

# Contrôle neuroendocrinien de la reproduction chez les mammifères

M. MIGAUD<sup>1</sup>, H. DARDENTE<sup>1</sup>, M. KELLER<sup>1</sup>, M. BATAILLER<sup>1</sup>, M. MEURISSE<sup>1</sup>, D. PILLON<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

Courriel : martine.migaud@inra.fr

L'amélioration des techniques de maîtrise de la reproduction, en particulier le contrôle de l'ovulation sans injection d'hormones, doit assurer la possibilité d'une reproduction programmée dans le temps et efficace. La connaissance approfondie du système hypothalamo-hypophysaire, un intégrateur majeur des signaux endocriniens et environnementaux qui contrôle la maturation folliculaire et l'ovulation, est un préalable indispensable au développement de méthodes robustes.

La reproduction est une fonction indispensable à la survie ainsi qu'à l'évolution des espèces. Cette fonction est sous le contrôle du complexe hypothalamo-hypophysaire, ainsi que des gonades qui exercent un rétrocontrôle sur ce complexe. Vers la fin des années 1970, la « *Gonado-tropin Releasing Hormone de mammifères* » (GnRH ou gonadolibérine) est purifiée indépendamment par les groupes de Guillemin et Schally et la séquence en acides aminés de cette hormone décapeptide est déterminée, travail qui a été récompensé par le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1977. Cette neurohormone, produite par le cerveau et plus particulièrement dans l'hypothalamus par des neurones spécialisés, stimule la production et la libération d'autres hormones, les gonadotrophines, qui elles-mêmes régulent la production des hormones sexuelles par les testicules ou les ovaires. Les neurones à GnRH constituent la clé de voûte de la fonction de reproduction.

Cet axe hypothalamo-hypophysogonadique se compose d'un ensemble de tissus neuronaux et endocriniens qui communiquent et qui fonctionnent comme une entité hautement intégrée dans la régulation de la reproduction. L'organisation de base de cet axe physiologique est très conservée dans le règne animal et sous-tend la compétence en matière de reproduction chez la plupart des espèces de vertébrés y compris les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les poissons et les mammifères. Cette revue est principalement focalisée sur les mammifères.

## 1 / Vue d'ensemble de l'organisation fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique de mammifères

Chez les vertébrés, le contrôle de la reproduction est assuré par l'axe Hypothalamo-Hypophysogonadique ou HHG (figure 1, pour revues Charlton 2008, Zohar *et al* 2010). Cet axe est constitué de trois éléments : *i*) l'hypothalamus, une structure diencephalique localisée à la base du cerveau, qui est connecté de manière anatomique par la tige pituitaire à *ii*) l'hypophyse, ou glande pituitaire, localisée à la base du cerveau, elle-même en communication avec *iii*) les gonades, testicules chez l'Homme et ovaires chez la femme, qui sont le lieu de production des cellules sexuelles, les gamètes, et des hormones sexuelles. La communication entre ces différents niveaux est assurée grâce à des neurohormones et hormones.

Entre l'hypothalamus et l'hypophyse, la GnRH ou gonadolibérine est considérée comme l'acteur majeur assurant la reproduction. Chez les mammifères, les neurones à GnRH de l'hypothalamus projettent leurs axones vers l'Eminence Médiane (EM), la GnRH est alors libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire qui assure le transport de cette neurohormone jusqu'aux cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. Chez les téléostéens, le système porte n'existe pas, les neurones à GnRH projettent alors directement leurs axones dans la « *Pars Proximalis Distalis* » (PPD) au voisinage des cellules gonadotropes (Zohar *et al* 2010).

L'hypophyse constitue à la fois un relai et un système d'amplification de la communication entre l'hypothalamus et les gonades. En effet, la GnRH, libérée dans l'antéhypophyse *via* la circulation portale hypophysaire, se lie à un récepteur spécifique (GnRHR) exprimé par les cellules gonadotropes. Cette liaison déclenche la production et la sécrétion des deux gonadotrophines, la LH (« *Luteinizing Hormone* ») et la FSH (« *Follicle Stimulating Hormone* »). Parvenues dans la circulation sanguine, les gonadotrophines chez le mâle ou chez la femelle, ont une double action. Elles agissent sur les gonades et induisent la production et la maturation des gamètes (spermatozoïdes et ovocytes) et permettent la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles indispensables au contrôle des cycles ainsi que des comportements sexuels. Les stéroïdes sexuels exercent des rétrocontrôles négatifs ou positifs au niveau hypothalamo-hypophysaire, et assurent une boucle d'autorégulation servant à maintenir le fonctionnement de l'ensemble de l'axe HHG.

## 2 / Le système GnRH

### 2.1 / Le neuropeptide GnRH

Aujourd'hui, plus de 25 formes de GnRH ont été décrites. Quatorze d'entre elles sont présentes chez les vertébrés (pour revues Kah *et al* 2007, Tostivint 2011). Les GnRH de vertébrés se présentent sous la forme d'un petit peptide de 10 acides aminés issu du clivage d'un précurseur, la prépro-GnRH.

Trois gènes paralogues de la GnRH, *GnRH1*, *GnRH2* et *GnRH3*, ont été mis

en évidence chez les vertébrés. Ces gènes ont vraisemblablement évolué à partir de la duplication d'un même gène (White et Fernald 1998, Fernald et White 1999) et chez plusieurs poissons téléostéens (le hareng, le médaka, le bar européen...) ces paralogues sont tous les trois exprimés dans le cerveau :

i) la GnRH de type 1 comprend plusieurs formes de GnRH dont la forme identifiée chez les mammifères, la mGnRH (« mammalian » GnRH). Elle est exprimée majoritairement dans des neurones du cerveau antérieur qui envoient leurs projections vers l'EM. Cette forme de GnRH joue un rôle majeur dans le système hypophysiotrope, gonadotrope ;

ii) la GnRH de type 2 a été identifiée chez le poulet, *Gallus gallus* « chicken GnRH-II ou cGnRH-II ». Elle est retrouvée chez la majorité des vertébrés, ainsi qu'une forme identifiée chez la lamproie marine. Cette forme de GnRH est exprimée par des neurones localisés dans le mésencéphale rostral. Elle est exprimée chez les tétrapodes, la lamproie marine et tous les téléostéens ;

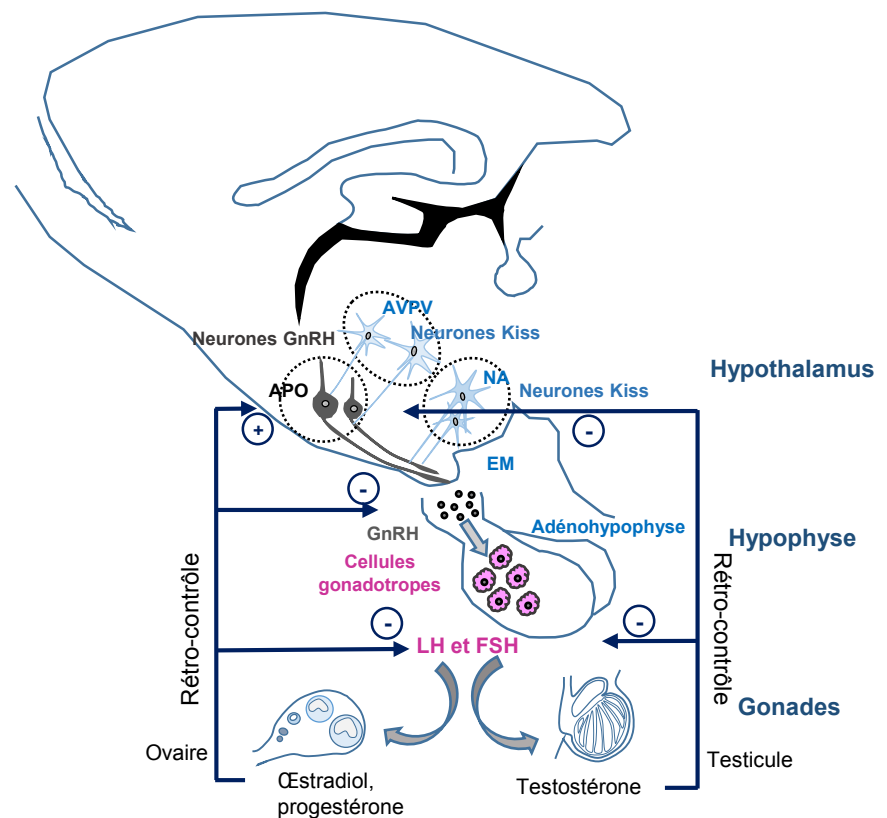
iii) la GnRH de type 3 ou sGnRH « salmon GnRH » a été identifiée chez quelques téléostéens. Cette forme est exprimée par certains neurones du cerveau antérieur. Chez ces espèces, cette forme de GnRH participe au contrôle hypophysiotrope (Oka 2002).

Les effets des différentes GnRH sont spécifiquement modulés par l'intermédiaire de récepteurs à 7 domaines transmembranaires dont les voies de signalisation dépendent des protéines Gq et/ou G11 pour activer la phospholipase C, ce qui conduit à la mobilisation du calcium par l'inositol phosphate3 (Perrett et McArdle 2013). C'est par l'intermédiaire de ces récepteurs que la GnRH (principalement mGnRH et sGnRH) agit sur les cellules gonadotropes hypophysaires et induit la libération des gonadotrophines.

## 2.2 / Ontogenèse des neurones à GnRH

Les neurones à GnRH ont la particularité d'avoir une origine extra-cérébrale (figure 2). Les premiers neurones qui expriment soit le messager du gène GnRH-1 ou le peptide GnRH sont détectés chez la souris à partir de 10,5 jours de gestation (E10,5) dans l'organe voméronasal et dans la paroi médiale de l'épithélium des fosses nasales (Schwanzel-Fukuda et Pfaff 1989, Wray *et al* 1989, Duittoz et Prévot 2014), et chez les autres espèces à des stades plus tardifs (E15 chez le rat, E30 chez le mouton, E35 chez le singe rhésus). Ces neurones migrent hors de l'épithélium olfactif en

Figure 1. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (adapté de Derouiche 2016).

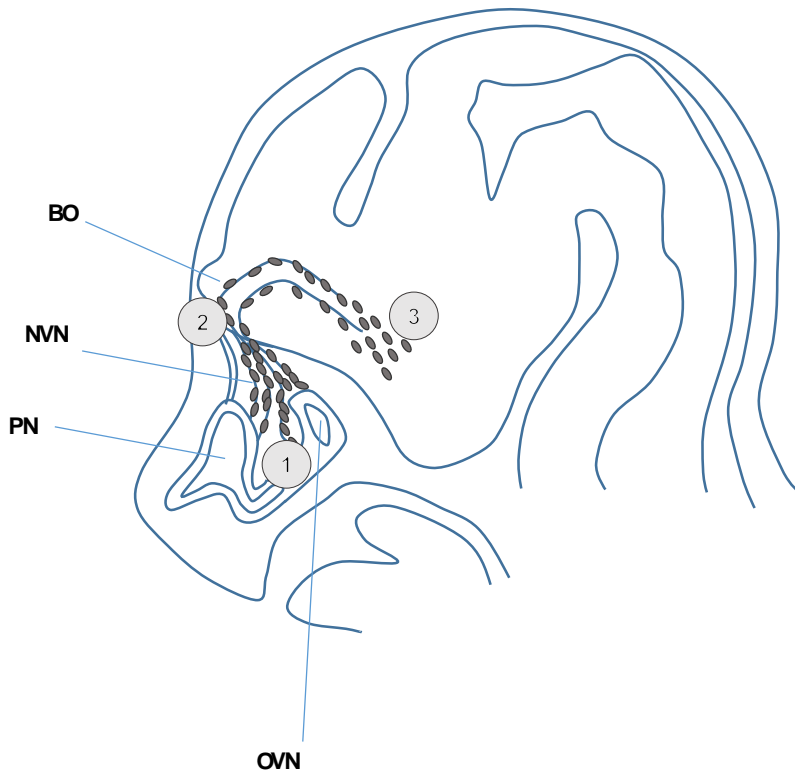


La GnRH est synthétisée par des neurones dont les corps cellulaires sont localisés dans l'Aire Pré-Optique (APO). Les terminaisons nerveuses de ces neurones à GnRH se projettent dans l'Éminence Médiane (EM). Les sécrétions pulsatiles de GnRH stimulent la sécrétion des gonadotrophines, FSH « Follicle Stimulating Hormone » et LH « Luteinizing Hormone ». Les gonadotrophines, libérées dans la circulation générale, stimulent à leur tour, la production de stéroïdes sexuels. Ces hormones en exerçant un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, régulent la production de FSH et LH. Chez la femelle, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif pendant la période pré-ovulatoire en agissant sur les neurones à kisspeptine (Kiss) de l'aire Antéro-Ventrale Para-Ventriculaire (AVPV), induisant ainsi le pic pré-ovulatoire de GnRH puis le pic de LH. Pendant la phase lutéale, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif au niveau de l'EM par l'intermédiaire des neurones Kiss du Noyau Arqué (NA) et sur les cellules gonadotropes adénohypophysaires. Chez le mâle les stéroïdes sexuels exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

empruntant un trajet dorso-ventral le long des nerfs olfactifs et voméronasaux, traversent la lame criblée de l'éthmoïde (la structure osseuse qui sépare l'épithélium olfactif des bulbes olfactifs) et pénètrent ensuite dans le bulbe olfactif principal (nerfs olfactifs) et dans le bulbe olfactif accessoire (nerfs voméronasaux). Les neurones à GnRH suivent alors un trajet médian au niveau des bulbes olfactifs puis entrent dans le diencéphale jusqu'aux bandelettes de Broca. Leur trajet devient alors plus ventral et prend fin dans l'Aire Pré-Optique (APO), structure hypothalamique où les neurones à GnRH sont disséminés entre l'aire septale médiane et l'hypothalamus antérieur. De nombreux facteurs interviennent dans ces processus de migration. Ce sont des molécules impliquées dans l'adhésion

cellulaire, des morphogènes, des facteurs de transcription, des neuromédiateurs et des hormones (Duittoz et Prévot 2014). Il a récemment été montré que cette phase de migration implique des molécules d'adhésion cellulaire comme la PSA-NCAM « Polysialinated-Neural Cell Adhesion Molecule » qui permettent une interaction directe et étroite avec les cellules gliales (Geller *et al* 2013). Une fois parvenus à destination, les neurones à GnRH développent leur croissance axonale en direction de l'EM. Chez la souris, ces fibres sont détectées dès E14,5 (Livne *et al* 1993). Plusieurs molécules chémo-attractives diffusibles dont le bFGF « basic Fibroblast Growth Factor » semblent jouer un rôle dans le guidage des terminaisons nerveuses vers l'EM (Gibson *et al* 2000).

**Figure 2.** Migration des neurones à GnRH dans la tête d'un embryon de souris (Adapté de Cariboni et al 2007).



Représentation schématique dans une coupe de cerveau d'embryon du parcours migratoire des neurones à GnRH (points gris) depuis leur origine dans la Placode Nasale (PN) dans la région de l'Organe VoméroNasal (OVN), leur trajet le long des nerfs olfactifs voméronasaux (NVN), leur entrée dans le cerveau au voisinage du bulbe olfactif (BO) et leur migration finale à travers le cerveau antérieur basal vers l'hypothalamus. Leur trajet parcourt trois environnements anatomiquement et chimiquement distincts : 1) le compartiment nasal, 2) la jonction nasale /proscéphale et 3) le cerveau antérieur basal.

### 2.3 / Neuroanatomie

À l'âge adulte chez la plupart des espèces, les corps cellulaires des neurones à GnRH ne se concentrent pas au sein d'un noyau mais sont au contraire disséminés au sein d'un continuum rostro-caudal localisé entre le bulbe olfactif et l'hypothalamus antérieur (Jasoni *et al* 2009). Chez les rongeurs et l'ovin, la majeure partie des corps cellulaires des neurones à GnRH est localisée dans l'APO et dans l'Organe Vasculaire de la Lame Terminale (OVLTL). Chez d'autres espèces, comme le primate, de nombreux corps cellulaires sont également retrouvés dans l'hypothalamus infundibulaire ou Noyau Arqué (NA) et cette population joue un rôle clé dans le contrôle de la fonction de reproduction (Plant *et al* 1978). En plus d'être disséminés dans l'hypothalamus, les neurones à GnRH présentent la caractéristique d'être en nombre relativement réduit. Les techniques immunohistochimiques (encadré 1) les plus fines ont détecté la présence d'environ 800 neurones chez la souris, 1 300 chez le rat et autour de 2 500 chez le mouton, le singe rhésus et le babouin.

Dans l'hypothalamus adulte, le neuro-ne à GnRH typique possède deux projections dendritiques, et peut présenter des prolongements qui s'étendent sur des distances éloignées de 2-3 mm du corps cellulaire du neurone ou péricaryon. Sans surprise, les terminaisons nerveuses de ces neurones projettent principalement vers l'EM, en contact avec le plexus primaire du système porte-hypophysaire de l'éminence médiane où ils libèrent la GnRH (Merchenthaler *et al* 1989).

Une fois libérée, la GnRH va stimuler les cellules gonadotropes et conduire à la libération de la LH et de la FSH. Ces hormones appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques hypophysaires et leur synthèse et sécrétion sont sous le contrôle de la libération, sous forme pulsatile, de la GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Chez les vertébrés, ces hormones glycoprotéiques sont hétérodimériques, composées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est commune à la FSH et à la LH ainsi qu'à la thyrostimuline ou TSH (« *thyroid-stimulating hormone* ») pour une même espèce et elle est le produit d'un même gène. A contrario, les

sous-unités  $\beta$  sont spécifiques de chaque hormone et sont codées par des gènes différents, ce qui leur confère des propriétés biologiques et immunologiques spécifiques (Combarrous *et al* 1998). Les deux hormones, LH et FSH ont une action directe au niveau des gonades où elles modulent la stéroïdogénèse et la gamétogénèse.

## 3 / Sécrétion pulsatile de la GnRH

### 3.1 / Caractéristiques de la sécrétion pulsatile de la GnRH

Au début des années 1980, le développement d'approches chirurgicales très raffinées a permis de démontrer que les terminaisons nerveuses de l'EM sécrètent les neurohormones hypothalamiques et en particulier la GnRH, de façon pulsatile et épisodique. L'hypothèse de la nature pulsatile de la sécrétion de GnRH a d'abord été suggérée à partir d'expériences réalisées sur le singe par Carmel et collègues (Carmel *et al* 1976), puis chez le rat (Levine et Ramirez 1982) et le mouton (Caraty *et al* 1982). Cette découverte a été suivie par la mise en évidence d'une parfaite concordance entre la survenue d'un pulse de GnRH et celle d'un pulse de LH et de FSH (Clarke et Cummins 1982, Caraty *et al* 1989). L'intervalle entre 2 pulses varie entre les espèces, il est d'environ 20 à 30 min chez les rongeurs, de l'ordre de 50 min chez la brebis et la vache et jusqu'à une heure chez le jument. La sécrétion pulsatile de la GnRH est retrouvée chez tous les mammifères étudiés jusqu'à présent. La différence de fréquence des pulses de GnRH établit la nature de la sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse. Ainsi, les hautes fréquences de libération de GnRH conduisent à la sécrétion de la LH alors que les basses fréquences sont responsables de la sécrétion de la FSH. Le changement de fréquence de libération de GnRH est donc sous-jacent à la cyclicité ovarienne ainsi qu'au développement folliculaire.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la synchronisation de l'activité des neurones à GnRH disséminés dans plusieurs zones de l'hypothalamus pour induire des pulses réguliers, restent encore mal connus. Toutefois, il semblerait que la signalisation GABAergique, le glutamate et la cholécystokinine-1 soient impliqués dans la synchronisation de l'activité pulsatile des neurones à GnRH (pour revue Constantin 2011).

### 3.2 / Déclenchement de la puberté et régulation des cycles

La pulsatilité de sécrétion de la GnRH intervient aussi dans le processus de



**Encadré 1.** Les techniques d'immunohistochimie.

Les techniques immunohistochimiques permettent de localiser des antigènes dans des tissus, cellules, bactéries, virus, etc. Grâce à un anticorps primaire dirigé contre l'antigène à détecter et à un système révélateur, un anticorps secondaire couplé à un traceur (figure 1A), il est possible de visualiser l'immunomarquage en microscopie optique (figure 1B) ou électronique.

Une préparation rigoureuse du tissu biologique est essentielle et repose sur 3 étapes au préalable à l'immunomarquage :

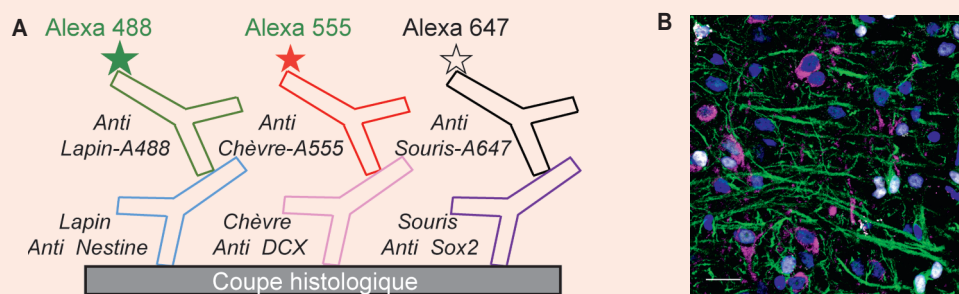
- 1) la fixation du tissu biologique pour figer les structures et immobiliser *in situ* les antigènes, afin de les conserver dans un état aussi proche que possible de leur état natif. Le fixateur couramment utilisé est le paraformaldéhyde ;
- 2) l'imprégnation par un milieu d'inclusion (paraffine, résine) ou congélation pour durcir le tissu ;
- 3) la réalisation des coupes histologiques (vibratome, microtome, cryostat, ultramicrotome...).

Les principales étapes d'une réaction immunohistochimique sont les suivantes :

- a) perméabilisation des membranes (saponine, Triton...) ;
- b) saturation des sites non spécifiques (gélatine, BSA, sérum...) ;
- c) incubation dans l'anticorps primaire (Ac I) ;
- d) rinçages en solution tamponnée pour éliminer l'excès d'Ac I non fixé sur l'antigène ;
- e) incubation dans l'anticorps secondaire (AcII) couplé à une molécule fluorescente, à un traceur enzymatique (peroxydase, phosphatase alcaline) ou à l'or colloïdal.

De nombreux fluorochromes sont disponibles sur le marché. Ils ont l'avantage de pouvoir être combinés entre eux (longueurs d'ondes d'émission ou d'excitation différentes) pour réaliser des immunomarquages multiples (figure 1 A et B).

**Figure 1.** Principe de l'immunohistochimie.



(A) Schéma de l'immunomarquage multiple en fluorescence illustré en B.

(B) Illustration d'une coupe histologique de cerveau ovin (d'après Batailler *et al* 2014 : acquisition en microscopie confocale ; Plateau d'Imagerie Cellulaire, PRC) : fibres de cellules gliales nestine (vert) ; corps cellulaires de neurones immatures double cortine (DCX ; magenta) ; noyaux de cellules souche Sox2 (blanc) ; noyaux cellulaires colorés en Hoechst (bleu).

déclenchement de la puberté et de la régulation cyclique (Karsch et Evans 1996) et saisonnée (Karsch *et al* 1988) de la fonction de reproduction (Knobil 1990). La puberté correspond à la programmation d'événements physiologiques et hormonaux qui engendrent des changements morphologiques, biologiques et comportementaux pour aboutir à l'activation de la fonction de reproduction. L'axe gonadotrope, activé pendant la période périnatale, entre en quiescence durant toute la période de la vie juvénile. À partir de la puberté cet axe est réactivé, ce qui se traduit par l'augmentation de la fréquence et de l'amplitude des pulses de GnRH conduisant à la sécrétion de FSH et de LH puis à l'ovulation ou à la production de spermatozoïdes. L'augmentation de la sécrétion de GnRH est régulée par des facteurs hypothalamiques (neuromédiateurs excitateurs, inhibiteurs et neuropeptides), périphériques (taux de leptine, ghréline,

stéroïdes, insuline...) et environnementaux (alternance jour/ nuit, stress, prise alimentaire, perturbateurs endocriniens). En plus des facteurs métaboliques et environnementaux, le fonctionnement des neurones à GnRH est aussi régulé par des facteurs génétiques. En effet, des mutations présentes dans plusieurs gènes, en particulier les gènes impliqués dans le développement du bulbe olfactif (*KALI* ou *FGFR1*) affectent également la puberté.

Des neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA contrôlent l'activité des neurones à GnRH en exerçant des actions antagonistes. Une des hypothèses concernant les mécanismes responsables du déclenchement de la puberté repose sur la levée d'inhibition des neurones à GnRH par les neurones GABAergiques hypothalamiques suivie d'une action stimulatrice du glutamate sur la pulsativité des neurones à GnRH conduisant à l'augmentation de la fré-

quence des pulses de GnRH (Bourguignon *et al* 1997).

Des facteurs de croissance parmi lesquels le TGF $\alpha$  « *Transforming Growth Factor  $\alpha$*  », Ojeda *et al* 2008) ou bien la prostaglandine E2 (Clasadonte *et al* 2011), qui sont produits par les astrocytes ou les tanocytes, des cellules astrogliales localisées dans l'hypothalamus et pour certaines en contact étroits avec les neurones à GnRH, modifient le microenvironnement de ces neurones et ont une action sur la sécrétion de GnRH.

La kisspeptine, codé par le gène *Kiss1*, et son récepteur le *Kiss1R* (GPR54) jouent également un rôle important dans le déclenchement de la puberté. En effet, de la naissance jusqu'à la période pré-pubertaire la kisspeptine est indétectable puis, stimulée par l'estradiol, la production augmente jusqu'à aboutir à l'induction de l'activation des neurones à GnRH

et par voie de conséquence, de l'axe HHG.

## 4 / Le réseau de neurones à GnRH

### 4.1 / Les neurones kisspeptidergiques

Les neurones à GnRH sont modulés par de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides. Parmi les sécrétagogues du GnRH, le neuropeptide Kiss1, découvert en 2003 est de loin le plus puissant (Pinilla *et al* 2012, Beltramo *et al* 2014). Chez l'Homme, des mutations spontanées dans les gènes *Kiss1* ou *Kiss1R* entraînent une forme sévère d'hypogonadisme, caractérisée par une très faible production de gonadotropines et donc de stéroïdes sexuels gonadiques, et la stérilité (Pinilla *et al* 2012). Des expériences d'ablations génétiques chez les rongeurs confirment sans ambiguïté le rôle majeur du système Kiss1 dans la fonction de reproduction. Bien que Kiss1 soit exprimé dans des tissus périphériques et aussi dans l'hypophyse, deux populations de neurones hypothalamiques, localisés dans l'aire préoptique et le noyau arqué, semblent nécessaires et suffisantes pour expliquer le rôle de Kiss1 sur l'axe reproducteur. Ces deux populations jouent des rôles distincts selon les espèces. Chez les rongeurs, les neurones Kiss1 de l'aire pré-optique, sous le contrôle de l'horloge des noyaux suprachiasmatiques (NSC), pilotent le pic pré-ovulatoire de GnRH, alors que ceux du noyau arqué semblent responsables du mode pulsatile de sécrétion du GnRH durant le reste du cycle. Chez d'autres espèces, et notamment le mouton, les neurones Kiss du noyau arqué semblent suffisants pour générer les deux modes de sécrétion du GnRH (*i.e.* pulsatilité et pic pré-ovulatoire). Les neurones Kiss du noyau arqué sont aussi un élément-clé de l'aspect saisonné de la reproduction chez de nombreuses espèces (Beltramo *et al* 2014). Aussi bien pour les hamsters que pour le mouton, l'injection ou la perfusion de Kiss1 chez des animaux en repos sexuel permet une réactivation fonctionnelle rapide de l'axe reproducteur (Revel *et al* 2006, Caraty *et al* 2007). Ces résultats suggèrent que Kiss1 est un candidat intéressant pour développer de nouvelles stratégies du contrôle de la reproduction, notamment chez les ovins et les caprins (Beltramo *et al* 2015). L'expression du gène *Kiss1* dans le noyau arqué présente de larges variations photopériodiques avec les niveaux les plus élevés durant la saison de reproduction de l'espèce concernée – automne/hiver pour le mouton, printemps/été pour les hamsters. Ces variations photopériodiques de *Kiss1* dans le

### Encadré 2. Le comportement sexuel.

Sur le plan évolutif, la reproduction, et donc la survie des espèces, dépend non seulement de régulations physiologiques précises, mais également de la synchronisation de ces mécanismes avec des interactions comportementales adaptées entre les individus de sexe opposé. Ainsi, ces comportements sont hautement synchronisés avec les régulations physiologiques provenant de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, permettant aux animaux d'interagir de manière adéquate afin d'assurer la mise en contact de gamètes fertiles, généralement au sein des voies génitales femelles.

Chez les vertébrés supérieurs, le mâle produit un grand nombre de spermatozoïdes tout au long de son existence. À l'inverse, la femelle ne produit qu'un nombre assez limité d'ovocytes. En conditions naturelles, étant donné le coût investi par la femelle dans la reproduction (gestation, investissement dans l'élevage des jeunes...), celle-ci a donc intérêt à choisir de s'accoupler avec un mâle présentant les meilleures qualités. Cependant, ce choix du partenaire sexuel est évidemment biaisé sous l'effet de la domestication où c'est l'éleveur qui décide du moment de la reproduction et du moyen mis en œuvre (monte naturelle avec choix des individus reproducteurs, insémination artificielle). Ce processus est bien sûr au cœur des processus de sélection en élevage.

Sur le plan comportemental, l'expression des comportements sexuels est hautement synchronisée avec le moment de l'ovulation ; ainsi, la femelle est réceptive aux avances du mâle dans une courte fenêtre temporelle située autour de l'ovulation au cours de laquelle, elle va rechercher la proximité du mâle. En fonction des contraintes de l'organisation socio-sexuelle des espèces (monogamie, polygamie...), les individus émettent généralement un certain nombre de signaux sexuels (odeur, vocalisations, coloration de certaines parties du corps...) afin d'attirer un partenaire sexuel. Une fois les deux partenaires réunis, le mâle réalise généralement une parade sexuelle à laquelle la femelle répond en adoptant une posture spécifique. Ces comportements, qui traduisent la motivation des deux partenaires, sont qualifiés de comportement appétitifs. À ces comportements fait généralement suite un comportement actif d'acceptation du mâle par la femelle, permettant à ce dernier d'exprimer une séquence assez stéréotypée comprenant montes, intromissions et menant à l'éjaculation.

L'organisation de cette séquence comportementale est sous la dépendance de divers acteurs neuroendocriniens. Parmi ceux-ci la dynamique de sécrétion des hormones stéroïdes (progestérone et œstrogènes chez la femelle, testostérone chez le mâle), hormones produites au niveau gonadique (ovaire et testicule), et leurs actions au niveau cérébral, notamment au niveau hypothalamique, jouent un rôle majeur dans le déclenchement des comportements sexuels.

À côté des facteurs physiologiques, les stimulations sociales sont également capables d'influer, parfois de manière spectaculaire, sur la fonction de reproduction. Ainsi, la connaissance des mécanismes comportementaux liés à la reproduction des espèces permet des applications intéressantes en élevage. Par exemple, chez les petits ruminants (ovins, caprins) où l'évolution naturelle de la photopériode induit une saison d'anoestrus (repos sexuel) au printemps, l'introduction d'un mâle sexuellement actif induit l'ovulation chez une proportion importante des femelles. Cet effet est appelé « effet mâle » et est utilisé afin d'obtenir des naissances en contre-saison, c'est-à-dire à l'automne. Dans ce cadre, le niveau d'activité sexuelle du mâle est un facteur clé pour induire l'ovulation des femelles. Par exemple chez la chèvre, des mâles dont le comportement sexuel a été stimulé par un traitement photopériodique adapté, permettent d'induire une réponse ovulatoire chez la plupart des femelles. *A contrario*, l'introduction de mâles restant exposés à la photopériode naturelle et donc normalement peu actifs à cette saison, n'induit pas de réponse ovulatoire chez les femelles.

L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet de se passer des traitements hormonaux normalement nécessaires pour obtenir des naissances à cette période de l'année. En effet, ces traitements présentent un certain nombre de problèmes sanitaires, environnementaux ou de bien-être animal, l'effet mâle est actuellement la seule méthode actuellement autorisée en élevage biologique où l'utilisation des hormones exogènes est proscrite.

noyau arqué dépendent de la mélatonine, *via* une action dans la *pars tuberalis* et l'axe TSH-Dio2-T3 (voir § 5.1, Revel *et al* 2006, Klosen *et al* 2013).

## 4.2 / Les stéroïdes sexuels

Les gonadotrophines LH et FSH, libérées dans la circulation générale, stimulent la production des stéroïdes sexuels par les gonades à partir du cholestérol. Les progestagènes, dont la progestérone (P), puis les androgènes dont la testostérone et la 5 $\alpha$  - dihydrotestostérone (DHT), et enfin les œstrogènes, dont l'œstradiol (E2), sont issus successivement de la chaîne de biosynthèse. Au moment de la puberté, les stéroïdes sexuels agissent sur des tissus cibles qui expriment des récepteurs spécifiques pour aboutir au développement des caractères sexuels secondaires. Les stéroïdes sexuels exercent également des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur le cerveau et l'hypophyse.

Par ailleurs, chez de nombreuses espèces de mammifères, et chez la brebis en particulier, les stéroïdes gonadiques, la progestérone et l'œstradiol sont nécessaires à l'induction du comportement sexuel (encadré 2).

## 4.3 / Rétrocontrôles des stéroïdes sexuels

### a) Contrôle neuroendocrine des cycles ovariens

Chez les espèces de mammifères à ovulation spontanée, le cycle ovarien est caractérisé par la sécrétion de niveaux relativement faibles ou toniques de LH et de FSH, qui sont interrompus une fois tous les 4-5 jours chez les rongeurs et une fois tous les 28 jours chez la femme, par une décharge massive de gonadotrophine qui déclenche l'ovulation. La sécrétion tonique des gonadotrophines pendant la phase folliculaire du cycle qui entraîne la folliculogénèse, est régulée par une boucle de rétroaction négative. Le principal composant ovarien de la boucle est l'œstradiol (E2) sécrétée par les follicules en développement et il est maintenant établi que ces rétrocontrôles se produisent au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Concernant l'hypothalamus, la rétroaction négative de l'E2 s'exerce principalement *via* la modulation de l'amplitude de la libération pulsatile de GnRH. Chez les espèces avec une phase lutéale prolongée, comme les primates ou les moutons, la sécrétion de progestérone par le corps jaune a pour effet de diminuer sensiblement la fréquence des pulsés de GnRH.

### b) Les récepteurs aux stéroïdes sexuels

Chez les mâles comme chez les femelles, la libération de GnRH et des

gonadotropines est contrôlée par les stéroïdes sexuels par l'intermédiaire de rétrocontrôles positifs ou négatifs sur l'hypothalamus *via* leurs récepteurs spécifiques (Scott *et al* 2000).

Chez le mâle, les androgènes agissent sur des récepteurs aux androgènes (AR, Raskin *et al* 2009). Les neurones à kisspeptine localisés dans la zone Antéro-Ventrale PériVentriculaire (AVPV) et du NA expriment les AR, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle le rétrocontrôle sur les neurones à GnRH engageait les neurones à kisspeptine (Smith *et al* 2005).

Pour les œstrogènes, deux types de récepteurs ont été mis en évidence, les récepteurs nucléaires de type  $\alpha$  et de type  $\beta$  (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) et un récepteur couplé aux protéines G, le GPR30, qui a été découvert récemment (Toran-Allerand *et al* 2002). Les récepteurs nucléaires ER $\alpha$  et ER $\beta$  agissent comme des facteurs de transcription en se liant au domaine ERE (« *Estrogen Responsive Element* ») de liaison à l'ADN pour induire la transcription de gènes cibles (Heldring *et al* 2007, Maggi et Villa 2014). Le récepteur GPR30 membranaire induit l'activation d'une cascade de signalisation cytoplasmique et pourrait être impliqué dans l'action rapide des œstrogènes (Noel *et al* 2009).

La progestérone se lie à deux types de récepteurs, le premier joue un rôle facilitateur dans l'apparition du pic pré-ovulatoire de LH et le second est impliqué dans le rétrocontrôle négatif des œstrogènes (Chappell *et al* 1999).

### c) Les rétrocontrôles stéroïdiens

Les hormones stéroïdiennes gonadiques jouent un rôle particulièrement important dans la régulation de la rétroaction de la sécrétion hypothalamique de GnRH et cette action est différente selon le sexe. Chez le mâle, le rétrocontrôle stéroïdien sur la sécrétion pulsatile de GnRH est exclusivement négatif. Chez la femelle, les effets de rétroaction des stéroïdes gonadiques sont complexes et dépendent de l'espèce et du stade du cycle œstral. L'E2 diminue l'expression de GnRH dans l'hypothalamus pendant la phase folliculaire. À l'inverse, pendant la période pré-ovulatoire, l'E2 a des effets positifs sur la libération de GnRH hypothalamique et c'est ce rétrocontrôle positif d'E2 par l'intermédiaire des récepteurs ER $\alpha$ , qui est responsable de l'induction de la décharge ovulatoire de GnRH suivie de celle de LH qui aboutit à l'ovulation. Etant donné que les neurones à GnRH n'expriment pas les ER $\alpha$ , comme l'ont démontré des études de liaison, résultat confirmé par immunohistochimie (Shivers *et al* 1983), d'autres popula-

tions sont vraisemblablement impliquées dans l'effet de l'E2 sur les neurones à GnRH. Des fibres de l'APO immunoréactives à la kisspeptine sont retrouvées à proximité des corps cellulaires des neurones à GnRH (Clarkson et Herbison 2006). Comme les neurones Kiss expriment les récepteurs ER $\alpha$  (Franceschini *et al* 2006) et les neurones à GnRH les récepteurs aux kisspeptines (Kiss1R ou GPR54, Messenger *et al* 2005), ces données suggèrent l'implication des neurones à Kiss dans le rétrocontrôle par les œstrogènes (Beltramo *et al* 2014).

## 5 / Facteurs endogènes et exogènes influençant l'activité des neurones à GnRH

### 5.1 / La photopériode chez les animaux saisonnés

Sous les latitudes tempérées, les animaux sont soumis à des changements saisonniers de leur environnement comme des variations du climat et de la disponibilité des ressources alimentaires. Différentes stratégies existent pour moduler les fonctions physiologiques et assurer la pérennité des espèces sous ces contraintes dont la régulation saisonnière des fonctions physiologiques. Les rythmes saisonniers de la reproduction sont des événements annuels récurrents qui aboutissent à la naissance et au sevrage des jeunes pendant la période la plus favorable à leur croissance afin qu'ils puissent atteindre un développement suffisant avant l'arrivée de l'hiver suivant (Bronson 1988). Pour une espèce donnée, la période de reproduction doit être programmée précisément, pour qu'une fois la période de gestation terminée, les naissances aient lieu au printemps, moment de l'année le plus propice à la survie des jeunes. La durée de gestation étant variable d'une espèce à l'autre (de quelques semaines à plusieurs mois), la période de reproduction est différente selon les espèces. Ainsi, la période d'activité sexuelle des chevaux et celle des hamsters, furets ou campagnols, a lieu au printemps en raison de la durée de la gestation qui est respectivement de 11 mois et quelques semaines pour ces deux groupes d'espèces. Chez les ovins, les caprins et certains cervidés, dont la gestation a une durée de 5 à 6 mois, la période de reproduction a lieu en automne et en hiver. Chez les ovins, la saison de reproduction débute à la fin de l'été/début de l'automne quand la durée du jour diminue et s'achève à la fin de l'hiver/début du printemps, quand la durée du jour augmente. Pendant la période d'activité sexuelle, les béliers présentent une augmentation de la production spermatique



associée à une augmentation du volume testiculaire, alors que les brebis montrent une succession de cycles d'environ 17 jours constitués d'une phase folliculaire de 2 à 3 jours suivie d'une longue phase lutéale de 14 à 16 jours. La phase de repos sexuel (ou anœstrus saisonnier) est caractérisée par la disparition de cycles ovariens chez la femelle et un volume testiculaire diminué chez le mâle, le tout associé à l'absence de comportement sexuel.

L'utilisation du modèle de brebis ovariectomisées (OVX) et traitées avec implants d'E2 capables de délivrer des doses constantes d'E2 a permis de démontrer l'importance du rôle des stéroïdes dans le contrôle saisonnier de la reproduction. Des brebis OVX porteuses d'un implant d'E2 ont des niveaux de LH sérique élevés d'octobre à janvier et qui diminuent jusqu'à des niveaux indétectables de février à août, c'est-à-dire jusqu'à l'automne suivant, soit au même moment que les femelles intactes qui sont cyclées en automne et en hiver. Au contraire, chez les brebis OVX ne recevant pas de traitement à l'œstradiol, les concentrations sériques de LH sont maximales et ne varient pas dans le temps. Les variations de sensibilité de l'hypothalamus à l'œstradiol sont donc à l'origine de la saisonnalité de la reproduction (Legan *et al* 1977, Legan et Karsch 1980). La modification de la rétroaction des stéroïdes sur la pulsativité de la GnRH constitue l'étape finale de l'action de la photopériode sur l'axe gonadotrope.

L'information photopériodique est transmise par la rétine aux noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC), siège de l'horloge circadienne centrale. Les NSC contrôlent la production de mélatonine ou « hormone de la nuit », par la glande pinéale. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'intégration du message mélatoninergique commencent à être élucidés grâce notamment aux travaux pionniers réalisés chez

l'oiseau. La *Pars Tuberalis* (PT) de l'hypophyse, un tissu endocrine en contact avec les terminaisons nerveuses de l'EM et qui entoure la tige pituitaire constitue une des cibles d'intégration du message mélatoninergique (figure 3, Dardente *et al* 2014). Dans la PT, la mélatonine pilote l'expression photopériodique de TSH (thyrotropine) et elle est élevée durant les jours longs d'été et très faible durant les jours courts d'hiver. Contrairement aux autres cellules thyroïdiques de la *pars distalis*, celles de la PT ne sont sensibles ni au TRH (« *Thyrotropin-Releasing Hormone* ») ni à l'hormone thyroïdienne T3, faute de récepteurs spécifiques. La TSH produite par la PT présente par ailleurs une glycosylation spécifique qui l'empêche d'agir sur la glande thyroïde. Cette TSH spéciale agit localement dans l'EM pour contrôler l'expression de DIO2 et DIO3, enzymes respectivement responsables de la production et de la dégradation de la T3. De ce contrôle résulte une production locale accrue de T3 spécifiquement durant les jours longs. Cette cascade moléculaire explicite l'observation répétée depuis les années 1940, d'abord chez divers oiseaux (canard, caille et étourneau) puis chez le mouton, selon laquelle une action de T3 dans cette région est requise pour que les animaux adaptent leur reproduction aux conditions printanières (Dardente *et al* 2014). La T3 pourrait agir indirectement sur les neurones à GnRH, peut-être *via* des mécanismes de plasticité morphologique tels que la réorganisation des extrémités axonales dans l'EM (Wood *et al* 2015) ou de plasticité structurale comme la cytogénèse (neurogenèse et gliogénèse), puisqu'il a été démontré que les tanocytes sont des cellules souches neurales et qu'il existe une niche neurogénique dans l'EM (encadré 3).

Une autre hypothèse très attractive pour expliquer l'action de la T3 et partiellement étayée, est que cette hormone agisse sur une petite population de neurones qui expriment le neuropeptide

Kisspeptine, le plus puissant sécrétagogue du GnRH identifié (c.f. § 4.1).

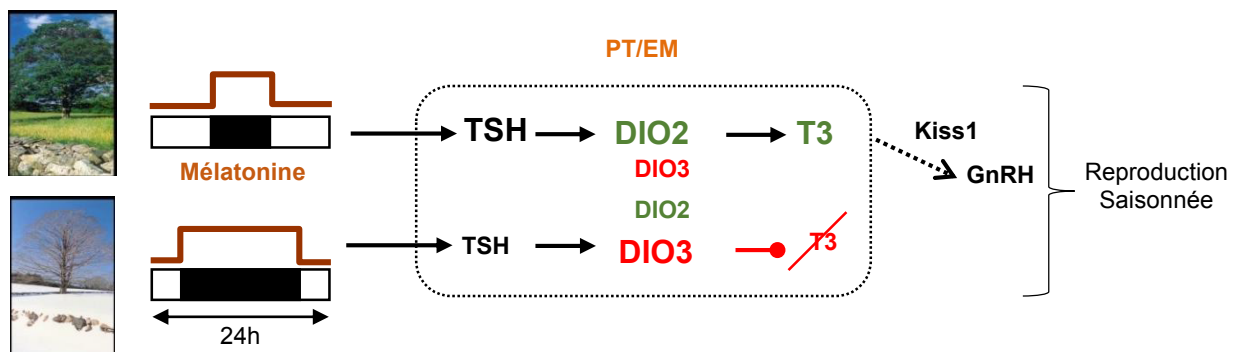
## 5.2 / L'alimentation

Les perturbations alimentaires ont des conséquences importantes sur la fonction de reproduction avant la puberté ainsi qu'à l'âge adulte, chez les mâles et les femelles (revue (Dupont *et al* 2014). Avant la puberté, des restrictions alimentaires entraînent un retard de croissance et un délai dans la mise en place de la puberté chez les mâles comme chez les femelles. Au stade adulte, chez les modèles de mammifères domestiques, on observe une prolongation de l'anœstrus post-partum et post-sevrage chez la vache et la truie respectivement. Plus généralement, une sous-alimentation entraîne des dysfonctionnements dans les cycles ovariens (Monget et Martin 1997). Chez la femme, les principaux éléments régulateurs de l'axe gonadotrope sont la prise alimentaire (en particulier les lipides) et le poids. D'ailleurs, chez les athlètes de haut niveau ou les patientes souffrant d'anorexie, des aménorrhées peuvent survenir. La sur-alimentation a aussi des conséquences sur la fonction de reproduction, en particulier le surpoids au moment de la conception peut compromettre le succès d'une grossesse.

## 5.3 / Les perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens (PEs) peuvent être d'origine naturelle (hormones naturelles), synthétiques (œstrogènes de synthèse, antibiotiques, agents plastifiants, produits phytosanitaires...). Les PEs capables d'induire des perturbations de la fonction de reproduction sont essentiellement les molécules ayant une activité agoniste ou antagoniste pour des analogues de type œstrogénique ou androgénique. Les œstrogènes synthétiques sont des molécules qui présentent un risque avéré pour la faune sauvage mais aussi pour la santé humaine si leur

**Figure 3.** Cascade de transduction du message photopériodique dans la pars tuberalis et l'éminence médiane (PT/ME).



L'action de la mélatonine se traduit par une modification locale des taux de T3. Ces variations de T3 affectent la production de GnRH suivant des mécanismes encore mal connus mais qui impliquent probablement Kiss1 (c.f. § 5.1).

**Encadré 3. La neurogenèse.**

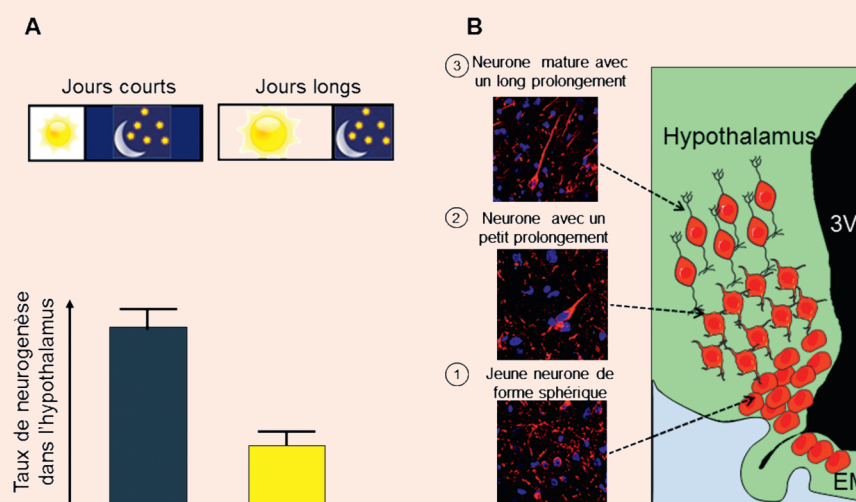
Longtemps le dogme selon lequel le cerveau adulte était dépourvu de toute capacité de régénération a prévalu, en lien avec les travaux du neurobiologiste Ramón y Cajal qui avait affirmé qu'aucun nouveau neurone n'apparaissait dans le cerveau adulte. Au début des années 1980, des travaux démontrent que certaines parties du cerveau des mammifères ont la capacité de produire de nouvelles cellules. Ces cellules migrent vers des zones fonctionnelles et se différencient en neurones. La formation de ces nouveaux neurones est appelée la neurogenèse. Chez les mammifères, y compris chez l'Homme, la neurogenèse est observée dans plusieurs zones du cerveau appelées des « niches » neurogéniques. Ces régions spécifiques ont une architecture et une organisation qui offrent aux Cellules Souches Neurales (CSNs) qui les composent, un microenvironnement moléculaire et cellulaire perpétuant leur capacité à se diviser de façon asymétrique. En effet, ces CSNs sont capables de se multiplier et génèrent d'une part une nouvelle cellule souche, d'autre part une cellule, appelée précurseur. Dans ce microenvironnement se produit également la différenciation des précurseurs, en jeunes neurones ou neuroblastes, à l'origine des neurones.

Deux régions cérébrales fournissent en permanence de nouveaux neurones : la zone sous-ventriculaire, située sur les parois des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire, localisée dans le gyrus denté de l'hippocampe. Récemment une troisième niche neurogénique localisée dans l'hypothalamus, à la base du cerveau a été mise en évidence. L'hypothalamus joue un rôle essentiel dans le contrôle des fonctions physiologiques comme par exemple la reproduction, la prise alimentaire ou la régulation thermique.

Chez la brebis en anœstrus, le passage d'une photopériode de type Jours Longs (JL) à une photopériode de type Jours Courts (JC) induit une reprise des cycles 40-50 jours après cette transition. La pose d'un implant de mélatonine, alors que les animaux sont placés en photopériode longue, a le même effet. De la même manière, l'activité sexuelle des brebis est inhibée entre 25 et 35 jours après le passage de JC à JL. Ces latences entre les transitions photopériodiques et la stimulation ou l'inhibition de l'axe gonadotrope sont compatibles avec l'implication de mécanismes de plasticité cellulaire comme la neurogenèse ou la gliogenèse. Notre hypothèse de travail est que des cellules nouvellement formées pourraient intégrer les circuits neuronaux impliqués dans la stimulation ou bien l'arrêt de l'activation de l'axe HHG et aboutir aux changements de statut reproductif de l'animal.

De telles phénomènes de plasticité cellulaire dépendants de la saison ont été démontrés dans des modèles aviaires d'oiseaux chanteurs, pour lesquels la production de nouveaux neurones est augmentée dans le noyau central de contrôle du chant au printemps pendant la saison de reproduction ou jusqu'à 1,5% des neurones totaux sont renouvelés par jour. Chez le hamster syrien, une transition vers les jours courts (inhibiteurs de l'axe reproducteur dans cette espèce) induit une augmentation de l'incorporation de BrdU, un analogue de la thymidine détectable par immunohistochimie, dans plusieurs régions du SNC dont l'hypothalamus (Huang *et al* 1998). Ces nouvelles cellules deviennent majoritairement des neurones. Chez le mouton, nous avons montré l'existence d'une niche neurogénique dans l'hypothalamus adulte (Batailler *et al* 2016). L'activité de cette niche neurogénique hypothalamique varie en fonction de la saison. Nous mettons en évidence une augmentation significative de la prolifération cellulaire ainsi que du nombre de jeunes neurones est observée pendant les jours courts correspondant à la période d'activité sexuelle (figure 1A, Migaud *et al* 2011, 2015), suggérant que des remaniements cellulaires d'intensités différentes opèrent en fonction des saisons. Nous avons également montré que la morphologie des jeunes neurones de l'hypothalamus, identifiés grâce à un immunomarquage à la doublecortine (DCX), varie en fonction de leur localisation (figure 1B, Batailler *et al* 2016). Leur forme est ronde et immature à proximité de la niche neurogénique hypothalamique, alors que, plus loin dans le parenchyme, ils adoptent une forme fusiforme avec des prolongements de plus en plus longs, caractéristiques des neurones matures. Ces résultats suggèrent l'existence de processus de maturation et/ou de migration des nouveaux neurones hypothalamiques.

**Figure 1.** La neurogenèse hypothalamique adulte sous l'influence de la photopériode chez le mouton.





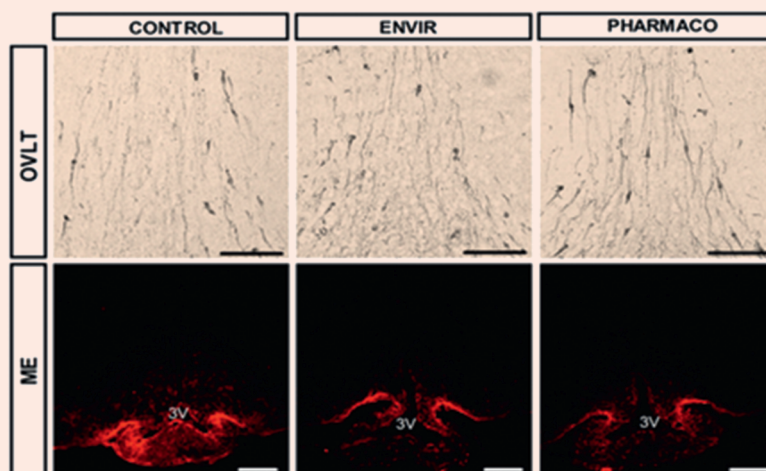
**Encadré 4. Les perturbateurs endocriniens.**

Les Perturbateurs Endocriniens (PEs) sont des micropolluants présents dans l'environnement, d'origine naturelle (hormones) ou synthétique (industrie chimique (pesticides, agents plastifiants...) et pharmaceutique (médicaments)). Agissant à faibles doses, les PEs sont capables d'interférer avec le système endocrinien des êtres vivants et peuvent alors induire des effets délétères sur la santé des individus (Gore *et al* 2014), mais aussi sur celle de leur descendance, avec parfois des effets transgénérationnels (Walker et Gore 2011).

La phase développementale de la vie de l'individu, depuis le développement embryo-fœtal jusqu'à la vie juvénile et périparturitaire, constitue une période de grande sensibilité aux PEs. Les hormones endogènes exercent des rôles organisationnels cruciaux sur l'organisme qui peuvent être perturbés par l'exposition aux PEs. Ainsi de nombreuses données ont mis en évidence des impacts néfastes de l'exposition développementale aux PEs sur les grandes fonctions de l'organisme, dont la reproduction et le métabolisme. Concernant la fonction de reproduction, l'exposition précoce aux PEs altère la compétence reproductrice chez l'adulte en interférant, pendant le développement, avec les hormones stéroïdes endogènes impliquées dans le développement sexuel et l'organisation cérébrale des circuits neuronaux qui coordonnent la physiologie et les comportements de manière sexe-spécifique. Nous avons récemment démontré, chez la souris, les effets délétères de l'exposition développementale à l'éthinylœstradiol (EE2), composant principal de la pilule contraceptive, inscrit dans la directive européenne 2013/39/EU sur la liste des substances prioritaires à surveiller dans les eaux de surface. L'exposition développementale à l'EE2 induit chez le mâle adulte un comportement sexuel exacerbé (Derouiche *et al* 2015a), corrélé à des modifications neuroanatomiques d'un noyau hypothalamique impliqué dans le contrôle du comportement sexuel mâle, le noyau sexuellement dimorphique (Derouiche *et al* 2015a). Ces effets sont transmis à la descendance jusqu'à la quatrième génération, seuls les individus de la première génération ayant été exposés pendant leur développement (Derouiche *et al* 2015a). Chez la souris femelle, l'exposition développementale à l'EE2 a pour effets d'avancer l'âge de déclenchement de la puberté (Derouiche *et al* 2015b) et d'observer, à l'âge adulte, un nombre accru de neurones hypothalamiques à GnRH et une densité réduite de fibres immunoréactives pour la GnRH (figure 1, Derouiche *et al* 2015b).

Les effets délétères de l'exposition généralisée aux PEs sur la physiologie, l'organisation cérébrale et les comportements des animaux, tant d'élevage que de la faune sauvage, et de l'être humain, font de cette problématique une question sociétale dont les conséquences sanitaires demeurent encore peu caractérisées.

**Figure 1.** Effet d'une exposition développementale sur les neurones à GnRH de souris femelles (d'après Derouiche *et al* 2015b).



L'exposition développementale à l'EE2 (doses environnementale (ENVIR) et pharmacologique (PHARMACO)) a pour conséquences, chez la souris femelle adulte, un nombre accru de corps cellulaires de neurones à GnRH (détection immunohistochimique DAB-Ni) dans l'*Organum Vasculum Lamina Terminalis* (OVL) (photographies en haut) et une réduction de la densité des fibres immunoréactives (détection fluorescente) pour la GnRH dans l'éminence médiane (ME) (photographies en bas), en comparaison avec les femelles contrôles non exposées à l'EE2 (CONTROL).

3V : troisième ventricule. Barre d'échelle = 100 µm.

présence dans l'environnement n'est pas contrôlée, car ces composés empruntent les mêmes voies de signalisation que les œstrogènes naturels (encadré 4).

## 6 / Perspectives

L'action des hormones qu'elles soient de nature stéroïdienne, protéique ou

glycoprotéique, dans le cadre du contrôle neuroendocrine de la reproduction, est loin d'être entièrement élucidée et une connaissance plus approfondie de ces mécanismes neuroendocrines pourrait permettre de réduire voire de supprimer l'utilisation des hormones dans le futur et contribuer ainsi au développement de nouveaux systèmes d'élevage, plus respectueux de l'environnement et de l'animal.

Les voies de signalisation neuronales impliquées dans la régulation de la libération du GnRH hypothalamique ne sont pas encore parfaitement identifiées. Dans le cadre du contrôle neuroendocrine de la puberté chez le rat et le primate non humain, des approches de biologie des systèmes ont récemment été développées (Lomniczi *et al* 2013). Ces approches *in silico* pourraient être élargies à l'identification des réseaux de gènes

qui, associés aux mécanismes neuroendocrines, régulent la libération de GnRH, afin d'obtenir la structure générale et l'agencement hiérarchique des gènes au sein de ces réseaux.

De même, les mécanismes neurobiologiques à la base de la génération du mode de libération pulsatile de GnRH restent aussi à définir. L'utilisation de techniques telles que l'optogénétique a déjà permis de définir les paramètres minimaux d'activation des neurones à GnRH ou de leurs projections distales dans l'EM, requis pour générer la sécrétion pulsatile de LH (Campos et Herbison 2014). Plus récemment encore, cette même approche a permis de montrer que l'activation spécifique et synchrone des neurones Kiss du NA induit la libération de LH de manière pulsatile (Han *et al* 2015). De telles approches pourraient également être mises en place pour caractériser plus précisément le rôle respectif des différentes populations de neurones Kiss dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH.

L'introduction récente de la technologie « CRISPR-cas9 » utilisée pour modifier le génome quel que soit l'espèce de

mammifère considérée (Hsu *et al* 2014), est susceptible d'apporter des réponses à des questions en lien avec nos animaux d'élevage et pourrait participer à la compréhension des mécanismes de saisonnalité de la reproduction.

D'un point de vue plus appliqué, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires neuroendocrines pourrait favoriser le développement nouvelles stratégies pour le contrôle de la reproduction. Ainsi, l'administration de Kiss, induit l'ovulation chez les petits ruminants en saison d'anoestrus (Hashizume *et al* 2010) et synchronise cette ovulation, quand il est administré pendant la saison de reproduction (Caraty *et al* 2007). Des recherches sont actuellement menées dans le but d'élaborer des analogues du Kiss, résistants à la dégradation enzymatique, injectables par voie intramusculaire, donc potentiellement utilisable en élevage. Des résultats récents ont montré l'efficacité de telles analogues pour déclencher l'ovulation chez la brebis (Decourt *et al* 2016) et pour induire une augmentation durable de la LH et de la FSH chez des brebis en repos sexuel (Beltramo *et al* 2015), ouvrant ainsi de nouvelles possibilités d'appli-

cation dans la gestion de la reproduction dans les élevages de petits ruminants.

## Conclusion

Au cours des dernières décennies, l'ensemble des connaissances acquises dans le domaine de la physiologie, en particulier sur les mécanismes centraux de contrôle de la reproduction, combiné aux progrès génétiques réalisés dans les différentes espèces animales ont permis des améliorations considérables dans les performances d'élevage des espèces domestiques, et le recours aux substances hormonales pour la maîtrise des fonctions de reproduction et de croissance a joué un rôle essentiel dans ces progrès. Cependant, depuis plusieurs années, l'Europe tend à restreindre l'utilisation de tels traitements hormonaux dans les pratiques d'élevage. Le développement de méthodes alternatives pour le contrôle de la reproduction chez les animaux d'élevage devient donc essentiel et repose en grande partie sur les avancées scientifiques à venir dans la compréhension des mécanismes neuroendocrines contrôlant la reproduction.

## Références

- Batailler M., Derouet L., Butruille L., Migaud M., 2016. Sensitivity to the photoperiod and potential migratory features of neuroblasts in the adult sheep hypothalamus. *Brain Struct. Funct.*, 221, 3301-3314.
- Beltramo M., Dardente H., Cayla X., Caraty A., 2014. Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 382, 387-399.
- Beltramo M., Robert V., Galibert M., Madinier J.B., Marceau P., Dardente H., Decourt C., De Roux N., Lomet D., Delmas A.F., Caraty A., Aucagne V., 2015. Rational design of triazololipopeptides analogs of kisspeptin inducing a long-lasting increase of gonadotropins. *J. Med. Chem.*, 58, 3459-3470.
- Bourguignon J.P., Jaeken J., Gerard A., de Zegher F., 1997. Amino acid neurotransmission and initiation of puberty: evidence from nonketotic hyperglycinemia in a female infant and gonadotropin-releasing hormone secretion by rat hypothalamic explants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 1899-1903.
- Bronson F.H., 1988. Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reprod. Nut. Dev.*, 28, 335-347.
- Campos P., Herbison A.E., 2014. Optogenetic activation of GnRH neurons reveals minimal requirements for pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 111, 18387-18392.
- Caraty A., Orgeur P., Thiery J.C., 1982. Demonstration of the pulsatile secretion of LH-RH into hypophysial portal blood of ewes using an original technic for multiple samples. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences. Serie III*, 295, 103-106.
- Caraty A., Locatelli A., Martin G.B., 1989. Biphasic response in the secretion of gonadotropin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J. Endocrinol.*, 123, 375-382.
- Caraty A., Smith J.T., Lomet D., Ben Said S., Morrissey A., Cognié J., Doughton B., Baril G., Briant C., Clarke I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148, 5258-5267.
- Cariboni A., Maggi R., Parnavelas J.G., 2007. From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Trends Neurosci.*, 30, 638-644.
- Carmel P.W., Araki S., Ferin M., 1976. Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology*, 99, 243-248.
- Chappell P.E., Schneider J.S., Kim P., Xu M., Lydon J.P., O'Malley B.W., Levine J.E., 1999. Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice. *Endocrinology*, 140, 3653-3658.
- Charlton H., 2008. Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history. *J. Neuroendocrinol.*, 20, 641-646.
- Clarke I.J., Cummins J.T., 1982. The temporal relationship between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111, 1737-1739.
- Clarkson J., Herbison A.E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus: sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147, 5817-5825.
- Clasadonte J., Poulain P., Hanchate N.K., Corfas G., Ojeda S.R., Prevot V., 2011. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 108, 16104-16109.
- Combarrous Y., Richard F., Martinat N., 1998. Mammalian follicle-stimulating hormone receptors and their ligands. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod Biol.*, 77, 125-130.
- Constantin S., 2011. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron: studies from embryonic GnRH neurons. *J. Neuroendocrinol.*, 23, 542-553.
- Dardente H., Hazlerigg D.G., Ebling F.J., 2014. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front. Endocrinol.*, 5, 19.
- Decourt C., Robert V., Anger K., Galibert M., Madinier J.B., Liu X., Dardente H., Lomet D., Delmas A.F., Caraty A., Herbison A.E., Anderson G.M., Aucagne V., Beltramo M., 2016. A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Sci. Rep.*, 6, 26908.

- Derouiche L., Keller M., Duittoz A.H., Pillon D., 2015a. Developmental exposure to Ethinylestradiol affects transgenerationally sexual behavior and neuroendocrine networks in male mice. *Sci. Rep.*, 5, 17457.
- Derouiche L., Keller M., Martini M., Duittoz A.H., Pillon D., 2015b. Developmental Exposure to Ethinylestradiol Affects Reproductive Physiology, the GnRH Neuroendocrine Network and Behaviors in Female Mouse. *Front. Neurosci.*, 9, 463.
- Duittoz A., Prevot V., 2014. Développement, neuroanatomie et fonction des neurones à Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). In : La reproduction animale et humaine, Saint-Dizier M., Chastant-Maillard M. (Eds). Éditions Quae, Versailles, France, 8, 149-170.
- Dupont J., Reverchon M., Bertoldo M.J., Froment P., 2014. Nutritional signals and reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 382, 527-537.
- Fernald R.D., White R.B., 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front. Neuroendocrinol.*, 20, 224-240.
- Franceschini I., Lomet D., Cateau M., Delsol G., Tillet Y., Caraty A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci. Lett.*, 401, 225-230.
- Geller S., Kolasa E., Tillet Y., Duittoz A., Vaudin P., 2013. Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development. *Glia*, 61, 550-566.
- Gibson M.J., Ingraham L., Dobrjansky A., 2000. Soluble factors guide gonadotropin-releasing hormone axonal targeting to the median eminence. *Endocrinology*, 141, 3065-3071.
- Gore A.C., Martien K.M., Gagnidze K., Pfaff D., 2014. Implications of prenatal steroid perturbations for neurodevelopment, behavior, and autism. *Endocr. Rev.*, 35, 961-991.
- Han S.Y., McLennan T., Czielesky K., Herbison A.E., 2015. Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112, 13109-13114.
- Hashizume T., Saito H., Sawada T., Yaegashi T., Ezzat A.A., Sawai K., Yamashita T., 2010. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 118, 37-41.
- Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A., 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.*, 87, 905-931.
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F., 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278.
- Huang L., DeVries G.J., Bittman E.L., 1998. Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J. Neurobiol.*, 36, 410-420.
- Jasoni C.L., Porteous R.W., Herbison A.E., 2009. Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. *Dev. Dyn.*, 238, 524-531.
- Kah O., Lethimonier C., Somoza G., Guilgur L.G., Vaillant C., Lareyre J.J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153, 346-364.
- Karsch F.J., Evans N.P., 1996. Feedback actions of estradiol on GnRH secretion during the follicular phase of the estrous cycle. *Acta Neurobiol. Exp.*, 56, 715-725.
- Karsch F.J., Malpoux B., Wayne N.L., Robinson J.E., 1988. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod. Nut. Dev.*, 28, 459-472.
- Klosen P., Sebert M.E., Rasri K., Laran-Chich M.P., Simonneaux V., 2013. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.*, 27, 2677-2686.
- Knobil E., 1990. The GnRH pulse generator. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 163, 1721-1727.
- Legan S.J., Karsch F.J., 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol. Reprod.*, 23, 1061-1068.
- Legan S.J., Karsch F.J., Foster D.L., 1977. The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 101, 818-824.
- Levine J.E., Ramirez V.D., 1982. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology*, 111, 1439-1448.
- Livne I., Gibson M.J., Silverman A.J., 1993. Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse. *Dev. Biol.*, 159, 643-656.
- Lomniczi A., Wright H., Castellano J.M., Sonmez K., Ojeda S.R., 2013. A system biology approach to identify regulatory pathways underlying the neuroendocrine control of female puberty in rats and nonhuman primates. *Horm. Behav.*, 64, 175-186.
- Maggi A., Villa A., 2014. In vivo dynamics of estrogen receptor activity: the ERE-Luc model. *The J. Ster. Biochem. Mol. Biol.*, 139, 262-269.
- Merchenthaler I., Setalo G., Csontos C., Petrusz P., Flerko B., Negro-Vilar A., 1989. Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology*, 125, 2812-2821.
- Messenger S., Chatzidakis E.E., Ma D., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Thresher R.R., Malinge L., Lomet D., Carlton M.B., Colledge W.H., Caraty A., Aparicio S.A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 1761-1766.
- Migaud M., Batailler M., Pillon D., Franceschini I., Malpoux B., 2011. Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J. Biol. Rhythms*, 26, 486-496.
- Migaud M., Buttrill L., 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.
- Monget P., Martin G.B., 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum. Reprod.*, 12, Suppl 1, 33-52.
- Noel S.D., Keen K.L., Baumann D.I., Filardo E.J., Terasawa E., 2009. Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Mol. Endocrinol.*, 23, 349-359.
- Oka Y., 2002. Physiology and release activity of GnRH neurons. *Prog. Brain Res.*, 141, 259-281.
- Ojeda S.R., Lomniczi A., Sandau U.S., 2008. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.*, 20, 732-742.
- Perrett R.M., McArdle C.A., 2013. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. *Front. Endocrinol.*, 4, 180.
- Pinilla L., Aguilar E., Dieguez C., Millar R.P., Tena-Sempere M., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 92, 1235-12316.
- Plant T.M., Krey L.C., Moossy J., McCormack J.T., Hess D.L., Knobil E., 1978. The arcuate nucleus and the control of gonadotropin and prolactin secretion in the female rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, 102, 52-62.
- Raskin K., de Gendt K., Duittoz A., Liere P., Verhoeven G., *et al* 2009. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J. Neurosci.*, 29, 4461-4470.
- Revel F.G., Saboureau M., Masson-Pevet M., Pevet P., Mikkelsen J.D., Simonneaux V., 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Cur. Biol.*, 16, 1730-1735.
- Schwanzel-Fukuda M., Pfaff D.W., 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*, 338, 161-164.
- Scott C.J., Tilbrook A.J., Rawson J.A., Clarke I.J., 2000. Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 313-326.
- Shivers B.D., Harlan R.E., Morrell J.I., Pfaff D.W., 1983. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*, 304, 345-347.
- Smith J.T., Dungan H.M., Stoll E.A., Gottsch M.L., Braun R.E., Eacker S.M., Clifton D.K., Steiner R.A., 2005. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinol.*, 146, 2976-2984.
- Toran-Allerand C.D., Guan X., MacLusky N.J., Horvath T.L., Diano S., *et al* 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.*, 22, 8391-8401.
- Tostivint H., 2011., Evolution of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene family



in relation to vertebrate tetraploidizations. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 170, 575-581.

Walker D.M., Gore A.C., 2011. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nature Rev. Endocrinol.*, 7, 197-207.

White R.B., Fernald R.D., 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 112, 17-25.

Wood S.H., Christian H.C., Miedzinska K., Saer B.R., Johnson M., Paton B., Yu L., McNeilly J., Davis J.R., McNeily A.S., Burt D.W., Loudon A.S., 2015. Binary Switching of Calendar Cells in the Pituitary Defines the Phase of the Circannual Cycle in Mammals. *Cur. Biol.*, 25, 2651-2662.

Wray S., Grant P., Gainer H., 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are

derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 8132-8136.

Zohar Y., Munoz-Cueto J.A., Elizur A., Kah O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165, 438-455.

## Résumé

La reproduction recouvre l'ensemble des processus biologiques qui permettent d'assurer la survie d'une espèce grâce à la naissance de nouveaux individus. Cette propriété fondamentale et obligatoire du monde vivant repose sur un mécanisme efficace et extrêmement complexe. Chez les vertébrés, c'est l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique qui est le cadre anatomique responsable de la compétence reproductive et donc de la pérennité des espèces. La coordination de ce système biologique à trois étages repose sur le contrôle neuronal de libération de la « *Gonadotrophin Releasing Hormone* » (GnRH), système localisé dans la partie rostrale de l'hypothalamus. La libération de GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire stimule la sécrétion des gonadotropines hypophysaires qui sont impliquées dans le déclenchement de la puberté et la régulation de la fonction de reproduction. Cette revue fournit des éléments de compréhension sur le fonctionnement du contrôle neuroendocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez les mammifères, en particulier, sur les propriétés du système à GnRH, le contrôle neuroendocrinien des cycles ovariens, l'effet de neuropeptides hypothalamiques « *kisspeptin* » sur les neurones à GnRH, le déclenchement de la puberté, la saisonnalité et conclue sur les perspectives de recherche dans cette discipline de la neurobiologie.

## Abstract

### *Neuroendocrine control of reproduction in mammals*

Reproduction covers all biological processes that ensure the survival of species through the birth of new individuals. This fundamental and mandatory property of any organism is based on an efficient and highly complex mechanism. In vertebrates, the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is the anatomical substrate responsible for the reproductive competence and therefore the sustainability of the species. The coordination of this three-stage-based biological system relies on the neural control of the gonadotrophin releasing hormone (GnRH) release. This system is localized in the rostral part of the ventral hypothalamus. GnRH is released in the hypophyseal portal system and stimulates the secretion of the pituitary gonadotropins that are involved in the onset of puberty and the regulation of reproductive function. This review provides understanding about the mechanisms of the neuroendocrine control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, in particular, on the properties of the system onto the GnRH neuroendocrine control of ovarian cycles, the effect of hypothalamic neuropeptides (*kisspeptin*) on GnRH neurons, the onset of puberty, and the seasonality of reproduction and concludes on research perspectives in this rejuvenated field of neurobiology.

MIGAUD M., DARDENTE H., KELLER M., BATAILLER M., MEURISSE M., PILLON D., 2016. Contrôle neuroendocrinien de la reproduction chez les mammifères. In : Neurobiologie des fonctions et des comportements. Chaillou E., Tillet Y., Baumont R. (Eds). Dossier, INRA Prod. Anim., 29, 255-266.