweera KN, Morgan PJ, Barrett P. Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts.* 2008;1:71-79.
50. Warner A, Mittag J. Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *J Mol Endocrinol.* 2012;49:R29-R35.
51. Carlson DJ, Strait KA, Schwartz HL, Oppenheimer JH. Immunofluorescent localization of thyroid hormone receptor isoforms in glial cells of rat brain. *Endocrinology.* 1994;135:1831-1836.
52. Prevot V, Dehouck B, Sharif A, Ciofi P, Giacobini P, Clasadonte J. The versatile tanycyte: a hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism. *Endocr Rev.* 2018;39:333-368.
53. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol.* 2007;505:209-220.
54. Xu Y, Tamamaki N, Noda T, et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol.* 2005;192:251-264.
55. Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science.* 2005;310:679-683.
56. Huang L, DeVries GJ, Bittman EL. Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol.* 1998;36:410-420.
57. Migaud M, Batailler M, Pillon D, Franceschini I, Malpoux B. Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J Biol Rhythms.* 2011;26:486-496.
58. Hazlerigg DG, Wyse CA, Dardente H, Hanon EA, Lincoln GA. Photoperiodic variation in CD45-positive cells and cell proliferation in the mediobasal hypothalamus of the Soay sheep. *Chronobiol Int.* 2013;30:548-558.

59. Batailler M, Chesneau D, Derouet L, et al. Pineal-dependent increase of hypothalamic neurogenesis contributes to the timing of seasonal reproduction in sheep. *Sci Rep.* 2018;8:6188.
60. Helfer G, Barrett P, Morgan PJ. A unifying hypothesis for control of body weight and reproduction in seasonally breeding mammals. *J Neuroendocrinol.* 2019;31:e12680.
61. Gomes FC, Maia CG, de Menezes JR, Neto VM. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia.* 1999;25:247-255.
62. Kapoor R, Fanibunda SE, Desouza LA, Guha SK, Vaidya VA. Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. *J Neurochem.* 2015;133:599-616.

---

**How to cite this article:** Quignon C, Beymer M, Gauthier K, Gauer F, Simonneaux V. Thyroid hormone receptors are required for the melatonin-dependent control of *Rfrp* gene expression in mice. *The FASEB Journal.* 2020;00:1–11. <https://doi.org/10.1096/fj.202000961R>

---



**Mécanismes neuroendocrines du contrôle  
saisonnier de la reproduction,  
un pas vers des modèles génétiquement modifiés**

## Résumé

Chez les mammifères, les variations annuelles de la production nocturne de mélatonine par la glande pinéale constituent un calendrier neuroendocrine permettant de synchroniser la reproduction avec les saisons afin d'assurer la naissance des petits au printemps. Ce travail contribue à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le signal mélatoninergique est intégré dans l'organisme et synchronise la reproduction. A l'aide de modèles murins génétiquement modifiés nous avons démontré le rôle clé du récepteur aux hormones thyroïdiennes TR $\alpha$  dans la régulation par la mélatonine du neuropeptide hypothalamique RFRP-3 impliqué dans la reproduction. De plus, nous avons montré que cette régulation implique des TR $\alpha$  non-neuronaux, possiblement tanycytaires. Considérant le rôle de niche neurogénique des tanocytes, nous avons fait l'hypothèse que la T3 pourrait réguler des processus de neurogenèse à l'origine des variations saisonnières de RFRP-3. Cependant, malgré un profil de prolifération cellulaire saisonnier dans l'hypothalamus du Hamster Syrien, aucune des cellules nouvellement formées ne semblent se différencier en neurones à RFRP-3.

### Mots clés :

Neuroendocrinologie, reproduction saisonnière, mélatonine, hormones thyroïdiennes, tanocytes

## Résumé en anglais

For mammals living in temperate zones, the annual variations of nocturnal production of melatonin by the pineal gland constitute a neuroendocrine calendar allowing animals to synchronize their reproductive activity with seasons to ensure springtime birth of the offspring. With this work we contribute to the understanding of the cellular and molecular mechanisms through which the seasonal message relayed by melatonin is integrated and synchronizes reproduction. We used genetically modified murine models to demonstrate the key role of the thyroid hormone receptor TR $\alpha$  in the melatonin-driven regulation of the hypothalamic neuropeptide RFRP-3, reported to regulate reproductive functions. In addition, we found that this regulation involves non-neuronal, possibly tanycytic TR $\alpha$ . Considering the role of tanocytes as a hypothalamic neurogenic niche we hypothesized that the seasonal variations of RFRP-3 neurons could involve a T3 regulation of neurogenesis processes. However, despite a clear photoperiodic profile of cell proliferation in the seasonal Syrian hamster hypothalamus, it seems that none of the newborn cells differentiate into RFRP-3 neurons.

### Keywords :

Neuroendocrinology, seasonal reproduction, melatonin, thyroid hormones, tanocytes