



**HAL**  
open science

# Ontogenèse des neurones à kisspeptine chez le rat : neurogenèse et cartographie spatio-temporelle de kisspeptine de l'embryogenèse à l'âge adulte

Elodie Desroziers

► **To cite this version:**

Elodie Desroziers. Ontogenèse des neurones à kisspeptine chez le rat : neurogenèse et cartographie spatio-temporelle de kisspeptine de l'embryogenèse à l'âge adulte. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours), 2011. Français. NNT : . tel-02809188

**HAL Id: tel-02809188**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02809188>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

Copyright

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologies*

UMR INRA-CNRS-Université de Tours

Physiologie de la reproduction et des comportements

Microenvironnement et dynamique des réseaux neuroendocriniens

## THÈSE

présentée par :

**Elodie DESROZIER**

soutenue le : **14 Décembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Ontogenèse des neurones à kisspeptine chez le rat :**  
Neurogenèse et cartographie spatio-temporelle de  
kisspeptine de l'embryogenèse à l'âge adulte.

**THÈSE dirigée par :**

**Duittoz Anne**

Professeur (HDR), Université François – Rabelais de Tours

**THÈSE co-encadrée par :**

**Franceschini Isabelle**

Chargée de recherche, INRA

**RAPPORTEURS :**

**Bouret Sébastien**

Chargé de recherche (HDR), INSERM, Lille

**Risold Pierre-Yves**

Chargé de recherche (HDR), INSERM, Besançon

**JURY :**

**Duittoz Anne**

Professeur, Université François – Rabelais de Tours

**Franceschini Isabelle**

Chargée de recherche, INRA

**Bouret Sébastien**

Chargé de recherche, INSERM, Lille

**Risold Pierre-Yves**

Chargé de recherche, INSERM Besançon

**Pralong François**

Directeur de Recherche, Université de Lausanne

**Beltramo Massimiliano**

Directeur de Recherche, INRA, Tours

**INVITE :**

**Vaudry Hubert**

Directeur de recherche, INSERM, Rouen

A mes deux grands-pères,  
A mes parents,  
A ma sœur,

A mon mari, Christopher.

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : **Sébastien Bouret, Pierre-Yves Risold, Hubert Vaudry, François Pralong, Massimo Beltramo, Anne Duittoz et Isabelle Franceschini** d'avoir consacré un peu de leur temps pour évaluer mon travail de thèse.

Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement mes deux directrices de thèse. **Anne**, pour m'avoir fait découvrir la neuroendocrinologie en théorie dès la licence et en pratique lors de mon stage de M1. Grâce à vous, les statistiques sont devenues un jeu. Je tiens également à vous remercier pour vos corrections, nos discussions scientifiques et votre soutien. **Isabelle**, pour ces 3 années ½ (Master 2 + Thèse) pendant lesquels votre encadrement m'a permis d'avancer et de progresser. Un grand merci pour m'avoir permis de présenter mes résultats tout au long de ma thèse que ce soit dans le cadre de réunion avec des collaborateurs français et étrangers ou en participant à de nombreux congrès nationaux et internationaux. Mais également, pour vos conseils, vos corrections, nos discussions scientifiques et surtout pour votre soutien dans toutes les démarches que j'ai pu entreprendre au cours de ma thèse.

Je tiens également à remercier tout particulièrement **Yves Tillet**, qui fut pour moi comme un troisième directeur de thèse de par sa disponibilité, ses conseils et son soutien tout au long de ces trois années de thèse dans le design des expérimentations, dans l'analyse des données immunohistochimiques, dans l'écriture de mes papiers et de ma thèse ainsi que dans toutes mes démarches de demandes de bourses pour un futur post-doctorat. Merci d'avoir partagé avec moi vos connaissances sur la neuroanatomie, l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon comité de thèse pour leurs conseils: **Sakina Mahouty-Kodja, Pierre-Yves Risold, Alain Caraty, Yves Tillet, Isabelle Franceschini et Anne Duittoz**.

Merci à **Alain Caraty** et à **Jens Mikkelsen** pour les anticorps qui m'ont permis d'obtenir tous les résultats présentés dans cette thèse.

Une pensée toute particulière à **Gilles Bruneau** pour son aide dans la mise en place de l'hybridation *in situ* et son soutien à chaque instant difficile. Mais également, pour nos discussions pas toujours scientifiques qui ont égayés les heures passées à "manipuler" au labo.

Je tiens à remercier **Matthieu Keller** pour m'avoir appris la stéréotaxie et son aide lors des injections de colchicine ainsi que pour ses conseils tout au long de ma thèse.

Une dédicace spéciale à **Vincent Robert** avec qui j'ai partagé les galères de la mise au point de l'hybridation *in situ* et qui à l'heure actuelle continue les manip.

Je tiens à remercier les deux étudiantes que j'ai encadrées au cours de cette thèse et qui ont participé à l'obtention de certains des résultats présentés dans ce manuscrit :

- **Cindy Gassaud**, étudiante en 1<sup>ère</sup> année de BTS, pour son aide technique en ce qui concerne l'étude du développement péri-pubertaire.
- **Marine Droguerre**, étudiante en master I, qui a réalisé toute les immunohistochimies et l'analyse qui ont permis d'identifier la période de neurogenèse des neurones à kisspeptine de l'ARC pendant que je réalisais les immunohistochimies sur les embryons au cours des derniers mois de manip avant l'écriture de ce manuscrit.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe MidynNet pour leurs conseils et les discussions autour de mes résultats lors des réunions d'équipe mais également et surtout pour leurs soutiens. Il ne faut pas oublier les moments de rigolade et de déconnade ensemble!

Je souhaite maintenant remercier différentes personnes avec qui j'ai partagées mes doutes, mes déceptions et qui m'ont toujours épaulées dans les moments de bonheur mais également dans les périodes difficiles que j'ai pu traverser pendant cette thèse :

- **Sarah** pour toutes nos conversations scientifiques riches en émotion mais également pour ton amitié qui j'espère perdurera malgré l'éloignement. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse et n'oublie pas que même si je suis loin je serai toujours à l'écoute quand tu en auras besoin : « chacun son tour ».
- **Monique** ou plutôt Momo que dire de plus que MERCI : merci pour les mardis dissections partagés avec toi au cours de mon Master II, merci pour ton aide et ton soutien au cours de ma thèse et surtout merci pour ta philosophie et ta bonne humeur. J'en profite pour te souhaiter une bonne retraite bien méritée, profites-en bien!
- **Camille, Caroline, Samia, Mélanie, Maïna, Betty** merci pour votre soutien tout au long de ces trois années
- **Les Martines**, nous sommes découvertes plutôt vers la fin de la thèse et je tiens à vous dire que je suis heureuse d'avoir fait votre connaissance, que je vous apprécie énormément et vous remercie pour votre soutien et vos conseils. Sans oublier nos discussions autour d'un café après déjeuner !

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participées à ce travail de thèse :

- **Ida Boulay** pour m'avoir appris l'art des perfusions intracardiaques
- **Delphine Pillon** pour m'avoir formé en théorie et en pratique sur les frottis vaginaux et pour son soutien
- Toute l'équipe de l'animalerie rat : **Claude, Déborah et Marine** pour leurs soins aux animaux.
- Toute l'équipe du labo dosage, spécialement **Anne-Lyse** pour les dosages de testostérone.
- **Lionel Lardic** pour les dosages d'œstradiol.
- **Maryse Meurisse et Nicole Jouanneau** pour leur conseil dans la préparation des tissus et dans la mise au point de protocole immunohistochimique.
- **Pascale Crépieux, Thomas Boulot, Guillaume Durand, Thibault Tranchant et Guillaume Tsikis** pour leur aide et leurs conseils dans la détection du kisspeptine par Western blot!
- **Maryline Cateau** avec qui j'ai partagé un bureau pendant les deux premières années de thèse et qui a toujours été prête à m'aider en préparant certains tampons.
- **Toute l'équipe du labo de Pierre-Yves et lui-même** qui nous ont accueillis Vincent et moi et nous ont fait partager leurs connaissances techniques, surtout **Gabrielle** pour le temps qu'elle a fourni à nous apprendre l'HIS DIG...

Je terminerai en remerciant l'ensemble du personnel de la PRC : les personnes de la bibliothèque, du magasin, de la logistique, de la laverie, de l'informatique et toutes les personnes qui permettent que le travail des chercheurs se passe dans les meilleures conditions.

Je tiens également à remercier la direction de la PRC, **Benoit Malpoux et Florian Guillou** de m'avoir accueillis dans leur unité au cours de mes différents stages et en thèse.

Je m'excuse d'avance pour toutes les personnes que j'aurai pu oublier de citer.

## Résumé

Le kisspeptine (kp) est un peptide issu du gène *Kiss1* jouant un rôle majeur dans le contrôle central de la fonction de reproduction y compris dans la mise en place de la puberté. Les neurones exprimant *Kiss1* sont situés dans deux régions hypothalamiques distinctes : l'aire rostrale péri-ventriculaire du 3<sup>ème</sup> ventricule (RP3V) et le noyau arqué (ARC). L'expression de *Kiss1* dans ces neurones est hautement régulée par les stéroïdes sexuels de manière opposée. L'expression de *Kiss1* des neurones du RP3V étant régulée positivement et celle des neurones de l'ARC négativement. De plus, le kp est capable de stimuler la sécrétion du GnRH chez l'adulte : les neurones à kp du RP3V seraient impliqués dans la genèse du pic pré-ovulatoire de GnRH et ceux de l'ARC agirait sur la pulsatilité de la sécrétion de GnRH. Au cours du développement, le kisspeptine a été montré comme un acteur majeur de la mise en place de la fonction de reproduction. Paradoxalement, les régulations et le rôle respectif des 2 populations de neurones à kisspeptine dans le déclenchement de la puberté n'ont pas encore été élucidées. **L'objectif principal de la thèse était donc d'étudier l'ontogenèse des neurones à kisspeptine en déterminant la période de neurogenèse de ces neurones et les variations d'immunoréactivité de kp dans le RP3V et dans l'ARC au cours du développement, de l'embryon à l'âge adulte, chez le rat.**

Dans un premier temps, nous avons défini la période de neurogenèse des neurones à kisspeptine de l'ARC, et l'expression spatio-temporelle du kp au cours du développement embryonnaire et néonatal. Nos résultats montrent une période étendue de neurogenèse commençant entre le jour embryonnaire (E)12,5 et E13,5, dont le pic se situe à E15,5 et qui n'est pas complètement terminé à E17,5. Bien que nous ayons été incapables de détecter des cellules *Kiss1* par HIS, des résultats par RT-PCR montrent la présence d'ARN messenger *Kiss1* (ARNm *Kiss1*) à E18,5 dans l'hypothalamus de rats mâles et femelles. Par IHC, dans le RP3V, quelques cellules kp-ir sont observées uniquement à E18,5. Dans l'ARC, les premières cellules kp-ir sont détectées à E14,5 et leur nombre augmente jusqu'à atteindre le maximum à E18,5. Puis, une diminution est observée entre E18,5 et E22,5. Au jour post-natal (PND) 0, le nombre de cellules kp-ir est identique à celui détecté à E22,5. Ces résultats suggèrent une sous-expression en période périnatale du kp de l'ARC indépendamment du sexe. En effet, aucune différence sexuelle n'est observée dans la distribution ou la densité de cellules kp-ir jusqu'à PND0 dans l'ARC et le RP3V. Dans le RP3V, à PND0, des fibres kp-ir sont détectées uniquement chez la femelle. Puis, à PND07, les fibres à kp sont détectées chez les deux sexes mais avec une densité plus importante chez les femelles comparées aux mâles. Dans l'ARC, à PND0, aucune différence sexuelle n'est observée dans le patron d'immunoréactivité kp. En revanche, à PND07, le nombre de corps cellulaires kp-ir diminue au profit d'une augmentation de la densité de fibres kp-ir et cette densité de fibre est plus faible chez les mâles que chez les femelles. Ces résultats suggèrent l'établissement des différences sexuelles au cours du développement néonatal.

Dans un second temps, une étude de kp-ir a été réalisée au cours du développement péri-pubertaire. Les différences sexuelles en faveur des femelles établies en période néonatale vont persister tout au long du développement aussi bien dans le nombre de cellules kp-ir que dans la densité de fibres kp-ir. Chez la femelle, la densité de fibre kp-ir diminue dans l'ARC tandis qu'elle augmente dans le RP3V au cours de la période infantile, sous des niveaux élevés d'oestradiol. La densité de fibre kp-ir dans le RP3V diminue entre la fin de la période infantile et la période juvénile indépendamment du sexe. Puis, une augmentation du nombre de cellules kp-ir et de la densité de fibres kp-ir dans les deux régions est observée en période pubertaire jusqu'à l'âge adulte. Cette augmentation va avoir lieu à des périodes différentes en

fonction du sexe et de la région. Chez les femelles, l'augmentation de la densité de fibres kp-ir est amorcée en premier dans l'ARC, entre la période juvénile et pubertaire, et plus tardivement dans le RP3V, entre la période pubertaire et adulte. Cette augmentation a lieu sous des niveaux constants et bas d'œstradiol. Chez le mâle les variations de densité de fibres kp-ir vont être similaires entre les deux régions. Ainsi, tous ces résultats suggèrent l'existence de régulations en période pré- et post-pubertaires qui ont lieu en décalage en fonction du sexe et de la région étudiés.

Dans un troisième temps, nous avons cartographié chez la rate adulte en proestrus, les cellules et fibres immunoréactives pour le kp (kp-ir) par immunohistochimie (IHC). Nos résultats ont donné lieu à une cartographie détaillée des cellules et des fibres kp-ir chez la rate adulte en pro-œstrus. Les fibres à kp ont été retrouvées tout au long du continuum hypothalamique suggérant un rôle de kp au-delà de la fonction de reproduction.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis : 1) de déterminer des périodes clés de l'ontogenèse des neurones à kisspeptine de leur neurogenèse embryonnaire aux périodes périnatales, néonatales et péri-pubertaires pendant lesquelles ces neurones sont soumis à des régulations de kp dont les facteurs et le rôle restent à déterminer.; et, 2) d'affiner la cartographie des fibres kp-ir chez la rate adulte suggérant ainsi un rôle du kisspeptine en dehors de la fonction de reproduction

Mots clés : kisspeptine, développement, rat, neurogenèse, différenciation sexuelle

## Résumé en anglais

Kisspeptin (kp) is a neuropeptide, derived from the *Kiss1* gene, which plays a key role in the central control of reproduction including pubertal onset. Cells which express *Kiss1* are localized in two distinct hypothalamic regions, the rostral peri-ventricular area of the third ventricle (RP3V) and the arcuate nucleus (ARC). *Kiss1* expression is highly regulated by sex steroids, positively in the RP3V and negatively in the ARC. Moreover, kp is able to stimulate GnRH secretion. RP3V kp neurons have been implicated in the triggering of the pre-ovulatory GnRH surge and ARC kp neurons in the regulation of GnRH pulsatile secretion. During development, kisspeptin has been shown to be a major component for the maturation of the hypothalamo-hypophysio-gonadal axis, more specifically for the triggering of puberty. Surprisingly, the regulations and roles of each kp neuron populations prior to puberty have not yet been elucidated. **The main aim of this study was to determine the neurogenesis period of kisspeptin neurons and establish a spatio-temporal mapping of kp expressions in the RP3V and the ARC throughout rat development, from embryogenesis until adulthood.**

Firstly, we defined the neurogenesis period of ARC kp neurons and the spatio-temporal expression of kp during embryonic and neo-natal development. The period of neurogenesis of ARC kp neurons begun between embryonic day (E) E12.5 and E13.5, reached its peak around E15.5 and was not completely over at E17.5. Although we were unable to detect *Kiss1* cells in the embryonic brain by ISH, *Kiss1* mRNA could be detected by RT-PCR in the E18.5 hypothalamus of male and female embryos. By IHC, some kp-ir cells were detected at E18.5 above the optic chiasma in the preoptic area. Kp-ir cells were also consistently detected in the embryonic ARC from E14.5. Their number increased until E18.5 to reach about half the amount observed in adults. Between E18.5 and E22.5 the number of kp-ir cells significantly decreased regardless of sex and this decrease persisted until birth. These results suggest a sex-independent down-regulation during pre-natal development. In the RP3V, kp-ir fibres were detected only in females at birth. At post-natal day (PND) 07, kp-ir fibres were observed in both males and females, but with a higher density in females than in males. In the ARC, no sex differences were observed at PND0 in the number of kisspeptin cell bodies nor in the density of kp-ir fibres. At PND07, kp-ir fibre density increased while kp-ir cell body numbers decreased in both sexes compared to PND0, with a stronger decrease in kp-ir fibre density in males compared to females. These results suggest that sex differences observed in adult could be established during the neonatal period.

Secondly, we studied variations of *Kiss1* mRNA and kp-ir during peri-pubertal development. Sex differences in kp-ir cell numbers and in RP3V and ARC kp-ir fibre densities that had been established during the neonatal period persisted throughout post-natal development. In females, kp-ir fibre density decreased in the ARC while it increased in the RP3V during the infantile period under higher estradiol level. The RP3V kp-ir fibre density decreased between the end of infantile period and juvenile period in a sex-independent manner. Then, an increase of the kp-ir cell numbers and kp-ir fibre densities in both regions was observed during the pubertal period until adulthood. This increase of kp-ir occurred at different timing depending on the region or sex analysed. In females, the increase of kp-ir fibre density begun first in the ARC, between the juvenile and pubertal period. In the RP3V kp-ir fibres density occurs latter, between the pubertal period and adulthood. These increases occur under constant low level of circulating estradiol. In males, variations of kp-ir fibres densities were identical in both regions. Taken together, these results suggest potential



regulations during the pre- and post-pubertal period which occur at different timing depending on sex and regions analysed.

Thirdly, we established cartography of cells and fibers immunoreactive for kp (kp-ir) by immunohistochemistry (IHC) in the adult pro-estrus female rat. Kp-ir cell bodies were exclusively observed in the arcuate nucleus, and kp-ir fibers were confined to the septo-preoptico-hypothalamic continuum of the brain. Thus, our results illustrate the variety of projection sites of kisspeptin neurons in the rat and suggest that these peptides play a role in other functions than reproductive function.

To conclude, we determined: 1) a precise cartography of kp-ir fibre in the female pro-estrus rat suggesting a role of kisspeptin beyond reproductive function; 2) the embryonic period of ARC kp neurons neurogenesis and the existence of important changes in kisspeptin expression during pre-natal, neo-natal and peri-pubertal periods. Together, these results suggest that kisspeptin expression is subject throughout development to transcriptional and post-transcriptional regulations which factors and roles remain to be determined.

Keywords: kisspeptin, development, rat, neurogenesis, sex differentiation

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	5
Résumé en anglais .....	7
Table des matières .....	9
Liste des Abréviations .....	13
Liste des tableaux .....	15
Liste des Figures.....	16
Liste des annexes :.....	18
Liste des articles:.....	19
<b><u>INTRODUCTION.....</u></b>	<b>20</b>
I. Préambule .....	212
<b>II. Le kisspeptine : du gène à la fonction.....</b>	<b>24</b>
II.1. Le gène <i>Kiss1</i> .....	24
II.2. Le système kisspeptine/ <i>Kiss1r</i> .....	24
II.2.a. Biochimie du kisspeptine.....	24
II.2.b. Le GPR54, récepteur au kisspeptine ( <i>Kiss1r</i> ) .....	28
II.3. Rôle physiologique de kisspeptine au sein de l'axe HHG.....	29
II.3.a. Etudes <i>in vivo</i> d'inactivation du système kisspeptine/ <i>Kiss1r</i> .....	29
II.3.b. Etudes <i>in vivo</i> d' injection de kisspeptine .....	30
II.3.c. Etudes <i>in vitro</i> .....	33
III. Distribution neuroanatomique de kisspeptine .....	378
III.1. Localisation des cellules exprimant l'ARN messager du <i>Kiss1</i> (Figure 5).....	38
III.2. Localisation des corps cellulaires et des fibres immunoréactives pour le kisspeptine (Figure 5).....	40
III.2.a. Localisation des corps cellulaires immunoréactifs pour le kisspeptine (Tableau 1) .....	40
III.2.b. Localisation des fibres immunoréactives pour les kisspeptine (Tableau 2).....	423
III.3. Quelles sont les cibles des neurones à kisspeptine? .....	44
III.3.a. Les neurones à GnRH.....	44
III.3.b. Autres cibles potentielles (Figure 6) .....	467
III.4. Co-expression avec d'autres neuropeptides/enzymes de synthèse et récepteurs .....	489

III.4.a. Co-expression avec d'autres neuropeptides/enzymes de synthèse (Tableau 3) ...	49
III.4.b. Co-expression de récepteurs (Tableau 4) .....	49
III.5. Différences sexuelles.....	51
III.5.a. Différences sexuelles dans l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine.....	51
III.5.b. Différence sexuelle dans la co-expression et les projections ? .....	53
IV. Variations et régulations de kisspeptine à l'âge adulte .....	545
IV.1. Variations de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine au cours des différentes phases du cycle .....	55
IV.1.a. Rappel sur les différentes phases du cycle estriens chez la femelle (Figure 8) ...	55
IV.1.b. Variations de l'expression de <i>Kiss1</i> au cours du cycle (Figure 9).....	57
IV.1.c. Variations de kisspeptine au cours du cycle (Figure 9) .....	58
IV.2. Régulations de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par les stéroïdes sexuels à l'âge adulte .....	60
IV.2.a. Régulations de l'expression de <i>Kiss1</i> par les stéroïdes sexuels à l'âge adulte.....	60
IV.2.b. Régulation de kisspeptine par les stéroïdes sexuels à l'âge adulte .....	62
IV.3. Régulations de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par d'autres facteurs à l'âge adulte .....	65
IV.3.a. Régulations de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par la balance énergétique à l'âge adulte .....	65
IV.3.b. Régulation de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par la photopériode à l'âge adulte .....	66
IV.3.c. Régulations de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par le stress à l'âge adulte .....	67
V. Variations et régulations de kisspeptine au cours du développement.....	69
V.1. Variations développementales de l'ARN messager <i>Kiss1</i> et du kisspeptine .....	69
V.1.a. Rappel sur le développement de l'axe HHG (Tableau 5).....	69
V.1.b. Variations développementales de <i>Kiss1</i> (Tableaux 6 et 7).....	74
V.1.c. Variations développementales de kisspeptine (Tableaux 6 et 7).....	76
V.2. Régulations développementales de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par les stéroïdes sexuels (Tableaux 8 et 9) .....	78
V.2.a. Régulations développementales de l'expression de <i>Kiss1</i> par les stéroïdes sexuels (Tableaux 8 et 9) .....	78
V.2.b. Régulations développementales de kisspeptine par les stéroïdes sexuels (Tableaux 8 et 9).....	81

V.3. Régulations développementales de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par d'autres facteurs (Tableau 10).....	84
V.3.a. Régulations développementales de l'expression de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par la balance énergétique .....	84
V.3.b. Régulation développementale de <i>Kiss1</i> et de kisspeptine par le stress .....	85
<b><u>OBJECTIFS.....</u></b>	<b>87</b>
<b><u>RESULTATS.....</u></b>	<b>88</b>
<b><u>CHAPITRE 1: Le kisspeptine au cours du développement embryonnaire.....</u></b>	<b>91</b>
I. Rappel du contexte bibliographique de l'étude:.....	92
II. Résumé de l'article .....	92
<i>Article 1: Ontogenesis of kisspeptin neurones: From neurogenesis to peri-natal development</i> .....	94
III. Résultats complémentaires.....	114
III.1. Dosages radio-immunologiques du kp chez l'embryon.....	114
III.2. Immunoréactivité kp avec l'anti-kp-10 C-term et l'anti-kp-52 chez l'embryon.....	114
III.3. Immunoréactivité kp avec l'anticorps anti-kp-52 N-term dans des régions extra-hypothalamiques.....	117
IV. Conclusion.....	119
<b><u>CHAPITRE 2: Le kp au cours du développement post-natal.....</u></b>	<b>120</b>
I. Rappel du contexte bibliographique de l'étude: .....	121
II. Résumé de l'article .....	121
<i>Article 2: Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region specific manner across postnatal development</i> .....	124
III. Résultats complémentaires :.....	1434
III.1. Dosages de la testostérone au cours du développement péri-pubertaire chez les mâles.....	144
III.2. Résultats préliminaires des variations de l'ARNm <i>Kiss1</i> en période péri-pubertaire chez la femelle.....	144
IV. Conclusion.....	145

<b><u>CHAPITRE 3: Cartographie de kp chez l'adulte.....</u></b>	<b><u>146</u></b>
I. Rappel du contexte bibliographique de l'étude: .....	148
II. Résumé de l'article : .....	149
<i>Article 3: Mapping of Kisspeptine Fibers in the Brain of Pro-Oestrus Rat.....</i>	<i>151</i>
III. Résultats complémentaires : .....	1634
III.1. Détection des corps cellulaires kp-ir du RP3V : .....	164
III.2. Spécificité de l'immunoréactivité obtenue avec l'anticorps anti-kp-10 C-term	164
IV. Conclusion: .....	166
<b><u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</u></b>	<b><u>167</u></b>
I. Neurogenèse et variations de kisspeptine au cours du développement embryonnaire et néonatal .....	169
I.1. Neurogenèse des neurones à kp .....	169
I.2. Localisation extra-hypothalamique de cellules kp-ir chez l'embryon.....	171
I.3. Sous-expression pré-natale du kp dans l'ARC .....	172
I.4. Rôle potentiel de kp en période embryonnaire et néonatale .....	173
I.5. Etablissement des différences sexuelles .....	174
II. Variations d'immunoréactivité kp au cours du développement péri-pubertaire .....	176
II.1. Persistances des différences sexuelles jusqu'à l'âge adulte .....	177
II.2. Variations développementales de l'immunoréactivité kp .....	177
III. Cartographie de l'ARNm <i>Kiss1</i> et de kisspeptine chez la rate adulte.....	179
III.1. Cartographie de kisspeptine .....	179
III.2. Spécificité du marquage kp .....	181
<b><u>CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>184</u></b>
Annexes.....	186
Références Bibliographique.....	210

## Liste des Abréviations

AFP: alpha-foetoprotéine

APO: aire pré-optique

AR: récepteurs aux androgènes

ARC: noyau arqué

ARNm *Kiss1*: ARN messenger du gène *Kiss1*

AVPV: région antéro-ventrale péri-ventriculaire

BNST: noyau du lit de la strie terminale

BPA: bisphénol A

Cellules *Kiss1*: cellules exprimant le gène *Kiss1*

Cellules kp-ir: cellules immunoréactives pour le kisspeptine

DHT: di-hydro-testostérone

DMH: noyau dorsomédian

Dyn: dynorphine

E: stade embryonnaire

E2: œstradiol

EM: éminence médiane

ER: récepteurs aux œstrogènes

FSH: hormone folliculo-stimulante

GnRH: Gonadotropin-releasing hormone

HHG: hypothalamo-hypophysio-gonadique

IHC: immunohistochimie

Ir: immunoréactif/ve

ISH: hybridation *in situ*

*Kiss1r* ou GPR54: récepteurs aux kisspeptines

KO: Knock-out

Kp: kisspeptine

LH: hormone lutéinisante

LepR: récepteurs à la leptine

MBH: hypothalamus médio-basal

NKB: neurokinine B

NPY: neuropeptide Y

OVLT: organe circumventriculaire du lit de la strie terminale

PeVN: région péri-ventriculaire

PND: jour post-natal

POMC: pro-opiomelanocortine

PR: récepteurs à la progestérone

PrIR: récepteurs à la prolactine

PSA-NCAM: polysialic acid neural cell adhesion molecule

RP3V: région rostral péri-ventriculaire du 3<sup>ème</sup> ventricule

T: testostérone

TH: tyrosine hydroxylase

STZ: streptozotocine

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** Localisation des corps cellulaires exprimant le gène *Kiss1* (*Kiss1*) et/ou immunoréactifs pour le kisspeptine (kp-ir) dans le cerveau en fonction des espèces.

**Tableau 2:** Distribution des fibres immunoréactives pour le kisspeptine dans l'hypothalamus en fonction des espèces.

**Tableau 3:** Pourcentage de neurones à kisspeptines co-exprimants d'autres neuropeptides chez différentes espèces.

**Tableau 4:** Pourcentage de neurones à kisspeptines co-exprimants des récepteurs aux stéroïdes sexuels chez différentes espèces.

**Tableau 5:** Développement de l'axe HHG chez le rat.

**Tableau 6:** Variations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp chez la rate.

**Tableau 7:** Variations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp chez le rat mâle.

**Tableau 8:** Régulations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp par les stéroïdes sexuels.

**Tableau 9:** Régulations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp par des composés stéroïdomimétiques.

**Tableau 10:** Régulations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp par le métabolisme énergétique et le stress.

**Tableau 11:** Immunoréactivité kisspeptine détectée avec l'anticorps anti-kp-10 au niveau de la tête chez des embryons en fonction du stade embryonnaire et du sexe.

**Tableau 12:** Différents anticorps anti-kisspeptine publiés au début de la thèse et leurs caractéristiques.



## Liste des Figures

**Figure 1:** L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG).

**Figure 2:** Du gène *Kiss1* aux différentes isoformes de kisspeptine.

**Figure 3:** Le kisspeptine-10, une molécule très conservée au cours de l'évolution.

**Figure 4:** Le kisspeptine appartient à la famille des RF-amides.

**Figure 5:** Localisation des corps cellulaires *Kiss1* et kisspeptine immunoréactifs chez les rongeurs.

**Figure 6:** Schéma représentant les différents sites de projections des deux populations de neurones à kisspeptine dans l'hypothalamus de souris

**Figure 7:** Schéma bilan sur la localisation des neurones à kisspeptine et la co-expression de différents neuropeptides et récepteurs chez les rongeurs.

**Figure 8:** Schéma du cycle estrien chez la rate.

**Figure 9:** Schéma représentatif des variations de l'ARN messager *Kiss1* et du kisspeptine au cours du cycle estrien chez la rate.

**Figure 10:** Schéma bilan des régulations des neurones à kisspeptine par les stéroïdes sexuels chez les rongeurs à l'âge adulte.

**Figure 11:** Quantité moyenne de kisspeptine par cerveau (pool de 4 cerveaux) en fonction du stade de développement embryonnaire.

**Figure 12:** Immunoréactivité pour le kp-10 C-term et pour la PSA-NCAM à E14,5.

**Figure 13:** Immunoréactivité pour kp-10 C-term à E18,5.

**Figure 14:** Immunoréactivité pour le kp-52 à E16,5 dans la tige optique.

**Figure 15:** Immunoréactivité pour le kp-52 à E16,5 dans le récessus optique.

**Figure 16:** Immunoréactivité pour le kp-52 à E16,5 dans l'hypothalamus ventromédian.

**Figure 17:** Immunoréactivité pour le kp-52 N-term à E18,5 dans la tige optique.

**Figure 18:** Immunoréactivité pour le kp-52 N-term dans l'aire pré-optique.

**Figure 19:** Immunoréactivité pour le kp-52 N-term dans le noyau du pons à E22 (A) et l'amygdale à E18,5 (B).

**Figure 20:** Niveaux de testostérone plasmatique au cours du développement péri-pubertaire chez le rat mâle.

**Figure 22:** Détection des corps cellulaires kp-ir dans le RP3V.

**Figure 23:** Immunoréactivité pour le kisspeptine dans le noyau dorsomédian de rates traitées à la colchicine.

**Figure 24:** Spécificité de l'anti-kp-10 C-term dans les noyaux arqué et dorsomédian de rates traitées à la colchicine.

**Figure 25:** Immunoreactivité pour le kisspeptine/RFRP-3 dans le noyau dorsomédian de rates traitées à la colchicine.

## Liste des annexes :

Annexe 1 : Article de synthèse “The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity”, Isabelle Franceschini, Elodie Desroziers, Alain Caraty and Anne Duittoz, 2010 .....	187
Annexe 2: Hybridation <i>in situ</i> .....	199
Annexe 3 : Digestion de l’ADNc, ligation dans le plasmide et transformation du plasmide dans les bactéries .....	2064
Annexe 4 : Préparations des solutions pour l’HIS radioactive.....	209

## Liste des articles

**Article 1:** Ontogenesis of kisspeptin neurones: from neurogenesis to peri-natal development, E. Desroziers, M. Droguerre, A.H. Bentsen, V. Robert, A. Duittoz, J. Mikkelsen, A. Caraty, Y. Tillet, I. Franceschini, en révision, Journal of Neuroendocrinology.....94

**Article 2:** Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region specific manner across rat postnatal development, E. Desroziers, J. Mikkelsen, A. Duittoz, I. Franceschini, en révision, Journal of Neuroendocrinology.....124

**Article 3 :** Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrus rat, E. Desroziers, J. Mikkelsen, V. Simoneaux, M. Keller, Y. Tillet, A. Caraty, I. Franceschini, 2010, Journal of Neuroendocrinology.....151

**Article 4:** The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity, I. Franceschini, E. Desroziers, A. Caraty, A. Duittoz, 2010, European Journal of Neuroscience.....188

## Introduction bibliographique

## Coupe Sagittale cerveau de rat adulte

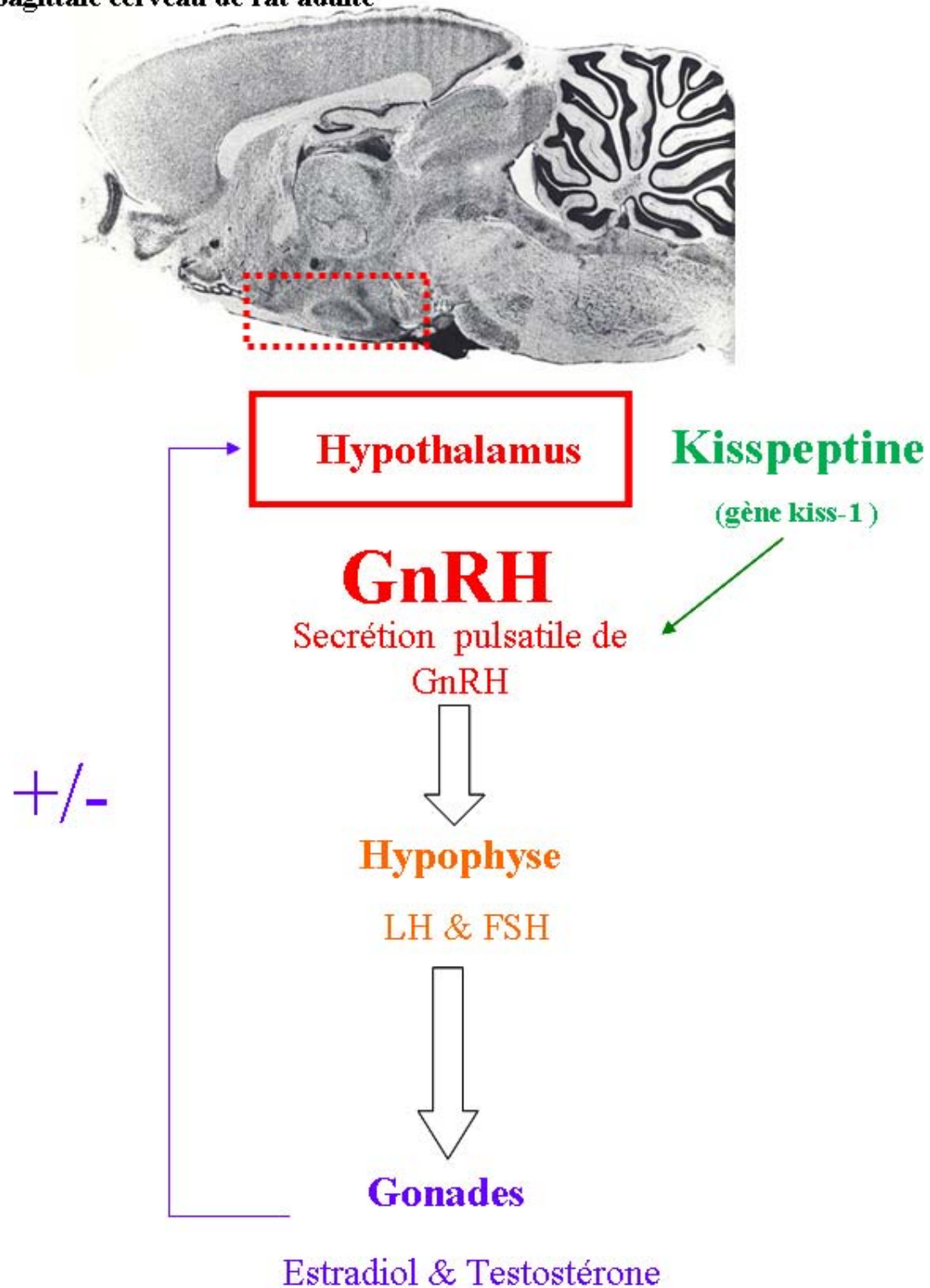


Figure 1: L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG)

## **I. Préambule**

La fonction de reproduction est sous le contrôle du cerveau, plus particulièrement, sous le contrôle d'un groupe de neurones situés dans l'hypothalamus : les neurones à GnRH. Ces neurones ont la particularité de sécréter une neuro-hormone : la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Les corps cellulaires de ces neurones sont localisés de manière très dispersée dans l'aire pré-optique et/ou dans l'hypothalamus médio-basal selon les espèces. Les neurones à GnRH projettent leurs axones majoritairement vers la zone externe de l'éminence médiane où ils déversent leur neurohormone dans les vaisseaux sanguins du système porte-hypothalamo-hypophysaire (Figure 1). La GnRH est alors libérée dans le sang porte de manière pulsatile afin de stimuler les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Ces cellules répondent à la GnRH en fonction de la fréquence et de l'amplitude des pulses de GnRH (Levine *et al.*, 1995; Thibault & Levasseur, 2001) en sécrétant deux hormones hypophysaires, la LH (Hormone lutéinisante) et la FSH (hormone folliculo-stimulante) (Figure 1). Ces deux hormones hypophysaires stimulent ensuite les gonades femelles et males qui produiront en retour les gamètes : ovules et spermatozoïdes, respectivement ; mais également des hormones gonadiques dont les stéroïdes sexuels. Ces stéroïdes sexuels sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique afin d'exercer un rétrocontrôle positif ou négatif sur la sécrétion de GnRH (Figure 1). La mise en place et la régulation de cet axe au cours des différentes périodes de la vie reproductrice, de l'embryogenèse à l'âge adulte, ont été largement étudiées (Thibault & Levasseur, 2001). Par exemple, il est maintenant admis que l'amplitude et la fréquence des pulses de sécrétion de GnRH varient en fonction des différentes phases de la vie reproductrice, c'est-à-dire au cours des différentes phases du développement et de la maturation de l'axe HHG (Becu-Villalobos & Libertun, 1995; Terasawa & Fernandez, 2001) mais également chez l'adulte au cours des différentes phases du cycle chez la femelle (Clarke *et al.*, 1987; Moenter *et al.*, 1991) . Ces variations sont dues à des régulations des neurones à GnRH par leurs environnements neuronaux via des neurotransmetteurs (GABA, glutamate...) et neuropeptides (NPY, Norépinephrine...)(Terasawa & Fernandez, 2001; Clarkson & Herbison, 2006a). Leur environnement glial joue également un rôle très important au travers de gliotransmetteurs et de molécules d'adhésions comme par exemple la PSA-NCAM (Ojeda *et al.*, 2010) (Tillet *et al.*, 2009; Franceschini *et al.*, 2010)(Annexe 1).

Depuis 2003, la découverte d'un nouveau neuropeptide hypothalamique, le kisspeptine (kp), dans la régulation de cet axe a provoqué une petite révolution dans la recherche sur le

contrôle central de la fonction de reproduction. En effet, en 2003, différentes équipes de recherche montrent que des mutations du récepteur au kp, le GPR54 ou *Kiss1r* (nomenclature suggérée par (Gottsch *et al.*, 2009)) étaient à l'origine de certains cas d'hypogonadisme hypogonadotrope, une maladie caractérisée par une absence d'hormones gonadotropes, LH et FSH, un retard pubertaire et un développement anormal des gonades (de Roux *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Ces études suggèrent alors un rôle du système kp/*Kiss1r* dans le déclenchement de la puberté.

Suite à ces découvertes, le kp a suscité un profond intérêt pour les neuroendocrinologistes et depuis de nombreuses études montrent aussi son rôle important dans la régulation à l'âge adulte de l'axe HHG, ou le kp interviendrait en amont des neurones à GnRH.



## **II. Le kisspeptine : du gène à la fonction**

Cette première partie de l'introduction, nous permettra de mieux appréhender les différents mécanismes permettant d'aller du gène du kisspeptine (kp) à sa fonction au sein de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG) (Figure 1).

### **II.1. Le gène Kiss-1**

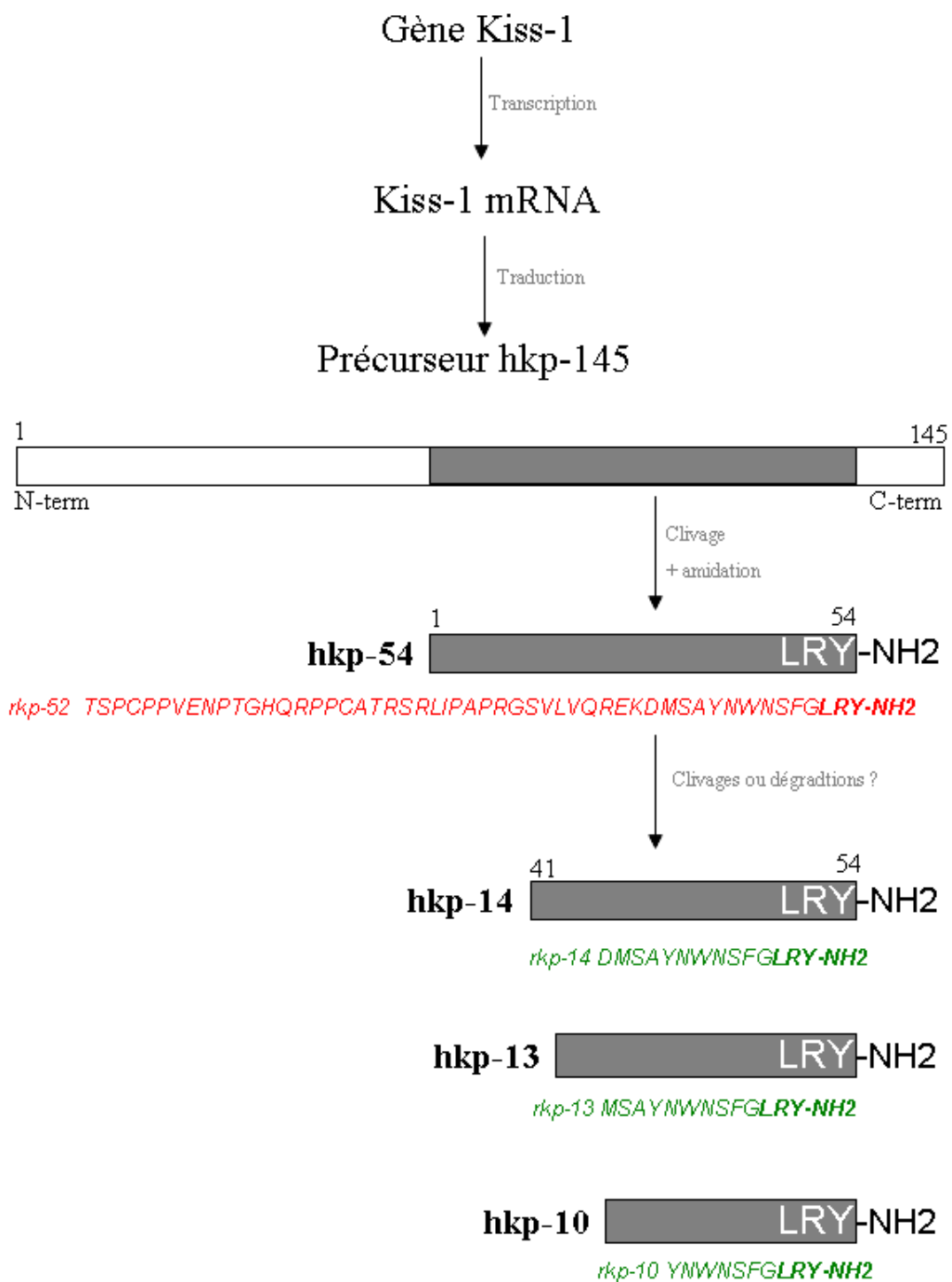
Le gène du kisspeptine, également appelé métastatine, a été découvert en 1996 pour son rôle anti-métastatique au sein de mélanomes chez l'humain (Lee *et al.*, 1996). Une équipe travaillant sur le cancer clone un nouveau gène étudié pour son action suppresseur de métastase : le *Kiss1*. Il est appelé ainsi en référence à la manufacture de chocolat de la ville d'Hershey, en Pennsylvanie, dont le produit star s'appelle «Hershey Chocolate Kiss» et dans laquelle se trouve le laboratoire de Lee et ses collaborateurs. Malgré son nom évocateur, à ce moment-là rien ne prédisait la découverte quelques années plus tard de son rôle dans la fonction de reproduction. L'équipe de Lee montre la présence par Northern Blot de l'ARN messager du gène *Kiss1* (ARNm *Kiss1*) dans le placenta en grande quantité et dans les reins en faible quantité (Lee *et al.*, 1996). La présence de l'ARNm *Kiss1* a depuis été observé dans de nombreux tissus : le placenta, les gonades, le cerveau, l'hypophyse, les reins, le foie, l'intestin grêle, le cœur et les muscles (Lee *et al.*, 1996; Ohtaki *et al.*, 2001; Castellano *et al.*, 2006a; Gaytan *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2009).

Chez les mammifères, un seul gène a pour le moment été détecté. En revanche, chez les batraciens et les poissons, l'existence de deux gènes a été démontrée : *Kiss1* et *kiss-2* (pour revue (Oakley *et al.*, 2009)). Dans la suite de ce manuscrit, nous parlerons essentiellement des ARN messagers et des peptides issus du gène *Kiss1* chez les mammifères.

### **II.2. Le système kisspeptine/kiss1r**

#### ***II.2.a. Biochimie du kisspeptine***

En 1996, Lee et ses collaborateurs prédisent à l'aide de la séquence de l'ADN complémentaire de *Kiss1* que ce gène coderait pour la synthèse d'une protéine de 164 acides



**Figure 2: Du gène kiss-1 aux différentes isoformes de kisspeptine.** h : humain ; r : rat

aminés dont la masse moléculaire serait de 18kDa (Lee *et al.*, 1996). Ce n'est que 5 ans plus tard que le précurseur de 145 acides aminés (Aa) de poids moléculaire de 15.6 kDa ainsi que différentes isoformes de kp seront purifiées à partir d'extrait de placenta humains par deux groupes de recherches indépendants chez l'homme (Kotani *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Parmi ces différentes isoformes purifiées, on compte une isoforme longue de 54 Aa (kp-54) ainsi que plusieurs petites isoformes composés de 14 (kp-14), 13 (kp-13) et 10 (kp-10) acides aminés (Figure 2) (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). L'isoforme kp-10 a également été purifié à partir d'un milieu conditionné provenant de trophoblastes humains en culture (Bilban *et al.*, 2004). La plus longue isoforme, initialement appelée « métastine » pour son rôle d'inhibiteur de métastase (Hori *et al.*, 2001), est composée de 54 acides aminés chez l'humain et sera appelée par Kotani et ses collaborateurs « kisspeptine » (kp) en référence au gène qui permet sa synthèse le *Kiss1* (Kotani *et al.*, 2001). Selon les espèces, l'isoforme longue ne possède pas le même nombre d'acides aminés : chez le rat, par exemple, elle est composée de 52 acides aminés (Figure 2). Les dix derniers acides aminés sont extrêmement conservés entre espèces (Figure 3). Actuellement, aucune étude ne montre l'existence de ces différentes isoformes dans d'autres tissus, y compris dans le système nerveux central, ni chez d'autres espèces.

Toutes ces isoformes ont la particularité d'être issues de différents clivages du précurseur sur sa partie N-terminale et d'avoir en commun la partie C-terminale. Cette dernière présente un motif LRF ou LRY qui a la particularité d'être amidé (Figure 3). Il existe de nombreux peptides connus pour posséder un motif identique et qui sont amidés sur leur partie C-terminale. Ils appartiennent à la famille des RF-amides : RFRP-1 et -3, neuropeptide FF, neuropeptides AF, PRF (prolactin releasing factor), QRFP (Pyroglutamylated RFamide peptide) (Figure 4) (pour revue (Tsutsui *et al.*, 2010)). Ainsi, le kp appartient lui aussi à cette famille (Figure 4). Le motif amidé est particulièrement immunogène (pour revue (Tsutsui *et al.*, 2010)).

La nomenclature de kisspeptine est conflictuelle entre métastine, qui reste utilisé par les scientifiques étudiant son rôle d'inhibiteur de métastase, et kisspeptine, préféré par les neuroendocrinologistes étudiant son rôle dans la fonction de reproduction. Tout au long de ce manuscrit, nous utiliserons la nomenclature conseillée par Gottsch en 2009 et toutes les isoformes seront présentées comme suit : kisspeptine-54 ou kp-54, par exemple pour la forme longue chez l'humain (Gottsch *et al.*, 2009).

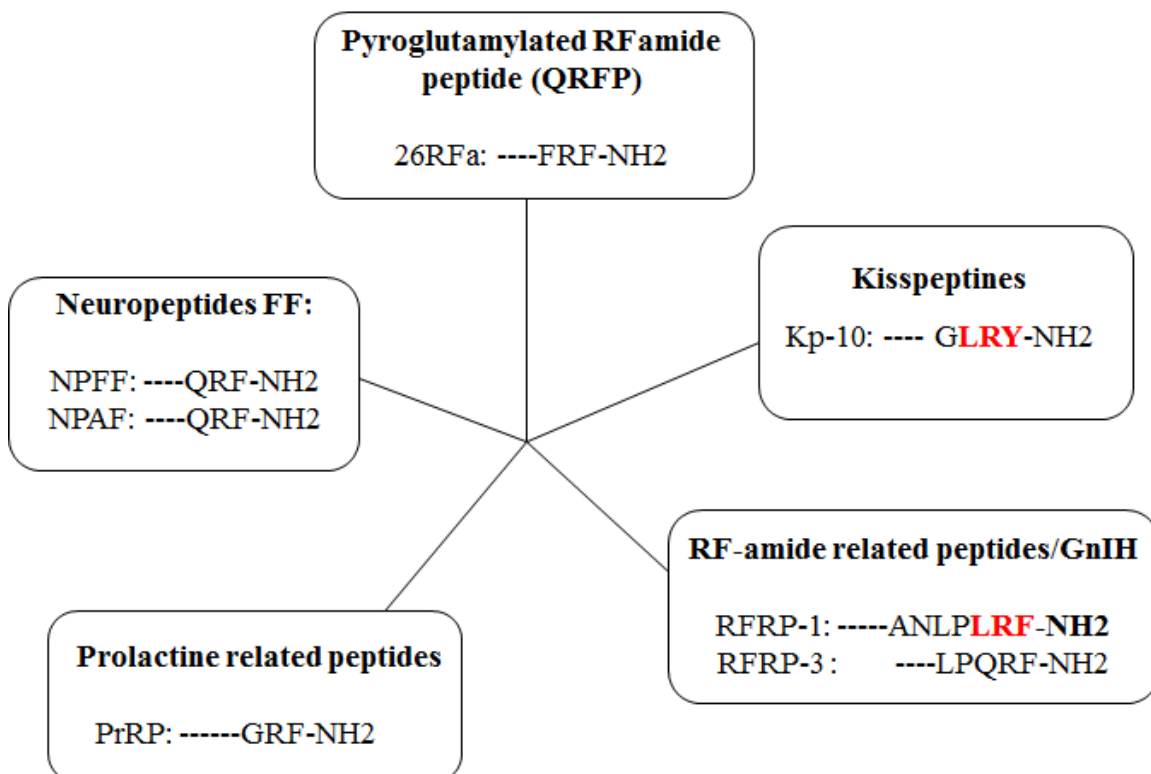
**Kp-10 issu du gène Kiss-1:**

Humain	Y N W N S F G L R F
Primates	Y N W N S F G L R F
Bovin/Cochon	Y N W N S F G L R Y
Equin	Y R W N S F G L R Y
Ovin	Y N W N S F G L R Y
Rongeurs	Y N W N S F G L R Y
Opossum	Y N W N S F G L R Y
Grenouille	Y N W N S F G L R Y
Poissons	Y L W N S F G L R Y

**Kp-10 issu du gène Kiss-2:**

Grenouille	F N F N P F G L R F
Medaka	F N Y N P F G L R F
Poisson zèbre	F N Y N P F G L R F
Bar de mer	F N F N P F G L R F

**Figure 3: Le kisspeptine-10, une molécule très conservée au cours de l'évolution** (adapté de la revue d'Oakley et al, 2010). En vert, séquence commune aux RF-amides ; en rouge, acides aminés qui diffèrent d'une espèce à l'autre.



**Figure 4: Le kisspeptine appartient à la famille des RF-amides.** (Adapté de Tsutui et al, 2010). LRF ou LRY sont des séquences très immunogènes.

### ***II.2.b. Le GPR54, récepteur au kisspeptine (Kiss1r)***

Le récepteur de kp a d'abord été identifié par une équipe étudiant les récepteurs à la galanine dans le cerveau de rat. Ils trouvent alors un récepteur, qu'ils nomment GPR54, qui partage 45% d'homologie de séquence avec les récepteurs à la galanine et appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Lee *et al.*, 1999). Ils établissent la première cartographie par hybridation *in situ* (HIS) des régions cérébrales chez le rat où l'ARN messager du récepteur est retrouvé (Lee *et al.*, 1999). Les auteurs montrent ainsi que le GPR54, *Kiss1r*, est exprimé dans de nombreuses régions du cerveau de rat mais que la plus haute expression est localisée dans différents noyaux de l'hypothalamus (cf. p.30 partie III. Distribution neuroanatomique de kisspeptine). D'autres études chez l'homme et le rat montrent l'expression de ce récepteur dans des tissus périphériques tels que l'hypophyse, les lymphocytes, le tissu adipeux, le pancréas, le placenta, la moelle épinière, le thymus, l'intestin grêle, le testicule, l'ovaire, la rate, le foie, l'estomac ainsi que chez le fœtus dans le foie et le cerveau (Clements *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001; Gaytan *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2009) Ces équipes de recherche étudient également l'activité biologique du récepteur trouvant comme nous l'avons présenté plus haut les ligands de ce récepteur : les différentes isoformes de kp, produits du gène *Kiss1* découvert 5 ans plus tôt, activent avec la même affinité le récepteur *Kiss1r*. De plus, les auteurs montrent que la propriété nécessaire à ces ligands pour activer ce récepteur est l'amidation. En effet, les isoformes de kp privées de leur partie C-terminale amidée n'activent pas le récepteur (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). En revanche, les autres membres de la famille des RF-amides qui possèdent également le motif amidé en C-term n'activent pas le récepteur *Kiss1r* excepté à haute concentration (Clements *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Depuis, une étude a montré que les acides aminés en position 6 et 10 de kp-10 étaient essentiels à l'activation du récepteur de kp *in vitro* et *in vivo* (Gutierrez-Pascual *et al.*, 2009). Néanmoins, des études récentes ont montré que l'isoforme longue de kp (kp-52 chez le rat et kp-54 chez l'humain) entraîne une augmentation plus importante de la concentration de LH et de testostérone que l'isoforme kp-10 chez des rats adulte (Thompson *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2009; Pheng *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré la présence des différentes isoformes dans l'hypothalamus ainsi il est difficile de savoir lesquelles de ces différentes isoformes sont biologiquement actives dans ce tissu.

### **II.3. Rôle physiologique de kisspeptine au sein de l'axe HHG**

#### ***II.3.a. Etudes in vivo du système kisspeptine/Kiss1r***

C'est en 2003 que les premières études chez l'humain suggèrent un rôle du peptide dérivé du gène *Kiss1* dans la physiologie de l'axe HHG. En effet, trois équipes différentes publient dans la même année que des mutations du *Kiss1r* sont à l'origine de certains cas d'hypogonadisme hypogonadotrope (de Roux *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Cette maladie est caractérisée par des niveaux bas d'hormones gonadotropes hypophysaires, la LH et la FSH, un retard pubertaire et un développement anormal des gonades chez l'homme (voir pour revue (Roze *et al.*, 2009)). Deux de ces équipes ainsi que deux nouvelles équipes mettent au point des souris knock-out (KO) pour le gène du *Kiss1r* (Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003; Dungan *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007). Ces souris *Kiss1r* KO sont infertiles et présentent un développement anormal des gonades, des taux bas d'hormones gonadotropes et des niveaux bas de stéroïdes sexuels. De plus, chez les femelles, l'observation de l'ouverture vaginale comme critère morphologique du déclenchement de la puberté, période clé de l'activation de l'axe HHG, montre que les souris déficientes pour le *Kiss1r* comparées aux souris sauvages présentent un retard pubertaire.

Indépendamment, en 2007, d'autres auteurs mettent en place et caractérisent des souris déficientes cette fois-ci pour le gène *kiss1* (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007). Ces souris *Kiss1* KO sont également infertiles et présentent les mêmes anomalies que celles observées chez les souris *Kiss1r* KO.

Toutes ces études ne permettent pas alors de déterminer si ce sont les mutations survenues dans l'hypothalamus ou celles survenues dans d'autres tissus contenant l'ARN messager du *Kiss1* et du *Kiss1r* (cf. p. 23 paragraphe II.1 et p.25 paragraphe II.2.b) qui sont à l'origine de ces anomalies rendant infertiles ces souris à l'âge adulte.

En plus des études d'inactivation des gènes *kiss1* ou *Kiss1r*, des études pharmacologiques d'infusion d'anticorps anti-kp ou d'antagoniste du *Kiss1r* ont été réalisées. Chez l'adulte, l'infusion d'un anticorps anti-kp dans l'aire pré-optique de rate intacte neutralise le pic pré-ovulatoire de LH et entraîne une perturbation des cycles estriens (Kinoshita *et al.*, 2005). Une injection i.c.v. d'un antagoniste du *Kiss1r* n'a pas d'effet sur le niveau basal de LH mais inhibe l'action stimulante du kp-10 sur la sécrétion de LH chez des mâles adultes intacts (Roseweir *et al.*, 2009). Au cours du développement, l'injection au sein

de l'éminence médiane de guenon pré-pubères supprime les pulses de GnRH et diminue le niveau moyen de GnRH mesuré par microdialyse (Roseweir *et al.*, 2009). De plus, l'injection i.c.v. pendant 7 jours de cet antagoniste sur des rates pré-pubères retarde l'ouverture vaginale et diminue la croissance utérine et ovarienne (Pineda *et al.*, 2010)

La présence de *Kiss1r* dans les neurones à GnRH chez le poisson, la souris et le rat (Irwig *et al.*, 2004; Parhar *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005) ainsi que la similarité des symptômes de l'hypogonadisme hypogonadotrope et de la maladie de Kallman, caractérisée par un défaut de migration des neurones à GnRH, suggèrent un défaut possible de migration ou de maturation de ces neurones. Les neurones à GnRH ont la particularité de provenir d'une région extra cérébrale, la placode olfactive, et de migrer en suivant les nerfs voméronasaux et terminaux dans l'aire pré-optique où ils sont retrouvés à l'âge adulte (pour revue (Franceschini *et al.*, 2010) (Annexe 1)). Les études sur les souris déficientes pour le *Kiss1r* ou le *Kiss1* ont donc également étudié un rôle possible du système kp/*Kiss1r* sur la migration ou la maturation des neurones à GnRH. Que ce soit pour les souris *Kiss1r* KO ou les souris *Kiss1* KO, la concentration de GnRH hypothalamique et l'immunoréactivité GnRH, plus particulièrement le nombre de corps cellulaires immunoréactifs pour le GnRH dans l'aire pré-optique, restent inchangées comparées aux souris sauvages (Seminara *et al.*, 2003; d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Dungan *et al.*, 2007).

Les modèles *kiss1* KO ou *Kiss1r* KO suggèrent qu'en absence du système kp/*Kiss1r* la maturation de l'axe HHG ne se réalise pas correctement mais que cela n'est pas dû à une action du système kp/*Kiss1r* sur la migration des neurones à GnRH. Une étude récente montre que lors d'une déplétion complète des cellules exprimant l'ARNm *Kiss1* très tôt au cours du développement, la fonction de reproduction n'est pas perturbée. Ceci suggère l'existence d'un système compensateur à la perte précoce des neurones à kp (Mayer & Boehm, 2011).

### ***II.3.b. Etudes in vivo d'injection de kisspeptine***

Parallèlement aux études d'inactivation du système kisspeptine/*Kiss1r*, de nombreuses équipes ont essayé de comprendre le rôle de kp sur l'axe HHG dans le déclenchement de la puberté et durant la vie reproductive adulte, en utilisant des approches pharmacologiques d'injections périphériques ou intracerebroventriculaires (i.c.v) de kp chez différentes espèces.

Chez l'adulte, des études par injection périphérique de kp montrent la capacité de ce peptide à stimuler la production des hormones gonadotropes, LH et FSH chez le rat, la souris

et l'homme (Matsui *et al.*, 2004; Dhillon *et al.*, 2005; Messenger *et al.*, 2005; Dhillon *et al.*, 2007). La présence du *Kiss1r* dans 55% des neurones à GnRH chez la souris (Messenger *et al.*, 2005) ainsi que de l'activation des neurones à GnRH montrée par l'expression de la protéine c-FOS (facteur de transcription dont l'expression est généralement déclenchée suite à un signal activateur) suite à l'injection périphérique de kp suggère un rôle direct de kp sur les neurones à GnRH (Matsui *et al.*, 2004). Cependant, les injections périphériques de kp ne permettent pas de discerner un effet central sur les neurones à GnRH d'un effet direct de kp sur les cellules hypophysaires. Des injections périphériques ou centrales de kp chez le rat et la souris en présence ou en absence d'antagonistes du GnRH démontrent que le signal kp passe par les neurones à GnRH (Gottsch *et al.*, 2004; Irwig *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004). Par ailleurs, une plus forte concentration de LH et de testostérone est détectée lorsque le kp est injecté au sein de l'APO (région où les neurones à GnRH sont localisés) comparée à d'autres régions confortant ainsi un effet direct de kp sur les neurones à GnRH (Patterson *et al.*, 2006).

Afin de montrer que l'action stimulatrice de kp sur les niveaux de LH et de FSH passe par les neurones à GnRH, Messenger et ses collaborateurs vont utiliser comme modèle la brebis. En effet, la taille ainsi que la bonne connaissance de la physiologie et de la neuroanatomie de cette espèce, rendent possible des prélèvements directs et sériés du liquide céphalorachidien (Messenger *et al.*, 2005). Ainsi, une injection i.c.v de kp chez des brebis entraîne l'élévation de la concentration de GnRH dosée dans le liquide céphalorachidien (Messenger *et al.*, 2005).

Toutes ces études démontrent un rôle majeur de kp dans la physiologie adulte de l'axe HHG par un mécanisme d'action central sur la sécrétion du GnRH.

*Au cours du développement post-natal*, le système GnRH va subir différentes phases d'activation et d'inactivation qui permettent la maturation de l'axe HHG (pour revue (Ojeda *et al.*, 1980; Terasawa & Fernandez, 2001)). La puberté est une période de réactivation du système GnRH après une longue période d'inactivité (pour revue (Ojeda *et al.*, 1980)) qui se caractérise par une augmentation de la sécrétion de GnRH (pour revue (Terasawa & Fernandez, 2001)). Le retard pubertaire observé chez les souris déficientes pour le système kp/*Kiss1r* suggère un rôle de kp dans la réactivation des neurones à GnRH (pour revue (Colledge, 2009)). Ainsi, des équipes étudient le rôle de kp dans le déclenchement de la puberté en pratiquant des injections de kp en période juvénile chez le rat (Matsui *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004a; Navarro *et al.*, 2004b; Navarro *et al.*, 2005a; Navarro *et al.*, 2005b;



Castellano *et al.*, 2006b), la souris (Han *et al.*, 2005) et le singe (Shahab *et al.*, 2005). Une injection de kp périphérique ou i.c.v. qu'elle soit unique ou répétée va entraîner une augmentation des niveaux de LH et de FSH chez des rats, des souris et des singes juvéniles mais également chez des rats pubères. Navarro et ses collaborateurs démontrent un avancement de l'ouverture vaginale et du poids de l'utérus, caractères morphologiques de l'entrée en puberté, ainsi qu'une augmentation du taux d'œstradiol chez des rates ayant reçues une administration chronique i.c.v de kp en période juvénile (Navarro *et al.*, 2004b). De plus, l'augmentation de LH et de FSH par injection i.c.v de kp chez des rats et des singes juvéniles ainsi que des rats pubères est bloquée par l'utilisation d'un antagoniste du GnRH (Navarro *et al.*, 2004b; Navarro *et al.*, 2005a; Navarro *et al.*, 2005b; Shahab *et al.*, 2005). Une de ces études va montrer que l'injection de kisspeptine i.c.v n'entraîne aucun changement dans l'expression du gène du GnRH chez des rats mâles pubères suggérant ainsi un rôle activateur de kp préférentiellement sur la sécrétion du GnRH et non sur son expression (Navarro *et al.*, 2005b) comme observé précédemment chez la brebis adulte (Messenger *et al.*, 2005). Une étude récente, chez des brebis juste avant la puberté, montre que l'action stimulatrice de kp dans la réactivation du système GnRH est essentielle mais pas suffisante pour déclencher la puberté chez cette espèce (Redmond *et al.*, 2011). En effet, des injections répétées en i.v. chez des brebis pré-pubères entraînent des pics pré-ovulatoire de LH et des ovulations mais ne sont pas suffisantes pour observer une phase lutéale complète et des cycles réguliers (Redmond *et al.*, 2011) Ainsi, toutes ces études montrent un rôle de kp dans l'activation de la sécrétion de LH par l'intermédiaire de l'activation de la sécrétion de GnRH au cours du développement pubertaire. En revanche, elles ne permettent pas de dater le moment précis où le système kp va agir sur la réactivation de la sécrétion de GnRH au cours du développement post-natal.

Le rôle de kisspeptine sur le système hypothalamo-hypophysaire au cours des périodes de développement post-natal précédant la puberté va être décortiqué plus précisément chez le rat par l'étude de Castellano et al, 2006 : des rats en périodes néonatale, infantile et en période juvénile reçoivent des injections intrapéritonéales (i.p.) de kp (Castellano *et al.*, 2006b). Une augmentation des niveaux plasmatiques de LH est observée suite à une injection i.p. de kp quel que soit l'âge étudié. Toutefois, cette augmentation significative n'est observée qu'en période infantile. Il est intéressant de noter qu'il existe une différence sexuelle, en faveur des femelles, dans la sécrétion de LH suite à une même stimulation par du kp (Castellano *et al.*, 2006b). Une autre partie intéressante de cette étude est l'intérêt porté aux changements de sensibilité de la réponse LH à différentes concentrations de kp injectées en i.c.v en fonction de deux périodes de maturation post-natale : la période infantile et juvénile/pubertaire chez des

mâles. Les résultats obtenus montrent que toutes les doses de kp stimulent la sécrétion de LH quel que soit l'âge mais que la réponse est plus importante pour de faible concentration de kp en période juvénile et pubertaire qu'en période infantile (Castellano *et al.*, 2006b). Ainsi, cette étude suggère l'existence d'une différence sexuelle dans la réponse au kp et d'une différence dans la sensibilité de cette réponse en fonction de la période de développement post-natal étudiée. Ce dernier point est en relation avec les données d'une autre équipe montrant que seule l'injection i.c.v de kp à forte dose entraîne un relargage de LH chez les souris mâles pré-pubères contrairement aux adultes (Han *et al.*, 2005).

*Pour conclure sur les injections de kp in vivo*, ces différentes études suggèrent un rôle de kp dans la mise en place et le fonctionnement adulte de l'axe HHG. Ces études suggèrent une action centrale de kp sur les neurones à GnRH, sans préciser les mécanismes d'actions impliqués. Elles ne permettent pas non plus d'écarter un rôle potentiel de kp directement sur l'hypophyse lors d'injections périphériques.

### ***II.3.c. Etudes in vitro***

La capacité de kp à stimuler la sécrétion de GnRH a également été étudiée dans des modèles d'explants hypothalamiques de rongeurs adultes (Thompson *et al.*, 2004; Nazian, 2006) et pendant le développement post-natal (Castellano *et al.*, 2006b; Nazian, 2006). L'équipe de Castellano a élargi son champ d'étude par une approche pharmacologique visant à étudier les voies de signalisation impliquées dans la sécrétion de GnRH après stimulation par le kisspeptine sur des explants hypothalamiques issus de rat juvénile. Ainsi, suite à une stimulation par le kp, le neurone à GnRH fait intervenir la voie des protéines Gαq entraînant ainsi la libération de calcium du réticulum endoplasmique et l'activation de la protéine kinase A, puis, dans un second temps, ils observent l'activation de la voie MAP kinase et le recrutement des ERK1/2 (Castellano *et al.*, 2006b). Ces résultats ayant été obtenus sur des explants hypothalamiques contenant l'aire pré-optique et l'éminence médiane, il est donc difficile de distinguer le site d'action précis de kp : les corps cellulaires ou les terminaisons des neurones à GnRH ? Afin de répondre à cette question, des études ont été réalisées sur des explants d'aire pré-optique ou d'éminence médiane.

- *Action sur les corps cellulaire à GnRH* : Deux groupes de recherche comparent l'excitabilité des neurones à GnRH, après stimulation par le kp, sur des explants d'aire pré-optique prélevés à l'âge adulte chez le rat (Dumalska *et al.*, 2008) et la souris (Han *et al.*,

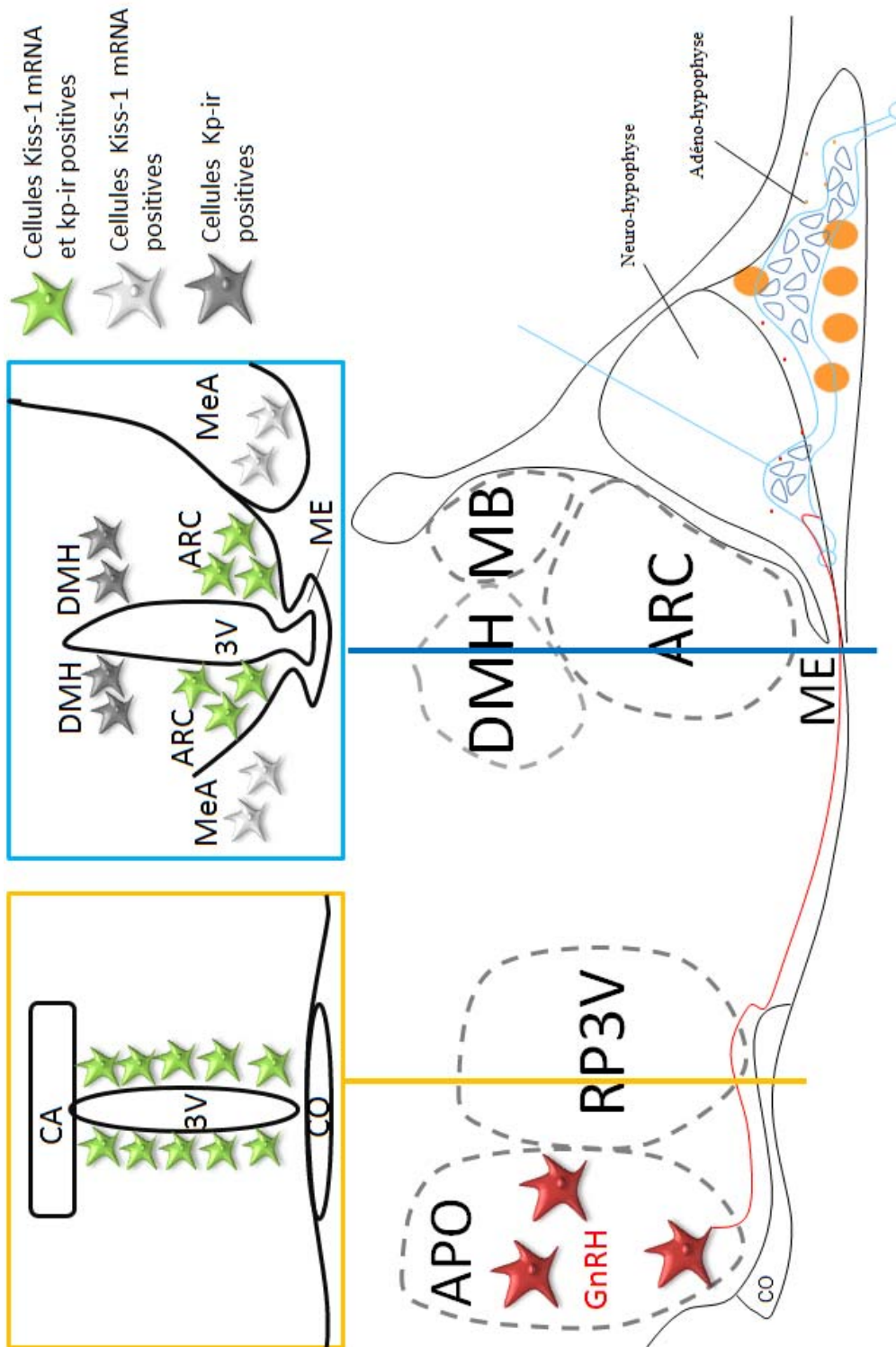
2005; Ducret *et al.*, 2010) et chez des souris en période juvénile (Han *et al.*, 2005). Ils montrent ainsi que l'activité électrophysiologique des neurones à GnRH est augmentée par le kp que ce soit à l'âge adulte (Han *et al.*, 2005; Dumalska *et al.*, 2008; Ducret *et al.*, 2010) ou pendant la période juvénile (Han *et al.*, 2005). De plus, le pourcentage de neurones à GnRH capable de répondre électrophysiologiquement au kp augmente au cours du développement (Han *et al.*, 2005). En accord avec les résultats précédents, Nazian et ses collaborateurs montrent non seulement que des explants hypothalamiques sont capables de sécréter du kp dans le milieu mais également que cette sécrétion est plus importante sur des explants d'hypothalamus provenant de rats mâles adultes comparés à ceux obtenus chez des rats en période infantile (Nazian, 2006). Une action stimulatrice de kp sur l'activité électrophysiologique et calcique des neurones à GnRH ainsi que sur la sécrétion de GnRH, plus particulièrement sur l'amplitude des pulses, a également été observée sur des neurones à GnRH issus de placodes olfactives embryonnaires murines (Constantin *et al.*, 2009a; Constantin *et al.*, 2009b). Tous ces résultats suggèrent donc un rôle précoce de kp sur l'activité et la sécrétion des neurones à GnRH qui seraient déjà capables de répondre au kp au cours du développement embryonnaire. Il est intéressant de noter que, suite à une stimulation par le kp, la réponse électrophysiologique des neurones à GnRH chez l'adulte est différente en fonction du sexe : la stimulation par le kp provoque une dépolarisation de la membrane plus importante chez les mâles que chez les femelles. Cette dépolarisation sera suivie d'une réponse électrophysiologique pour toutes les cellules testées provenant d'explants issus de femelle contrairement aux mâles (Han *et al.*, 2005). Une étude utilisant des lignées immortalisées de neurones à GnRH, les GT1-7 et les GN-11 montre que l'ajout de kp dans le milieu de culture engendre une augmentation de l'expression de l'ARN messager du GnRH et fait intervenir comme l'ont démontré Castellano et Constantin la voie de signalisation des MAP kinases (Novaira *et al.*, 2009). Pour finir sur l'action de kp sur les neurones à GnRH *in vitro*, un pré-traitement à l'aide d'un antagoniste de *Kiss1r* inhibe l'action stimulatrice du kisspeptine sur l'activité électrophysiologique des neurones à GnRH sur des tranches d'aire pré-optique en culture issues de souris mâle adulte (Roseweir *et al.*, 2009).

- *Action sur les terminaisons des neurones à GnRH* : Une étude utilisant des explants d'hypothalamus médio-basal de souris (comprenant l'éminence médiane, le noyau arqué et le noyau ventromédian) montre que le kp est capable de stimuler directement les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH, sans passer par le corps cellulaire du neurone, au niveau de l'éminence médiane provoquant ainsi la sécrétion de GnRH (d'Anglemont de Tassigny *et al.*,

2008). Ces résultats sont en accord avec une observation faite *in vivo* sur des singes en période pubertaire et montrant une sécrétion pulsatile de kp en corrélation avec la sécrétion pulsatile de GnRH dans la tige infundibulaire (Keen *et al.*, 2008). Tous ces résultats suggèrent que le kp serait sécrété dans l'éminence médiane de manière pulsatile et pourrait ainsi réguler la sécrétion de GnRH au niveau des terminaisons des neurones à GnRH.

- *Action sur l'hypophyse* : Le *Kiss1r* est exprimé dans les cellules de la pars tuberalis, une sous-division de l'adénohypophyse, et plus particulièrement dans les cellules immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-LH $\beta$  (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008). Des études sur des cultures de cellules adénohypophysaires montrent également la présence de l'ARN messager *Kiss1r* dans les cellules gonadotropes chez le rat (Gutierrez-Pascual *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2008) et la brebis (Smith *et al.*, 2008b). Toutes ces études suggèrent que le kp pourrait avoir un rôle direct sur les cellules adénohypophysaires. La majorité des études *par injection périphérique de kp* (cf. p.27 paragraphe II.3.b.) ont essayé de discriminer un effet potentiel de kp sur les cellules gonadotropes en utilisant des modèles de cultures de cellules ou d'explants hypophysaires provenant de rats pubères ou adultes supplémentés à des doses similaires de kp (kp-54 ou kp-10) (Matsui *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2005a; Navarro *et al.*, 2005b). Sur des cultures de cellules hypophysaires dérivées de rat adulte, aucun effet de kp sur la sécrétion dans le milieu de culture de l'une ou l'autre des hormones gonadotropes quel que soit le sexe de l'animal n'a été observé (Matsui *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004). En revanche, sur des cultures hypophysaires ovines, porcines et bovines, d'autres études ont montré un effet stimulateur de kp sur la sécrétion de LH des cellules hypophysaires en culture (Kadokawa *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008b; Suzuki *et al.*, 2008). Néanmoins, l'une de ces études montre que l'injection périphérique de kp n'a pas d'effet sur la sécrétion de LH chez des brebis HPD (dont l'hypothalamus a été déconnecté de l'hypophyse) (Smith *et al.*, 2008b). Un effet stimulateur de kp a été détecté sur la sécrétion des hormones somatotropes (GH, hormone de croissance) et lactotropes (PRL, prolactine) *in vivo* chez le rat, la vache et le porc (Gutierrez-Pascual *et al.*, 2007; Kadokawa *et al.*, 2008). Sur des cultures de cellules hypophysaires dérivées de rats mâles pré-pubères, un effet stimulateur de l'ajout de kp dans le milieu de culture a été observé sur la sécrétion de LH mais pas sur la sécrétion de FSH (Navarro *et al.*, 2005a; Navarro *et al.*, 2005b). Une étude plus récente confirme un effet stimulateur de kp sur la sécrétion de LH sur des cultures d'adénohypophyse de rats mâles pré-pubères (Gutierrez-Pascual *et al.*, 2007).

**En résumé de cette deuxième partie d'introduction**, le **kp** est un peptide issu de la transcription du **gène Kiss-1**. Tout d'abord découvert pour son rôle anti-métastatique, il a par la suite été montré comme étant un **acteur majeur de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique**. Le kp agit comme un **stimulateur** de la fonction de reproduction en amont des **neurones à GnRH, plus particulièrement sur la sécrétion de cette neurohormone**, et semble jouer un **rôle** aussi bien dans **la mise en place de cette fonction** que dans sa **régulation à l'âge adulte**. De plus, un **rôle potentiel** de kisspeptine est suggéré sur **l'hypophyse**, plus particulièrement, une action stimulatrice sur les cellules somatotropes et lactotropes chez l'adulte et sur les cellules gonadotropes uniquement au cours du développement péri-pubertaire.



**Figure 5: Localisation des corps cellulaires kiss-1 et kisspeptine immunoréactifs chez les rongeurs.** APO, aire préoptique; CO, chiasma optique; CA, commissure antérieure; RP3V, région rostrale périventriculaire du 3<sup>ème</sup> ventricule; ME, éminence médiane; ARC, noyau arqué; MB, corps mammillaires; MeA, amygdale médiane; 3V, 3<sup>ème</sup> ventricule

### **III. Distribution neuroanatomique de kisspeptine**

Dans cette seconde partie de l'introduction, nous ferons l'état des connaissances concernant la localisation neuroanatomique des cellules exprimant l'ARNm *Kiss1* (cellules *Kiss1*) et kp-ir (cellules kp-ir) au sein du cerveau chez les mammifères.

Les premières études sur l'ARNm *Kiss1* montrent la présence par RT-PCR de ce dernier au sein de l'hypothalamus chez l'humain et le rat (Muir *et al.*, 2001; Irwig *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004a; Brailoiu *et al.*, 2005) mais ne permettent pas de définir les sous-régions de l'hypothalamus dans lesquelles se trouvent les cellules et/ou les fibres à kp. Ainsi, de nombreux auteurs ont utilisé les techniques d'hybridation *in situ* (HIS) et d'immunohistochimie (IHC) afin de déterminer la localisation précise des corps cellulaires et des fibres contenant ce nouveau neuropeptide.

#### **III.1. Localisation des cellules exprimant l'ARN messager du kiss-1 (Figure 5 et tableau 1)**

Chez la souris, les cellules *Kiss1* sont détectées dans deux régions de l'hypothalamus : une région rostrale contenant le noyau antéro-ventral para-ventriculaire (AVPV) et le noyau péri-ventriculaire (PeVN) appelé région rostrale péri-ventriculaire du 3<sup>ème</sup> ventricule (RP3V) ainsi qu'une région caudale contenant le noyau arqué (ARC) chez le mâle comme chez la femelle (Gottsch *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005a; Smith *et al.*, 2005b). Des cellules *Kiss1* sont également détectées dans l'amygdale (Gottsch *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Une étude récente à l'aide de souris transgéniques Cre recombinante exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *Kiss1* montre la présence de cellules GFP positives dans le RP3V et dans l'ARC mais également dans d'autres régions extra-hypothalamiques : l'amygdale et le cortex (Cravo *et al.*, 2010).

Chez le hamster syrien, une étude ne détecte aucune cellule *Kiss1* dans le RP3V (Revel *et al.*, 2006) contrairement à une étude plus récente qui montre des cellules *Kiss1* positives dans les deux régions rostrales et caudales de l'hypothalamus (Ansel *et al.*, 2010). Chez le hamster sibérien, toutes les publications montrent que les cellules *Kiss1* sont détectées dans les mêmes régions hypothalamiques que chez la souris (Greives *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2007).

Genre	Espèces	APO	AVPV	PeVN	ARC	DMH	EM	BNST	Amygdale
Rongeurs	Souris	0	Kiss-1	Kiss-1	Kiss-1	0	0	0	Kiss-1
		0	Kp-ir	Kp-ir	Kp-ir	Kp-ir	0	0	0
Hamster		0	Kiss-1	Kiss-1	Kiss-1	0	0	0	?
		0	?	?	Kp-ir	0	0	0	?
Rat		0	Kiss-1	Kiss-1	Kiss-1	0	0	0	Kiss-1
		0	*Kp-ir	*Kp-ir	Kp-ir	Kp-ir	0	0	0
Ongulés	Mouton	Kiss-1			Kiss-1	0	0	?	?
		Kp-ir			Kp-ir	Kp-ir	Kp-ir	?	?
Cheval		?			?	?	0	?	?
		?			Kp-ir	Kp-ir	0	Kp-ir	?
Chèvre		?			?	?	0	?	?
		?			Kp-ir	?	0	?	?
Primates	Singe	Kiss-1			Kiss-1	?	?	?	?
		Kp-ir			Kp-ir	0	Kp-ir	Kp-ir	?
Homme		?			Kiss-1	?	0	?	?
		Kp-ir			Kp-ir	0	0	?	?

**Tableau 1: Localisation des corps cellulaires exprimant le gène kiss-1 (kiss-1) et/ou immunoréactifs pour le kisspeptine (kp-ir) dans le cerveau en fonction des espèces.** 0: absence de détection, ? : pas étudié, \*kp-ir: détecté chez des animaux sous ovariectomie supplémentés en œstradiol et/ou après injection de colchicine. APO : aire pré-optique ; AVPV : région antéro-ventral péri-ventriculaire ; PeVN : région péri-ventriculaire ; ARC : noyau arqué ; DMH ; noyau hypothalamique dorsomédian ; EM : éminence médiane ; BNST : noyau du lit de la strie terminale



Chez le rat, les deux populations de cellules *Kiss1* positives sont également détectées : dans le RP3V et l'ARC, respectivement (Irwig *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007; Kalamatianos *et al.*, 2008). Une étude récente a montré la présence de cellules *Kiss1* dans l'amygdale (Kim *et al.*, 2011).

Chez le mouton, les quelques données disponibles montrent la présence de cellules exprimant l'ARN messager du *Kiss1* dans le noyau arqué essentiellement mais également de quelques cellules dans l'aire pré-optique (POA) (Estrada *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008a; Smith *et al.*, 2009a).

Chez le singe et l'homme, quelques rares cellules *Kiss1* sont détectées dans l'APO. La majorité des cellules *Kiss1* sont observées dans l'ARC (Tableau 1) (Shahab *et al.*, 2005; Rometo *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010).

Pour conclure sur la localisation des cellules *Kiss1*, chez la majorité des espèces étudiées, les corps cellulaires contenant l'ARN messager du *Kiss1* sont retrouvés dans deux régions hypothalamiques : une population se trouvant en partie rostrale de l'hypothalamus, le RP3V, chez les rongeurs ou l'APO chez les ovins ainsi qu'une population caudale au niveau de l'ARC commune à toutes les espèces (Figure 5). Les données par HIS ne permettent pas de déterminer quelles sont les cibles de ces cellules. L'immunohistochimie permet de localiser le peptide et d'aiguiller sur de potentielles populations cellulaires cibles.

### **III.2. Localisation des corps cellulaires et des fibres immunoréactives pour le kisspeptine (Figure 5 et tableau 1)**

#### ***III.2.a. Localisation des corps cellulaires immunoréactifs pour le kisspeptine (Tableau 1)***

Chez la souris, les corps cellulaires immunoréactifs pour le kisspeptine (cellules kp-ir) sont détectés dans trois régions hypothalamiques chez l'adulte : le RP3V, le noyau dorsomédian (DMH) et l'ARC (Clarkson & Herbison, 2006b; Clarkson *et al.*, 2009a; Clarkson *et al.*, 2009b).

*Chez le hamster*, des cellules kp-ir sont observées dans le RP3V et l'ARC (Greives *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2007).

*Chez le rat*, des cellules kp-ir sont détectées dans l'ARC chez des animaux intacts (Brailoiu *et al.*, 2005; Kinoshita *et al.*, 2005; True *et al.*, 2010). De plus, Brailoiu et ses collaborateurs montrent la présence de cellules kp-ir comme chez la souris dans le DMH (Brailoiu *et al.*, 2005). En revanche, ces auteurs rapportent l'absence de cellules kp-ir dans le RP3V. Des corps cellulaires kp-ir sont détectés dans le RP3V chez le rat après injection de colchicine (un bloqueur du transport des protéines du corps cellulaire vers les fibres) (Adachi *et al.*, 2007; Takase *et al.*, 2009; Lederman *et al.*, 2010), ce qui suggère l'existence de régulations post-transcriptionnelles, plus particulièrement l'existence d'un transport axonal rapide. Une étude montre également la présence de quelques cellules kp-ir dans le RP3V chez des rates ovariectomisées avec implants d'œstradiol (Kauffman *et al.*, 2007) suggérant que la concentration de peptide dans les corps cellulaires du RP3V serait différente en fonction des niveaux oestrogéniques de l'animal.

*Chez le mouton, la chèvre et le cheval*, des cellules kp-ir sont détectées dans l'ARC (Franceschini *et al.*, 2006; Pompolo *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2007; Decourt *et al.*, 2008; Magee *et al.*, 2009; Ohkura *et al.*, 2009b; Cheng *et al.*, 2010). En revanche, des cellules kp-ir sont observées dans l'aire pré-optique uniquement chez la brebis (Franceschini *et al.*, 2006; Pompolo *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010). Enfin, des cellules kp-ir sont détectées dans le DMH chez la brebis (Franceschini *et al.*, 2006; Pompolo *et al.*, 2006) et chez le cheval (Decourt *et al.*, 2008).

*Chez le singe et l'homme*, les études par immunohistochimie détectent des cellules kp-ir en grande densité dans l'ARC, mais également quelques cellules kp-ir dans l'APO (Rometo *et al.*, 2007; Ramaswamy *et al.*, 2008; Hrabovszky *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010). Des cellules kp-ir sont également détectées au sein de l'éminence médiane (EM) et du noyau du lit de la strie terminale (BNST) (Ramaswamy *et al.*, 2008; Hrabovszky *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010).

Genre	Espèces	APO	RP3V	Régions autour du 3V	ARC	DMH	EM ZI	EM ZE
Rongeurs	Souris	+	+	+	+	+	+	0
	Hamster	?	+	+	+	?	?	?
	Rat	+	+	+	+	+	+	+
Ongulés	Mouton	+		+	+	+	+	+
	Cheval	+		+	+	?	+	0
	Chèvre	+		+	+	?	+	+
Primates	Singe	+		?	+	?	+	+
	Homme	+		+	+	+	+	+

**Tableau 2: Distribution des fibres immunoréactives pour le kisspeptine dans l'hypothalamus en fonction des espèces.**  
 +: positive, ?: pas étudié. APO : aire pré-optique ; RP3V : région rostral péri-ventriculaire du 3<sup>ème</sup> ventricule; ARC : noyau arqué ; DMH ; noyau hypothalamique dorsomédian ; EM : éminence médiane ; ZI : zone interne ; ZE : zone externe

### ***III.2.b. Localisation des fibres immunoréactives pour les kisspeptine (Tableau 2)***

Quelle que soit l'espèce étudiée, des fibres kp-ir sont détectées dans les régions où les cellules kp-ir sont détectées : le RP3V pour les rongeurs, l'APO pour les ongulés et les primates ainsi que l'ARC. De plus, la densité de fibres kp-ir est toujours plus élevée dans l'ARC que dans les autres régions.

*Chez la souris*, l'équipe d'Herbison a publié une cartographie détaillée des fibres kp-ir. Celles-ci sont détectées dans de nombreuses régions du continuum hypothalamique, plus particulièrement tout au long du 3<sup>ème</sup> ventricule de l'OVLT au récessus pré-mamillaire, mais également dans des régions extra-hypothalamiques comme par exemple le péri-aqueductal grey, l'amygdale et le locus coeruleus. Dans l'éminence médiane, des fibres kp-ir sont détectées uniquement dans la zone interne (Clarkson *et al.*, 2009b).

*Chez le rat*, des fibres kp-ir sont retrouvées dans de nombreuses régions du continuum hypothalamique dont les régions périventriculaires toutes au long de l'axe rostro-caudal de l'OVLT au récessus pré-mamillaire et extra-hypothalamiques comme par exemple le péri-aqueductal grey et le locus coeruleus. Dans l'éminence médiane, une grande densité de fibres est détectée dans la zone interne et quelques fibres sont observées dans la zone externe (Brailoiu *et al.*, 2005; True *et al.*, 2010).

*Chez le mouton, la chèvre et le cheval*, des fibres kp-ir sont décrites tout au long du 3<sup>ème</sup> ventricule de la partie la plus rostrale, où l'on retrouve l'OVLT, à la partie la plus caudale, où l'on observe le récessus pré-mamillaire (Franceschini *et al.*, 2006; Decourt *et al.*, 2008). Des fibres kp-ir sont également détectées dans les régions où des cellules kp-ir sont observées : l'APO, l'ARC et le DMH (Franceschini *et al.*, 2006; Decourt *et al.*, 2008; Magee *et al.*, 2009; Ohkura *et al.*, 2009a; Wakabayashi *et al.*, 2010). Des fibres kp-ir sont détectées dans l'éminence médiane, en grande quantité dans la zone interne, et seulement quelques fibres kp-ir sont détectées au sein de la zone externe de l'éminence médiane, région où sont localisées les terminaisons des neurones à GnRH (Franceschini *et al.*, 2006; Decourt *et al.*, 2008; Ohkura *et al.*, 2009a; Wakabayashi *et al.*, 2010).

*Chez le singe et l'homme*, les fibres kp-ir sont détectées tout au long du 3<sup>ème</sup> ventricule de l'OVLT au récessus pré-mamillaire ainsi que dans de nombreux noyaux hypothalamiques à proximité du 3<sup>ème</sup> ventricule : le noyau para-ventriculaire, l'aire hypothalamique antérieure et

le DMH (Hrabovszky *et al.*, 2010). Comme chez les ongulés, des fibres kp-ir sont détectées en forte densité dans la zone interne de l'éminence médiane et seulement quelques fibres kp-ir sont détectées au sein de la zone externe (Ramaswamy *et al.*, 2008; Hrabovszky *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010).

*Pour conclure sur la localisation des cellules et des fibres kp-ir*, chez la majorité des espèces étudiées, les cellules kp-ir sont localisées dans deux régions hypothalamiques identiques à celles où les cellules *Kiss1* sont observées : une région antérieure, le RP3V pour les rongeurs ou l'APO pour les ongulés et les primates, ainsi qu'une région postérieure commune à toutes les espèces, l'ARC (Figure 5). Quant aux fibres kp-ir, des études identifient les différentes régions où se projettent les neurones à kp : la majorité hypothalamique mais aussi certaines régions extra-hypothalamiques.

### **III.3. Quelles sont les cibles des neurones à kisspeptine?**

Dans ce troisième paragraphe sur la neuroanatomie de kp, nous allons nous intéresser aux différentes cibles des neurones à kp. Pour cela, nous commencerons par détailler la relation entre les neurones à kp et les neurones à GnRH. Puis, nous terminerons sur les autres cibles potentielles des neurones à kp qui ont été déterminées à l'aide des études récentes par des traçages antérogrades et rétrogrades. Il est important de noter qu'aucune étude par immunohistochimie n'a actuellement été réalisée sur la localisation des cellules présentant à leur membrane le *Kiss1r*. Les quelques données sur la présence de fibres kp-ir dans différentes régions hypothalamiques et extra-hypothalamiques sont majoritairement cohérentes avec les résultats des études cartographiant les cellules exprimant l'ARNm *Kiss1r* (Lee *et al.*, 1999; Herbison *et al.*, 2010).

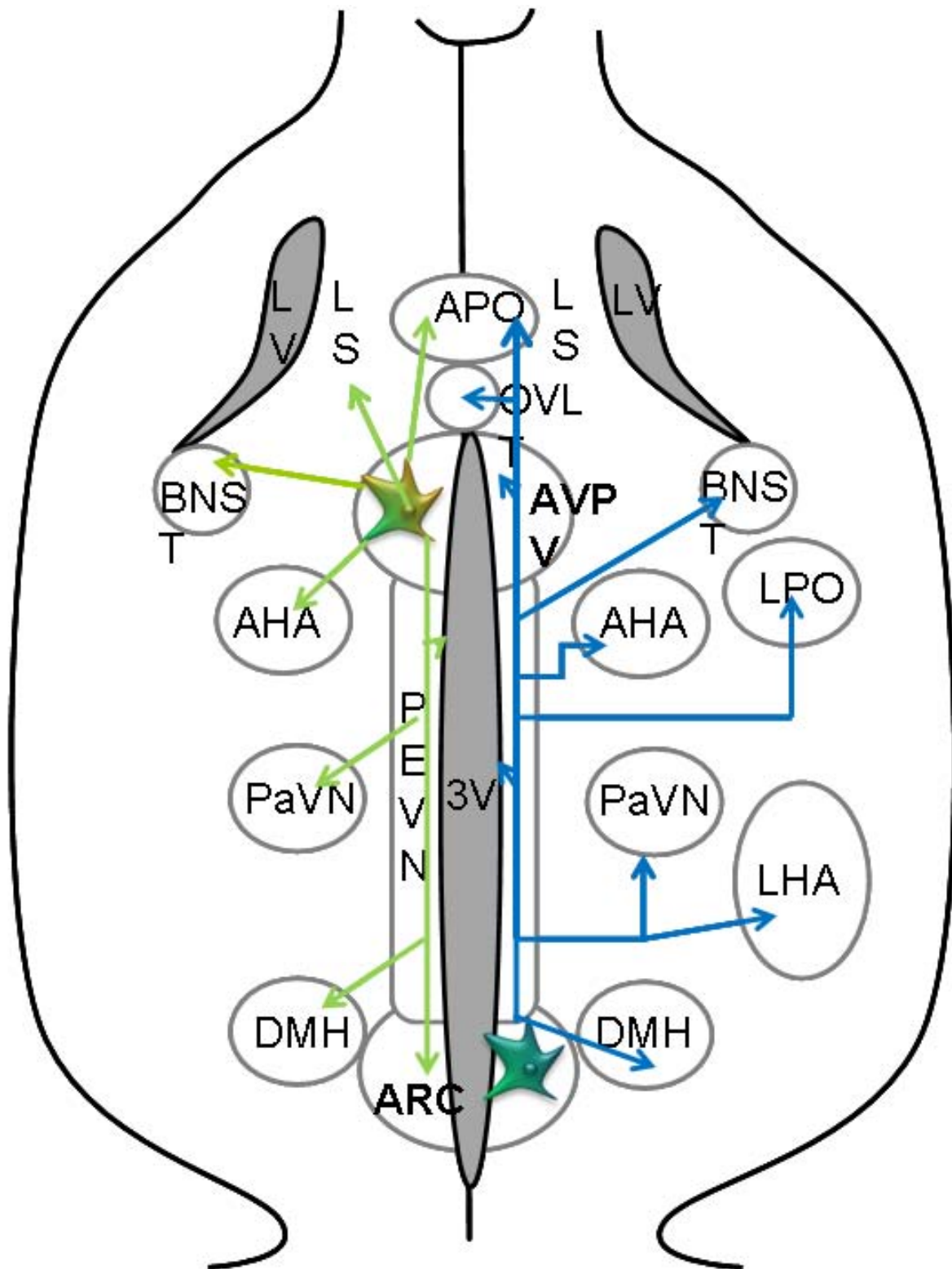
#### ***III.3.a. Les neurones à GnRH***

- *Plus de la moitié des corps cellulaire à GnRH de l'aire pré-optique expriment le *Kiss1r** (Irwig *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005; Herbison *et al.*, 2010). Des fibres kp-ir sont observées à proximité des corps cellulaires à GnRH : chez la rate (Kinoshita *et al.*, 2005), la souris (Clarkson & Herbison, 2006b), la jument (Decourt *et al.*, 2008) et la brebis (Smith *et al.*, 2008a; Tillet *et al.*, 2009). Chez la souris et la brebis, les auteurs ont quantifié le nombre de corps cellulaire GnRH recevant des afférences kp-ir (Clarkson & Herbison, 2006b; Smith

*et al.*, 2008a). Les deux études montrent que de nombreux corps cellulaires à GnRH reçoivent des appositions kp-ir (Clarkson & Herbison, 2006b; Smith *et al.*, 2008a).

- *Les corps cellulaires à GnRH dans le MBH* : Chez certaines espèces d'ongulés et de primates, des fibres kp-ir sont également détectées à proximité des corps cellulaires à GnRH (Decourt *et al.*, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2008; Hrabovszky *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010). Dans le MBH de la brebis, le pourcentage de corps cellulaires GnRH-ir recevant des appositions kp-ir est supérieur à 60% (Smith *et al.*, 2008a). Chez le singe et l'homme, le pourcentage de corps cellulaires GnRH-ir recevant des afférences kp est inférieur à 50% dans cette région (Ramaswamy *et al.*, 2008; Hrabovszky *et al.*, 2010).

- *Les terminaisons nerveuses à GnRH dans l'éminence médiane* : Chez le rat, une étude récente a montré par microscopie électronique des appositions proches entre les axones à GnRH et les axones à kp (on parle de juxtaposition axono-axonale) dans la partie latérale de la zone interne de l'éminence médiane mais a observé l'absence de structure synaptique entre ces deux types neuronaux suggérant ainsi que le kp agirait sur les neurones à GnRH par un autre mécanisme qu'une transmission synaptique (Uenoyama *et al.*, 2011). En revanche, chez la souris, la présence de fibres kp-ir dans la zone interne de l'éminence médiane et l'absence de fibres dans la zone externe, où l'on retrouve les terminaisons des neurones à GnRH, suggèrent l'absence de juxtaposition axono-axonale entre les neurones à GnRH et à kp au sein de cette structure (Clarkson & Herbison, 2006b; Clarkson *et al.*, 2009b). Des doubles marquages GnRH/kp ont permis de montrer des juxtapositions axo-axonales entre les fibres à GnRH et les fibres à kp dans la zone externe de l'éminence chez les ongulés et les primates (Decourt *et al.*, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2008; Tillet *et al.*, 2009; Hrabovszky *et al.*, 2010). Ces études de neuroanatomie confortent l'hypothèse d'une action possible de kp au niveau des terminaisons des neurones à GnRH (d'Anglemon de Tassigny *et al.*, 2008; Keen *et al.*, 2008).



**Figure 6: Schéma représentant les différents sites de projections des deux populations de neurones à kisspeptine dans l'hypothalamus de souris** (Adapté de Yeo et al, 2011). LV: ventricule latéral; 3V: 3<sup>ème</sup> ventricule; LS: septum latéral; APO: aire préoptique; OVLT: organe vasculaire du lit de la strie terminale; BNST: noyau du lit de la strie terminale; AVPV: aire antéroventral paraventriculaire; AHA: aire hypothalamique antérieure; LPO: aire préoptique latérale; PaVN: noyau paraventriculaire; LHA: aire hypothalamique latérale; DMH: noyau hypothalamique dorsomédian; ARC:; noyau arqué; PeVN: noyau périventriculaire.

### ***III.3.b. Autres cibles potentielles (Figure 6)***

Cette année, deux études utilisant des marquages rétrogrades et antérogrades ont permis de mieux définir les sites d'actions des neurones à kp chez la souris (Yeo & Herbison, 2011) et chez la rate (Uenoyama *et al.*, 2011).

*Chez la souris*, de nombreuses régions reçoivent des afférences kp en provenance des deux populations RP3V et ARC. En revanche certaines régions reçoivent des afférences spécifiquement de l'une ou l'autre des deux populations (Figure 6) (Yeo & Herbison, 2011). Il est important de noter que ces données suggèrent l'existence d'un dialogue entre les neurones à kp de l'ARC et ceux du RP3V.

*Chez la rate et la souris*, suite à l'injection i.p. d'un marqueur rétrograde le fluorogold, aucune cellule kp-ir ni dans le RP3V et ni dans l'ARC ne présente de double marquage kp/fluorogold. Ces résultats suggèrent l'absence de contacts directes entre les axones à kp et les vaisseaux sanguins du système porte hypothalamo-hypophysaire et relancent le débat d'un potentiel rôle de kisspeptine centrale sur l'hypophyse (Uenoyama *et al.*, 2011)

Chez la souris et la brebis, deux études montrent par double immunofluorescence que les neurones à kisspeptine projettent sur les corps cellulaires immunoréactifs pour NPY et POMC (Backholer *et al.*, 2008; Fu & van den Pol, 2010). De plus, chez la souris, les auteurs montrent que le kisspeptine stimule directement l'activité électrophysiologique des neurones à POMC et inhibe par un mécanisme synaptique indirect l'activité électrophysiologique des neurones à NPY (Fu & van den Pol, 2010).

*Pour conclure sur les cibles cellulaires potentielles des neurones à kp*, en accord avec son rôle majeur dans la fonction de reproduction, les neurones à kp sont en relation avec les neurones à GnRH : par des appositions corps cellulaires-fibres dans l'APO chez la majorité des espèces et dans le MBH chez les ongulés et primates ainsi que par quelques juxtapositions axono-axonales au sein de l'éminence médiane. Toutefois, la présence de fibres kp-ir et la démonstration que les neurones à kp projettent dans de nombreuses régions tout au long du continuum hypothalamique suggèrent un rôle de kp sur d'autres fonctions que la fonction de reproduction.



Genre	Espèce	RP3V			ARC		
		TH	Met-Enk	Gal	NKB	Dyn	Met-Enk
Rongeurs	Souris	>50%	28-38%	7%	?	?	65%
	Hamster	?	?	?	?	?	?
	Rat	> 50%	?	?	97%	?	?
Ongulés	Mouton	?	?	?	> 90%	>70%	?
	Chèvre	?	?	?	99,5%	78%	?
	Cheval	?	?	?	?	?	?
Primates	Singes	?	?	?	40-60%	?	?
	Hommes	?	?	?	77%	?	?

**Tableau 3: Pourcentage de neurones à kisspeptines co-exprimant d'autres neuropeptides/enzymes de synthèse chez différentes espèces.** TH: tyrosine hydroxylase, Met-Enk: met-enképhaline, Gal: galanine, NKB: neurokinine B, Dyn: dynorphine. ?: pas encore étudiés

Espèces	Sexe	RP3V/APO				ARC			
		ER $\alpha$	ER $\beta$	PR	AR	ER $\alpha$	ER $\beta$	PR	AR
Souris	F	>65%	31%	67%	?	99%	25%	?	?
	M	?	?	?	0%	88%	?	?	64%
Rat	F	>62%	21%	?	?	>70%	11%	?	?
	M	?	?	?	?	?	?	?	?
Mouton	F	50%	?	?	?	93%	?	> 86%	?
	M	?	?	?	?	?	?	?	?

**Tableau 4: Pourcentage de neurones à kisspeptines co-exprimant des récepteurs aux stéroïdes sexuels chez différentes espèces.** ER: récepteur aux estrogènes, PR: récepteur à la progestérone, AR: récepteur aux androgènes, ?: pas encore étudiés

### **III.4. Co-expression avec d'autres neuropeptides/enzymes de synthèse et récepteurs**

#### ***III.4.a. Co-expression avec d'autres neuropeptides/enzymes de synthèse***

##### ***(Tableau 3)***

- *Dans les corps cellulaire du RP3V* : Certains neurones à kp co-expriment la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme intervenant dans la synthèse des catécholamines, chez le rat et la souris (Kauffman *et al.*, 2007; Semaan *et al.*, 2010; Clarkson & Herbison, 2011). La galanine et la met-enképhaline ont également été détectées par IHC dans certains neurones à kp chez la souris (Porteous *et al.*, 2011).

- *Dans les corps cellulaires de l'ARC* : Les neurones à kp co-expriment deux neuropeptides connus pour être impliqués dans le contrôle de la sécrétion de GnRH : la neurokinine B (NKB), impliquée dans le feedback négatif de l'œstradiol sur la sécrétion de GnRH, et la dynorphine (dyn), impliquée dans le feedback négatif de la progestérone sur la sécrétion de GnRH, chez la rate, la brebis, la chèvre, le singe et l'homme (Goodman *et al.*, 2007; Hrabovszky *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2010; True *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010). Ces études nomment cette population KNDy. Une étude récente montre la co-expression à 65% des corps cellulaires kp-ir de l'ARC avec la met-enképhaline chez la souris (Porteous *et al.*, 2011). Récemment, une étude s'intéressant à la population KNDy montre une boucle d'auto-régulation de ces neurones via NKB sur l'expression de *Kiss1* (Navarro *et al.*, 2011).

- *Au niveau des fibres* : Dans la majorité de ces études, une forte co-localisation des fibres à kisspeptine avec la NKB, la dynorphine, la met-enképhaline, la galanine a également été observé tout au long du continuum septo-hypothalamique chez la rate, la souris, la brebis et l'homme (Goodman *et al.*, 2007; True *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010; Porteous *et al.*, 2011).

#### ***III.4.b. Co-expression de récepteurs (Tableau 4)***

- *Les neurones à kp co-expriment les différents récepteurs aux stéroïdes sexuels en des proportions qui varient selon le sexe étudié* (pour revue (Lehman *et al.*, 2010)).

Chez la femelle, les récepteurs aux œstrogènes (ER) : ER $\alpha$  et ER $\beta$ , sont détectés dans les différentes sous-populations de neurones à kp chez le rat (Kinoshita *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007) et la souris femelle (Smith *et al.*, 2005a; Clarkson *et al.*, 2008). Chez toutes les espèces, la quasi-totalité des neurones à kp de l'ARC co-exprime l'ER $\alpha$ . Quelle que soit la région RP3V ou ARC, le pourcentage de neurones à kp co-exprimant ER $\alpha$  est toujours au moins trois fois supérieur au pourcentage de neurones à kp exprimant l'isoforme ER $\beta$  (Smith *et al.*, 2005a; Smith *et al.*, 2006b). De plus, les neurones à kp co-expriment le récepteur à la progestérone (PR) dans l'ARC chez la brebis (Smith *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2010) et dans le RP3V chez la souris femelle (Clarkson *et al.*, 2008).

Chez la souris mâle, plus de la moitié des neurones à kp du noyau arqué co-expriment l'isoforme ER $\alpha$  et le récepteur aux androgènes (AR) (Smith *et al.*, 2005b).

*- Les neurones à kp ne co-expriment pas que les récepteurs aux différents stéroïdes sexuels mais également d'autres récepteurs.*

Les récepteurs à la leptine (LepRa et LepRb) ont été détectés au sein de la population des cellules à kp de l'ARC chez la souris (Smith *et al.*, 2006a). Cette étude montre que 42% des cellules *Kiss1* de l'ARC co-expriment l'ARNm de l'isoforme LepRb (Smith *et al.*, 2006a). Deux études récentes montrent : d'une part que l'ARNm de l'isoforme LepRb chez la souris adulte est détecté en plus forte proportion dans l'ARC que dans le RP3V (Caron *et al.*, 2010), et, d'autre part que seules les cellules kp-ir de l'ARC activent la voie de signalisation des récepteurs à la leptine après injection intrapéritonéale de leptine (Quennell *et al.*, 2011).

Les récepteurs à la prolactine (PrIR) sont co-exprimés par la population des neurones à kp de l'ARC : à plus de 80% chez la rate (Kokay *et al.*, 2011) et à plus de 60% chez la brebis (Li *et al.*, 2011).

*Pour conclure sur les neuropeptides et récepteurs co-exprimés par les neurones à kisspeptine*, ces derniers co-expriment de nombreux neuropeptides et récepteurs. Certains des neuropeptides co-exprimés par les neurones à kp sont connus pour être exprimés différemment en fonction du sexe, par exemple NKB (Ciofi *et al.*, 2006; Ciofi *et al.*, 2007) et TH (Simerly, 1989). De plus, les neurones à kp co-expriment fortement les différents récepteurs aux stéroïdes sexuels. Tous ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que les neurones à kp pourraient avoir un patron d'expression différent en fonction du sexe.

### **III.5. Différences sexuelles**

#### ***III.5.a. Différences sexuelles dans l'expression de Kiss1 et de kisspeptine***

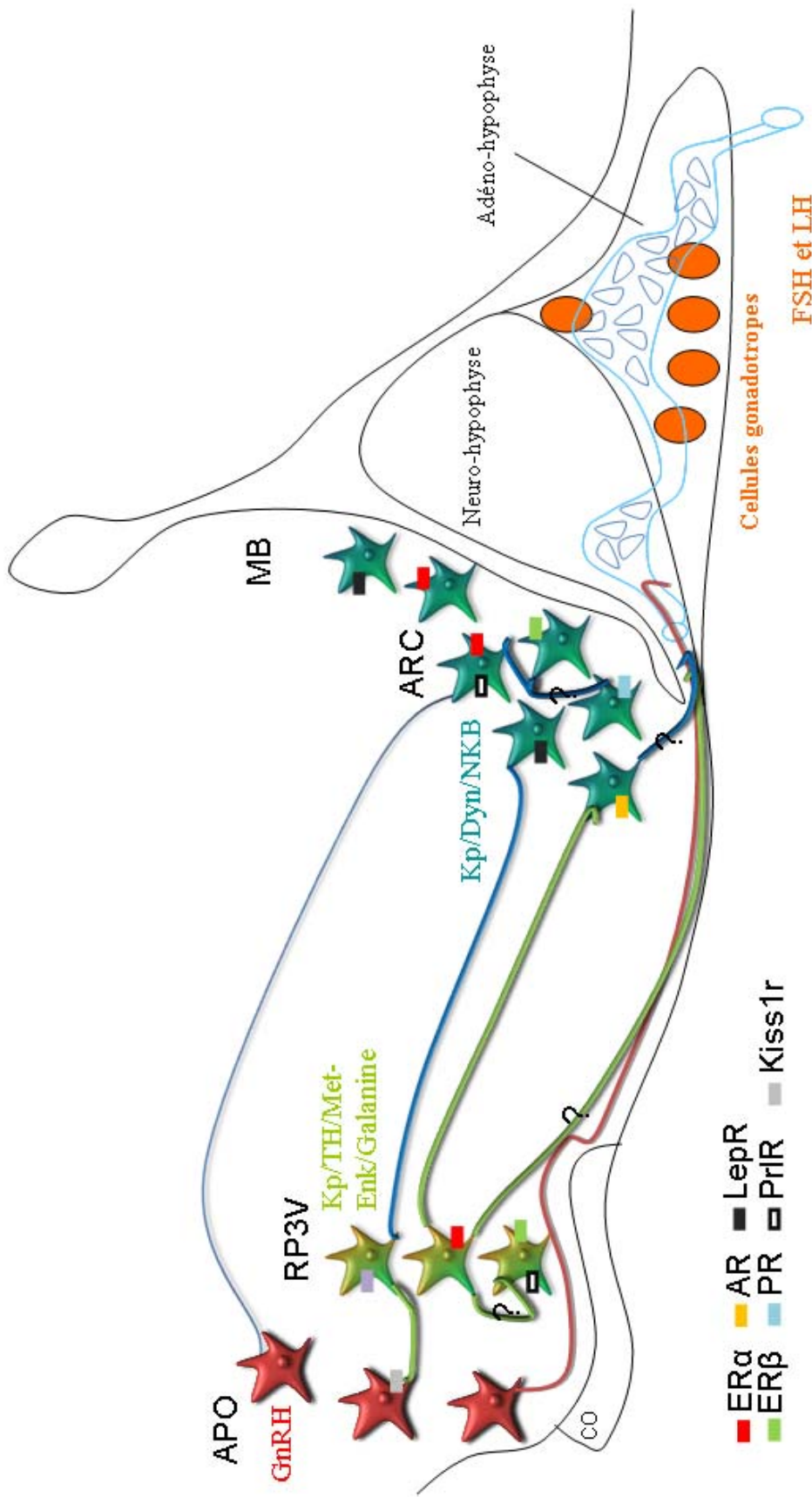
Chez la souris, le nombre de cellules kp-ir dans le RP3V est quatre fois plus élevé chez la femelle adulte comparé aux mâles (Clarkson & Herbison, 2006b). Au cours de cette étude, les auteurs démontrent également que le pourcentage de neurones à GnRH avec des appositions kp au sein de l'APO est lui aussi quatre fois plus élevé chez les femelles que chez les mâles (Clarkson & Herbison, 2006b). Ces différences sexuelles sont observées dès la période infantile pour l'expression de *Kiss1* (jour post-natal 14) (Kauffman *et al.*, 2009; Semaan *et al.*, 2010) et de kisspeptine (jour post-natal 10) (Clarkson & Herbison, 2006b).

En revanche, pour la population de neurones à kisspeptine de l'ARC, les résultats sont moins clairs. L'équipe d'Herbison stipule que le patron et la densité du marquage kp ne diffèrent pas entre les mâles et les femelles (Clarkson & Herbison, 2006b). Mais l'absence de quantification de la densité de fibres et/ou du nombre de cellules kp-ir ne permet pas de conclure clairement à l'absence de différence sexuelle dans cette région et reste à déterminer. Toutefois, Kauffman et ses collaborateurs ont montré l'existence d'une différence sexuelle dans l'expression de *Kiss1* des neurones à kisspeptine de l'ARC dès le jour post-natal 14 sur des animaux gonadectomisés (Kauffman *et al.*, 2009).

Une étude récente montre que le nombre de cellules *Kiss1* détecté dans l'amygdale est plus bas chez les femelles que chez les mâles (Kim *et al.*, 2011).

Chez le rat, des études montrent une différence sexuelle de l'expression du gène *Kiss1* et de kp dans le RP3V en faveur des femelles intactes mais également chez des animaux gonadectomisés montrant que les différences sexuelles observées chez l'adulte ne sont pas dues à des différences dans les taux circulants de stéroïdes sexuels (Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007; Iijima *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010). Ces différences sexuelles d'expression de *Kiss1* dans le RP3V sont observées dès le jour post-natal 19 (Cao & Patisaul, 2011) et vont persister tout au long du développement (Takumi *et al.*, 2010).

Dans l'ARC, certaines études observent des différences sexuelles au niveau de l'expression de *Kiss1* mais aussi de la quantité de peptide chez des rats intacts ou gonadectomisés contrairement à la souris où aucune différence sexuelle n'est observée (Adachi *et al.*, 2007; Iijima *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010). Celles-ci sont détectées dès le



**Figure 7: Schéma bilan sur la localisation des neurones à kisspeptine et la co-expression de différents neuropeptides et récepteurs chez les rongeurs.** ER : récepteurs aux œstrogènes ; PR : récepteurs à la progestérone ; AR ; récepteurs aux androgènes ; LepR : récepteurs à la leptine ; PrIR : récepteurs à la prolactine ; Kiss1r : récepteurs aux kisspeptines.

jour post-natal 2 pour l'expression de *Kiss1* (Cao & Patisaul, 2011) et persistent tout au long du développement (Takumi *et al.*, 2010).

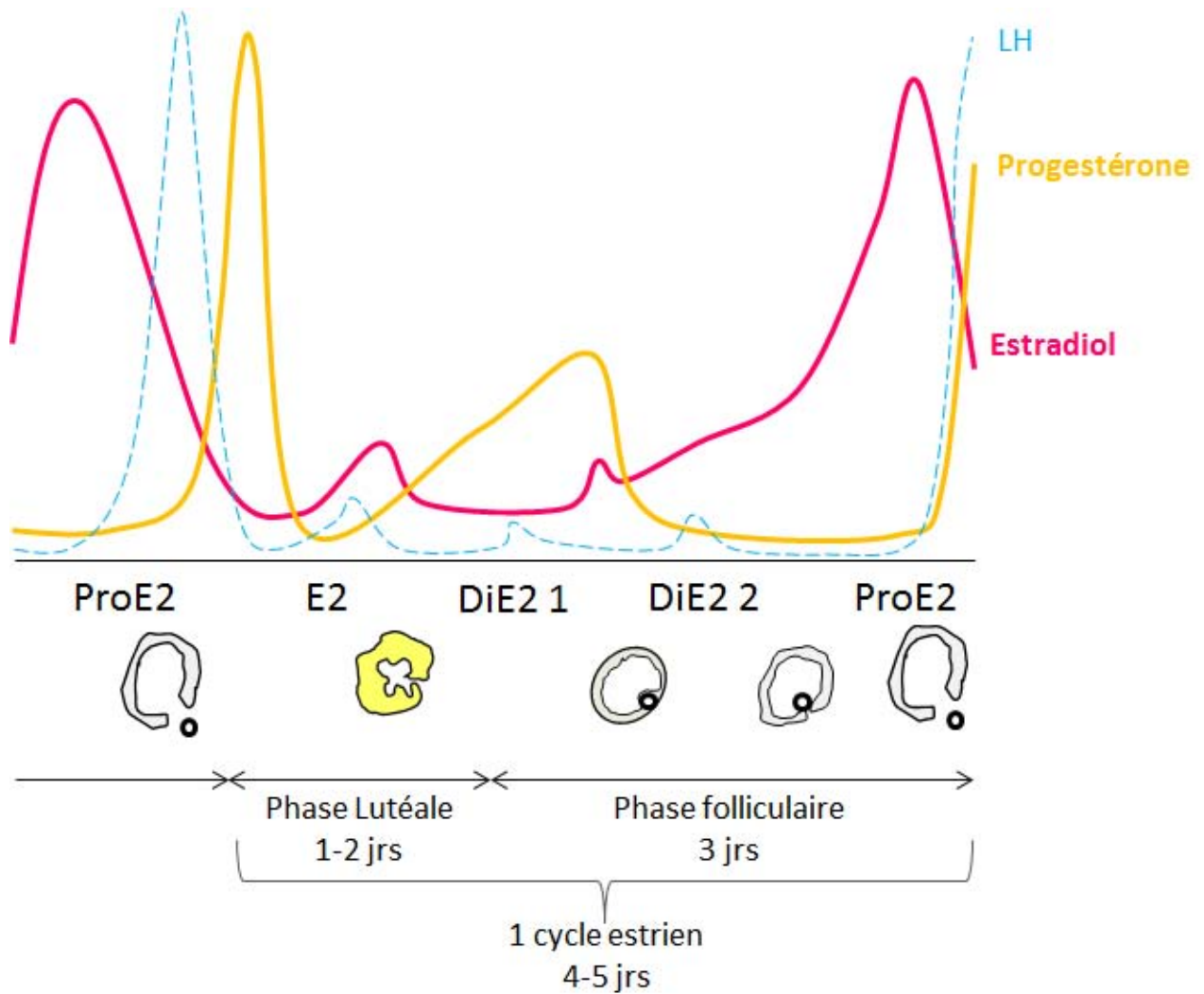
Dans l'amygdale, le nombre de cellules *Kiss1* est plus faible chez les femelles que chez les mâles (Kim *et al.*, 2011).

Chez le mouton et chez l'homme, un plus grand nombre de cellules kp-ir et un réseau plus dense de fibres kp-ir dans l'ARC sont détectés chez les femelles comparé aux mâles (Cheng *et al.*, 2010; Hrabovszky *et al.*, 2010). Aucune donnée comparative n'a pour le moment été publiée au niveau de l'APO chez ces espèces.

### ***III.5.b. Différence sexuelle dans la co-expression et les projections ?***

Aucune étude n'a pour le moment comparé la co-expression de neuropeptides entre les mâles et les femelles. De plus, il manque encore de nombreuses données sur la co-expression de récepteurs chez les mâles. De même, les études récentes cartographiant les fibres kp-ir ou étudiant les projections des neurones à kp par des marquages rétrogrades/antérogrades ont été réalisées uniquement chez les femelles.

**En conclusion générale de cette troisième partie d'introduction**, nous avons développé l'état des connaissances sur la neuroanatomie de kp. Les **corps cellulaires des neurones à kp** se situent essentiellement dans **deux régions hypothalamiques** : une région antérieure **chez les rongeurs nommée RP3V** et **chez les autres espèces, APO** ; ainsi qu'une région postérieure **commune à toute les espèces l'ARC** (Figure 7 : Schéma bilan). Les **fibres à kp** sont retrouvées **tout au long du continuum hypothalamique** et se projettent dans de nombreuses régions hypothalamiques suggérant un **rôle de kp au-delà de la régulation des neurones à GnRH et de la fonction de reproduction**. Enfin, la **co-expression de différents récepteurs** par les neurones à kp suggère une **régulation** importante de ces neurones **par les stéroïdes sexuels** par exemple mais aussi par **d'autres facteurs hypothalamiques** comme la prolactine ou périphérique comme la leptine (Figure 7: Schéma bilan). Les régulations de kp feront l'objet des deux dernières parties de cette introduction.



**Figure 8: Schéma du cycle estrien chez la rate.** ProE2 : proestrus ; E2 : œstrus ; DiE2 : dioestrus.

## **IV. Variations et régulations de kisspeptine à l'âge adulte**

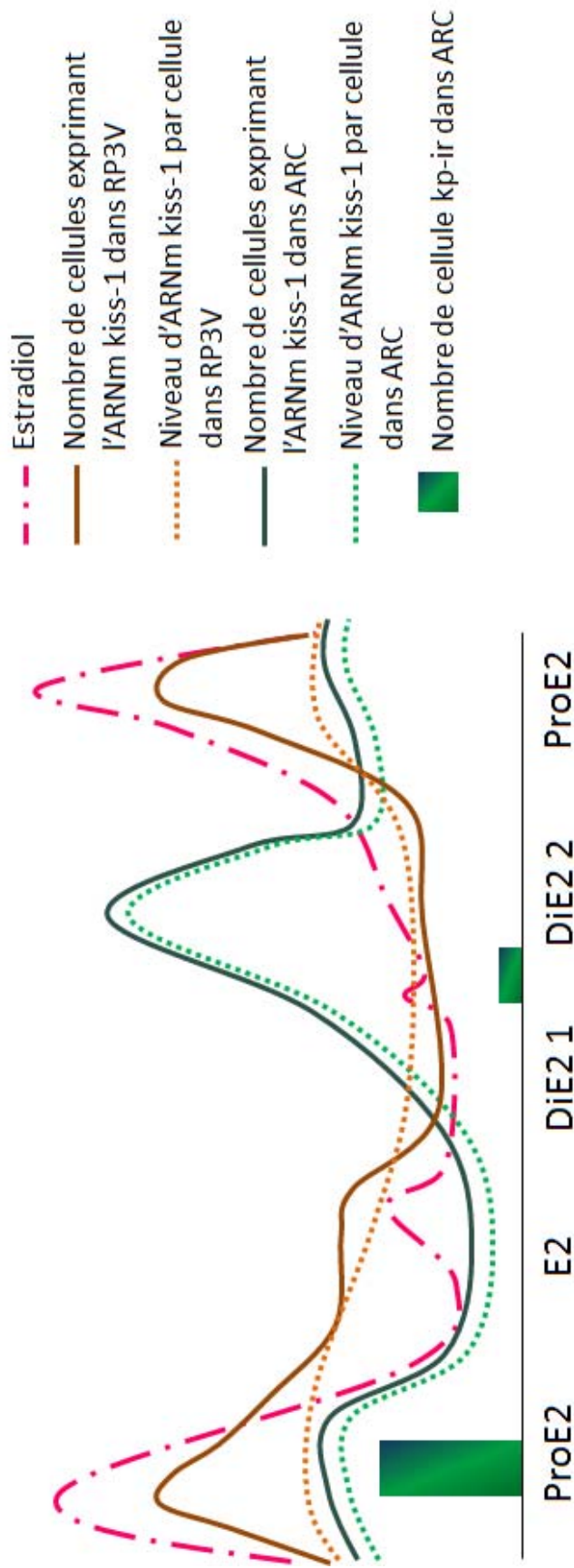
Dans cette troisième partie de l'introduction, après un rappel sur les différentes phases du cycle estrien chez la femelle, nous décrirons les variations de l'expression de *Kiss1* mais également du peptide ayant été observées au cours des différentes phases du cycle sexuel chez la femelle. Enfin, nous présenterons l'état des connaissances actuelles sur la régulation de kp par les stéroïdes sexuels ainsi que par d'autres facteurs chez l'adulte.

### **IV.1. Variations de l'expression de kiss-1 et de kisspeptine au cours des différentes phases du cycle**

#### ***IV.1.a. Rappel sur les différentes phases du cycle estrien chez la femelle (Figure 8)***

Le cycle estrien correspond à une succession de différentes phases pendant lesquelles les différents niveaux de l'axe HHG vont subir des changements afin d'engager la maturation du gamète femelle et conduire à son ovulation en vue d'une fécondation (Thibault & Levasseur, 2001). La production des gamètes femelles a commencé au cours du développement embryonnaire et périnatal créant ainsi une réserve de follicules immatures contenant chacun un ovocyte. A l'âge adulte, la femelle adulte possède donc un stock de follicules immatures. Une cohorte de follicules contenant chacun un ovocyte immature va être recruté en début de cycle. Puis l'augmentation des niveaux de LH au cours de la phase folliculaire/pré-ovulatoire va permettre la maturation de ces follicules et de leurs ovocytes. Enfin, un de ces follicules (pour les espèces mono-ovulantes (vache, jument) ou plusieurs pour les espèces multi-ovulantes (brebis, souris, rats...)) sera sélectionné, arrivera à maturation complète et son ovocyte sera libéré, c'est l'ovulation. Ensuite, le follicule sans son ovocyte devient alors un corps jaune, c'est la phase lutéale. Cette phase se terminera par la régression du corps jaune s'il n'y a pas eu fécondation et début de gestation. Ces différentes phases : la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale sont communes à toutes les espèces mammaliennes mais vont avoir une durée différente en fonction de l'espèce. Elles sont associées à de nombreux changements de sécrétion de GnRH qui entraînent des modifications des niveaux plasmatiques de LH et de FSH mais également des variations de concentrations sanguines de stéroïdes sexuels produit par les cellules folliculaires au cours de leur maturation. Par exemple chez la brebis, un peu avant l'ovulation, le patron de sécrétion de





**Figure 9: Schéma représentatif des variations de l'ARN messager kiss-1 et du kisspeptine au cours du cycle œstrien chez la rate.** (Adapté de Smith et al, 2006 pour l'ARNm et de Kinoshita et al, 2005 pour le peptide). ProE2 : proœstrus ; E2 : œstrus ; DiE2 : dioœstrus.

GnRH est modifié, l'amplitude et la fréquence des pulses de GnRH augmentent induisant le pic pré-ovulatoire de LH qui conduira à l'ovulation. Chez la rate, le cycle estrien dure de 4 à 5 jours et se décompose en une phase folliculaire/pré-ovulatoire de 3 jours et une phase lutéale de 1 à 2 jours. Le cycle estrien chez la rate est souvent déterminé par différentes périodes : proestrus, œstrus, dioestrus 1 et dioestrus 2 qui sont différenciables par l'aspect des cellules vaginales après frottis et coloration. La phase folliculaire/pré-ovulatoire de 3 jours comprend les deux périodes de dioestrus et la période de proestrus. C'est au cours de cette dernière que va avoir lieu l'ovulation souvent en fin de matinée ou début d'après-midi du proestrus chez la rate. Puis, la phase lutéale va correspondre à la fin de la période de proestrus et à l'œstrus voir début de dioestrus 1 lors d'un cycle de 5 jours. Au cours de ces différentes phases les niveaux de stéroïdes sexuels : œstradiol et progestérone vont fluctuer.

#### ***IV.1.b. Variations de l'expression de *Kiss1* au cours du cycle (Figure 9)***

Chez la rate, une première étude compare les niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* au cours des différentes phases du cycle estrien (Navarro *et al.*, 2004a). Le niveau d'ARNm *Kiss1* est plus élevé en proestrus qu'en œstrus. De plus, les niveaux observés en dioestrus 1 sont significativement plus élevés que ceux de tous les autres stades (Navarro *et al.*, 2004a). Ces résultats suggèrent alors pour la première fois une régulation de l'expression du *Kiss1* au cours des différents stades du cycle estrien donc possiblement par les hormones gonadiques tels que les stéroïdes sexuels dont les concentrations plasmatiques fluctuent également au cours du cycle. Malheureusement, cette étude ne différencie pas les deux populations de neurones à kp. Des études vont alors analyser les niveaux d'ARNm *Kiss1* soit par RT-PCR en discriminant les deux populations antérieures et postérieures des neurones à kp soit par HIS (Kinoshita *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007).

Dans le RP3V, le nombre de cellules *Kiss1* augmente en période de proestrus jusqu'à atteindre leur maximum dans l'après-midi du proestrus. Les niveaux d'expression de *Kiss1* diminuent ensuite jusqu'à atteindre leur minimum en période de dioestrus 1 et la ré-augmentation est initiée en période de dioestrus 2 (Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007). Si on compare les variations du nombre de cellules *Kiss1* dans cette région avec les fluctuations de concentrations plasmatiques d'œstradiol, on observe alors que les niveaux d'ARNm *Kiss1* sont élevés lorsque les niveaux plasmatiques d'œstradiol sont également élevés et inversement suggérant une régulation positive de l'œstradiol sur l'expression de *Kiss1* dans les neurones à kp du RP3V.

Dans l'ARC, les niveaux d'ARNm *Kiss1* sont bas en œstrus et augmentent pour atteindre leurs maximums en dioestrus (Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007). Ces résultats corrélés aux niveaux plasmatiques d'œstradiol suggèrent une régulation négative de l'expression de *Kiss1* dans les neurones à kp de l'ARC par l'œstradiol.

Chez la brebis, dans l'APO, une augmentation du nombre de cellules *Kiss1* est détectée en phase folliculaire tardive (Smith *et al.*, 2009a).

Dans l'ARC, une augmentation non significative du nombre de cellules *Kiss1* est observée en phase folliculaire tardive (Estrada *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que l'ARC est analysé en trois parties distinctes rostrale, médiane et caudale : le nombre de cellules *Kiss1* et la quantité d'ARNm *Kiss1* par cellules sont significativement plus élevés en phase folliculaire tardive dans l'ARC caudal (Estrada *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009a). Ces résultats chez la brebis suggèrent que les neurones à kp de l'ARC pourraient être régulé différemment et donc avoir un rôle différent en fonction de leur position rostro-caudale dans cette région. Ces résultats suggèrent une régulation positive en période pré-ovulatoire par les stéroïdes sexuels de la population de neurones à kp de l'ARC chez la brebis qui n'est pas observée dans l'ARC chez la rate.

Chez la guenon, aucune variation du nombre de cellules *Kiss1* quel que soit le stade du cycle ou la population de neurones à kp n'a été détecté (Smith *et al.*, 2010). En revanche, les auteurs observent une augmentation des niveaux d'ARNm de *Kiss1* par cellules dans l'APO et dans l'ARC caudal en phase folliculaire tardive (Smith *et al.*, 2010). Ainsi, chez la guenon, l'expression de *Kiss1* est régulée positivement dans les deux populations de neurones à kp en fin de phase de folliculaire c'est-à-dire en période pré-ovulatoire.

#### ***IV.1.c. Variations de kisspeptine au cours du cycle (Figure 9)***

Bien que les niveaux de peptides soient difficilement quantifiables par immunohistochimie, une semi-quantification est tout de même possible par le comptage du nombre de cellules et/ou de la densité des fibres immunoréactives.

Pour les corps cellulaires kp-ir: des études chez des espèces différentes quantifient le nombre de cellules kp-ir en fonction des différentes périodes du cycle estrien.

Chez la rate, dans l'ARC, le nombre de cellules kp-ir est significativement plus élevé en période de proestrus qu'en dioestrus (Kinoshita *et al.*, 2005). Ainsi, le nombre de cellules kp-ir est inversement corrélé au nombre de cellules *Kiss1* (Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent l'existence de modifications post-transcriptionnelles en fonction du stade du cycle estrien chez la rate. La régulation de ces modifications post-transcriptionnelles par les stéroïdes sexuels reste encore à déterminer.

Chez la souris, dans le RP3V, aucune différence significative du nombre de cellules kp-ir n'est observée en fonction du stade du cycle quelle que soit la position rostro-caudale des cellules au sein du RP3V (Clarkson & Herbison, 2011).

Chez la brebis, une tendance à l'augmentation du nombre de cellules kp-ir est observée en phase folliculaire tardive quelle que soit la position rostro-caudale dans l'hypothalamus des neurones à kp comme pour l'ARNm *Kiss1* (Smith *et al.*, 2009a). Dans l'ARC caudal, cette augmentation du nombre de cellules kp-ir en phase folliculaire tardive comparée à la phase lutéale est significative. Ainsi, chez la brebis, il semble que la quantité de cellules *Kiss1* ainsi que le nombre de cellules kp-ir suivent le même patron de variations au cours des différentes phases du cycle. Une étude récente ne détecte quant à elle aucun effet des différentes périodes du cycle sur le nombre de cellules kp-ir chez la brebis (Hoffman *et al.*, 2011).

Pour les fibres kp-ir: une étude a mesuré la quantité d'apposition kp-ir sur les neurones à GnRH en saison de reproduction comparée à la saison d'anoestrus chez la brebis (Smith *et al.*, 2008a). Le nombre de neurones à GnRH possédant des afférences kp ainsi que le nombre de fibres kp-ir à proximité des neurones à GnRH sont significativement plus élevés en période de reproduction essentiellement dans le MBH (Smith *et al.*, 2008a).

*Pour conclure sur les variations au cours du cycle*, l'ARN messager *Kiss1* et le kp subissent des variations au cours des différents stades du cycle. De plus, ces variations diffèrent en fonction de la position rostro-caudale des neurones à kp dans l'hypothalamus et également en fonction de l'espèce étudiée. Pour les rongeurs, la concentration plasmatique d'œstradiol fluctuant au cours des différentes périodes du cycle estrien, il est tentant de comparer les niveaux d'ARN messager *Kiss1* et de kp avec les niveaux d'œstradiol en fonction des stades du cycle. Cette comparaison suggère alors une régulation positive de

l'œstradiol sur l'expression de *Kiss1* et de kp dans le RP3V et une régulation plutôt négative de l'œstradiol sur l'expression de *Kiss1* et de kp dans l'ARC. Bien entendu l'œstradiol n'étant pas le seul stéroïde sexuel fluctuant au cours de ces différentes phases du cycle, la progestérone varie également, seule des études de retrait et d'ajout des stéroïdes sexuels permettront de mieux comprendre les régulations de l'expression de *Kiss1* et de kp dans les deux populations de neurones à kp par les stéroïdes sexuels.

## **IV.2. Régulations de l'expression de kiss-1 et de kisspeptine par les stéroïdes sexuels à l'âge adulte**

### ***IV.2.a. Régulations de l'expression de Kiss1 par les stéroïdes sexuels à l'âge adulte***

Chez le rat, des hauts niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* sont détectés en absence de gonades. L'ajout d'un implant d'œstradiol chez la femelle ou de testostérone chez le mâle provoque une diminution des niveaux d'ARNm *Kiss1* dans l'hypothalamus entier (Navarro *et al.*, 2004a). Les auteurs observent également que chez la femelle les niveaux d'ARNm *Kiss1* obtenus après injections sous cutanées (s.c) chronique, deux semaines après ovariectomie, d'œstradiol benzoate, un analogue de l'œstradiol, sont identiques à ceux obtenus après injections s.c. chronique d'un agoniste de ER $\alpha$  contrairement à l'injection s.c. chronique d'un agoniste de Er $\beta$  (Navarro *et al.*, 2004a). Cette étude démontre alors une régulation des niveaux d'expression de *Kiss1* par l'œstradiol et suggère une action négative de l'œstradiol sur l'expression de *Kiss1* qui passerait par ER $\alpha$  chez le rat (Navarro *et al.*, 2004a). Malheureusement, cette étude étant réalisée sur des hypothalami entier ne permet pas de discriminer quelle population de neurones à kp, RP3V ou ARC, est régulée par les stéroïdes sexuels. Chez la rate, d'autres études par RT-PCR et par HIS, ciblant chacune des deux populations de neurones à kp, suggèrent une régulation positive de l'expression de *Kiss1* dans le RP3V uniquement chez la femelle et négative dans l'ARC chez les deux sexes (Kinoshita *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007; Homma *et al.*, 2009). Chez la femelle, un autre stéroïde sexuel est également sécrété et varie au cours du cycle estrien : la progestérone (Figure 8). Une étude récente a montré par RT-PCR sur hypothalami entier de rate que la pose d'un implant de progestérone suite à une ovariectomie n'avait aucun effet sur les niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* (Roa *et al.*, 2008).

Chez la souris, dans le RP3V, l'œstradiol et la testostérone vont avoir un effet stimulateur sur l'expression de *Kiss1* chez la femelle et le mâle, respectivement (Smith *et al.*, 2005a).

Dans l'ARC, l'œstradiol et la testostérone vont avoir un effet inhibiteur sur l'expression de *Kiss1* (Smith *et al.*, 2005b). Chez le mâle, les auteurs montrent également que la testostérone agit sur les neurones à kp après aromatisation en œstradiol (Smith *et al.*, 2005b). En effet, l'ajout de DHT (di-hydro-testostérone) par implant s.c., un analogue non aromatisable de la testostérone, ne permet pas d'induire ni une stimulation ni une inhibition de l'expression de *Kiss1* dans le RP3V et dans l'ARC respectivement contrairement à l'ajout d'œstradiol (Smith *et al.*, 2005b). Smith et ses collaborateurs utilisent aussi des souris transgéniques déficientes pour ER $\alpha$  et AR (récepteur aux androgènes) afin de déterminer par quels récepteurs le signal stéroïdogène régule l'expression de *Kiss1* (Smith *et al.*, 2005a; Smith *et al.*, 2005b). Ils démontrent ainsi que l'action de l'œstradiol chez la femelle passe par l'ER $\alpha$  pour les deux populations de neurones à kp et que l'action de la testostérone passe par l'AR ainsi que par aromatisation de la testostérone en œstradiol qui stimule ensuite l'ER $\alpha$ .

Chez la brebis, dans l'APO, en saison d'œstrus c'est-à-dire de reproduction aucun effet de l'ovariectomie ni de l'administration chronique d'œstradiol par implant s.c. n'est observé sur le nombre de cellules *Kiss1* deux semaines après le traitement (Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009a). En revanche, en saison d'anoestrus c'est-à-dire de repos sexuel, une augmentation du nombre de cellules exprimant le *Kiss1* dans l'APO est détectée après administration chronique d'œstradiol via un implant s.c. sur des brebis ovariectomisées (Smith *et al.*, 2007).

Dans l'ARC, une diminution du nombre de cellule *Kiss1* quelle que soit la saison de reproduction est observée uniquement dans l'ARC médian et caudal deux semaines après ovariectomie et pose d'un implant d'œstradiol (Smith *et al.*, 2007). L'injection unique en i.v. d'œstradiol à une dose mimant celle d'un feedback positive sur des brebis ovariectomisées deux semaines auparavant entraîne une augmentation du nombre de cellules *Kiss1* de l'ARC médian et postérieur (Smith *et al.*, 2009a). Ainsi ces résultats suggèrent que chez la brebis l'expression de *Kiss1* des neurones à kp de l'APO ne serait pas régulée par l'œstradiol mais qu'en revanche contrairement aux rongeurs l'expression de *Kiss1* des neurones à kp de l'ARC serait régulée négativement et positivement par l'œstradiol de manière dose dépendante.

Chez la truie, une étude par HIS a montré que, comme chez les rongeurs, l'expression de *Kiss1* est régulée positivement et négativement par l'œstradiol dans les neurones à kp du RP3V et ceux de l'ARC, respectivement (Tomikawa *et al.*, 2009).

Chez le singe, une étude sur des mâles castrés montre que l'ajout d'un implant de testostérone diminue les niveaux d'ARNm *Kiss1* dans l'ARC mais n'a aucun effet dans l'APO (Shibata *et al.*, 2007). Ainsi, l'expression de *Kiss1* dans les neurones de l'APO n'est pas régulée par la testostérone mais en revanche l'expression de *Kiss1* dans les neurones à kp de l'ARC est régulée négativement par la testostérone.

#### ***IV.2.b. Régulation de kisspeptine par les stéroïdes sexuels à l'âge adulte***

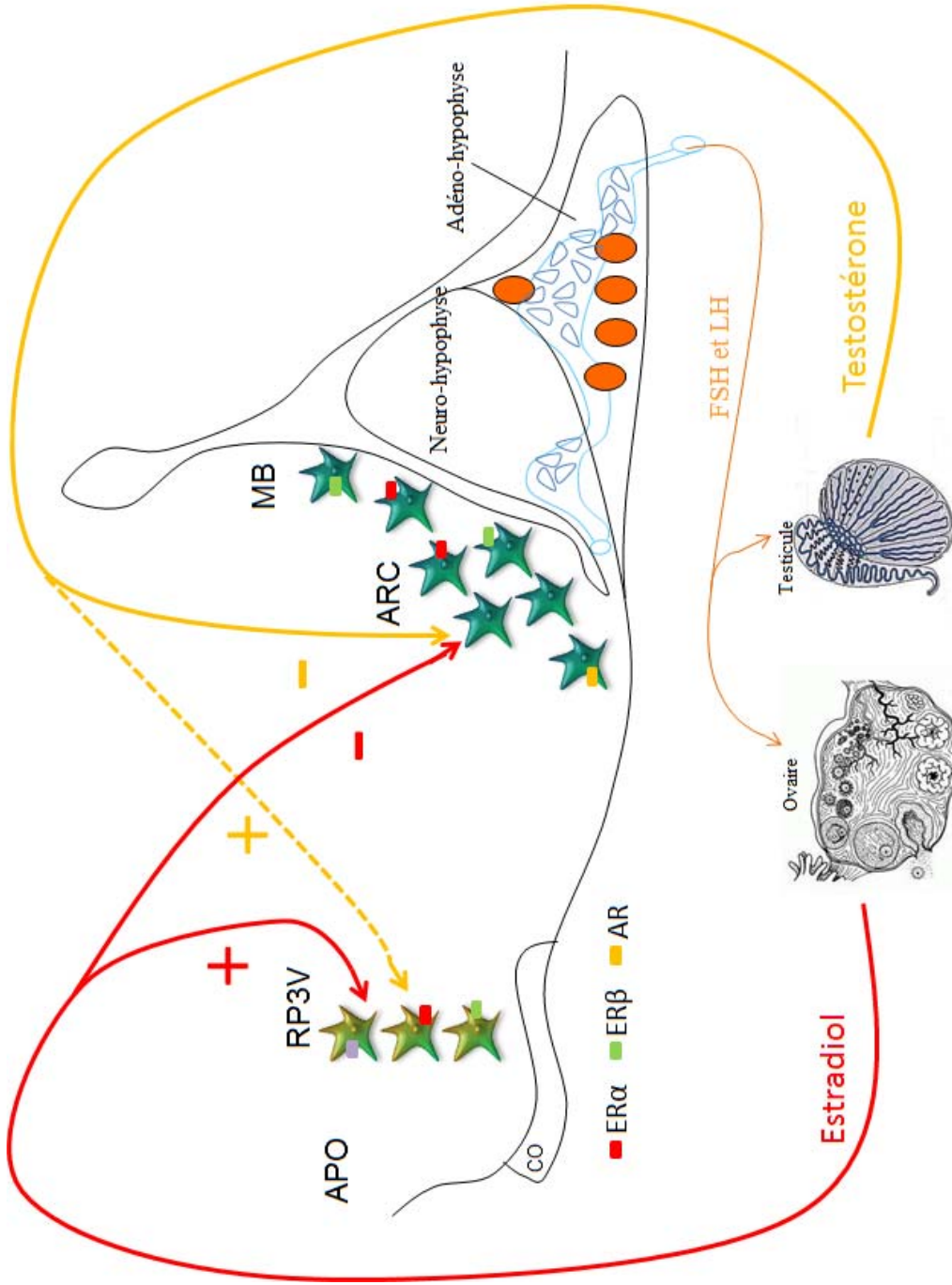
Quelques études ont quantifié le nombre de cellule kp-ir après gonadectomie avec ou sans remplacement d'œstradiol ou de testostérone.

Chez le rat, après traitement à la colchicine, des cellules kp-ir sont détectées dans le RP3V et dans l'ARC aussi bien chez le mâle que chez la femelle (Adachi *et al.*, 2007). L'analyse qualitative du patron d'immunoréactivité kisspeptine suggère que le nombre de cellules kp-ir varie après gonadectomie suivie ou non de la pose d'un implant d'œstradiol ou de testostérone (Adachi *et al.*, 2007).

Dans le RP3V, une augmentation du nombre de cellules kp-ir est suggérée (étude non quantitative) chez la femelle suite à un traitement chronique à l'œstradiol comparé aux femelles ovariectomisées (Adachi *et al.*, 2007). Chez le mâle, il semble n'y avoir aucun effet d'une supplémentation chronique de testostérone dans cette région sur l'ir kp (Adachi *et al.*, 2007).

Dans l'ARC, l'analyse qualitative suggère que le nombre de cellules kp-ir diminue suite à un traitement chronique à l'œstradiol pour la femelle ou à la testostérone pour les mâles (Adachi *et al.*, 2007). Ainsi, malgré l'absence de quantification du nombre de cellules kp-ir et le blocage du transport de kp par la colchicine, les auteurs suggèrent que les niveaux de kp suivent le même patron que les niveaux d'ARN messenger en fonction du statut stéroïdogénique et donc que les stéroïdes sexuels réguleraient uniquement la transcription du gène *Kiss1*.

Chez la souris, dans le RP3V, dans une première étude, aucun effet du retrait des hormones gonadiques par ovariectomie ni de l'ajout d'implant d'œstradiol après ovariectomie



**Figure 10: Schéma bilan des régulations des neurones à kisspeptine par les stéroïdes sexuels chez les rongeurs à l'âge adulte.** La flèche en trait pointillé signifie que la régulation par la testostérone des neurones du RP3V pourrait passer par l'aromatisation de la testostérone en estrogène et agir via les ERs.



n'est observé sur le nombre de cellules kp-ir quelle que soit la partie rostro-caudale du RP3V (Clarkson *et al.*, 2008). Depuis, deux autres études ont montré une diminution du nombre de cellules kp-ir après ovariectomie et une augmentation du nombre de cellules kp-ir après l'ajout d'un implant d'œstradiol dans cette région (Gill *et al.*, 2010; Vida *et al.*, 2010). Ces résultats apparemment contradictoires pourraient être dus à une différence dans la quantité d'œstradiol délivrée par les implants selon l'étude et ne nous permettent donc pas de conclure sur les effets de l'œstradiol sur l'immunoréactivité kp.

Dans l'ARC, malgré l'absence de quantification, une diminution de la densité de fibres kp-ir est suggérée en absence d'œstradiol suite à une ovariectomie (Gill *et al.*, 2010).

*Chez le hamster orchidectomisé, dans le RP3V*, une régulation positive de la testostérone est détectée sur le nombre de cellules kp-ir tandis qu'aucun effet n'est observé dans l'ARC (Greives *et al.*, 2008).

*Chez la brebis, dans l'APO*, il est intéressant de noter que contrairement aux niveaux d'ARNm *Kiss1* qui ne semblaient pas être régulés par l'œstradiol, le nombre de cellules kp-ir augmente suite à la pose d'un implant d'œstradiol sur des brebis ovariectomisées (Smith *et al.*, 2008a).

Dans l'ARC médian et caudal, comme pour le nombre de cellules *Kiss1*, le nombre de cellules kp-ir augmente suite à la pose d'un implant d'œstradiol sur des brebis ovariectomisées (Smith *et al.*, 2008a).

*Pour conclure sur la régulation par les stéroïdes sexuels de l'expression de Kiss1 et de kp*, celle-ci est différente selon les régions et l'espèce étudiée. Chez les rongeurs, les études montrent une régulation positive de l'expression de *Kiss1* et de kp dans les neurones à kp du RP3V et une régulation plutôt négative de l'expression de *Kiss1* et de kp dans les neurones à kp de l'ARC par l'œstradiol et la testostérone (Figure 10). Chez la brebis, l'expression de *Kiss1* n'est pas régulée par l'œstradiol dans l'APO. En revanche, le nombre de cellules kp-ir est régulé positivement suggérant une régulation de type post-transcriptionnelle dans cette région pour cette espèce. De plus, chez cette espèce, l'expression de *Kiss1* et de kp ne semble pas être régulée dans l'ARC antérieur par l'œstradiol mais serait régulée de manière dose-dépendante dans l'ARC caudal suggérant l'existence d'une hétérogénéité des neurones à kp de l'ARC.

### **IV.3. Régulations de l'expression de kiss-1 et de kisspeptine par d'autres facteurs à l'âge adulte**

Il est maintenant bien admis que certains facteurs environnementaux tels que la photopériode pour les espèces saisonnées, l'état nutritionnel et le stress peuvent induire des dysfonctionnements de la fonction de reproduction. De nombreuses études ont donc été entreprises pour déterminer si ces différents facteurs environnementaux pouvaient être de potentiels régulateurs du système kp/*Kiss1r*.

#### ***IV.3.a. Régulations de l'expression de Kiss1 et de kisspeptine par la balance énergétique à l'âge adulte***

Dès les premières études sur le système kp/*Kiss1r*, des scientifiques se sont intéressés à un rôle potentiel de kp dans la relation entre balance énergétique et fonction de reproduction.

*La leptine* est l'hormone de la satiété, qui informe le système nerveux central du statut énergétique de l'organisme, plus précisément de l'état de la réserve en adipocyte de l'organisme (Henson & Castracane, 2003). L'utilisation de souris déficientes pour la leptine, souris ob/ob, a permis de montrer son importance dans la fonction de reproduction puisque ces souris se sont avérées être infertiles (Henson & Castracane, 2003). L'étude de Smith et ses collaborateurs en 2006 montre, en plus de la présence de l'isoforme b du récepteur à la leptine (LepRb) dans les cellules *Kiss1* de l'ARC, que le nombre de cellules *Kiss1* est diminué chez des souris déficientes pour la leptine (souris ob/ob) comparé aux souris sauvages (Smith *et al.*, 2006a). De plus, l'injection i.p. de leptine à ces souris déficiente pour la leptine augmente les niveaux d'ARNm *Kiss1* par cellule mais pas suffisamment pour restaurer les niveaux d'ARNm *Kiss1* observés chez les sauvages (Smith *et al.*, 2006a). Cette étude démontre pour la première fois une régulation du gène *Kiss1* par le statut énergétique de l'animal via la leptine. Deux études sur des rats mâles et femelles traités à la streptozotocine (STZ) afin d'induire un diabète caractérisé par une hyperglycémie et une hypoleptinémie montrent une diminution des niveaux d'ARNm *Kiss1* au sein de l'hypothalamus entier (Castellano *et al.*, 2006c; Castellano *et al.*, 2009). Chez les mâles, une injection de leptine permet d'augmenter les niveaux d'ARNm *Kiss1* et même de les restaurer (Castellano *et al.*, 2006c). Chez le hamster, une diminution de l'expression de *Kiss1* dans l'ARC suite à une restriction alimentaire est également détectée (Paul *et al.*, 2009). Récemment, une étude sur des souris

ob/ob mâle confirme la diminution de l'expression de *Kiss1* dans l'ARC (Quennell *et al.*, 2011). Cette étude montre également qu'à défaut de différence significative dans l'expression de *Kiss1* par les neurones à kisspeptine du RP3V, c'est le nombre de cellules kp-ir qui est diminué chez les souris ob/ob dans le RP3V suggérant ainsi une régulation positive par la leptine de type transcriptionnelle dans les neurones à kp de l'ARC et post-transcriptionnelle dans les neurones à kp du RP3V (Quennell *et al.*, 2011). Des études récentes chez la souris, le rat et la brebis soumis à des régimes pauvres en graisse ou à des restrictions alimentaires démontrent également que les deux populations de neurones à kp sont régulées par le statut énergétique de l'individu via la leptine (Backholer *et al.*, 2008; Kalamatianos *et al.*, 2008; Quennell *et al.*, 2011).

*La ghreline*, qui contrairement à la leptine est une hormone orexigène (stimulant la prise alimentaire), a récemment été montrée pour son rôle dans la régulation de la fonction de reproduction (voir pour revue (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2006)). Un rôle inhibiteur de la ghreline a été observé sur l'expression de *Kiss1* dans le RP3V chez des rates (Forbes *et al.*, 2009).

#### ***IV.3.b. Régulation de Kiss1 et de kisspeptine par la photopériode à l'âge adulte***

Les neurones à kp ont également beaucoup intéressé tous les scientifiques travaillant sur des espèces dont la reproduction est dite saisonnée comme la brebis et le hamster, par exemple. Cela signifie que ces animaux ont une période d'activité sexuelle limitée au cours de l'année. Cette période d'activité de la fonction de reproduction sera différente en fonction des espèces et est contrôlée par la photopériode correspondant au rapport entre la durée du jour et de la nuit. Les animaux saisonnés vont donc avoir une sécrétion de GnRH qui va subir différents changements en fonction de la période de l'année selon qu'ils seront en période d'activité sexuelle ou de veille (Thibault & Levasseur, 2001). A la suite de la découverte du rôle de kp comme stimulateur de la fonction de reproduction en amont des neurones à GnRH, il semblait intéressant de déterminer si les neurones à kp étaient régulés différemment en fonction de la photopériode.

*Chez le hamster syrien et le hamster sibérien*, qui sont des animaux dont les fonctions de reproduction sont également saisonnées et qui se reproduisent en jours longs, une régulation des neurones à kp en fonction de la durée du jour a été observée (Revel *et al.*, 2006; Greives *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2007; Greives *et al.*, 2008). Dans le RP3V, pour le

hamster syrien et le hamster sibérien, un plus grand nombre de corps cellulaires kp-ir est détecté en période de jours longs, (c'est-à-dire en période de reproduction) (Greives *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2007; Greives *et al.*, 2008). Dans l'ARC, chez le hamster syrien, les niveaux d'ARNm *Kiss1* et le nombre de cellules kp-ir dans l'ARC sont plus élevés en période de jours longs correspondant à la période d'activité sexuelle (Revel *et al.*, 2006). Au contraire, chez le hamster sibérien, un plus grand nombre de cellules kp-ir est quantifié en période de jours courts, période d'inactivité sexuelle (Greives *et al.*, 2007; Mason *et al.*, 2007; Greives *et al.*, 2008). Ces résultats différents pourraient être dus à une différence entre le hamster syrien et le sibérien. Une de ces études montre que ce n'est pas les changements en taux circulant de testostérone qui provoque ces différences d'ir kp en fonction des saisons puisque des hamsters sibériens orchidectomisés présentent également ces changements d'expression de *Kiss1* et de kp en fonction de la saison (Greives *et al.*, 2008).

*Chez la brebis*, seuls les neurones à kp de l'ARC présentent des niveaux variables d'expression de *Kiss1* et de kp-ir en fonction des saisons de reproduction. Le nombre de cellules *Kiss1* et kp-ir est plus élevé en période d'activité sexuelle (œstrus) qu'en période de repos sexuel (anoestrus) (Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009b). De plus, une étude récente a montré que l'unique modulation de la photopériode était suffisante pour influencer le nombre de cellules kp-ir chez la brebis (Chalivoix *et al.*, 2010).

Toutes ces études ne permettent pas de déterminer le facteur intervenant dans cette régulation. La mélatonine qui est l'hormone indicatrice de la photopériode au sein du système nerveux central pourrait être une bonne candidate. D'autant que la première étude chez le hamster montrait que la pinéalectomie prévenait l'effet réducteur de la photopériode sur l'expression de *Kiss1* en période d'inactivité sexuelle (Revel *et al.*, 2006). Une étude récente montre l'absence du récepteur à la mélatonine au sein des neurones à kp de l'ARC chez la brebis (Li *et al.*, 2011) suggérant un effet indirect de la mélatonine dans la régulation des neurones à kp par la photopériode.

#### ***IV.3.c. Régulations de l'expression de Kiss1 et de kisspeptine par le stress à l'âge adulte***

Une étude chez la rate adulte s'est intéressée à la régulation des neurones à kp par induction de différents stress psychologiques, métaboliques et immunologiques (Kinsey-Jones *et al.*, 2009). L'expression de *Kiss1* est inhibée au sein de l'ARC quel que soit le type de

stress (Kinsey-Jones *et al.*, 2009). En revanche, dans le RP3V, le stress métabolique n'a aucun effet tandis que les stress psychologiques et immunologiques induisent une inhibition de l'expression de *Kiss1* (Kinsey-Jones *et al.*, 2009). Cette étude va plus loin en déterminant que la régulation de kp par ces stress passe par le neuropeptide principal de l'axe du stress le CRF (Corticotrophin-releasing-factor) et par l'hormone hypophysaire sécrétée suite à un stress le cortisol (Kinsey-Jones *et al.*, 2009).

**En résumé de cette quatrième partie d'introduction**, les neurones à kp sont sujets à des **variations de leur niveau d'expression de kiss-1** mais également **des niveaux de kp** au cours des **différentes phases du cycle** chez la femelle adulte. Des variations de l'expression de *Kiss1* et de kisspeptine ont été montrées comme étant **régulées par les deux hormones sexuelles mâle et femelle** : la testostérone et l'œstradiol, respectivement. De plus, de **nombreux facteurs** semblent également réguler les neurones à kp chez l'adulte suggérant que ces neurones pourraient être **des centres intégrateurs des signaux environnementaux** permettant ou non la stimulation de la fonction de reproduction.

## **V. Variations et régulations de kisspeptine au cours du développement**

Dans cette dernière partie de l'introduction, après un rappel sur les différentes périodes de développement de l'axe HHG, nous nous intéresserons premièrement aux données existantes sur les variations de l'expression de *Kiss1* et du kp observées au cours des différentes phases du développement embryonnaire et post-natal. Deuxièmement, nous établirons l'état des connaissances sur la régulation du kp par les facteurs connus pour réguler ce système chez l'adulte.

Suite à la découverte en 2003 du rôle majeur du système kisspeptine/*Kiss1r* dans la mise en place de la puberté, l'étude des variations et des régulations développementales de l'ARNm *Kiss1* et de l'ir kp est devenu un domaine très compétitif. La majorité des résultats ont été publiés dans ce domaine au cours de ma thèse (25 études sur 36).

### **V.1. Variations développementales de l'ARN messenger kiss-1 et du kisspeptine**

#### ***V.1.a. Rappel sur le développement de l'axe HHG (Tableau 5)***

Au cours du développement, les différents acteurs de l'axe HHG vont se développer et mûrir afin d'atteindre leurs fonctions adulte. Dans ce premier paragraphe, nous rappellerons les différentes étapes de l'ontogenèse et de la maturation des trois acteurs principaux de cette axe : l'acteur hypothalamique principal les neurones à GnRH, l'adénohypophyse à travers l'évolution des concentrations plasmatiques des hormones gonadotropes LH et FSH ainsi que les gonades plus particulièrement les niveaux de stéroïdes sexuels. La majorité des données présentées ici proviennent des études effectuées chez le rat qui est notre modèle d'étude (voir pour revue (Ojeda *et al.*, 1980; Ojeda & Urbanski, 1988). En raison de l'impossibilité d'étudier directement la sécrétion du GnRH chez le rat, pour les données de sécrétion de GnRH au cours du développement nous utiliserons comme exemple le primate chez qui elles sont très bien décrites (Terasawa & Fernandez, 2001).

*En période embryonnaire*, les premiers corps cellulaires à GnRH sont observés dans l'APO à 17 jours de gestation (E17) (Ugrumov *et al.*, 1985)(voir pour revue (Daikoku & Koide, 1998)). A E20.5, une grande densité d'axones GnRH est observée dans la zone externe de l'éminence médiane au contact des vaisseaux porte hypothalamo-hypophysaire (Ugrumov

	Embryonnaire		Néonatale		Infantile	Juvenile	Pubertaire	Adulte
	E0	E22/PND0	PND07	PND21	PND35	PND45-50		
<b>Hypothalamus GnRH</b>	- E17: cellules GnRH-ir dans APO - E20: premiers axone GnRH-ir dans EM - E18 à E21: augmentation GnRH dans extrait de cerveau et plasma	- Augmentation nombre d'axone GnRH-ir dans EM - Augmentation GnRH dans extrait de cerveau et plasma	- Mise en place du feedback négatif de l'E2	- Mise en place du feedback positif de l'E2				
<b>Adéno-hypophyse LH et FSH</b>	- E17: cellules LH et FSH ir - Hypophyse immature - Système porte hypothalamo-hypophysaire immature	- LH et FSH élevé - Hypophyse mature - Système porte hypothalamo-hypophysaire mature	- LH et FSH chute	- LH chute en début de période et augmente en fin de période - FSH reste basse - FSH augmente			- 1 <sup>er</sup> pic préovulatoire de LH - 1 <sup>er</sup> estrus = mise en place fonction lutéinisante	
<b>Gonades Stéroïdes sexuels</b>	- Estradiol produite peu avant la naissance - pic périnatale de testostérone	- LH-R et FSH-R - Estradiol et testostérone 2x supérieurs à l'adulte	- Estradiol augmente et plus élevé qu'en période néonatale - Testostérone ne varie pas	- Estradiol chute en début de période et augmente en fin de période - Testostérone reste basse			- 1 <sup>er</sup> estrus = mise en place fonction lutéinisante 1 <sup>er</sup> - Testostérone SPZ augmente	

**Tableau 5: Développement de l'axe HHG chez le rat.** En noir, changements communs aux deux sexes; en rose, changement spécifique à la femelle; en bleu, changement spécifique aux mâles.

*et al.*, 1985). Cette augmentation de densité d'axones GnRH est corrélée avec une augmentation du GnRH contenu dans des extraits de cerveaux ainsi que dans le plasma de rat entre E18 et E21 (Ugrumov *et al.*, 2005). Les hormones LH et FSH ont été détectées à E17 dans le sang fœtal alors que le système porte hypothalamus-hypophysaire et l'hypophyse ne sont pas encore matures (voir pour revue (Ojeda *et al.*, 1980)). Les gonades se développent au cours du développement embryonnaire et sont capables de produire des stéroïdes sexuels, œstradiol et testostérone, juste avant la naissance (voir pour revue (Ojeda *et al.*, 1980)).

*La période néonatale* correspond à la première semaine de vie post-natale. La pulsativité des neurones à GnRH étant difficile à étudier chez le rat, la majorité des auteurs utilisent les niveaux plasmatiques de LH pour prédire l'évolution de la sécrétion de GnRH au cours du développement. Les niveaux plasmatiques de LH et FSH sont élevés montrant ainsi la capacité de l'hypophyse à sécréter les hormones gonadotropes et suggérant une activité sécrétrice importante des neurones à GnRH (Dohler & Wuttke, 1974; Ojeda *et al.*, 1980). De plus, au cours de cette période, le nombre d'axones à GnRH continue d'augmenter au sein de la zone externe de l'éminence médiane et est corrélé à une augmentation de la quantité de GnRH dans le cerveau et le plasma de rat (Ugrumov *et al.*, 2005). Le système porte-hypothalamo-hypophysaire se développe et l'hypophyse devient mature (voir pour revue (Ojeda *et al.*, 1980)). Les gonades deviennent sensibles aux hormones gonadotropes en exprimant les récepteurs à la LH et la FSH. Les concentrations plasmatiques d'œstradiol et de testostérone sont plus élevées les deux premiers jours après la naissance puis diminuent mais restent tout de même deux fois supérieures à celles observées chez l'adulte (Dohler & Wuttke, 1974). La présence en grande quantité dans le sang au cours de cette première semaine de vie d'une protéine de liaison de l'œstradiol : l'alpha-fétoprotéine (AFP) rend impossible l'action de l'œstradiol sur l'hypothalamus (Greenstein, 1992).

*La période qui suit, dite infantile*, se déroule entre le jour de développement post-natal 7 (PND07) et PND21 (voir pour revue (Ojeda *et al.*, 1980)). Les niveaux plasmatiques de LH et de FSH chutent suggérant une inactivation de la sécrétion de GnRH au cours de cette période (Zapatero-Caballero *et al.*, 2003; Zapatero-Caballero *et al.*, 2004). Chez le primate, la mesure de la sécrétion de GnRH est possible et montre une inhibition de la sécrétion de GnRH caractérisé par une diminution de l'amplitude et de la fréquence des pulses au cours de la période juvénile correspondant chez les rongeurs à la période infantile (voir pour revue (Terasawa & Fernandez, 2001)). Chez la femelle et le mâle, les niveaux d'œstradiol vont être supérieurs à ceux observés en période néonatale (Dohler & Wuttke, 1974). Chez le mâle, la



concentration plasmatique de testostérone reste identique à celle observé en période néonatale (Dohler & Wuttke, 1974). La baisse des taux d'AFP dans le sang au cours de cette période (voir pour revue (Ojeda *et al.*, 1980; Ojeda & Urbanski, 1988)) permet à l'œstradiol d'accéder à l'hypothalamus ainsi le feedback négatif devient effectif (Ojeda *et al.*, 1975; Greenstein, 1992).

*La période juvénile* se déroule à partir de PND21 jusqu'à PND35 chez les femelles et PND45-50 pour les mâles. Chez la femelle, la concentration plasmatique de FSH reste basse au cours de cette période (Zapatero-Caballero *et al.*, 2004). Chez le mâle, la concentration plasmatique de FSH augmente progressivement tout au long de la période juvénile (Zapatero-Caballero *et al.*, 2003). En revanche, la concentration plasmatique de LH commence par diminuer puis augmente en fin de période chez les deux sexes (Zapatero-Caballero *et al.*, 2003; Zapatero-Caballero *et al.*, 2004). Chez la femelle, la concentration plasmatique d'œstradiol suit exactement le même patron (Zapatero-Caballero *et al.*, 2004). De plus, ces augmentations de LH et d'œstradiol sont corrélées à la mise en place du feedback positif de l'œstradiol sur l'hypothalamus (Andrews *et al.*, 1981). Le mécanisme de mise en place de ce feedback positif reste encore imprécis. Certains auteurs suggèrent l'existence d'un switch de la sensibilité à l'œstradiol du noyau arqué, c'est l'hypothèse du gonadostat (Ojeda & Urbanski, 1988). Chez le primate, la phase correspondant à la phase juvénile chez la rate est caractérisée par la réactivation de la sécrétion de GnRH avec une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des pulses (voir pour revue (Terasawa & Fernandez, 2001)). Chez le mâle, la testostérone reste basse (Zapatero-Caballero *et al.*, 2003). La fin de la phase juvénile et le début de la phase pubertaire sont caractérisés par l'ouverture vaginale chez la femelle et par l'apparition du premier spermatozoïde dans les tubes séminifères chez le mâle (Ojeda *et al.*, 1980).

*La phase pubertaire* correspond à la période où l'axe HHG va mûrir pour aboutir à un fonctionnement adulte. Chez la femelle, le premier pic pré-ovulatoire de LH est observé et la fonction lutéinisante est mise en place donnant le premier cycle estrien. Elle finira lorsque la rate réalisera des premiers cycles réguliers autour de PND60. Chez les mâles, la maturation des premiers spermatozoïdes est terminée et ils entament leur voyage vers les vases déférents (Ojeda *et al.*, 1980). De plus, le niveau plasmatique de testostérone augmente considérablement pour atteindre son maximum à l'âge adulte (Dohler & Wuttke, 1974; Zapatero-Caballero *et al.*, 2003). La frontière entre fin de période pubertaire et l'âge adulte est

Femelles			Néonatale		Infantile		Juvénile		Pubertaire		
			P0	P7	P7	P21	P21	P35	P35	P60	
RP3V	Cellules kiss-1	<i>Cao et al, 2011</i>	∅		↗		ND		ND		
		<i>Losa et al, 2010</i>	ND		↗		↗		ND		
		<i>Takase et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗	ND	
		<i>Takumi et al, 2010</i>	∅		↗		↗		↗		
	Cellules kp-ir	<i>Sun et al, 2007</i>	ND		ND		↗		↗		
		<i>Takase et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗		ND
ARC	Cellules kiss-1	<i>Cao et al, 2011</i>	↗		↘		ND		ND		
		<i>Losa et al, 2010</i>	ND		ND		↘		ND		
		<i>Takase et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗	ND	
		<i>Takumi et al, 2010</i>	↗		↘		↗		↗		
	Cellules kp-ir	<i>Losa et al, 2010</i>	ND		↗		ND		ND		ND
		<i>Sun et al, 2007</i>	ND		ND		↗		↗		
		<i>Takase et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗		ND

**Tableau 6: Variations développementales de l'expression de kiss-1 et de kp chez la rate.** ND: pas analysé

Mâles			Néonatale		Infantile		Juvénile		Pubertaire	
			P0	P7	P7	P21	P21	P45	P45	P60
RP3V	Cellules kiss-1	<i>Bensten et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗	
		<i>Cao et al, 2011</i>	∅		↗		ND		ND	
		<i>Losa et al, 2010</i>	ND		↗		↗		ND	
		<i>Takumi et al, 2010</i>	∅		↗		↗		↗	
	Cellules kp-ir		ND		ND		ND		ND	
ARC	Cellules kiss-1	<i>Bensten et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗	
		<i>Cao et al, 2011</i>	↗		↗		ND		ND	
		<i>Losa et al, 2010</i>	ND		ND		↘		ND	
		<i>Takumi et al, 2010</i>	↗		↗		↗		↗	
	Cellules kp-ir	<i>Bentsen et al, 2010</i>	ND		ND		↗		↗	
		<i>Losa et al, 2010</i>	ND		↗		↘		ND	

**Tableau 7: Variations développementales de l'expression de kiss-1 et de kp chez le rat mâle.** ND: pas analysé

plus difficile à détecter chez les mâles. Elle est souvent détectée après mise en accouplement selon la capacité du mâle à avoir un comportement de monte et à féconder la femelle.

*Pour conclure sur les variations du fonctionnement de l'axe HHG au cours du développement embryonnaire et post-natal*, la sécrétion du GnRH en particulier va subir une phase d'inactivation et de réactivation qui permettra la maturation de l'axe HHG au cours de la puberté afin de rendre fertile l'individu. De nombreux neuropeptides, neurotransmetteurs mais également gliotransmetteurs connus pour réguler les neurones à GnRH à l'âge adulte ont été étudiés pour déterminer leur rôle au cours du développement pubertaire (Becu-Villalobos & Libertun, 1995; Clarkson & Herbison, 2006a; Ojeda *et al.*, 2010). En 2003, la découverte du kp et de son rôle dans l'activation des neurones à GnRH au cours de la puberté (cf. page 30 paragraphe II.3.b) va alors relancer le débat sur les mécanismes du déclenchement de la puberté.

#### **V.1.b. Variations développementales de *Kiss1* (Tableaux 6 et 7)**

Chez différentes espèces, en période embryonnaire, bien que l'ARNm *Kiss1* soit détecté dans des fœtus, aucune étude n'a encore recherché de potentielles variations pré-natales d'ARNm *Kiss1* (Kotani *et al.*, 2001; Morelli *et al.*, 2008; Bellingham *et al.*, 2009; Fiorini & Jasoni, 2010).

*Chez le rat*, une première étude au cours du développement démontre la présence de l'ARNm *Kiss1* dans l'hypothalamus dès le jour post-natal un (PND01) (Navarro *et al.*, 2004a). Deux études suggèrent une régulation négative en période infantile et une régulation positive en période juvénile de l'expression de *Kiss1* mais avec un timing différent en fonction du sexe (Navarro *et al.*, 2004a; Sun *et al.*, 2007). Cependant, ces premiers résultats par RT-PCR ne permettaient pas de discriminer les variations d'expression de *Kiss1* dans les neurones à kp du RP3V de celles des neurones à kp de l'ARC. En effet, l'expression de *Kiss1* est régulée de manière différente chez l'adulte en fonction de la région.

Dans le RP3V, aucune cellule n'est détectée dans le RP3V en période néonatale (Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011). Chez la femelle, les niveaux d'ARNm *Kiss1* augmentent progressivement en période infantile et juvénile (Losa *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011) puis une diminution est observée entre la période pubertaire et l'âge adulte (Takumi *et al.*, 2010). En revanche, chez le mâle, aucune variation significative

de l'ARNm *Kiss1* n'est observée tout au long du développement péri-pubertaire (Losa *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011) excepté pour une étude qui montre une augmentation significative du nombre de cellules *Kiss1* entre la période juvénile et la période pubertaire (Bentsen *et al.*, 2010).

Dans l'ARC, des cellules *Kiss1* sont détectées dès PND0 (Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011). Chez la femelle, le nombre de cellules *Kiss1* ainsi que les niveaux d'ARNm *Kiss1* diminuent en période infantile, se stabilisent en période juvénile puis augmentent à l'âge adulte (Takase *et al.*, 2009; Losa *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011). Chez le mâle, aucune variation significative n'est observée pendant la période infantile mais le nombre de cellules *Kiss1* est significativement supérieur en période juvénile et pubertaire comparé au début de la période infantile (Bentsen *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010).

*Chez la souris, quelle que soit la région*, aucune cellule *Kiss1* n'est détectée en période néonatale (Semaan *et al.*, 2010).

Dans le RP3V, chez les femelles, une augmentation du nombre de cellules *Kiss1* est détectée au cours de la période infantile (Semaan *et al.*, 2010). Chez les mâles, aucune variation du nombre de cellules *Kiss1* n'est détectée en période infantile (Semaan *et al.*, 2010). Cependant, une augmentation du nombre de cellules *Kiss1* est détectée entre la période juvénile et l'âge adulte (Han *et al.*, 2005).

Dans l'ARC, chez les mâles, aucune différence dans le nombre de cellules *Kiss1* n'est observée contrairement au niveau d'ARNm *Kiss1* par cellule qui est plus élevés en période juvénile qu'à l'âge adulte (Han *et al.*, 2005). Ainsi, chez la souris, les résultats obtenus suggèrent une régulation positive des deux régions chez les deux sexes au cours de la période infantile et entre la période juvénile et adulte.

*Chez la brebis, dans l'APO*, une augmentation du nombre de cellules *Kiss1* positives est détectée entre la période juvénile et la période pubertaire (Redmond *et al.*, 2010).

Dans l'ARC, aucun changement n'est observé entre ces deux périodes (Redmond *et al.*, 2010).

*Chez le singe, dans le MBH*, une augmentation des niveaux d'ARN messenger *Kiss1* est détectée entre la période juvénile et la période pubertaire chez les deux sexes (Shahab *et al.*, 2005).

### ***V.1.c. Variations développementales de kisspeptine (Tableaux 6 et 7)***

Chez la rate, dans le RP3V, aucune étude ne décrit l'ir kp en période néonatale. Une augmentation du nombre de cellules kp-ir est détectée après l'ouverture vaginale (OV) chez des femelles traitées à la colchicine (Takase *et al.*, 2009). Chez des rats intacts, les résultats de différentes études sont en désaccord. En effet, une étude, montre également une augmentation du nombre de cellules kp-ir après l'OV chez des femelles intacts (Sun *et al.*, 2007). En revanche, d'autres études ne détectent aucune cellule kp-ir dans cette région tout au long du développement chez des mâles et des femelles intacts (Bentsen *et al.*, 2010; Iijima *et al.*, 2010; Losa *et al.*, 2010). La densité de fibres kp-ir augmente entre le début de la période infantile et la phase juvénile chez les femelles (Losa *et al.*, 2010).

Dans l'ARC, une étude décrit, malgré une faible résolution, la présence de cellules kp-ir dès PND07 (Iijima *et al.*, 2010). Chez les deux sexes, le nombre de cellules kp-ir ne varie pas au cours de la période juvénile (Losa *et al.*, 2010) mais augmente entre la période pubertaire et l'âge adulte (Sun *et al.*, 2007; Takase *et al.*, 2009; Bentsen *et al.*, 2010). La densité de fibres kp-ir augmente entre le début de la période infantile et la fin de la période juvénile chez la femelle (Losa *et al.*, 2010).

Dans les deux régions, tout au long du développement, Iijima et ses collaborateurs décrivent, sans apporter de quantification précise, une augmentation de l'immunoréactivité kp chez les deux sexes et notent que l'immunoréactivité kp est toujours plus faible chez le mâle comparé à la femelle quelle que soit la région (Iijima *et al.*, 2010).

Chez la souris, dans le RP3V, une augmentation du nombre de cellules kp-ir dans le RP3V est observée tout au long des périodes infantile, juvénile et pubertaire jusqu'à l'âge adulte dans les deux sexes (Clarkson & Herbison, 2006b; Clarkson *et al.*, 2009a). Quelle que soit la période de développement, le nombre de cellules kp-ir est toujours plus élevé chez les femelles que chez les mâles (Clarkson & Herbison, 2006b).

Chez le fœtus humain, une étude détecte de l'ir kp dans l'épithélium olfactif mais ne décrit pas de potentielles variations de kp en fonction de l'âge embryonnaire (Morelli *et al.*, 2008).

Pour conclure sur les variations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp, des variations de l'ARNm *Kiss1* et de kisspeptine sont détectées en fonction des périodes de développement. Ces variations tendent vers une augmentation non linéaire qui atteint en

Références	Embryonnaire	Neonatal	Infantile	Juvenile	Pubertal	Adult
Bateman et al, 2008		♀ EB PND01-03			Avancement OV	RP3V & ARC kp-ir densité de fibre Acyclique
Dickerson et al, 2011	Mères traitées EB E16-18			♀ Avancement OV	♂ Retard BPD	♀ RP3V kp-ir densité de fibre Cyclique irrégulier ♂ ∅ RP3V kp-ir densité fibre
Kauffman et al, 2007		♀ ↑ T à PND0				↓ RP3V kiss-1 mRNA ∅ ARC kiss-1 mRNA
Homma et al, 2009		♂ ORX à PND0 ♀ ↑ EB à PND05				↑ RP3V kiss-1 mRNA ↑ RP3V kp-ir cells nb ∅ ARC ↓ RP3V kiss-1 mRNA ↓ RP3V kp-ir cells nb ∅ ARC
Losa et al, 2010		♀ EB PND01-03		↓ RP3V & ARC kp-ir Densité de fibre	Avancement OV	
Navarro et al, 2009		♀ & ♂ ↑ EB à PND01				hypothal kiss-1 mRNA
Sun et al, 2007		♀ ↑ Danazol à PND05			↑ hypothal kiss-1 mRNA ↑ RP3V & ARC kp-ir cells nb ↓ RP3V kp-ir cells nb	
Sun et al, 2010					Avancement OV et 1 <sup>er</sup> Estrus	
Takase et al, 2009			♀ OvX+ implant E2 à PND15/20 Comparées aux OVX	∅ RP3V ↓ ARC kiss-1 mRNA ↓ LH		↑ RP3V kiss-1 mRNA ∅ ARC ↓ LH

**Tableau 8: Régulations développementales de l'expression de kiss-1 et de kp par les stéroïdes sexuels chez le rat.** Flèche rouge = injection unique; trait rouge = injections répétées; barre orange = période d'analyse de l'expression de *Kiss1*; barre verte, période d'analyse de l'ir kp; barre bleu, état physiologique; T, testostérone; EB, œstradiol benzoate; ORX, orchidectomie; OVX, ovariectomie; OV, ouverture vaginale; BPD, distance balano-preputiale; ND: pas analysé

générale son maximum à l'âge adulte et sont différentes en fonction de la région, du sexe et de l'espèce étudiée.

## **V.2. Régulations développementales de l'expression de kiss-1 et de kisspeptine par les stéroïdes sexuels (Tableaux 8 et 9)**

Pour étudier les régulations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp par les stéroïdes sexuels différents modèles existent. Chez le rat, ce sont essentiellement des modèles de gonadectomies et/ou d'ajout de stéroïdes sexuels (œstradiol, testostérone, progestérone, tableau 8) ou de composés stéroïdomimétiques (perturbateurs endocriniens ou agoniste/antagoniste des récepteurs aux stéroïdes sexuels, tableau 9) par injections ponctuelles ou pose d'implants. Chez la souris, ce sont différents modèles de mutation naturelle telles que les souris hpg ou transgéniques qui permettent d'identifier des régulations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kp par les stéroïdes sexuels. La souris hpg est une mutation naturelle résultant de l'absence de GnRH, un hypogonadisme sévère et ainsi l'absence de stéroïdes sexuels circulants (Gill *et al.*, 2010). La souris AFPKO est une souris déficiente en AFP (alpha-fétoprotéine) ainsi le cerveau n'est pas protégé de l'œstradiol au cours de la période néo-natale (González-Martínez *et al.*, 2008). La souris ArKO est déficiente pour l'aromatase, l'enzyme qui transforme la testostérone en œstradiol (Clarkson *et al.*, 2009a; Bakker *et al.*, 2010). La souris Kiss-ER $\alpha$ KO est une souris déficiente en ER $\alpha$  uniquement au sein des neurones à kisspeptine (Mayer *et al.*, 2010).

Dans les prochains paragraphes, nous détaillerons les résultats obtenus lors de la manipulation des stéroïdes sexuels au cours du développement sur les niveaux d'ARNm *Kiss1* et d'ir kp dans ces différents modèles.

### ***V.2.a. Régulations développementales de l'expression de Kiss1 par les stéroïdes sexuels (Tableau 8 et 9)***

Chez le rat, une injection unique de danazol, un dérivé de la testostérone, chez des femelles en période néonatale entraîne une augmentation des niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* autour de la puberté (Sun *et al.*, 2007).

Dans le RP3V, lorsque des femelles sont traitées de façon ponctuelle avec de la testostérone ou de l'œstradiol en période néonatale, une diminution de l'ARN messager *Kiss1* est observé à l'âge adulte (Kauffman *et al.*, 2007; Homma *et al.*, 2009). A l'inverse, la

	Embryonnaire	Neonatal	Infantile	Juvenile	Pubertal	Adult
Références						
Bai et al, 2011		Mères traitées BPA				
Navarro et al, 2009		BPA PND01-05				
ND						
Patisaul et al, 2009						

**Tableau 9: Régulations développementales de l'expression de kiss-1 et de kp par des composés**

**stéroïdomimétiques chez le rat.** Trait rouge=traitement chronique; barre orange= période d'analyse de l'expression de *Kiss1*; barre verte, période d'analyse de l'ir kp; barre bleu, état physiologique; EB, œstradiol benzoate; E, œstradiol; PPT, agoniste de ER $\alpha$ ; BPA, bisphénol A; ND, pas analysé



castration de mâle en période néonatale entraîne une augmentation de l'ARNm *Kiss1* à l'âge adulte (Homma *et al.*, 2009). Chez des femelles qui ont été ovariectomisées et supplémentées en œstradiol par la pose d'un implant sous-cutané en période infantile, les niveaux d'ARNm *Kiss1* sont plus élevés en période juvénile comparés aux femelles ovariectomisées sans implants d'œstradiol (Takase *et al.*, 2009). De plus, chez ces femelles, une diminution de la concentration plasmatique de LH est observée en période juvéniles et adulte.

Dans l'ARC, le traitement avec de la testostérone chez des femelles ou de l'œstradiol chez des mâles en période néonatale n'a aucun effet sur l'expression de *Kiss1* à l'âge adulte (Kauffman *et al.*, 2007; Homma *et al.*, 2009). Après ovariectomie en période infantile, les niveaux d'ARNm *Kiss1* en période juvénile sont plus élevés comparés aux femelles intactes et une diminution des taux circulants de LH est détectée (Takase *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs suggèrent une diminution de la sensibilité des neurones à kisspeptine de l'ARC au rétrocontrôle négatif de l'E2 entre la période juvénile et l'âge adulte (Takase *et al.*, 2009).

Chez la souris, dans le RP3V, les niveaux d'expression de *Kiss1* sont diminués à partir de la période infantile jusqu'à l'âge adulte chez les femelles hpg comparées aux femelles sauvages (Gill *et al.*, 2010). En revanche, aucun effet n'est observé sur l'expression de *Kiss1* chez les mâles dans cette région (Gill *et al.*, 2010). Chez des mâles et des femelles gonadectomisés en période juvénile, le nombre de cellules *Kiss1* est plus élevé que chez des animaux intacts à cette même période (Kauffman *et al.*, 2009).

Dans l'ARC, chez les souris hpg et chez les souris Kiss-ER $\alpha$ KO, une augmentation des niveaux d'ARNm *Kiss1* est observée quel que soit le sexe pour les souris hpg (Gill *et al.*, 2010) et chez les femelles pour les souris Kiss-ER $\alpha$ KO à partir de la période infantile jusqu'à l'âge adulte (Mayer *et al.*, 2010). Chez les souris femelles Kiss-ER $\alpha$ KO, une avancée de la puberté associée à des niveaux plasmatiques de LH significativement supérieurs à ceux observés chez les sauvages en période infantile et juvénile et une acyclicité à l'âge adulte est observée (Mayer *et al.*, 2010). La gonadectomie en période juvénile augmente le nombre de cellules *Kiss1* chez les femelles juvéniles mais n'a aucun effet chez les mâles aux mêmes âges (Kauffman, 2009).

Chez le fœtus ovin, une diminution des niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* est observée chez les fœtus suite à une exposition in utero à un cocktail de perturbateurs endocriniens tout au long de la gestation jusqu'à l'euthanasie (Bellingham *et al.*, 2009).

*In vitro*, l'action des stéroïdes sexuels sur l'expression de *Kiss1* a été étudiée par RT-PCR sur des lignées de cellules GnRH, les FNC-B4, issus de tissus olfactifs embryonnaires humains (Morelli *et al.*, 2008). Après ajout d'œstradiol dans le milieu de culture, le niveau d'ARN messager *Kiss1* des cellules en culture diminue de manière dose dépendante à partir de  $10^{-11}$  M (Morelli *et al.*, 2008). Aucun effet de l'ajout de testostérone dans le milieu n'est observé contrairement à l'ajout de DHT (dihydrotestostérone) qui provoque une augmentation dose-dépendante des niveaux d'ARNm *Kiss1* (Morelli *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent une action de la testostérone via les récepteurs aux androgènes contrairement à ce qui a été observé *in vivo* chez la souris (Smith *et al.*, 2005b). Ces différences peuvent être dues aux modèles de culture de lignée cellulaire et/ou à l'espèce.

#### ***V.2.b. Régulations développementales de kisspeptine par les stéroïdes sexuels (Tableau 8 et 9)***

Chez le rat, dans le RP3V, le traitement des mères en cours de gestation et au cours de la lactation avec du Bisphénol A (BPA), un xénoestrogène, entraîne une élévation du nombre de cellules kp-ir chez la descendance mâle dès la période juvénile (Bai *et al.*, 2011). De plus, le traitement des mâles au BPA entraîne une augmentation des niveaux plasmatiques de LH et d'E2, une diminution des taux circulants de testostérone ainsi qu'une capacité à répondre à une stimulation oestrogénique par un pic pré-ovulatoire de LH (Bai *et al.*, 2011). Suite à un traitement des mères à l'œstradiol au cours des derniers jours de gestations, le nombre de cellules kp-ir a diminué chez la descendance femelle à l'âge adulte. En parallèle un avancement de la puberté et des cycles irréguliers sont observés (Dickerson *et al.*, 2010). Chez la descendance mâle aucun effet n'est observé sur le nombre de cellules kp-ir néanmoins un avancement de la puberté est détecté (Dickerson *et al.*, 2010). Des femelles traitées en période néonatale à l'aide d'un dérivé de testostérone, le danazol, présentent une augmentation du nombre de cellules kp-ir en période pubertaire. En parallèle ces femelles ont une puberté avancée (Sun *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010). Lorsque des femelles sont traitées avec de l'œstradiol en début de période néonatale, la densité de fibre kp-ir est diminuée en période pubertaire (Losa *et al.*, 2010). Pour les autres études qui ont observé l'effet d'un traitement à l'œstradiol en début de période néonatale chez des femelles sur le patron d'ir kp à l'âge adulte, les résultats montrent une diminution de l'immunoréactivité kp aussi bien au niveau du nombre de cellules kp-ir que de la densité de fibres kp-ir (Bateman & Patisaul, 2008; Homma *et al.*, 2009; Patisaul *et al.*, 2009). Dans certaines de ces études, les auteurs

montrent que ces femelles présentent un avancement de la puberté et sont acycliques à l'âge adulte (Bateman & Patisaul, 2008; Patisaul *et al.*, 2009). Chez les mâles, l'injection d'œstradiol en début de période néonatale n'entraîne aucun changement de l'ir kp à l'âge adulte (Patisaul *et al.*, 2009). La castration en début de période néonatale provoque une augmentation de l'ir kp à l'âge adulte (Homma *et al.*, 2009).

Dans l'ARC, chez des femelles traitées à l'œstradiol en début de période néonatale la densité de fibres kp-ir est diminuée à l'âge adulte (Bateman & Patisaul, 2008; Patisaul *et al.*, 2009). Chez des mâles traités à l'œstradiol en début de période pubertaire, aucun effet n'est observé à l'âge adulte (Homma *et al.*, 2009; Patisaul *et al.*, 2009).

*Chez la souris*, dans le RP3V, le nombre de cellules kp-ir est moindre chez les femelles hpg, ARKO mais aussi AFPKO adultes comparés aux sauvages (González-Martínez *et al.*, 2008; Clarkson *et al.*, 2009a; Bakker *et al.*, 2010; Gill *et al.*, 2010). Par ailleurs, Bakker et ses collaborateurs observent que cette diminution du nombre de cellules kp-ir chez les femelles atteint le nombre de cellules kp-ir des mâles suggérant ainsi que les mécanismes de différenciation sexuelle n'ont pas eu lieu chez les femelles ARKO (Bakker *et al.*, 2010). Chez les souris *Kiss-ER $\alpha$ KO*, aucune augmentation de la quantité de cellules kp-ir n'est observée au cours du développement juvénile et pubertaire comparée aux femelles sauvages (Mayer *et al.*, 2010). De plus, les souris *Kiss-ER $\alpha$ KO* présentent une avancée de leur puberté associée à des niveaux plasmatiques de LH significativement supérieurs à ceux observés chez les sauvages en période infantile et juvénile et sont acycliques à l'âge adulte (Mayer *et al.*, 2010). L'ovariectomie en fin de période infantile entraîne une diminution du nombre de cellules kp-ir en période pubertaire et chez l'adulte (Clarkson *et al.*, 2009a). De plus, ces femelles ovariectomisées n'ont toujours pas présenté d'ouverture vaginale au moment de l'euthanasie à l'âge adulte. Puis la pose d'un implant d'œstradiol, que ce soit tout de suite après l'ovariectomie ou 7 jours après, restaure le nombre de cellules kp-ir en période pubertaire et adulte ainsi que les paramètres physiologiques de la puberté (Clarkson *et al.*, 2009a).

Dans l'ARC, le patron d'immunoréactivité kp est diminué chez les mâles et les femelles hpg (Gill *et al.*, 2010) et chez les femelles *Kiss-ER $\alpha$ KO* et AFPKO comparés aux sauvages (Clarkson *et al.*, 2009a; Mayer *et al.*, 2010). Suite à une ovariectomie en période

	Embryonnaire	Neonatal	Infantile	Juvenile	Pubertal	Adult
Références						
Castellano et al, 2005 ND				Jeun de 72h ♀ & ♂ hypothal kiss-1 mRNA	hypothal kiss-1 mRNA	
Castellano et al, 2011			Manipulation des portés = sous-nutrition ♀		hypothal kiss-1 mRNA ARC kp-ir cells nb Avancement OV	
Iwasa et al, 2010 a ND		Sous-nutrition des mères gestantes ♀	hypothal kiss-1 mRNA de PND04 à PND16 ♂	hypothal kiss-1 mRNA dès PND04		
Iwasa et al, 2010 b ND		Sous-nutrition des mères au cours de lactation Puis des ♀ après sevrages jusqu'à PND26		hypothal kiss-1 mRNA dès PND15		
Iwasa et al, 2011		Sous-nutrition dès mères en gestation et lactation ♀		hypothal kiss-1 mRNA Avancement OV		
Knox et al, 2011			LPS treatment ♀	RP3V kiss-1 mRNA Avancement OV et 1 <sup>er</sup> Estrus		

**Tableau 10: Régulations développementales de l'expression de kiss-1 et de kp par le**

**métabolisme énergétique et le stress chez le rat.** Traits violets = période pendant laquelle l'état nutritionnel est affecté ; traits marrons = période de stress; barre orange= période d'analyse de l'expression de *Kiss1*; barre verte, période d'analyse de l'ir kp; barre bleu, état physiologique; OV, ouverture vaginale; LPS, lipopolysaccharide provoque un stress inflammatoire; ND, pas analysé

infantile, le patron d'ir kp diminue puis est restauré en période pubertaire et à l'âge adulte par la pose d'un implant d'œstradiol que ce soit tout de suite après l'ovariectomie ou 7 jours après (Clarkson *et al.*, 2009a).

Chez la brebis, dans l'APO, des injections de testostérone en fin de gestation entraînent une augmentation du nombre de cellules kp-ir de la descendance mâle adulte dont le nombre est équivalent à celui des femelles adultes contrôles (Cheng *et al.*, 2010).

Dans l'ARC, aucun effet n'est observé sur le patron d'ir kp de la descendance mâle adulte (Cheng *et al.*, 2010).

Pour conclure sur la régulation de l'ARNm *Kiss1* et l'ir kp par les stéroïdes sexuels au cours du développement, les différentes études décrites suggèrent un effet tout d'abord organisationnel des stéroïdes sexuels en période fœtale et néonatale, qui devient activationnel autour de la puberté, sur le patron d'expression de *Kiss1* et sur l'ir kp. Des perturbations précoces de la signalisation par les stéroïdes sexuels entraînant des anomalies du patron d'expression de *Kiss1* et de kp sont associées à des défauts de mise en place et de fonctionnement de l'axe HHG.

### **V.3. Régulations développementales de l'expression de kiss-1 et de kisspeptine par d'autres facteurs (Tableau 10)**

#### ***V.3.a. Régulations développementales de l'expression de *Kiss1* et de kisspeptine par la balance énergétique***

Chez le rat, suite à une sous-nutrition de la mère en fin de gestation et/ou en début de lactation, les niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* de la descendance mâle et femelle sont diminués en période juvénile et pubertaire (Iwasa *et al.*, 2010a; Iwasa *et al.*, 2010b; Iwasa *et al.*, 2011). Chez des femelles et des mâles en période juvénile, un jeûne de 72h entraîne une diminution des niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* (Castellano *et al.*, 2005). Dans une étude récente, la taille des portées de rats est manipulée dès la naissance provoquant une sous-nutrition ou une sur-nutrition chez la descendance femelle au cours de la lactation (Castellano *et al.*, 2011). Pour les femelles sur-nourrit, une augmentation des niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* est détectée en période juvénile et inversement (Castellano

*et al.*, 2011). Chez ces femelles, une sous-nutrition entraîne un retard pubertaire et une sur-nutrition un avancement de la puberté (Castellano *et al.*, 2011).

Dans le RP3V, une augmentation de la densité de fibres kp-ir est observée en période juvénile en condition sur-nourrit (Castellano *et al.*, 2011).

Dans l'ARC, une diminution du nombre de cellules kp-ir est détectée en période juvénile en condition sous-nourrit (Castellano *et al.*, 2011).

Chez des souris femelles déficientes pour la leptine (souris ob/ob) qui s'avèrent être infertiles, les niveaux d'ARNm *Kiss1* dans le RP3V et dans l'ARC sont diminués à l'âge adulte (Quennell *et al.*, 2011). De plus, le nombre de cellules kp-ir dans le RP3V est également diminué à l'âge adulte (Quennell *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter que des souris déficientes pour le LepR spécifiquement dans les cellules exprimant *Kiss1* ne présentent aucun défaut de mise en place de la puberté ni de fertilité suggérant que l'action directe de la leptine sur les neurones à kisspeptine ne serait pas nécessaire à la mise en place de la fonction de reproduction (Donato *et al.*, 2011).

*In vitro*, une étude utilise des cellules FNC-B4, qui expriment le *Kiss1* et sont immunoréactives pour le kp (Morelli *et al.*, 2008). L'ARNm des récepteurs à la leptine est détecté dans ces cellules. Une augmentation du niveau d'ARNm *Kiss1* et du nombre de cellule kp-ir est détectée suite à l'ajout de leptine dans le milieu de culture (Morelli *et al.*, 2008).

### ***V.3.b. Régulation développementale de Kiss1 et de kisspeptine par le stress***

Chez des rates juvéniles traitées en période néonatale et infantile au lipopolysaccharide (LPS) connue pour induire un stress immunologique, une sous-régulation de l'expression de l'ARN messager *Kiss1* dans le RP3V est observée en période juvénile associée à un avancement de la puberté (Knox *et al.*, 2009).

**En résumé de cette dernière partie de l'introduction, des variations des niveaux d'expression du gène kiss-1 et des variations de la protéine sont détectés au cours du développement. Ces variations semblent être dues à une action organisationnelle puis activationnelle des stéroïdes sexuels au cours du développement. Ces études suggèrent que**

certain **facteurs environnementaux** déjà connus pour réguler les neurones à kp chez l'adulte (balance énergétique et stress) pourraient également **réguler les neurones à kp au cours du développement**. De plus, il est important de noter que des perturbations précoces (péri-natale) de l'environnement peuvent entraîner des changements dans l'expression de *Kiss1* et de kp associées à des défauts de mise en place et de fonctionnement à l'âge adulte de la fonction de reproduction.

## Objectifs



Suite à la découverte en 2003 de son rôle majeur dans la fonction de reproduction, le kp a été largement étudié pour son rôle stimulateur des neurones à GnRH.

Comme nous l'avons introduit dans le dernier chapitre de l'introduction, ces dernières années, de nombreuses études ont montré que des dysfonctionnements de la fonction de reproduction par exposition au cours du développement à différents facteurs environnementaux tels que les perturbateurs endocriniens, la malnutrition ou le stress étaient associés à des changements dans le patron d'expression du *Kiss1* et d'immunoréactivité kisspeptine à l'âge adulte. Ces études suggèrent ainsi que les neurones à kisspeptine seraient très précocement sensibles à ces différents facteurs. Paradoxalement, très peu de données sont publiées sur l'ontogenèse des neurones à kisspeptine chez des animaux intacts. Il était donc nécessaire de déterminer les périodes clés de développement des neurones à kisspeptine chez des animaux intacts permettant ensuite de mieux comprendre les mécanismes de régulations et le rôle de ce système au cours du développement de la fonction de reproduction.

Dans ce contexte, l'objectif principal de notre travail de thèse était **d'étudier l'ontogenèse des neurones à kp en définissant la période de neurogenèse et en établissant une cartographie spatio-temporelle de kp de l'embryogenèse à l'âge adulte. Nous avons pris comme modèle le rat** qui est le rongeur dont la physiologie au cours de la puberté est la mieux définie. Ce travail nous permettra de discerner les périodes clés de développement des neurones à kisspeptine telles que la période de leur neurogenèse ou les périodes potentiellement sujettes à d'importantes régulations de kp.

Pour mener à bien cette étude, notre travail s'est divisé en trois grands objectifs :

- 1) **L'étude de la neurogenèse des neurones à kisspeptine et de l'évolution spatio-temporelle de kp au cours du développement embryonnaire.**
- 2) **L'étude de variations de kp au cours du développement post-natal.**
- 3) **La cartographie des corps cellulaires et des fibres kp chez l'adulte.**

Dans la suite de ce manuscrit, les résultats obtenus pour chacun de nos objectifs seront décrits dans trois chapitres distincts : le premier traitera des résultats obtenus chez l'embryon, le second décrira les résultats obtenus au cours du développement et le dernier traitera de la cartographie chez l'adulte.

## Résultats

Avant de réaliser nos études au cours du développement, nous avons été confronté à des problèmes de spécificité d'immunomarquage chez l'adulte (voir dernier chapitre des résultats).

Au cours des trois années de thèses, nous avons utilisé différents anticorps anti-kisspeptine. Le premier chapitre des résultats traitant de la neurogenèse et de l'évolution spatio-temporelle de kp au cours du développement embryonnaire a été réalisé au cours de la dernière année de la thèse avec un anticorps nouvellement fabriqué par le Dr Alain Caraty : un anti-kp-52-N-term. Le second chapitre des résultats traitant des variations d'immunoréactivité de kisspeptine au cours du développement post-natal a été réalisé avec un anti-kp-52 provenant de notre collaboration avec le Dr Jens Mikkelsen. Pour finir, dans le troisième chapitre, nous avons établi une cartographie comparée à l'aide de deux anticorps dirigés contre différentes isoformes de kp : un anti-kp-10-C-term et l'anti-kp-52.

# Chapitre 1: Le kp au cours du développement embryonnaire

Article 1:

Ontogenesis of kisspeptin neurons: from neurogenesis to peri-natal development.

En révision, Journal of Neuroendocrinology

## **I. Rappel du contexte bibliographique de l'étude :**

Quelques études démontrent un rôle organisationnel des stéroïdes sexuels ainsi que d'autres facteurs (nutritionnels, stress...) en période néonatale (cf. page 68 paragraphe V.3 de l'introduction). Paradoxalement, peu d'études décrivent l'ontogenèse des neurones à kisspeptine chez des animaux intacts. Les périodes clés de développement des neurones à kisspeptine tels que leur période de neurogenèse et les potentiels périodes de régulations de l'expression de *Kiss1* et de *kp* restaient indéterminée.

## **II. Résumé de l'article :**

**Le but de cette étude était de déterminer la date de naissance des neurones à *kp* et de décrire l'apparition, la localisation et les potentielles variations de l'ARN messager *kiss-1* et *kp-ir* au cours du développement embryonnaire chez le rat.**

Afin de déterminer la période de neurogenèse des neurones à *kp*, nous avons injecté du BrdU, qui s'incorpore à l'ADN des cellules en division, à des mères gestantes à différents stades de gestation : E11,5, E12,5, E13,5, E14,5, E15,5 et E17,5. Nous avons ensuite euthanasié, fixé et prélevé les cerveaux de la descendance à l'âge adulte. Enfin, chez les femelles, nous avons réalisé un double immunomarquage dirigé contre le *kp* et le BrdU afin de quantifier le pourcentage de cellules doubles positives par rapport au nombre total de cellules *kp-ir* en fonction de l'âge d'injection du BrdU. Pour l'étude de l'apparition, de la localisation et des variations de l'expression de *Kiss1* et *kp* au cours du développement embryonnaire et périnatal, nous avons prélevé des embryons de rat à différents stades de développement E12,5, E14,5, E16,5, E18,5, E22,5 et PND0. Nous avons ensuite réalisé des qRT-PCR, des hybridations *in situ* contre l'ARN messager *Kiss1* et des marquages immunohistochimiques dirigés contre le *kp*.

Tout d'abord, pour l'étude de la date de naissance des neurones à *kp*, les résultats présentés sont ceux obtenus pour la population de neurones à *kp* de l'ARC. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, les neurones à *kp* du RP3V n'étaient pas détectable ni par IHC ni par HIS dans nos conditions expérimentales chez des rates intactes. Les résultats obtenus montrent une période de neurogenèse des neurones à *kp* de l'ARC étendue : commençant entre E12,5 et E13,5, dont le pic de neurogenèse se situerait autour de E15,5 et qui n'est pas complètement terminée à E17,5.

Deuxièmement, les résultats obtenus par qRT-PCR montrent la présence de l'ARN messager *Kiss1* dans l'hypothalamus d'embryons de rat dès E14,5 chez les mâles comme chez les femelles. Malheureusement, nous n'avons pas pu détecter de cellules *Kiss1* chez aucun des embryons traités par hybridation *in situ* (expérience réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr Jens Mikkelsen au Danemark).

Enfin, les résultats par immunohistochimie montrent la présence de cellules kp-ir dans le noyau arqué des embryons à partir de E14,5. Le nombre de corps cellulaires kp-ir dans cette région augmente jusqu'à atteindre son maximum à E18,5. A cet âge, le nombre de cellules kp-ir correspond à la moitié de celui observé chez l'adulte. A E22 et PND0, le nombre de cellules kp-ir est significativement plus bas qu'à E18,5. Il est intéressant de noter qu'aucune différence sexuelle n'est observée en période embryonnaire et périnatale. Dans le RP3V, seulement quelques cellules ir kp sont observées à E18,5.

Pour conclure, cette étude démontre que les neurones à kp de l'ARC naissent sur une période étendue et que ces derniers sont soumis à une baisse d'immunoréactivité kp en période périnatale indépendante du sexe de l'animal



25 **Abstract:**

26 Kisspeptins, encoded by the *Kiss1* gene, play a key role in the regulation of reproductive  
27 function but nowadays very little is known about the ontogenesis of this system. The aims of the  
28 present study were to determine the period of arcuate nucleus (ARC) kisspeptin cell birth and the  
29 embryonic stage and neuroanatomical sites of onset of kisspeptin immunoreactivity. Bromo-desoxy-  
30 uridine (BrdU) was administered to female rats at various gestational stages and double  
31 immunohistochemistry against kisspeptin and BrdU was performed on brain sections from their  
32 offsprings. The period of neurogenesis of ARC kisspeptin neurones begun between embryonic day (E)  
33 E12.5 and E13.5, reached its peak at E15.5 and was not completely over at E17.5. *Kiss1* mRNA was  
34 detected in mediobasal hypothalamic punches of embryos aged E14.5, E16.5, E18.5 and E22.5 by  
35 real-time RT-PCR. Accordingly, kisspeptin-immunoreactive (ir) cells were consistently detected in the  
36 embryonic ARC from E14.5 and their number increased until E18.5 to reach about half the level  
37 observed in adults. Between E18.5 and E22.5 the number of kisspeptin-ir cells significantly decreased  
38 regardless of sex and this decrease persisted until birth. Taken together, these results demonstrate that  
39 rat ARC kisspeptin neurones are born locally during an extended embryonic period and are able to  
40 synthesise kisspeptin rapidly after their birth, consistent with the hypothesis of a role during  
41 embryonic activation of the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis. A sex-independent decrease of  
42 kisspeptin-ir was observed during the perinatal period suggestive of important regulations of  
43 kisspeptin neurones around birth.

44



## 45 **Introduction**

46

47 Kisspeptins are neuropeptides encoded by the *Kiss1* gene, which are synthesized by two  
48 distinct neuronal populations of the hypothalamus. The one located in the arcuate nucleus (ARC)  
49 appears to play a fundamental role in the control of GnRH pulsatile secretion while the one located in  
50 the preoptic area (POA), predominant in females, has been implicated in the pre-ovulatory GnRH/LH  
51 surge (1, 2). Kisspeptins are potent secretagogues of GnRH not only in adults (3) but also during  
52 postnatal development (4) and this may be one mechanism by which these neuropeptides are able to  
53 reactivate the hypothalamo-pituitary gonadal axis at the end of the juvenile period and trigger puberty  
54 onset (5). Kisspeptin fibres as well as the receptor for kisspeptins (*Kiss1r*) are found in numerous areas  
55 of the forebrain (6-8) and recent double immunolabelling and electrophysiological data in rodents  
56 suggest that at least part of the projections from kisspeptin neurones target *Kiss1r* expressing-GnRH  
57 neurones directly, both in the POA and median eminence(8-11).

58

59 Despite a considerable amount of knowledge that has been gained within the past decade on  
60 the functional importance and cytoarchitecture of this system from puberty to adulthood, the literature  
61 on the ontogeny of kisspeptin neurones is still sparse. In human fetuses, kisspeptin-like  
62 immunoreactivity has been detected in olfactory epithelial cells (12) but the specificity of the antibody  
63 used in that study is questionable (13). In mice, a reverse transcription polymerase chain reaction  
64 demonstrated the expression of *Kiss1* mRNA in the embryonic mediobasal hypothalamus as early as  
65 embryonic day (E) 13.5 (14) but there is as yet no evidence for kisspeptin peptide synthesis prior to  
66 birth. Besides, *Kiss1r* mRNA has been detected on mice GnRH neurones at E13.5 along the nasal  
67 portion of their migratory route (15) and evidence that this receptor is already functional pre-natally  
68 stems from two independent studies using primary cultures of GnRH neurones derived from  
69 embryonic tissue (14, 16). Based on embryonic explant co-culture experiments it has been proposed  
70 that embryonic kisspeptins may have a chemoattractive effect on GnRH neurites as they grow from  
71 the POA to the mediobasal hypothalamus (14). In rats, the earliest developmental time point reported

72 for hypothalamic *Kiss1* expression is postnatal day (PND) 0 (17, 18) and for kisspeptin  
73 immunoreactivity PND7 (19).

74

75 The urge to precisely characterize the early stages of kisspeptin neurone ontogenesis is  
76 reinforced by a growing body of evidence for the extreme peri-natal sensitivity of this system to  
77 environmental cues and its later impact on the postnatal development of reproductive function (20-33).  
78 The great majority of the aforementioned studies were performed in rats. Therefore the principal aims  
79 of this study were to determine the neurogenesis period of kisspeptin neurones and to define the  
80 developmental onset of kisspeptin synthesis in rat embryos.

81

82

### 83 **Materials and methods**

84

85 Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Lyon, France).  
86 All animal procedures were performed in accordance with the European legislation for animal  
87 experimentation (directive 86/609/EEC for animal experiments).

88

#### 89 ***Experiment 1: Birthdating of kisspeptin neurones***

90

##### 91 *Animals*

92 Wistar rats initially obtained from Charles River Breeding Laboratories (L'Arbresle, France),  
93 were reared in our own animal facility under a 12:12h light/dark cycle with food and water available  
94 ad libitum. Following weaning (PND24), rats were housed in groups of four per cage. To obtain timed  
95 pregnant rats, pro-oestrous females were put overnight in the presence of a male at a ratio of 2 to 3  
96 females per male. The morning following the mating night was considered as embryonic age 0.5 days  
97 (E0.5). The presence of spermatozoids was verified in vaginal smears. Timed pregnant female rats  
98 were given a single intraperitoneal injection of bromodesoxyuridine (BrdU, 150 mg/kg) as previously  
99 described (34) at either E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E15.5, or E17.5. Following weaning, female

100 offsprings were grouped into cages of 4 and daily checked for vaginal aperture and oestrous cyclicity  
101 as previously described (7). Those female offsprings that displayed at least two successive regular  
102 oestrous cycles were euthanised at 3 months of age on dioestrous stage by ip injection of pentobarbital  
103 and intracardiac perfusion of fixative (see below) as previously described (7). Their male siblings as  
104 well as their BrdU-treated mothers were euthanized the same way and used for other studies.

105

#### 106 *Double immunofluorescence against kisspeptin and BrdU*

107 Brain fixation, preparation of serial cryosections and cryoprotectant removal were performed  
108 as previously described (7). One out of four serial set of sections from female offsprings representative  
109 of each embryonic stage of BrdU injection were processed for kisspeptin/BrdU double  
110 immunofluorescent labelling in parallel. Sections were incubated in HCl 2N during 20 min at 37°C  
111 and rinsed in Borate buffer for 10 min. Following PBS (Phosphate buffered saline, 0.1N, pH 7.4)  
112 rinses and saturation in blocking solution (PBS , 0.3% triton, 0.1% azide, 2% normal donkey serum,  
113 0.25% human serum albumin), sections were incubated with a sheep anti-kisspeptin (AC067, 1:1000)  
114 and a rat anti-BrdU (Abscys AbC 117-7513, 1:200) in blocking solution for three days at 4°C. Anti-  
115 kisspeptin AC067, thereafter referred to as anti-kisspeptin (N-ter) was raised in lamb against a 14  
116 amino acid (AA) peptide close to the N terminal (N-ter) rat kisspeptin-52 (corresponding to AA 4 to  
117 18) according to a previously published immunization protocole (35) and the resulting antiserum was  
118 affinity purified (Eurogenetech). Its specificity was confirmed by pre-adsorption tests with rat  
119 kisspeptin-52. Sections were rinsed four times in PBS before being incubated for 2 h with donkey anti-  
120 sheep A488 (Molecular Probes) and donkey anti-rat Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories,  
121 Newmarket, UK) secondary antibodies both diluted 1:500 in blocking solution. Controls for the BrdU  
122 staining consisted in performing the immunostaining procedure on adult rats that had not been exposed  
123 to any BrdU treatment or by omitting either the primary or secondary antibody. All these conditions  
124 resulted in absence of staining. Following PBS rinses, sections were counterstained in Hoechst nuclear  
125 marker (Hoechst 33258 pentahydrate, Invitrogen), mounted onto gelatin-coated glass slides, and  
126 cover-slipped with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA).

127

128 *Image analysis*

129 A qualitative evaluation of the kisspeptin/BrdU double immunoreactive cells was initially  
130 undertaken by confocal analysis of a randomly chosen sample of kisspeptin-ir cells assessed by  
131 epifluorescence to have BrdU-ir in their Hoechst-positive nucleus. For this analysis we used the Zeiss  
132 LSM 700 upright confocal system equipped with ZEN control software at X63 objective magnification  
133 (Plan-Apochromat" X63/1.40 oil M27, df=0.19) and collected images at 1 µm intervals throughout the  
134 entire kisspeptin immunoreactive volume. This preliminary analysis verified the nuclear localisation of  
135 the BrdU-ir in all cells. The quantitative analysis could hence be performed by standard epifluorescent  
136 observations. Photomicrographs from sections at the level of the posterior half of the ARC (from 2.00  
137 to 4.30 posterior to the bregma on rat brain atlas (36)) were digitally captured with Spot insight image  
138 capture system CCD camera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) set up on an  
139 epifluorescent microscope (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan, UPlanF1, X200.50). Cells were  
140 identified by their nuclear Hoechst staining and the percentage of kisspeptin/BrdU double  
141 immunoreactive cells, was calculated as the total number of double labelled cells over the total number  
142 of kisspeptin-ir cells counted.

143

144 ***Experiment 2: Detection and localization of Kiss1 mRNA and kisspeptin in embryonic rat brain***

145

146 *Animals*

147 For real-time RT-PCR analysis of *Kiss1* and immunohistochemical analysis of kisspeptins in  
148 the hypothalamus of embryos, timed pregnant rats were programmed in our own animal facility (see  
149 experiment 1). For *in situ* hybridization analysis of *Kiss1* in embryos, timed pregnant rats were  
150 directly obtained from Charles River Breeding Laboratories (Arbresle, France) where the day of  
151 mating (which occurred during a 4 h period in the morning) was considered as E0. Timed pregnant  
152 rats were euthanised by cervical dislocation and their embryos removed from the uterine horns in ice  
153 cold PBS. The sex of each embryo was determined by PCR for the SRY gene (forward primer:  
154 CAGCAGAAACAGCAGCACCAG and reverse primer: GGGGAGTGTTGGCATAGGTAGG) from

155 a piece of tail that was sampled prior to further processing for either RT-PCR, *in situ* hybridization or  
156 immunohistochemistry.

157

#### 158 *Tissue preparation for immunohistochemistry*

159 Whole embryos (E12.5 and E14.5) or embryonic heads (E16.5, E18.5 and E22.5) were briefly  
160 rinsed in ice-cold PBS and fixed by a 72h-immersion in a solution of 0,2% picric acid/4% PAF in 0.1  
161 M phosphate buffer solution (pH 7.4). PND0 brains were fixed by intracardiac perfusion as previously  
162 described (7) except for the volume of intracardiac perfusion solutions which were reduced by half.  
163 Following cryoprotection and embedding in Tissue Teck (7), tissues were cut in the sagittal and/or  
164 frontal plane into serial sets of sections (20µm thick) and directly mounted on Super Frost Plus slides.  
165 The number of serial sets was adjusted in relation to the growing size of the brain across embryonic  
166 stages: 3 sets for E12.5; 4 sets for E14.5 and E16.5; 6 sets for E18.5 and E22.5. This sampling  
167 provided a representative picture of the entire hypothalamus (37). Kisspeptin-ir cells were detected  
168 and counted on a total of 4 to 10 sagittal sections depending on the embryonic stage.

169

#### 170 *Kisspeptin immunoperoxidase labelling*

171 One set of sections from one male and one female rat of each age were processed in parallel  
172 for immunoperoxidase labelling with sheep anti-kisspeptin (N-ter) AC067 (1:100, 3 days at 4°C)  
173 followed by a biotinylated donkey anti-sheep secondary antibody (1:500, 1 h at room temperature,  
174 Jackson Immunoresearch) and ABC amplification procedure (Vector Elite kit) as previously described  
175 (7) except that the normal goat serum was replaced by normal donkey serum and that all antibodies  
176 and reagents were directly applied onto the slide-mounted sections in wet chambers. This procedure  
177 was repeated until having 3 to 4 rats immunolabelled per age and per sex.

178

#### 179 *Specificity of the staining obtained with the anti-kisspeptin (N-ter) on embryonic brains*

180 For E18.5 embryos (which displayed maximal kisspeptin immunoreactivity), other  
181 consecutive sets of sections were also processed for either pre-adsorbition tests with rat kisspeptin-52  
182 or immunofluorescent labelling and confocal analysis. Pre-adsorbition tests were performed as

183 previously described (7) by overnight preincubation of the antibody working solution with 0.1  $\mu$ M rat  
184 kisspeptin-52. Immunofluorescent labelling of slide-mounted embryonic sections was performed with  
185 anti-kisspeptin (N-ter) (1:100, 3 days at 4°C), alexafluor-488-conjugated donkey anti-sheep antibody  
186 (Molecular Probes, 1:500, 2 h at room temperature) and Hoechst nuclear marker. As an additional  
187 control, staining obtained with the AC067 on these rat embryos was also compared with that obtained  
188 on consecutive sections with the well characterised anti-kisspeptin (C-ter) AC564 raised against the  
189 amidated C-terminal (C-ter) portion of mature kisspeptins ((38), affinity-purified form generously  
190 gifted by R. Steiner).

191

#### 192 *Tissue preparation for in situ hybridization histochemistry*

193 Tissue Teck-embedded heads from E16, E19, PND18 and PND29 female rats were snap  
194 frozen and sectioned as previously described (7). Frozen sections (20  $\mu$ m thick) were cut either in the  
195 frontal or sagittal plane, directly mounted on Super Frost Plus slides, post-fixed with 4%  
196 paraformaldehyde, rinsed in PBS, dried overnight and stored at -80°C until processed for *in situ*  
197 hybridization. Frontal sections sampled at the level of the ARC from PND18 and 29 female rats were  
198 used as a positive control.

199

#### 200 *Kiss1 in situ hybridization*

201 Brain sections were fixed in 4% paraformaldehyde, acetylated, delipidated and dehydrated as  
202 previously described (39). A previously characterised *Kiss1* oligonucleotide probe complementary to  
203 the 325-370 bases of the rat *Kiss1* gene was used for detection of *Kiss1* mRNA (40). The probe was  
204 labelled at the 3'-end with [35S]-ATP (GE Healthcare, UK) using deoxynucleotidyl transferase (Roche  
205 Diagnostics, Germany). The specific activity of the hybridization buffer was 1 million cpm per 100  $\mu$ l.  
206 Hybridization and washing of the sections were performed as previously described (40). The sections  
207 were layered with a Kodak autoradiography emulsion NTB (Caresteam Health Inc, USA) and  
208 developed 21 days later before being counterstained in thionin and coverslipped.

209

210

211 *Tissue collection and real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

212 For real-time RT-PCR, whole embryos (E14.5) or embryonic heads (E16.5, E18.5 and  
213 E22.5) were rapidly embedded in Tissue-Tek, frozen in an isopentane solution at - 50°C and stored at  
214 -80°C until cryosectioning in the sagittal plane. Frozen tissue punches were successively collected  
215 throughout the entire mediobasal hypothalamus of each embryo and pooled (3 to 5 punches  
216 per mediobasal hypothalamus) using a 0.8 mm diameter canula in a cryostat (n = 3 to 4  
217 embryos per embryonic stage). After each punch the tissue was cryosectioned (50 µm  
218 section), mounted on slides, fixed in chloroform/ethanol (50:50, v:v) and processed for cresyl  
219 violet staining for accurate visualization of brain structures under a stereomicroscope (Nikon  
220 SMZ1000). Only punches correctly positioned (encompassing the area where kisspeptin-  
221 immunoreactive cells had been identified in the previous immunohistochemical experiment)  
222 were further processed for RNA extraction and real-time RT-PCR (n = 3 for E14.5; n = 3 for  
223 E16.5; n = 1 for E18.5; n = 3 for E22.5). Negative control samples consisted in similar  
224 punches sampled in the tongue, a neighbouring and anatomically easily identifiable structure  
225 at each embryonic stage. All frozen punches were stored at -80°C until total RNA extraction,  
226 which was performed using the PicoPure RNA isolation kit from Arcturus (Exilone SARL/  
227 Vicq /France) according to manufacturers instruction. RNA concentration and quality were  
228 determined by UV spectrometry (BioSpec nano, Shimadzu) and agarose gel electrophoresis  
229 respectively. Reverse transcription was performed at 42°C in 40 µl reaction volumes  
230 containing 1.8 µg RNA, AMV Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, oligo dTs and dNTPs mixed  
231 according to manufacturer's instructions (Promega, Charbonnière les bains/ France). Real time PCR  
232 analysis was performed with a qPCR iCycler (iQV3.1 software, BioRad) using iQ SYBR Green  
233 Supermix (Biorad SA, Marne la coquette, France). Primer sequences and cycling conditions for *Kiss1*  
234 and for the housekeeping ribosomal protein S11 (RPS11) were as previously optimized (19; *Kiss1*  
235 sense: 5'-TGGCACCTGTGGTGAACCCTGAAC-3', *Kiss1* antisense: 5'-ATCAGGCGACTGCGG  
236 GTGGCACAC-3'; RPS11 sense: 5'-CATTTCAGACGGAGCGTGCTTAC-3', RPS11 antisense: 5'-

237 TGCATCTTCATCTTCGTCAC-3'). PCR specificity was verified by melting curve analysis and  
238 agarose gel electrophoresis. Each sample was run in triplicates to obtain an average cycle  
239 threshold value (Ct) and for each assay a standart curve was created using a 2-fold serial  
240 dilution of cDNA, against which *KissI* and RPS11 mRNA were quantified based on the cycle  
241 threshold method (18). No significant difference for Ct values were observed for RPS11  
242 between the embryonic age groups. Negative control samples devoid of cDNA templates  
243 were included for each PCR and yielded no amplification. Values are expressed as a ratio of  
244 *KissI* mRNA over *RPS11* mRNA.

245

#### 246 *Image analysis*

247 For *KissI in situ* hybridization and kisspeptin immunoperoxidase labelled sections, each  
248 section was examined on a brightfield microscope (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) using  
249 a X25 objective (170017 250.50; Leica Microsystems SAS). Precise mapping of immunoreactive  
250 cells was done with help of the atlas of embryonic rat brain (37) and consecutive cresyl violet-stained  
251 sections. Special attention was taken on the migratory pathway of GnRH neurones from the olfactory  
252 pit to the POA and on two regions where kisspeptin neurones are found in the adult: the POA and the  
253 ARC. Photomicrographs were captured on a brightfield microscope (Olympus BX51; Olympus,  
254 Tokyo, Japan) using X20 (UPlanF1, X200.50), X40 (UPlanF1,X400.75) and X100 (UPlanF1,  
255 X1001.30 oil iris, Japan) objectives with the Spot insight image capture system CCD camera  
256 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA). For quantification of kisspeptin-ir cell  
257 numbers at different stages of development, all immunoreactive cells of each immunoperoxidase  
258 labelled section were counted using the X100 objective. Immunofluorescent kisspeptin-ir cells were  
259 analysed by confocal microscopy at X63 objective magnification as described above.

260

#### 261 *Statistical analysis*

262 All data were expressed as the mean  $\pm$  SEM and represented by histograms. All statistical  
263 analysis were performed using R software. R is a language and environment for statistical computing



264 and graphics and is a GNU project (<http://gnu.org>). For all data, Shapiro test and Fisher test were used  
265 to verify the normality and homogeneity of variance, respectively. Comparisons between groups of  
266 ages were done using a One Way analysis of variance. Post-hoc comparisons were done using  
267 Student-test with Bonferroni adjustment method.

268

269

## 270 **Results**

271

### 272 **Neurogenesis period of kisspeptin neurones**

273 The first aim of this study was to determine the birthdate period of kisspeptin neurones in the  
274 rat ARC. After BrdU injection at different stages of gestation, the number of kisspeptin-ir cell bodies  
275 and kisspeptin-ir cell bodies containing BrdU-ir in their nuclei were counted in the ARC of adult  
276 female offspring. The degree of overlap between the BrdU-ir and the Hoechst nuclear staining was  
277 variable between cells whatever brain region examined. For quantification, cells double labelled for  
278 kisspeptin and BrdU were classified in two categories. The first category was referred as  
279 “kisspeptin/BrdU *filled*” and brought together kisspeptin-ir cell bodies containing compact and rather  
280 homogeneously distributed BrdU-ir in their nuclei (yellow arrows, Fig. 1 A to D). This category of  
281 BrdU-ir appeared more or less segmented depending on the nuclei (yellow arrows, Fig. 1 B to D). The  
282 second category was referred as “kisspeptin/BrdU *sparse punctate*” and brought together all  
283 kisspeptin-ir cell bodies containing only a few (<8) dispersed small dots of BrdU-ir in their nuclei  
284 (white arrows, Fig. 1 A to D) (blue bars Fig. 1 F). A qualitative analysis on a random sample of  
285 kisspeptin/BrdU-ir cell bodies was also performed at the confocal microscope as control, and  
286 confirmed the nuclear distribution of the BrdU-ir (Fig. 1 E).

287

288 Kisspeptin-ir cell bodies with a *filled* pattern of nuclear BrdU (which was the criteria chosen  
289 for neuronal birth dating) were first detected at E12.5. Their percentage trended to increase 4-fold  
290 between E12.5 and E14.5 ( $p=0.06$ , yellow bars Fig. 1 F). At E15.5, the percentage of kisspeptin-ir cell

291 bodies with *filled* BrdU labelling reached its maximum, being significantly higher than at E12.5, E13.5  
292 and E17.5 ( $p < 0.01$  for E12.5 and E17.5 and  $p < 0.05$  for E13.5, yellow bars Fig. 1 F).

293

294 Kisspeptin-ir cell bodies with a *sparse punctuate* pattern of nuclear BrdU were already  
295 detected at E11.5, the earliest stage analysed. Their proportion increased significantly 5.5-fold  
296 between E11.5 and E12.5 ( $p < 0.05$ , blue bars Fig. 1 F) and remained high until E13.5 before starting to  
297 slowly decrease until E17.5 when it became significantly lower ( $p < 0.05$ , blue bars Fig. 1 F).

298

### 299 **Spatiotemporal appearance of kisspeptin immunoreactivity in embryonic rat brain**

300 The second aim of this study was to determine the embryonic stage and neuroanatomical site  
301 of onset of kisspeptin-ir. Considering previous reports showing kisspeptin and GnRH co-expression in  
302 migrating cells of the nasal cavity of human foetuses (12) and suggesting a precocious functional link  
303 between kisspeptins and GnRH neurones in mouse embryo (14), a particular attention was taken on  
304 the migratory pathways of the GnRH neurones from the olfactory placode to the POA. No kisspeptin-  
305 ir was observed along the GnRH neurone migratory pathways either on the vomeronasal organ nor  
306 along the terminal/olfactory nerves.

307

308 In the POA of E18.5 rats we repeatedly detected one or two kisspeptin-ir cell-like profiles per  
309 section just above the optic chiasma in each of the 6 rats examined in the sagittal plane at this stage (3  
310 females and 3 males). These were round and heavily labelled, with a diameter averaging 10  $\mu\text{m}$  and  
311 without processes (Fig. 2A). This pattern of immunoreactivity was no more detected at older stages.

312

313 Kisspeptin-ir cells were much more numerous in the ARC where these were first detected at  
314 E14.5 in both sexes (data not shown). Fig 2 displays a high magnification view of these kisspeptin-ir  
315 cells in the ARC/ME at E18.5, the age where kisspeptin-immunoreactivity was the most abundant.  
316 ARC kisspeptin-ir cells were ovoid with an average diameter of 10 $\mu\text{m}$  and most of these were  
317 polarised with one small process (Fig.2 B). Kisspeptin-ir was observed in the cytoplasm as a thin rim  
318 surrounding the nucleus (Fig. 2 B and C) as previously described for ARC kisspeptin-ir cell bodies in

319 adult (7). A particular attention was also payed to the presence of immunoreactive fibres in the ME. In  
320 both males and females, kisspeptin-ir varicose fibres were first detected in the median eminence at  
321 E18.5 and were more frequently observed in the frontal plane, following a medio-lateral orientation  
322 (Fig. 2 D). The few kisspeptin-ir fibres detected on sagittal sections were generally shorter than in the  
323 frontal plane (data not shown). At E22.5 no kisspeptin-ir fibres could be detected in the ME. These  
324 reappeared after birth at PND0 albeit still less numerous than that described in adult pro-oestrous  
325 female rats (7). Pre-adsorbition of the primary antibody anti-kisspeptin (N-ter) with 0.1  $\mu$ M rat  
326 kisspeptin-52 totally abolished the kisspeptin-ir at E18.5 (Fig. 3 A and B). This confirmed the  
327 specificity of the kisspeptin-ir staining observed on these rat embryos. Immunoreactive cells were  
328 clearly detected on both sagittal (Fig. 3 A) and frontal sections (Fig. 3 C). The same pattern of  
329 kisspeptin-immunoreactivity was observed with the use of an antibody directed against the C-terminal  
330 amidated part of kisspeptins (Fig. 3 D).

331

332 No sex difference was observed in the distribution of kisspeptin-ir cell bodies in the ARC.  
333 Between E14.5 and E18.5 detectable kisspeptin-ir cell bodies spread both along the medio-lateral and  
334 antero-posterior axis (Fig. 4 A, B). The clear antero-posterior gradient observed in the adult (Fig. 4 C)  
335 was not yet apparent at E18.5 (Fig. 4 B). The mean number of kisspeptin-ir cells per ARC was  
336 estimated  $800 \pm 90$  in adult dioestrous females (experiment 1). A statistically significant increase was  
337 measured between the anterior and posterior portion of the adult ARC ( $p < 0.05$ , Fig. 4 C).

338

### 339 **Quantification of kisspeptin-ir cells across embryonic stages**

340 Kisspeptin-ir cells were first detected at E14.5 in the ARC of both sexes at a mean of  $15 \pm$   
341  $1.7$  cell bodies per female ARC (grey bars, Fig. 5A) and  $11.3 \pm 4.8$  cell bodies per male ARC (white  
342 bars, Fig. 5A). At E16.5, a 6-fold increase in the mean number of kisspeptin-ir cell bodies per ARC  
343 was observed in both sexes compared to E14.5 with an average of  $84.0 \pm 20.0$  cells for females (grey  
344 bars, Fig. 5A) and  $73.3 \pm 14.7$  cells for males (white bars, Fig. 5A). At E18.5, the mean number of  
345 kisspeptin-ir cells increased 30-fold compare to E14.5 and 5-fold compared to E16.5 for both sexes  
346 (Fig. 5A). The mean number of kisspeptin-ir cell bodies per ARC at E18.5 was  $474.7 \pm 199.1$  for

347 females (grey bars, Fig. 5A) and 441.3 +/- 64.8 for males (white bars, Fig. 5A). Interestingly, a  
348 dramatic decrease of kisspeptin-ir cell bodies' number per ARC was observed at E22.5 with a mean  
349 number of kisspeptin-ir cell bodies per ARC of 81.0 +/- 35.1 for females (grey bars, Fig. 5A) and of  
350 32 +/- 32 for males (white bars, Fig. 5A). Finally, a slight increase in the mean numbers of kisspeptin-  
351 ir cell bodies was observed on the day of birth (PND0) compared to E22.5 which however remained 4-  
352 fold lower than at E18.5: 122.0 +/- 15.6 kisspeptin-ir cell bodies per female ARC and 120.0 +/- 36.5  
353 kisspeptin-ir cell bodies per male ARC (grey and white bar respectively, Fig. 5A). Since no  
354 statistically significant differences between sexes were observed at any stage of development, results  
355 from both sexes were pooled for statistical analysis of differences between ages (black bars, Fig. 5 A).  
356 The mean number of kisspeptin-ir cell bodies at E18.5 was significantly higher than all other ages  
357 studied ( $p < 0.05$ , black bars Fig. 5A).

358

#### 359 **Detection and localization of kiss1 mRNA in embryonic brain**

360 In order to support the results obtained using immunohistochemistry, experiments were  
361 undertaken to verify the presence of *Kiss1* mRNA in the mediobasal hypothalamus at these early  
362 embryonic stages. By *in situ* hybridization, we were unable to detect any cluster of silver grains either  
363 at E19 (Fig. 5 B) nor at E16 (data not shown) although numerous kiss 1 mRNA expressing cells (as  
364 detected by the presence of clusters of silver grains) could be observed in the ARC of PND18 (Fig. 5  
365 C) and PND29 rats (data not shown). This encouraged us to rely on a more sensitive technique. By  
366 real time RT-PCR we managed to detect a mediobasal hypothalamic expression of *Kiss1* in all the rats  
367 analysed at embryonic stages E14.5 , E16.5, and E18.5 and in two out of three rats at E22.5 (Fig. 5D  
368 and E). By contrast only traces of *Kiss1* expression were detected in punches sampled through the  
369 tongue, whose ratio of *Kiss1* over RPS11 mRNA fell into the 0.1%-0.2% range. All the E16.5 rats  
370 displayed higher levels of hypothalamic *Kiss1* mRNA than any of the E14.5 or E22.5 rats analysed.  
371 The highest level of hypothalamic *Kiss1* mRNA was detected in the E18.5 rat.

372

373

374

375 **Discussion**

376

377 **Period of neurogenesis of ARC kisspeptin neurones**

378 According to the BrdU pulse labelling birth dating experiment, the period of neurogenesis of  
379 ARC kisspeptin neurones begun between E11.5 and E12.5, reached its peak at E15.5 and continued  
380 beyond E17.5. It therefore encompasses most of the neurogenesis period described for other  
381 parvicellular neurones of the posterior hypothalamus (41-43). As compared to the neurogenesis time  
382 period described to date for other hypothalamic neurones (34, 41-43), the onset and peak of  
383 neurogenesis of kisspeptin neurones occurred relatively late. This is consistent with the model put  
384 forward by Markakis and collaborators stipulating that the most posterior neuronal populations of the  
385 hypothalamus are born after the most anterior ones (41). The neurogenesis period of kisspeptin  
386 neurones extended beyond E17.5 and one cannot exclude the possibility of later periods of  
387 neurogenesis for ARC kisspeptin neurones. The hypothalamus, centre of homeostasis, is a structure of  
388 great structural plasticity throughout life and there is increasing evidence that neurogenesis can be  
389 reactivated in this area of the brain by physiological stimuli beyond the embryonic stage (44).

390

391 Interestingly, different patterns of BrdU labelling were observed as previously described by  
392 others (45-47). The kisspeptin/BrdU-ir *filled* contained more or less segmented BrdU-ir which may  
393 reflect maturation of these kisspeptin-ir cells during the 3 months survival time following BrdU  
394 injections. During maturation, the DNA of a cell can indeed be subject to important chromatin  
395 remodelling that may interfere with the accessibility of the anti-BrdU antibody (46). The *sparse*  
396 *punctate* BrdU labelling may be due to a dilution of the BrdU in course of successive cell cycle  
397 divisions of kisspeptin neurone progenitors as previously shown for other neuronal types (46, 48). One  
398 can note that the surge in the percentage of kisspeptin-ir cells with a *sparse punctuate* pattern of BrdU-  
399 ir preceded and was wider than the surge in the percentage of kisspeptin-ir cells with a *filled* pattern of  
400 BrdU-ir, which supports the hypothesis that these cells were pulse labelled by BrdU at the progenitor  
401 stage.

402

### 403 **Spatiotemporal onset of kisspeptin expression in embryo**

404 In this study, another aim was to determine the spatio-temporal appearance of kisspeptin-ir in  
405 the rat embryos of both sexes. Kisspeptin-ir cells could readily be detected by immunohistochemistry  
406 as early as E14.5 in the ARC that is shortly after the onset of neurogenesis of ARC kisspeptin  
407 neurones. To support this result, we also demonstrate *Kiss1* expression in the mediobasal  
408 hypothalamus at this early embryonic stage. This suggests that these neurones are born locally and  
409 start synthesizing kisspeptins rapidly after the last cell cycle exit. Such a precocious synthesis has  
410 already been observed for other neuropeptides of the arcuate nucleus as for example NPY or POMC  
411 (47). The first kisspeptin-ir cells were detected close to the third ventricle and they were further  
412 detected laterally, rostrally and caudally between E14.5 and E18.5. It is therefore likely that kisspeptin  
413 neuroblasts synthesise kisspeptin prior to the end of their migration which, for most hypothalamic  
414 neurones occurs in an outward-inward sequence from the lining of the 3rd ventricle (49, 50). The  
415 number of kisspeptin-ir cells increased between E14.5 and E18.5 consistent with increased  
416 neurogenesis and acquisition of kisspeptin synthesis during this time period. Consistently, the level of  
417 hypothalamic *Kiss1* mRNA was found higher in the E16.5 and E18.5 rats than in the E14.5 rats. At  
418 E18.5, the mean number of kisspeptin-ir cell bodies in the ARC was about half that estimated from our  
419 first experiment on adult dioestrous females. This is consistent with our *in situ* hybridization data  
420 showing higher *Kiss1* expression in postnatal cells (Fig. 5 B and C) and with our recent finding that  
421 the number of kisspeptin-ir cells in the ARC significantly increases around female puberty in rats (E.  
422 Desroziers and I. Franceschini, unpublished observations). As for the POA, in the absence of  
423 specificity controls for the few cell-like kisspeptin-ir profiles observed above the optic chiasma in  
424 E18.5 animals, it will definitely be important to increase the sensitivity of the *in situ* hybridization  
425 method to test whether or not expression of *Kiss1* already occurs pre-natally in the POA as it does in  
426 the ARC. There is so far no evidence from the literature for *Kiss1* expression in this area prior to the  
427 infantile period (17). In contrast to what has been reported in human embryos (12), kisspeptin-ir cells  
428 were totally absent in the embryonic peripheral olfactory pathway of rats. This observation may be  
429 related to the suspected cross-reactivity of the antibody used by Morelli and collaborators with other

430 RFamide peptides (13). On the other hand one cannot exclude the possibility of species differences in  
431 the distribution of kisspeptins.

432

### 433 **A prenatal sex-independent decrease in kisspeptin-ir**

434         Of particular interest a sharp decrease in the number of kisspeptin-ir cells was detected  
435 between E18.5 and E22.5 in both females as in males, suggestive of sex-independent regulatory  
436 factor(s). This decrease occurred close to parturition, a period during which numerous changes in the  
437 level of different hormones in the mother but also in the foetus occur, known to interfere with  
438 numerous neuropeptidergic systems (51). One possibility is that the sharp decrease in kisspeptin-ir  
439 detected between E18.5 and E22.5 in part reflects kisspeptin release. Based on results obtained with  
440 the anti-kisspeptin (C-ter), one can assume that most kisspeptins are already amidated at this stage of  
441 development and hence biologically active (52, 53). It is interesting to note that this decrease in  
442 kisspeptin-immunoreactivity coincided with the previously reported arrival of GnRH fibres within the  
443 median eminence (54, 55) and onset of GnRH release into the circulation (55). Previous  
444 pharmacological studies on embryonic cultures of GnRH neurones have suggested that kisspeptins  
445 could act both as a guidance factor for developing GnRH neurites (14) and as an enhancer of GnRH  
446 pulsatile secretion (15). The kinetics of the immunoreactivity changes observed in the present *in vivo*  
447 study are compatible with the hypothesis of embryonic kisspeptins being secreted close to birth to  
448 facilitate GnRH release. Nevertheless future studies remain necessary to precisely characterize the  
449 respective turnover of *Kiss1* expression and kisspeptin synthesis/release at this critical period of  
450 development and the associated regulatory factors. In embryonic brains, *Kiss1r* has previously been  
451 shown in mice POA explants (14) and in GnRH neurones in particular (15). In PND0 mice its  
452 expression seems to be confined to GnRH neurones (8) but a wider expression range during  
453 embryonic development cannot be excluded. It is not unusual for neurotransmitters to play different  
454 roles during embryogenesis as compared to adulthood. In light of the known negative effect of  
455 kisspeptins on cell survival, proliferation and migration in other tissues (56, 57) and molecular  
456 interactions with signalling pathways of receptors involved in neural cell chemotaxis (58), embryonic  
457 kisspeptin may well be involved in wider morphogenic events of the developing brain.

458 **Acknowledgements**

459 We are grateful to Dr. R Steiner for affinity purification of the anti-kisspeptin (C-ter) AC564  
460 antibody, to Marylin Cateau for technical assistance, to Dr. G. Bruneau for helpful advices concerning  
461 *in situ* hybridization protocols and analysis and to Claude Cahier for animal husbandry. This work  
462 was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, France), the  
463 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), the University of Tours  
464 (France), the NOVO Nordisk Foundation, the Danish Medical Research Council and a grant  
465 from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-CESA-006). Elodie Desroziers was  
466 supported by a fellowship from INRA and the Region Centre (France).

467

468

469 **Figure Legends**

470

471 **Figure 1: Neurogenesis of kisspeptin neurones in the ARC**

472 A to D: Photomicrographs of double immunofluorescence-labelled sections displaying the various  
473 pattern of nuclear BrdU immunoreactivity (red) encountered in kisspeptin-ir (green) neurones of the  
474 posterior ARC. Examples of cells classified as with *filled* and *sparse punctate* nuclear BrdU-ir are  
475 pointed by yellow and blue arrows respectively. E: Double immunofluorescent staining against  
476 BrdU (in red) and kisspeptin (in green), observed by confocal microscopy in the arcuate  
477 (ARC) nucleus. Hoechst staining in blue confirmed the nuclear localisation of the BrdU. The  
478 red line and the green line in the xy image indicate the place of optical section in the YZ  
479 plane, and in the XZ plane respectively.. F: Histogram representing the percentage of kisspeptin  
480 neurones with sparse punctate (blue bars) versus filled (yellow bars) nuclear BrdU-ir depending on the  
481 time of BrdU injection during embryonic development. Statistical differences ( $p < 0.05$ ) between times  
482 of BrdU injection are represented by different letters (y and z for BrdU-filled; a and b for BrdU-total  
483 (sparse punctate + filled). E, embryonic day. Scale bar (A, B, C, D) 20  $\mu\text{m}$  and (E) 10  $\mu\text{m}$ .

484



485 **Figure 2: Kisspeptin-ir cell bodies and fibres in the POA and ARC/ME at E18.5.**

486 Representative high magnification views of immunoperoxidase-labelled kisspeptin-ir cell bodies in the  
487 POA of a female rat (A) and in the ARC of a male rat (B). Kisspeptin-immunoreactivity (green)  
488 surrounds a Hoechst-labelled nucleus (blue) in the 6  $\mu\text{m}$  thick-confocal stack (z step = 1 $\mu\text{m}$ ) through  
489 the immunofluorescence-labelled neurone shown in (C). Kisspeptin-ir varicose fibres were observed in  
490 the ME (D, which corresponds to a higher magnification of the boxed area in Fig. 3 D). Scale bar (A  
491 to D) 10  $\mu\text{m}$

492

493 **Figure 3: Control experiments for the specificity of kisspeptin-ir in embryonic brain**

494 Representative photomicrographs showing ARC kisspeptin-ir cells in sagittal (A and B) or frontal (C  
495 and D) sections labelled with anti-kisspeptin (N-ter) (A, B, and C) or anti-kisspeptin (C-ter) (D) by  
496 immunoperoxidase. Kisspeptin-ir cell bodies (arrows) were observed under control conditions (A) but  
497 not in consecutive sections after pre-adsorption with 0.1  $\mu\text{M}$  rat kisspeptin-52 (B). Kisspeptin-ir cell  
498 bodies (arrows) and fibres (arrowheads) were equally observed with anti-kisspeptin (N-ter) (C) and  
499 with anti-kisspeptin (C-ter) (D). 3V, third ventricle; ME, median eminence. Scale bar (A, B, C, D) 50  
500  $\mu\text{m}$ .

501

502 **Figure 4: Kisspeptin-ir cell body distribution in the embryonic rat POA and ARC and adult rat**  
503 **ARC**

504 Representative schemes (adapted from (37)) of sagittal brain sections at E14.5 (A) and E18.5 (B)  
505 displaying the localisation of POA (asterix) and ARC (squares) kisspeptin-ir cells. At E14.5 (A),  
506 kisspeptin-ir cell bodies were not observed in lateral sections of the ARC contrary to medial sections  
507 where the first kisspeptin-ir cell bodies were detected (dots). At E18.5 (B), a few kisspeptin-ir cell  
508 bodies were observed in lateral sections of the ARC (dots). Their number and rostrocaudal extent  
509 increased medially. A few kisspeptin-ir cell bodies were detected anterior to the rostral 3V at E14.5  
510 (asterix, A) and just dorsal to the optic chiasma in the POA at E18.5 (asterix, B). In adult (C),  
511 distribution of kisspeptin-ir cell bodies in three sections of a representative rat and number of  
512 kisspeptin-ir cell bodies throughout the rostrocaudal axis on one representative female rat. 3V; LV,

513 lateral ventricle; OC, optic chiasma; POA, preoptic area; SO, supraoptic nucleus; ME, median  
514 eminence VMH, ventro-medial hypothalamus; MB, mammillary bodies; Pit, pituitary; Apit, anterior  
515 pituitary; Ppit, posterior pituitary; BSph, sphenoid bones; NasE, Nasal epithelium; A, anterior; P,  
516 posterior; D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral.

517

518 **Figure 5: Quantitative analysis of kisspeptin-ir cell bodies and kiss1 mRNA across embryonic**  
519 **development**

520 A: Histogram representing the developmental progression in the number of ARC kisspeptin-ir cells.  
521 Females (grey bars) and males (white bars) displayed similar quantities of kisspeptin-ir cells at each  
522 developmental stage and statistical analysis of developmental variations was done on the total rat  
523 population of each group regardless of sex (black bars). Bars labelled with different letters are  
524 significantly different from each other at  $p < 0.01$ . E, embryonic day; PND, post-natal day. B, C:  
525 Photomicrographs of the ARC after *in situ* hybridization with a S35-labelled *Kiss1* oligonucleotide  
526 probe. Note the absence of detectable *Kiss1* cells at E19 (B) which contrasts with the numerous *Kiss1*  
527 cells detected at PND19 (C). D: Histogram representing the ratio of *Kiss1* over RPS11 mRNA across  
528 embryonic stages. E: A representative cresyl violet-stained sagittal section through the brain of an  
529 E16.5 embryo (at the level of the square area delimited in the bottom left inset scheme adapted from  
530 Figure 122 of the the Paxinos and Ashwell atlas of the developing rat nervous system (37)  
531 illustrating the accurate positioning of the mediobasal hypothalamic punch. The mesencephalic  
532 flexure is pointed by an arrow; A, anterior; P, posterior; D, dorsal; V, ventral. Scale bar (B, C) 50 $\mu$ m  
533 and (E) 1mm.

534

535

536

537

538

539

540

541

542 References

543  
544

- 545 1. Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, Okamura  
546 H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus.  
547 *Brain Res.* 2010; **1364**:103-15.
- 548 2. Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, Kisspeptin, GPR54 and the Pre-Ovulatory  
549 Luteinising Hormone Surge. *Journal of Neuroendocrinology.* 2009; **21**(4): 305-11.
- 550 3. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR,  
551 Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin directly  
552 stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc*  
553 *Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**(5): 1761-6.
- 554 4. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castano JP, Malagon MM,  
555 Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M. Ontogeny and mechanisms of  
556 action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of  
557 the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2006; **257**:875-83.
- 558 5. Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E. An increase in kisspeptin-  
559 54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1  
560 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology.* 2008;  
561 **149**(8): 4151-7.
- 562 6. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE.  
563 Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol.* 2009;  
564 **21**(8): 673-82.
- 565 7. Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, Franceschini  
566 I. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol.* 2010;  
567 **22**(10): 1101-12.
- 568 8. Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal  
569 development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone  
570 neurons. *Endocrinology.* 2010; **151**(1): 312-21.
- 571 9. Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa  
572 M, Okamura H, Maeda KI, Tsukamura H. Ultrastructural Evidence of Kisspeptin-  
573 Gonadotrophin-Releasing Hormone Interaction in the Median Eminence of Female Rats:  
574 Implication of Axo-Axonal Regulation of GnRH Release. *J Neuroendocrinol.* 2011; **Epub**  
575 **ahead of print.**
- 576 10. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse  
577 hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone  
578 neurons. *Endocrinology.* 2006; **147**(12): 5817-25.
- 579 11. Liu X, Porteous R, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Millar R, Petersen SL,  
580 Herbison AE. Frequency-dependent recruitment of fast amino acid and slow neuropeptide  
581 neurotransmitter release controls gonadotropin-releasing hormone neuron excitability. *J*  
582 *Neurosci.* 2011; **31**(7): 2421-30.
- 583 12. Morelli A, Marini M, Mancina R, Luconi M, Vignozzi L, Fibbi B, Filippi S, Pezzatini  
584 A, Forti G, Vannelli GB, Maggi M. Sex steroids and leptin regulate the "first Kiss" (KiSS  
585 1/G-protein-coupled receptor 54 system) in human gonadotropin-releasing-hormone-secreting  
586 neuroblasts. *J Sex Med.* 2008; **5**(5): 1097-113.
- 587 13. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi  
588 MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate  
589 nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology.* 2007;  
590 **148**(12): 5752-60.

- 591 14. Fiorini Z, Jasoni CL. A novel developmental role for kisspeptin in the growth of  
592 gonadotrophin-releasing hormone neurites to the median eminence in the mouse. *J*  
593 *Neuroendocrinol.* 2010; **22**(10): 1113-25.
- 594 15. Constantin S, Caligioni CS, Stojilkovic S, Wray S. Kisspeptin-10 facilitates a plasma  
595 membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons.  
596 *Endocrinology.* 2009; **150**(3): 1400-12.
- 597 16. Constantin S, Caraty A, Wray S, Duittoz AH. Development of gonadotropin-releasing  
598 hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinology.* 2009; **150**(7): 3221-7.
- 599 17. Cao J, Patisaul HB. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors  
600 alpha and beta and *Kiss1* in neonatal male and female rats. *J Comp Neurol.* 2011; **Epub**  
601 **ahead of print.**
- 602 18. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-  
603 Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally  
604 regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54,  
605 in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide.  
606 *Endocrinology.* 2004; **145**(10): 4565-74.
- 607 19. Iijima N, Takumi K, Sawai N, Ozawa H. An immunohistochemical study on the  
608 expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly  
609 developed anti-kisspeptin antibody. *J Mol Neurosci.* 2010; **43**(2): 146-54.
- 610 20. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE,  
611 Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of *Kiss1* gene expression in the brain of  
612 the rat. *Endocrinology.* 2007; **148**(4): 1774-83.
- 613 21. Bateman HL, Patisaul HB. Disrupted female reproductive physiology following  
614 neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased  
615 GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology.* 2008;  
616 **29**(6): 988-97.
- 617 22. Bellingham M, Fowler PA, Amezcaga MR, Rhind SM, Cotinot C, Mandon-Pepin B,  
618 Sharpe RM, Evans NP. Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-  
619 disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and  
620 pituitary gland. *Environ Health Perspect.* 2009; **117**(10): 1556-62.
- 621 23. Dickerson SM, Cunningham SL, Patisaul HB, Woller MJ, Gore AC. Endocrine  
622 disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology.*  
623 2010; **152**(2): 581-94.
- 624 24. Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa  
625 T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H.  
626 Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular  
627 kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol Reprod.* 2009; **81**(6):  
628 1216-25.
- 629 25. Knox AM, Li XF, Kinsey-Jones JS, Wilkinson ES, Wu XQ, Cheng YS, Milligan SR,  
630 Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters  
631 hypothalamic *Kiss1* and *Kiss1r* mRNA expression in the female rat. *J Neuroendocrinol.* 2009;  
632 **21**(8): 683-9.
- 633 26. Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, Pineda  
634 R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1  
635 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation.  
636 *Endocrinology.* 2009; **150**(5): 2359-67.
- 637 27. Patisaul HB, Todd KL, Mickens JA, Adewale HB. Impact of neonatal exposure to the  
638 ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber  
639 density in male and female rats. *Neurotoxicology.* 2009; **30**(3): 350-7.

- 640 28. Sun Y, Perry GN, Yu J, Chen B, Tian Z. Effect of nourishing "Yin"-removing "Fire"  
641 Chinese herbal mixture on hypothalamic kisspeptin expression in female precocious rats. *J*  
642 *Ethnopharmacol.* 2010; **127**(2): 274-9.
- 643 29. Bai Y, Chang F, Zhou R, Jin PP, Matsumoto H, Sokabe M, Chen L. Increase of  
644 Anteroventral Periventricular Kisspeptin Neurons and Generation of E2-Induced LH-Surge  
645 System in Male Rats Exposed Perinatally to Environmental Dose of Bisphenol-A.  
646 *Endocrinology.* 2011; **152**(4): 1562-71.
- 647 30. Cao J, Mickens JA, McCaffrey KA, Leyrer SM, Patisaul HB. Neonatal Bisphenol A  
648 exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus.  
649 *Neurotoxicology.* 2011; **33**(1): 23-36.
- 650 31. Castellano JM, Bentsen AH, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Romero M, Garcia-  
651 Galiano D, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Mikkelsen JD, Tena-Sempere M. Early metabolic  
652 programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions  
653 on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system.  
654 *Endocrinology.* 2011; **152**(9): 3396-408.
- 655 32. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Fujisawa S, Kinouchi R, Gereltsetseg G,  
656 Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic  
657 *Kiss1* expression and the timing of puberty in female rats. *J Physiol.* 2011; **588**(Pt 5): 821-9.
- 658 33. Losa SM, Todd KL, Sullivan AW, Cao J, Mickens JA, Patisaul HB. Neonatal  
659 exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling  
660 pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod Toxicol.* 2010.
- 661 34. Amiot C, Brischoux F, Colard C, La Roche A, Fellmann D, Risold PY.  
662 Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing  
663 ventral diencephalon. *Eur J Neurosci.* 2005; **22**(2): 531-4.
- 664 35. Caraty A, de Reviere MM, Pelletier J, Dubois MP. Reassessment of LRF  
665 radioimmunoassay in the plasma and hypothalamic extracts of rats and rams. *Reprod Nutr*  
666 *Dev.* 1980; **20**(5A): 1489-501.
- 667 36. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates (Second Edition). San  
668 Diego, CA: Academic Press 1986.
- 669 37. Paxinos G, Ashwell KWS. Atlas of the developing rat nervous system (Third Edition).  
670 San Diego, CA: Academic Press 2008.
- 671 38. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin  
672 immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen  
673 receptor alpha. *Neuroscience Letters.* 2006; **401**(3): 225-30.
- 674 39. Larsen PJ, Mikkelsen JD, Jessop DS, Lightman SL, Chowdrey HS. Neuropeptide Y  
675 mRNA and immunoreactivity in hypothalamic neuroendocrine neurons: effects of  
676 adrenalectomy and chronic osmotic stimulation. *J Neurosci.* 1993; **13**(3): 1138-47.
- 677 40. Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Tena-Sempere M, Juul A, Mikkelsen JD.  
678 Maturation of kisspeptinergic neurons coincides with puberty onset in male rats. *Peptides.*  
679 2010; **31**(2): 275-83.
- 680 41. Markakis EA, Swanson LW. Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron  
681 generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; **24**(2-  
682 3): 255-91.
- 683 42. Brischoux F, Fellmann D, Risold PY. Ontogenetic development of the diencephalic  
684 MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis. *Eur J Neurosci.* 2001; **13**(9): 1733-44.
- 685 43. Legagneux K, Bernard-Franchi G, Poncet F, La Roche A, Colard C, Fellmann D,  
686 Pralong F, Risold PY. Distribution and genesis of the RFRP-producing neurons in the rat  
687 brain: comparison with melanin-concentrating hormone- and hypocretin-containing neurons.  
688 *Neuropeptides.* 2009; **43**(1): 13-9.

- 689 44. Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pillon D. Emerging new  
690 sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the  
691 hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci.* 2010; **32**(12): 2042-52.
- 692 45. Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF. Neurogenesis and stereological  
693 morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J*  
694 *Comp Neurol.* 2004; **469**(3): 325-39.
- 695 46. Sauerzweig S, Baldauf K, Braun H, Reymann KG. Time-dependent segmentation of  
696 BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or  
697 proliferation marker. *J Neurosci Methods.* 2009; **177**(1): 149-59.
- 698 47. Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM. Pomc-expressing progenitors give rise to  
699 antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nat Med.* 2010; **16**(4):  
700 403-5.
- 701 48. Bruneau G, Izvoloskaia M, Ugrumov M, Tillet Y, Duittoz AH. Prolonged neurogenesis  
702 during early development of gonadotropin-releasing hormone neurones in sheep (*Ovis Aries*):  
703 in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology.* 2003; **77**(3): 177-86.
- 704 49. Markakis EA. Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front*  
705 *Neuroendocrinol.* 2002; **23**(3): 257-91.
- 706 50. Altman J, Bayer SA. Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the  
707 specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *J Comp Neurol.* 1978;  
708 **182**(4 Pt 2): 995-1015.
- 709 51. Brunton PJ, Russell JA. Endocrine induced changes in brain function during  
710 pregnancy. *Brain Res.* 2010; **1364**:198-215.
- 711 52. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul  
712 E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN,  
713 Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the  
714 natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001; **276**(37):  
715 34631-6.
- 716 53. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A,  
717 Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE,  
718 Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott  
719 KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the  
720 peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001; **276**(31): 28969-75.
- 721 54. Daikoku S, Kawano H, Matsumura H, Saito S. In vivo and in vitro studies on the  
722 appearance of LHRH neurons in the hypothalamus of perinatal rats. *Cell Tissue Res.* 1978;  
723 **194**(3): 433-45.
- 724 55. Ugrumov MV, Ivanova IP, Mitskevich MS, Liposits Z, Setalo G, Flerko B.  
725 Axovascular relationships in developing median eminence of perinatal rats with special  
726 reference to luteinizing hormone-releasing hormone projections. *Neuroscience.* 1985; **16**(4):  
727 897-906.
- 728 56. Ramaesh T, Logie JJ, Roseweir AK, Millar RP, Walker BR, Hadoke PW, Reynolds  
729 RM. Kisspeptin-10 inhibits angiogenesis in human placental vessels ex vivo and endothelial  
730 cells in vitro. *Endocrinology.* 2010; **151**(12): 5927-34.
- 731 57. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R,  
732 Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knofler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G.  
733 Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of  
734 primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004; **117**(Pt 8): 1319-28.
- 735 58. Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC. Kisspeptin-10-induced signaling  
736 of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential  
737 mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer Res.* 2005; **65**(22):  
738 10450-6.

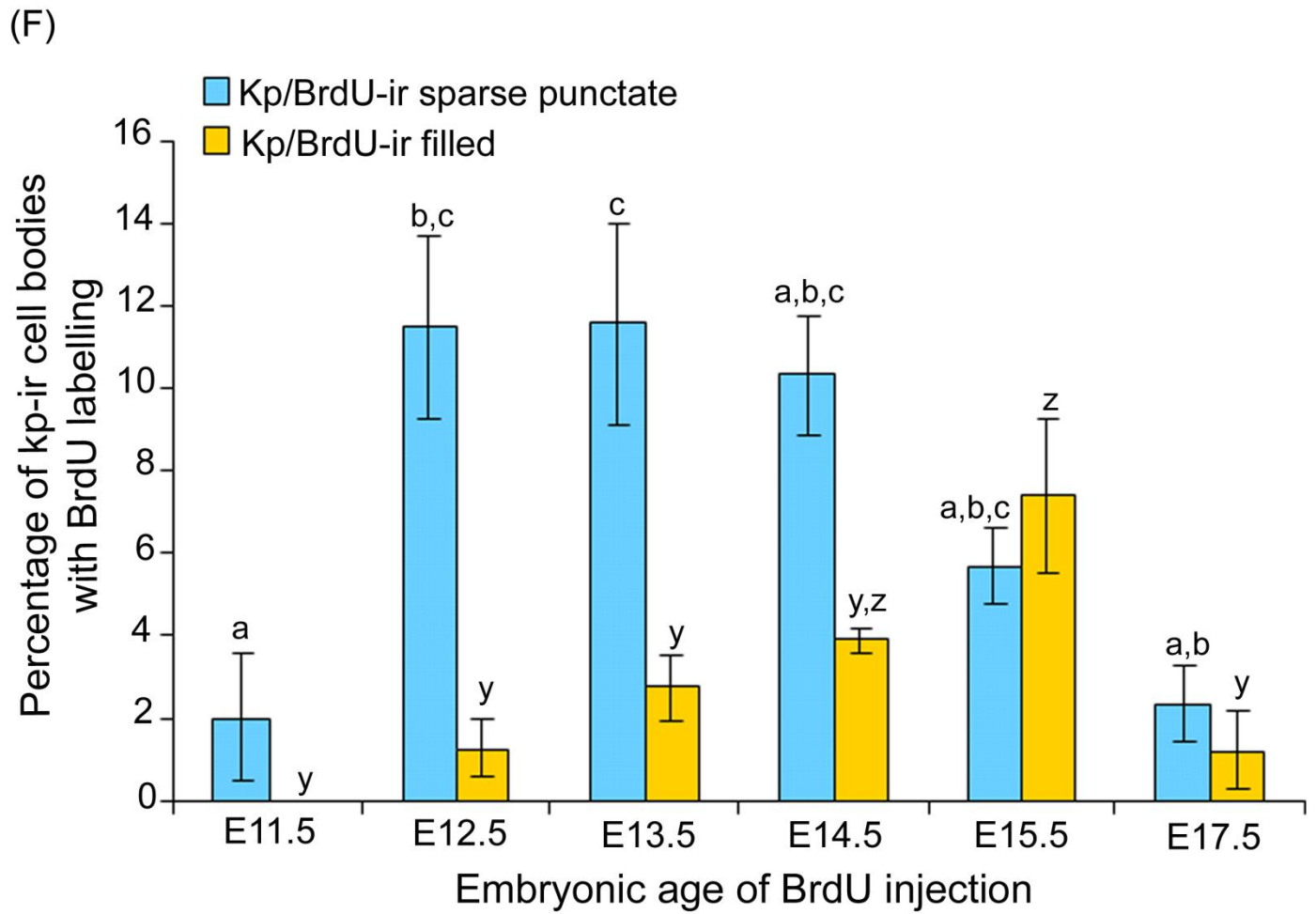
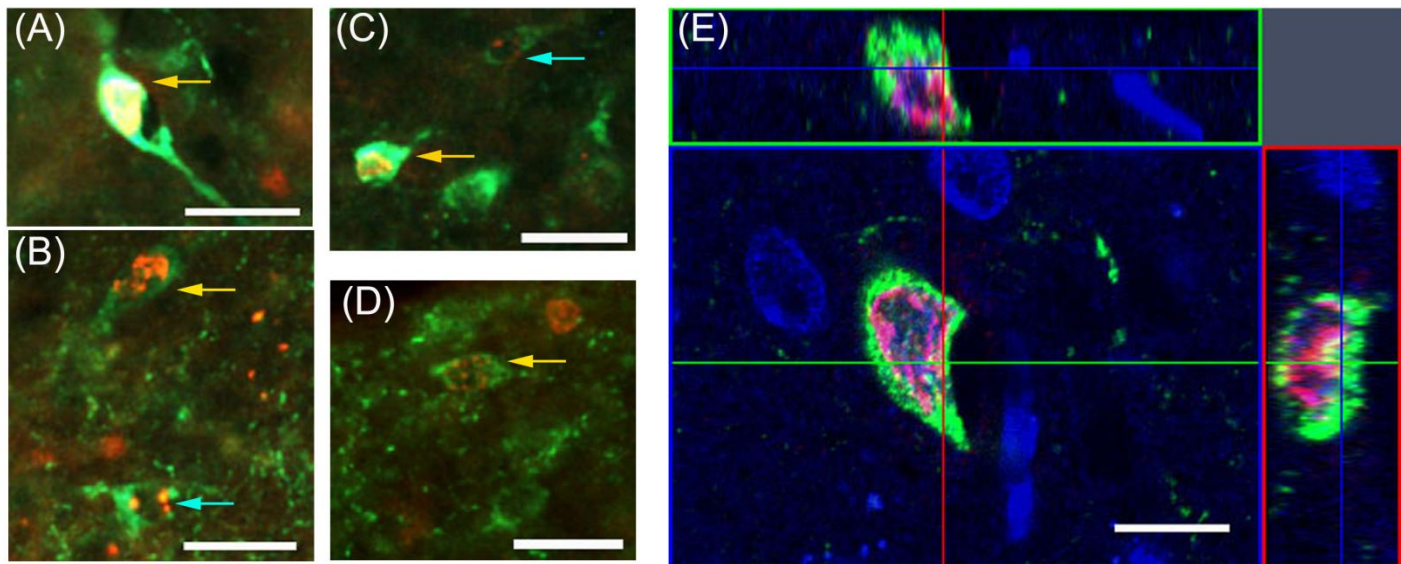


Figure 1

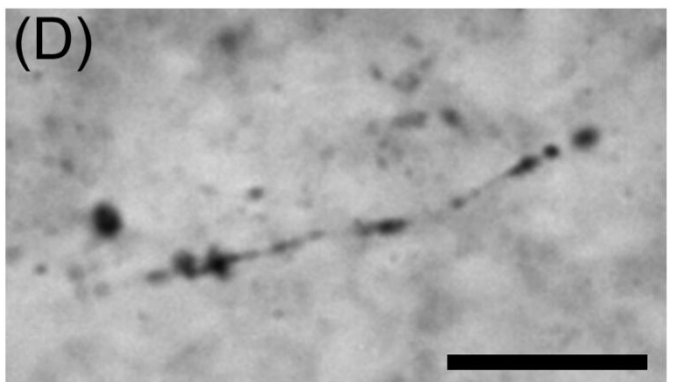
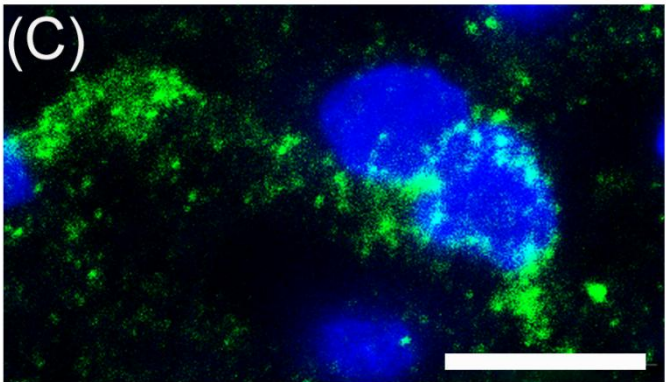
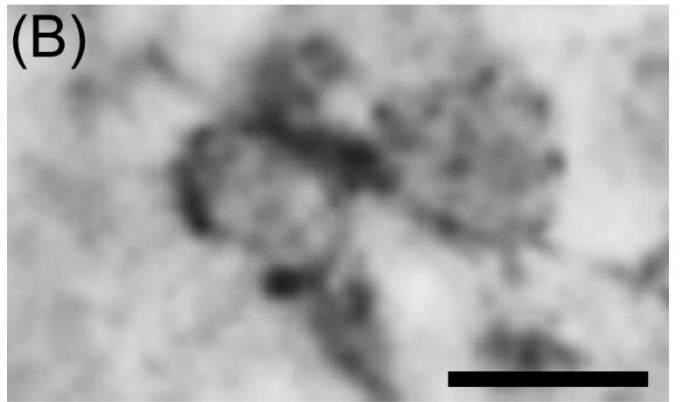
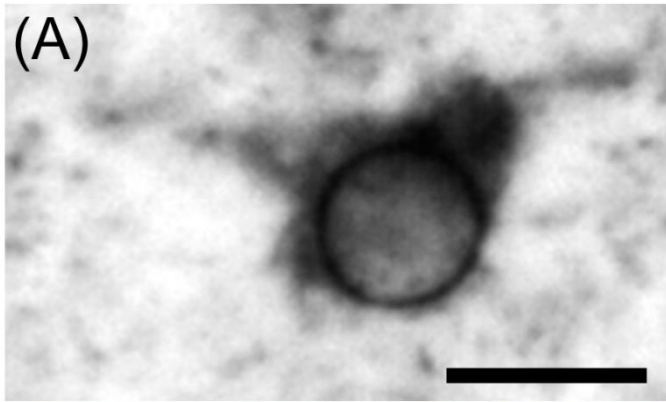


Figure 2



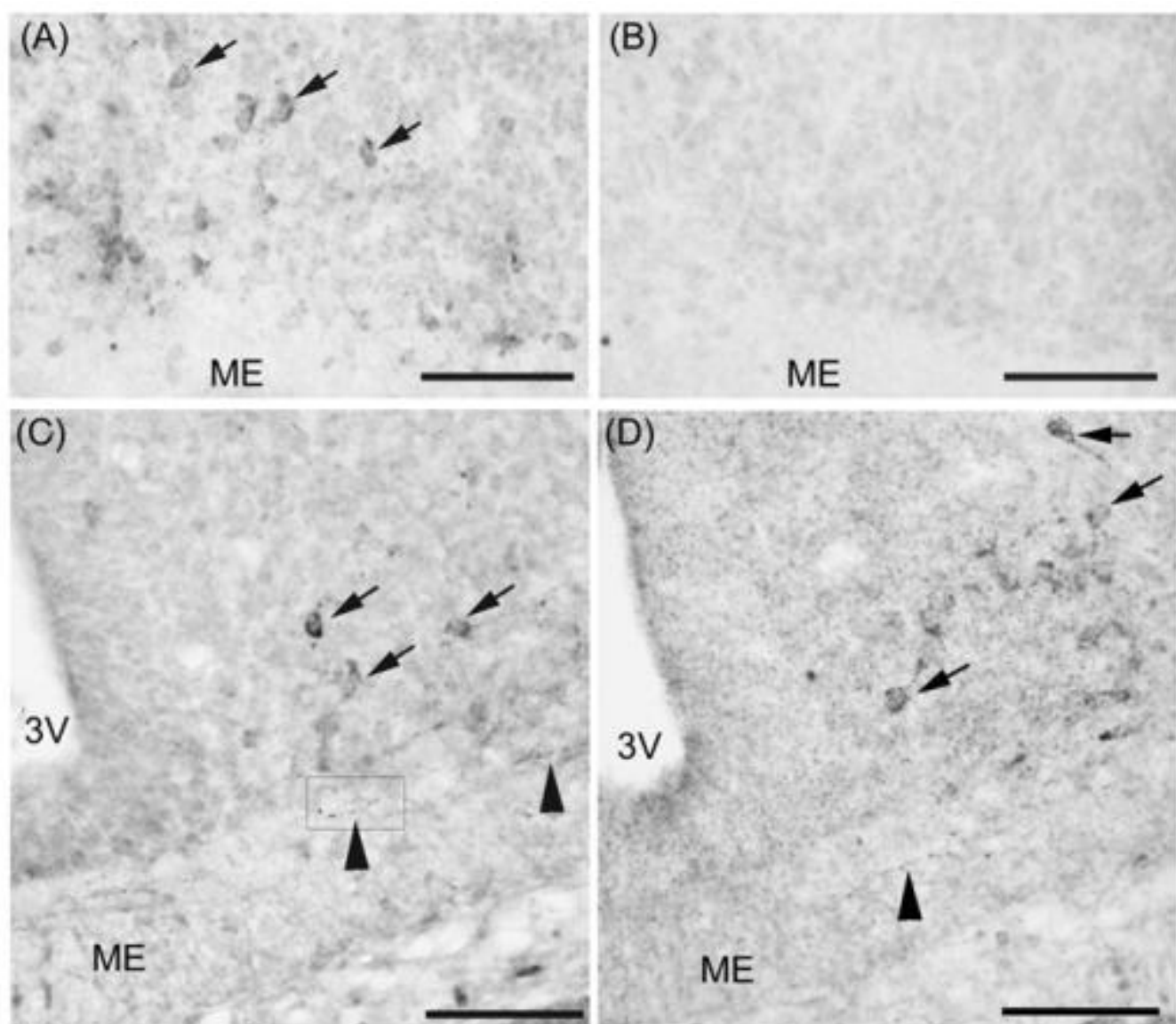
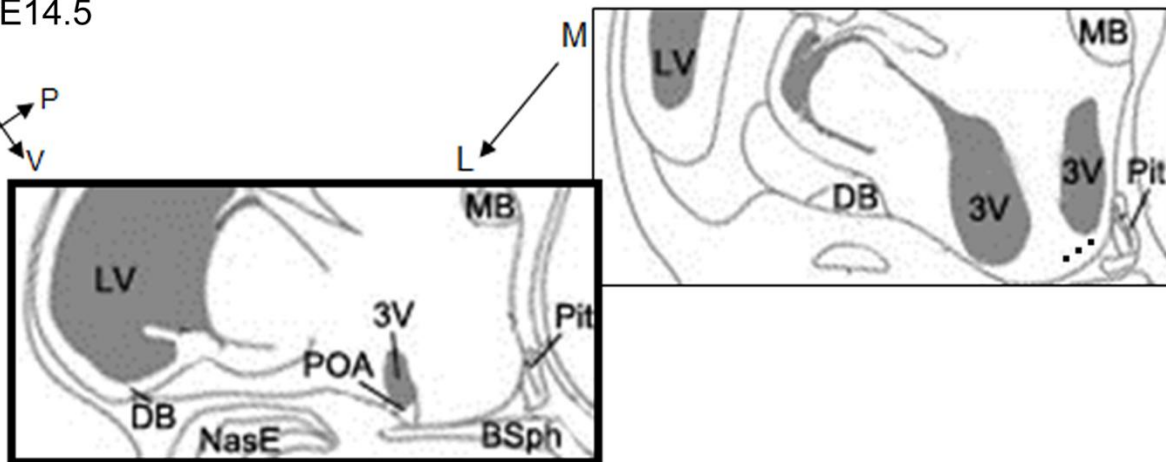
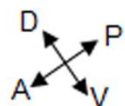
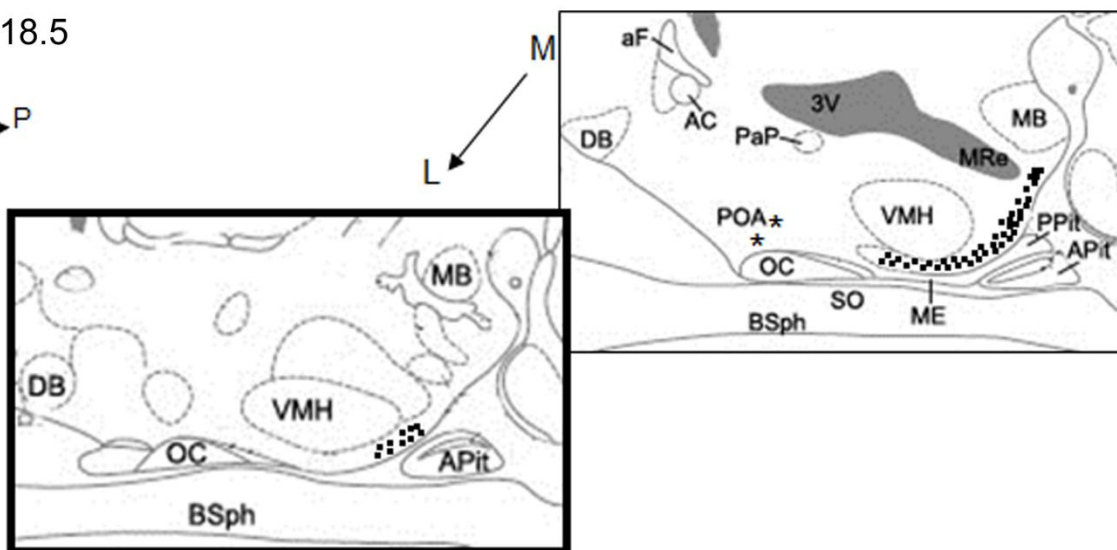
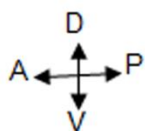


Figure 3

(A) E14.5



(B) E18.5



(C) Adult

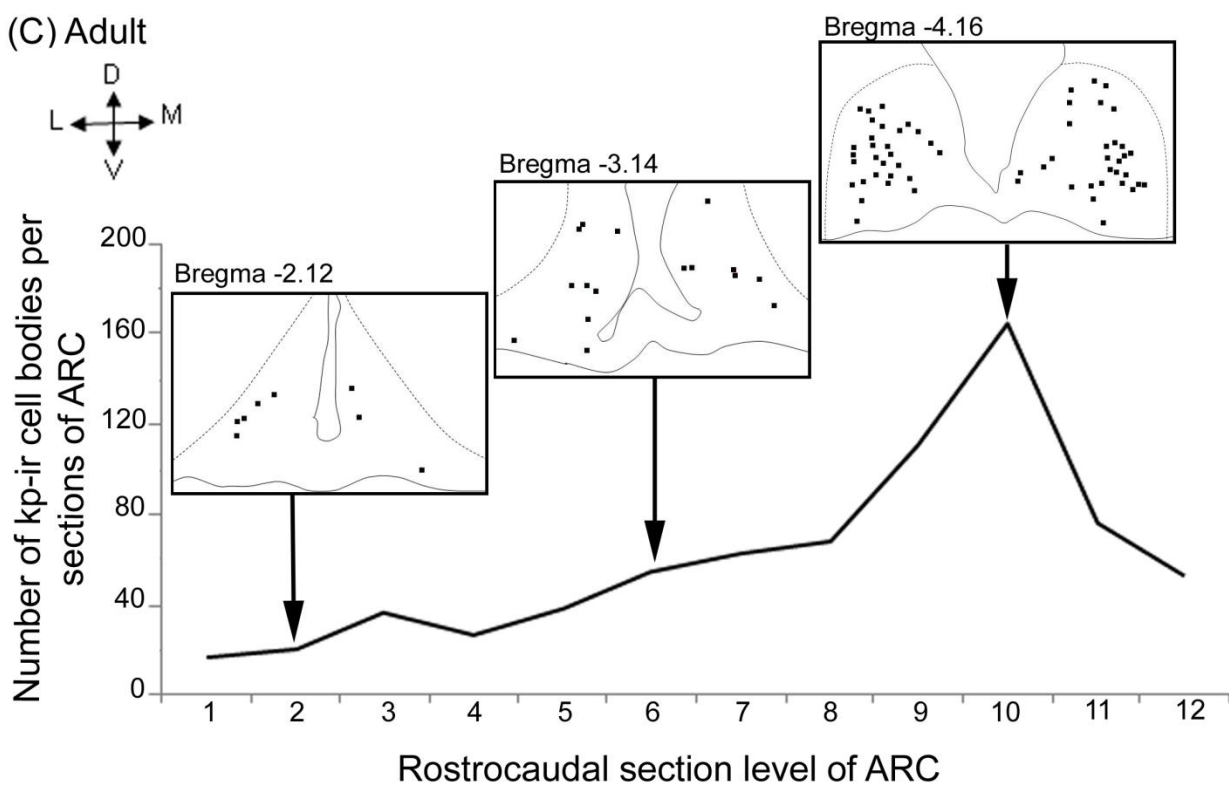
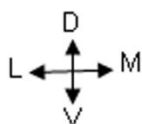


Figure 4

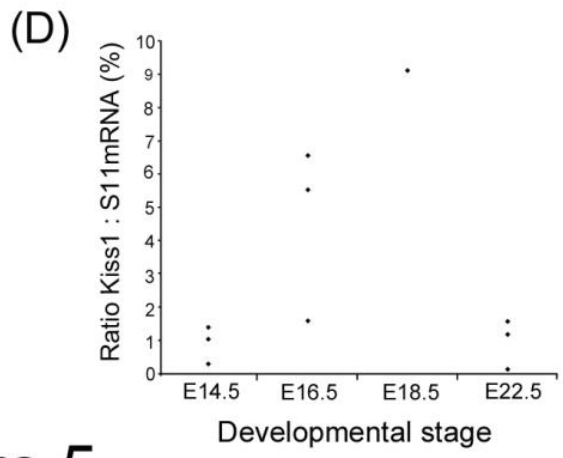
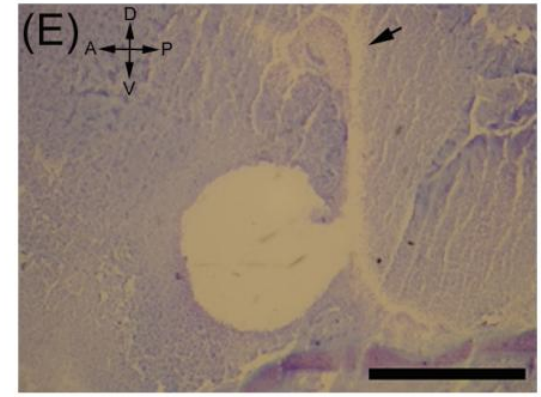
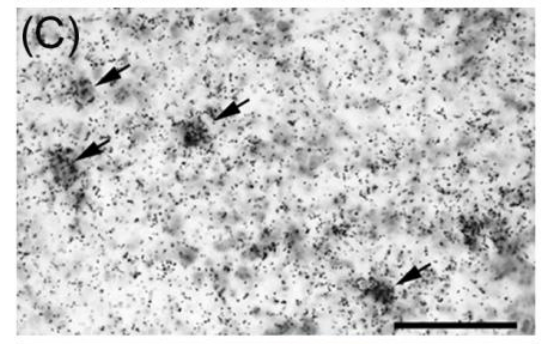
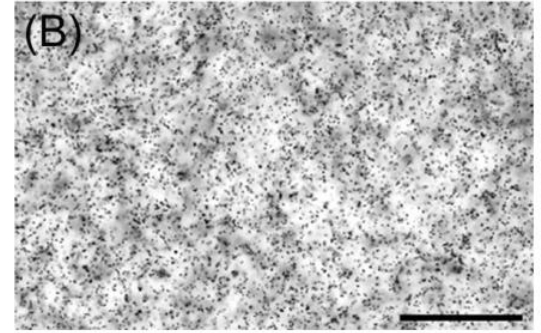
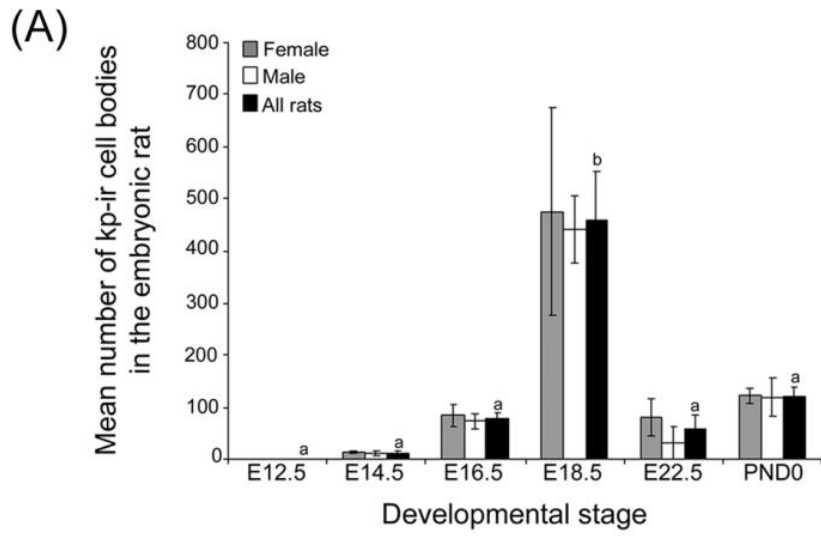
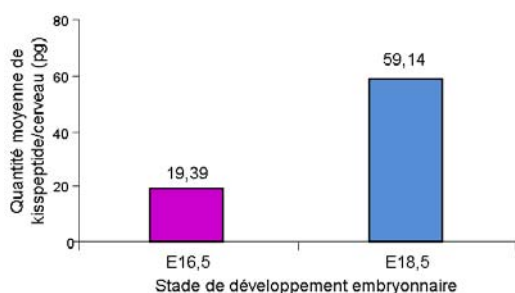


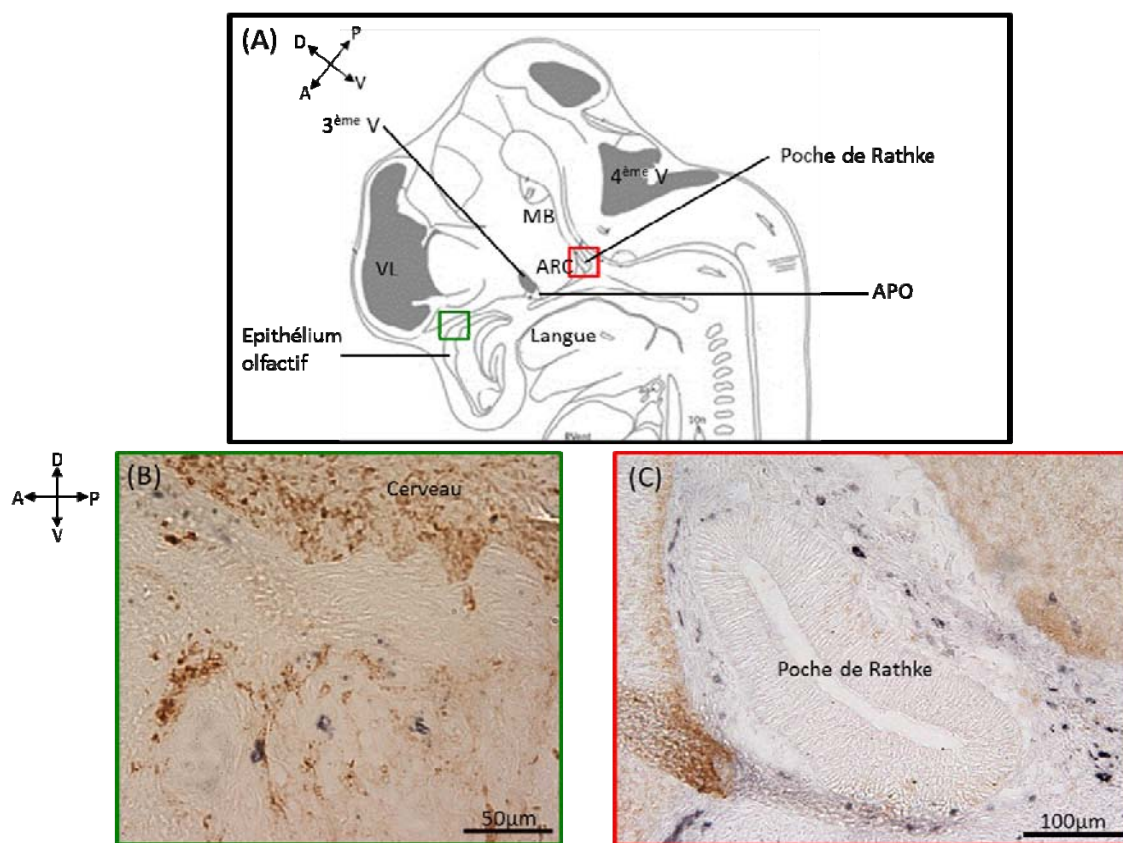
Figure 5



**Figure 11:** Quantité moyenne de kisspeptine par cerveau (pool de 4 cerveaux) en fonction du stade de développement embryonnaire. E : stade embryonnaire

	Femelle (n=3)		Mâle (n=3)	
	E14,5	E18,5	E14,5	E18,5
Cerveau	-	-	-	-
Epithélium olfactif	+	+	+	+
Poche de Rathke	+	+	+	+
Nerf oculomoteur	-	+	-	+

**Tableau 11:** Immunoréactivité kisspeptine détectée avec l'anticorps anti-kp-10 au niveau de la tête chez des embryons en fonction du stade embryonnaire et du sexe. E : stade embryonnaire



**Figure 12:** Immunoréactivité pour le kp-10 C-term et pour la PSA-NCAM à E14,5. (A) Schéma de la tête d'un embryon à E14,5 (adapté de « Atlas of the developing rat nervous system », Ashwell&Paxinos). (B) Immunoréactivité pour le kp-10 C-term dans l'épithélium olfactif. (C) Immunoréactivité pour le kp-10 C-term autour de la poche de Rathke. VL: ventricule latéral, 3<sup>ème</sup> V: 3<sup>ème</sup> ventricule, 4<sup>ème</sup> V: 4<sup>ème</sup> ventricule, APO: aire préoptique, ARC: noyau arqué, MB: corps mammillaires.

### **III. Résultats complémentaires :**

Pour l'étude du développement embryonnaire, nous avons utilisé différentes techniques et différents anticorps. Parmi les techniques utilisées et non présentées dans l'article, nous avons réalisé en collaboration avec le Dr Alain Caraty des dosages radio-immunologiques sur des hypothalami entiers d'embryons de rat qui seront présentés dans le premier paragraphe. Dans le second, nous présenterons les résultats obtenus suite à l'utilisation des deux anticorps précédemment décrit l'anti-kp-10 C-term (AC#564) et l'anti-kp-52 (JLV) (les deux seuls disponibles au début de la thèse) sur des coupes de cerveaux d'embryons de rat. Pour finir, nous présenterons des résultats préliminaires obtenus avec le nouvel anticorps anti-kp-52 N-term dans des régions cérébrales externes à l'hypothalamus.

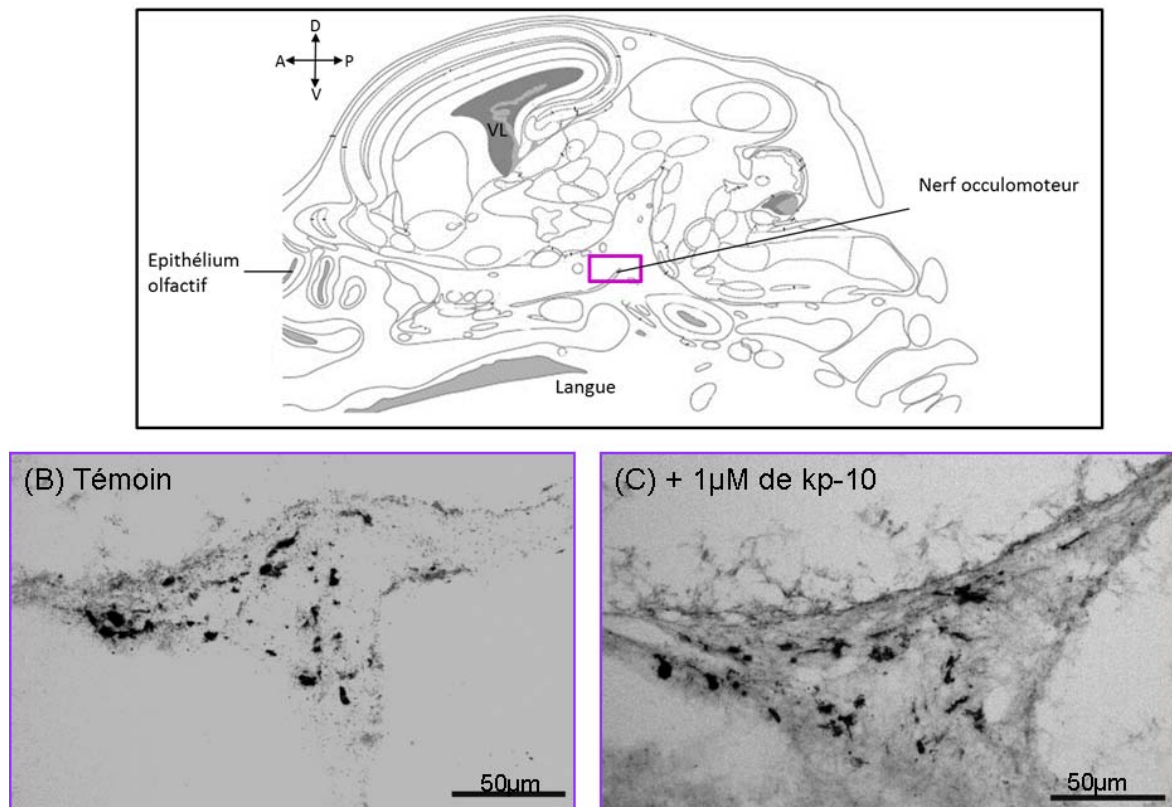
#### **III.1. Dosages radio-immunologiques du kp chez l'embryon :**

Afin de doser la quantité de peptides contenus dans l'hypothalamus d'embryons de rat à différents âges de développement. Nous avons disséqué les hypothalami d'embryons à E16,5 et E18,5. Le dosage du kp par RIA a été réalisé avec l'anticorps anti-kp-10 C-term (en collaboration avec le Dr Alain Caraty). Les résultats préliminaires présentés dans la Figure 20 correspondent à la quantité moyenne de kp par cerveau détecté par RIA sur un pool de 4 cerveaux (indépendamment du sexe). La quantité moyenne de kp par cerveau est 3 fois supérieure à E18,5 (59,14 pg) comparée à celle détectée à E16,5 (19,39 pg) (Figure 11). Malheureusement, nous avons été dans l'incapacité de reproduire ces résultats.

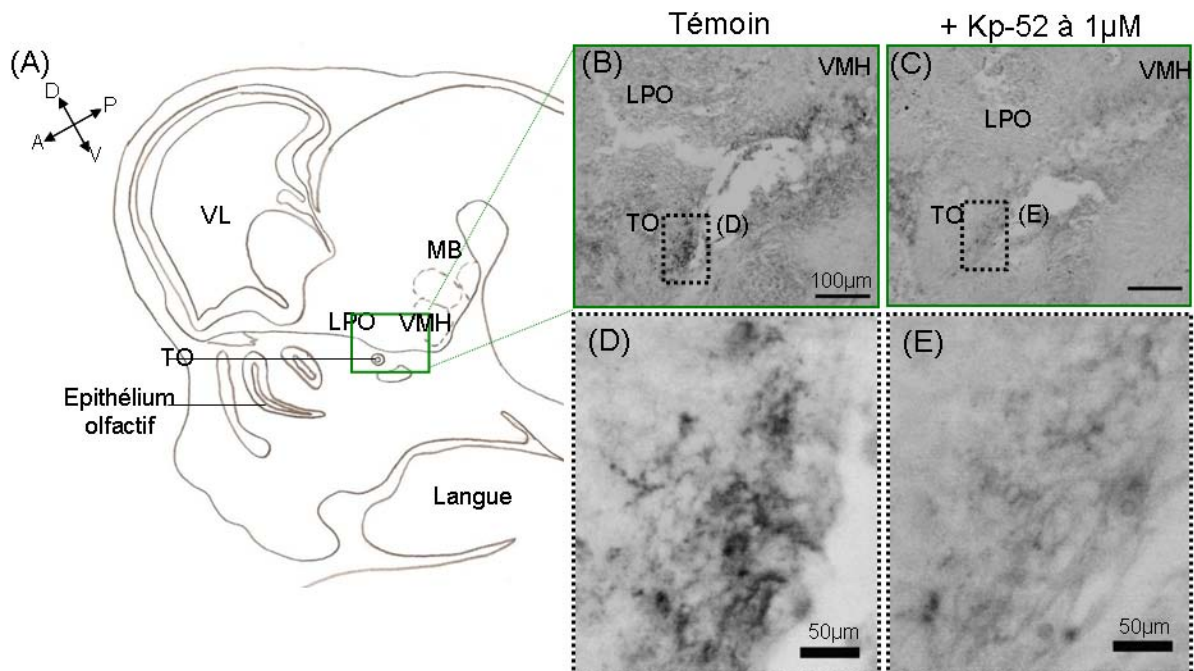
#### **III.2. Immunoréactivité kp avec l'anti-kp-10 C-term et l'anti-kp-52 chez l'embryon :**

Les premiers marquages immunohistochimiques sur l'embryon ont été réalisés au début de la thèse avec l'anti-kp-10 C-term sans connaître le sexe de l'embryon et avant de connaître les risques de réaction croisée de cet anticorps avec les RFRPs chez le rat. A E14,5 et à E18,5, de nombreuses régions de la tête se sont révélées positives (Tableau 11). A E14,5, des cellules kp-10 C-term-ir étaient détectés dans l'épithélium olfactif (Figure 12 A et B) ainsi que dans la poche de Rathke, l'ébauche de l'hypophyse (Figure 12 A et C). Malheureusement, à E18,5, un test de pré-adsorption avec du kp-10 a montré que le marquage obtenu avec l'anticorps anti-kp-10 C-term n'était pas spécifique (Figure 13).

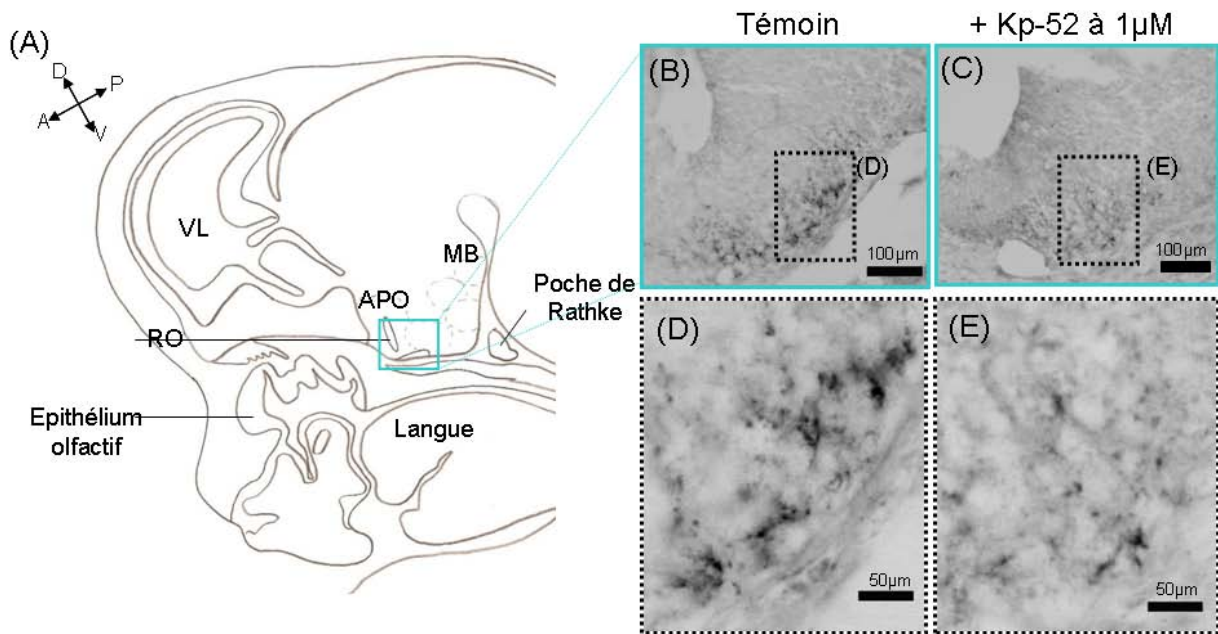




**Figure 13: Immunoréactivité pour kp-10 C-term à E18,5.** (A) Schéma de la tête d'un embryon à E18,5 (Adaptés de « Atlas of the developing rat nervous system », Ashwell&Paxinos). (B et C) Immunoréactivité pour le kp-10 C-term dans le nerf oculomoteur en condition témoin (B) et en condition inhibée avec 1µM de kp-10 synthétique (fournit par A.Caraty) (C). VL: ventricule latéral. (C)

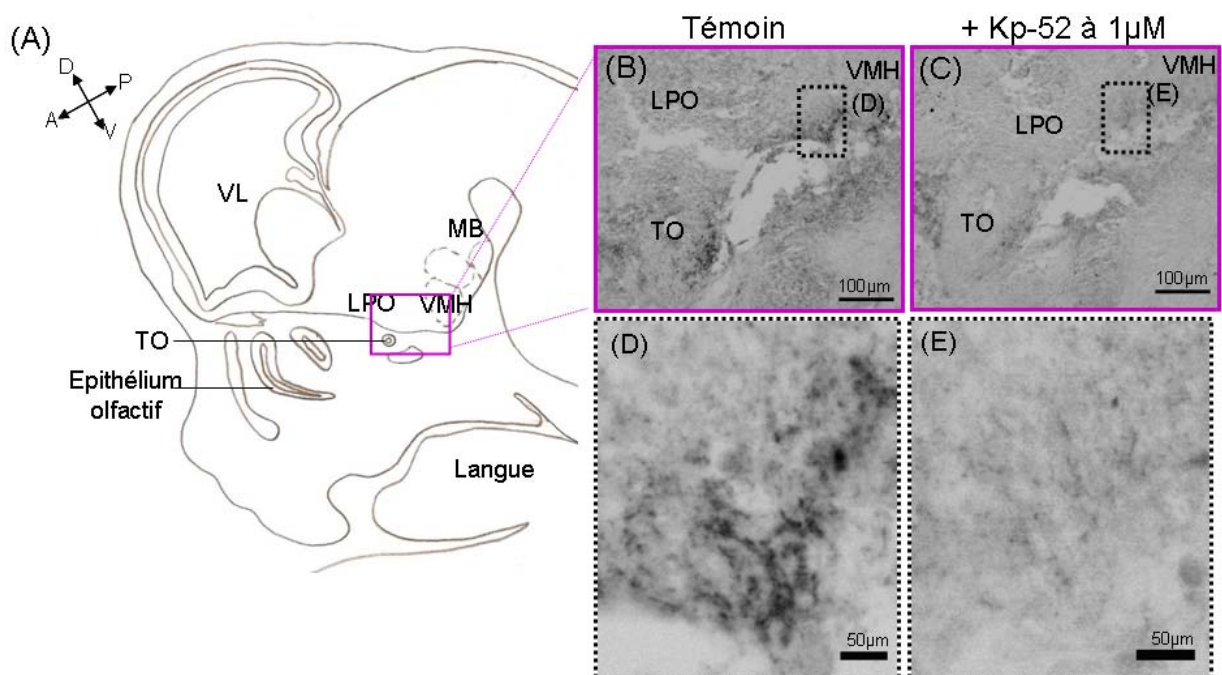


**Figure 14: Immunoréactivité pour le kp-52 à E16,5 dans la tige optique.** (A) Schéma de la tête d'un embryon à E16,5 (Adapté de « Atlas of the developing rat nervous system », Ashwell&Paxinos). (B, C, D et E) Immunoréactivité pour le kp-52 dans la tige optique en condition contrôle (B et D) et en condition inhibée avec 1µM de kp-52 synthétique de rat (Phoenix Pharmaceuticals®). VL: ventricule latéral, TO: tige optique, LPO: aire préoptique latérale, VMH: hypothalamus ventromédian, MB: corps mamillaires.



**Figure 15: Immunoréactivité pour le kp-52 à E16,5 dans le récessus optique.**

(A) Schéma de la tête d'un embryon à E16,5 (Adapté de « Atlas of the developing rat nervous system », Ashwell&Paxinos). (B, C, D et E) Immunoréactivité pour le kp-52 dans le recessus optique en condition contrôle (B et D) et en condition inhibé avec 1µM de kp-52 synthétique de rat (Phoenix Pharmaceuticals®). VL: ventricule latéral, RO: récessus optique, APO: aire préoptique, MB: corps mammillaires.



**Figure 16: Immunoréactivité pour le kp-52 à E16,5 dans l'hypothalamus ventromédian.**

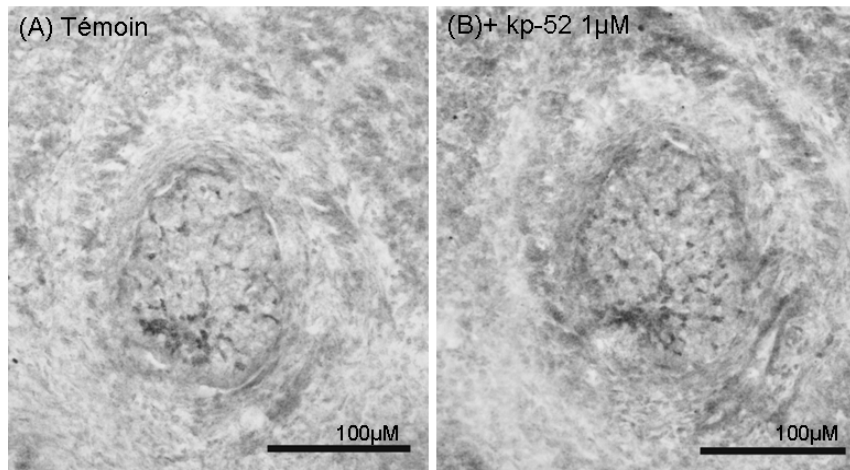
(A) Schéma de la tête d'un embryon à E16,5 (Adapté de « Atlas of the developing rat nervous system », Ashwell&Paxinos). (B, C, D et E) Immunoréactivité pour le kp-52 dans l'hypothalamus ventromédian en condition contrôle (B et D) et en condition inhibé avec 1µM de kp-52 synthétique de rat (Phoenix Pharmaceuticals®). VL: ventricule latéral, TO: tige optique, LPO: aire préoptique latérale, VMH: hypothalamus ventromédian, MB: corps mammillaires.

Par la suite, l'anticorps anti-kp-52 (JLV) a été utilisé spécifiquement sur des embryons femelles et les résultats nous ont semblé plus encourageant. En effet, avec cet anticorps, l'immunoréactivité kp-52 se trouvait spécifiquement localisée dans des régions proches des régions où l'on retrouve le kisspeptine à l'âge adulte. Les résultats obtenus avec cet anticorps montrent qu'à E14,5 et à E16,5, une structure est immunomarquée : la tige optique (Figure 14 B and D). De plus, à E16,5, deux structures supplémentaires localisées dans des régions ventrales du diencephale sont immunomarquées : au niveau du récessus optique (Figure 15 B and D) et du noyau ventromédian (Figure 26 B and D). A cet âge, un test de pré-adsorption avec du kp-52 a permis d'estomper fortement le marquage dans chacune de ces structures dès 1 $\mu$ M (Figure 14, 15, 16 C and E). En revanche, aucune immunoréactivité kp-52 n'a été observée à E18,5 contrairement aux résultats obtenus par dosage RIA. L'arrivée de résultats plus convaincants et clairement spécifiques avec le nouvel anticorps anti-kp-52 N-term (AC#067) ainsi que l'anti-kp-10 après purification (AC#564p) (voir article précédent) a interrompu l'étude des neurones à kp avec l'anticorps anti-kp-52 (JLV).

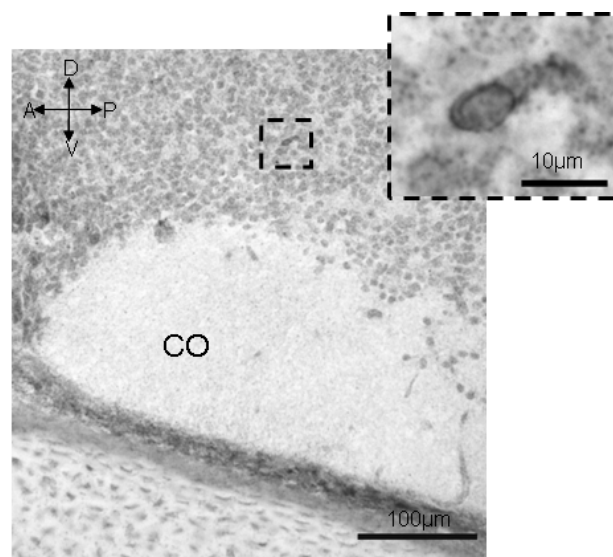
### III.3. Immunoréactivité kp avec l'anticorps anti-kp-52 N-term dans des régions extra-hypothalamiques :

L'utilisation du nouvel anticorps anti-kp-52 N-term a permis de détecter des corps cellulaire kp-ir dans le noyau arqué des embryons de E14,5 à PND0 ainsi que dans le RP3V à E18,5 (voir article sur ontogenèse des neurones à kp). Cependant, aucune des régions précédemment détectées avec les deux autres anticorps anti-kp-10 C-term et anti-kp-52 excepté pour la tige optique n'ont été observées avec ce nouvel anticorps anti-kp-52 N-term. Malheureusement, l'immunomarquage observé avec le nouvel anticorps dans la tige optique s'est avéré non spécifique après pré-adsorption avec du kp-52 de rat (Phoenix Pharmaceuticals®) (Figure 17). De plus, des cellules kp-ir ont également été détectées dans d'autres régions extra-hypothalamiques: l'aire pré-optique, le tronc cérébral et l'amygdale. En effet, 2 à 3 cellules ont été observées dans l'APO de manière redondante sur chacun des animaux analysés (Figure 18). Des cellules kp-ir sont détectées dans le tronc cérébral, plus particulièrement le noyau du pons, chez certains animaux à E16,5 (n=1/2 femelle, n=2/2 mâle) et à E22 (n=2/3 femelle et n=1/3 mâle) (Figure 19 A). En revanche, aucune cellule n'est observée dans cette région à E18,5. En ce qui concerne l'amygdale, les coupes étant récupérées avec comme repère l'œil, cette structure n'était pas présente sur tous les animaux immunomarqués. Néanmoins, sur les animaux où elle était présente, des cellules kp-ir ont été

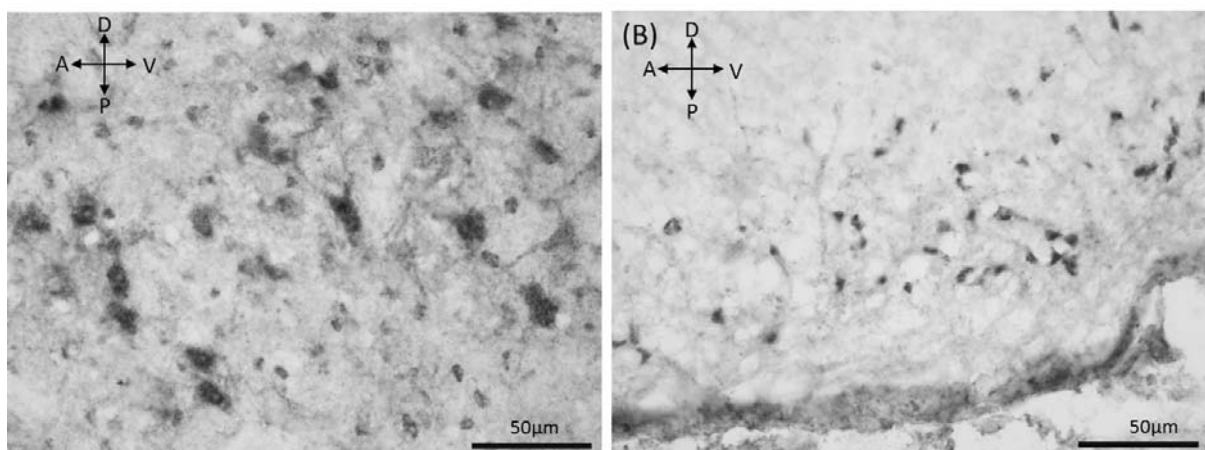




**Figure 17: Immunoréactivité kp-52 N-term à E18,5 dans la tige optique. (A)** en condition contrôle et (B) en condition inhibé avec 0,1µM de kp-52.



**Figure 18: Immunoréactivité pour le kp-52 N-term dans l'aire pré-optique.** CO : chiasma optique ; D : dorsal ; V : ventral ; A : antérieur ; P :postérieur



**Figure 19: Immunoréactivité pour le kp-52 N-term dans le noyau du pont à E22 (A) et l'amygdale à E18,5 (B).**

décelées uniquement à E18,5 chez la femelle (n=2/2) (Figure 19 B). Chez les mâles, aucune cellule n'est décelée dans l'amygdale à cet âge (n=3/3). La spécificité des immunomarquages obtenus dans le tronc cérébral et dans l'amygdale doivent encore être confirmés par des tests de pré-adsorption et sur un nombre plus élevé d'animaux.

#### **IV. Conclusion :**

Les résultats présentés dans l'étude soumise pour publication décrivent pour la première fois l'ontogenèse des neurones à kp. Dans le noyau arqué, nos résultats ont montré une période étendue de neurogenèse : commençant entre E12,5 et E13,5, dont le maximum est atteint autour de E15,5 et qui n'est pas complètement fini à E17,5. Les premières cellules kp-ir sont décelées dans l'ARC à E14,5. Le nombre de cellule kp-ir augmente jusqu'à atteindre un nombre proche de celui observé chez l'adulte à E18,5. Puis, une diminution du nombre de corps cellulaire kp-ir est observé jusqu'à la naissance. Aucune différence sexuelle n'est observée dans le patron d'immunoréactivité kp au cours du développement embryonnaire et périnatal dans l'ARC. A E18,5, seulement quelques cellules kp-ir sont observées dans le RP3V. Les résultats préliminaires obtenus par dosage radio-immunologique montrant une augmentation de la quantité totale de kp entre E16,5 et E18,5 sont en accord avec les résultats obtenus par immunohistochimie. De plus, les observations des régions extra-hypothalamiques ont montrées que le tronc cérébral et l'amygdale contenaient des cellules kp-ir. Ces résultats préliminaires nécessitent encore d'être vérifiés par des tests de pré-adsorption.

Ainsi, cette étude au cours du développement embryonnaire et périnatal décrit la date de naissance ainsi que la localisation et les variations des cellules kp-ir jusqu'à la naissance. Qu'en est-il après la naissance ? Nous développerons les résultats que nous avons obtenus au cours du développement post-natal dans le prochain chapitre des résultats.

## Chapitre 2: Le kp au cours du développement post-natal

Article 2:

Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region specific manner across rat postnatal development

Article accepté en mars 2012 dans Journal of Neuroendocrinology

## **I. Rappel du contexte bibliographique de l'étude :**

Au début de la thèse, une étude montrait des variations des niveaux hypothalamiques d'ARNm *Kiss1* au cours du développement post-natal chez le rat (Navarro *et al.*, 2004a). Une seconde étude suggérait l'existence de variations de l'expression de *Kiss1* (par RT-PCR) en fonction de la région étudiée mais uniquement en période juvénile et pubertaire (Sun *et al.*, 2007). Ainsi aucune étude n'avait été réalisée en HIS et la seule étude réalisée autour de la puberté par immunohistochimie (Sun *et al.*, 2007) utilisait un anticorps (Phoenix Pharmaceuticals®) dont la spécificité a été clairement mise en doute la même année (Goodman *et al.*, 2007).

L'un des objectifs de la thèse était de décrire et comparer les variations de l'ARNm *Kiss1* et du peptide au cours du développement néonatal et péri-pubertaire afin de déterminer des périodes clés de régulations d'expression de *Kiss1* et de kisspeptine au cours du développement post-natal. De plus, nous souhaitons comparer les résultats obtenus par HIS sur l'expression de *Kiss1* et par IHC sur l'immunoréactivité kp afin de discriminer les régulations transcriptionnelles des régulations post-transcriptionnelles au cours des différentes périodes de développement post-natal. La mise au point de l'HIS nous a permis d'obtenir uniquement des résultats préliminaires (voir Annexe 2). Néanmoins, au cours de ma thèse, les variations d'expression de *Kiss1* au cours du développement post-natal ont été publiées par d'autres équipes (Losa *et al.*, 2010; Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011). Ces études nous ont permis d'étoffer notre discussion sur nos résultats obtenus par IHC et ainsi de soumettre pour publication nos résultats sur les variations développementales de l'ir kp. Les résultats préliminaires obtenus par HIS au cours du développement péri-pubertaire seront présentés à la suite de l'article récemment soumis.

## **II. Résumé de l'article :**

**Le but de cette étude était de quantifier les variations de l'immunoréactivité kp au cours du développement néonatal et péri-pubertaire dans les deux régions (RP3V et ARC) peuplées par les neurones à kp chez le rat femelle et mâle.**

Pour réaliser cette étude, des cerveaux de rats femelles et mâles à différents stades du développement post-natal ont été prélevés et fixés : en période néonatale (PND0, PND07), en période infantile (PND11 et PND19), en milieu de période juvénile (PND29), en période

pubertaire (PND49) et à l'âge adulte (PND61). Pour chaque âge, les cerveaux de 5 femelles et 5 mâles ont été immunomarqués avec l'anti-kp-52 (JLV). Nous avons décrit l'immunoréactivité kp au cours de la période néonatale et nous avons analysé l'immunoréactivité kp au cours du développement péri-pubertaire en dénombrant les cellules kp-ir et en mesurant la densité de fibres kp-ir. Nous avons également réalisé sur un groupe indépendant de 12 femelles un suivi de l'ouverture vaginale (OV), pour déterminer le début de la puberté PND34+/-2. Un suivi de la mise en place de la cyclicité des femelles après OV a été réalisé par une analyse cytologique de frottis vaginaux quotidiens. Ceci nous a permis d'évaluer l'âge du premier œstrus à PND49+/-3 ainsi que l'entrée dans l'âge adulte à PND63+/-2 (lorsque 50% minimum des femelles ont réalisé deux cycles estriens réguliers consécutifs). Des prélèvements de sang ont également été réalisés chez les femelles afin de comparer l'évolution de l'immunoréactivité kp avec les niveaux circulants d'œstradiol.

Dans le RP3V, des fibres kp-ir sont détectées dès PND0 mais uniquement chez la femelle. Puis, à PND07, les fibres à kp sont détectées chez les deux sexes mais avec une densité plus importante chez les femelles comparée aux mâles. Dans l'ARC, à PND0, aucune différence sexuelle n'est observée dans le patron d'immunoréactivité kp. En revanche, à PND07, une augmentation de la densité de fibres kp-ir est visualisée au profit du nombre de corps cellulaires kp-ir qui diminue et cette densité de fibre est plus faible chez les mâles que chez les femelles. Dans l'éminence médiane, quelques fibres kp-ir sont détectées à PND0 et leur nombre et épaisseur semblent avoir augmenté à PND07 chez les deux sexes. Néanmoins, l'immunoréactivité kp est plus dense dans cette région chez les femelles que chez les mâles à PND07.

Les différences sexuelles en faveur des femelles établies en période néonatale vont persister tout au long du développement aussi bien dans le nombre de cellules kp-ir que dans la densité de fibres kp-ir.

Chez les femelles, au cours de la période infantile, la densité de fibre kp-ir diminue dans l'ARC tandis qu'elle augmente dans le RP3V, sous des niveaux élevés d'œstradiol. La densité de fibre kp-ir entre la fin de la période infantile et la période juvénile diminue indépendamment du sexe dans le RP3V. Puis, une augmentation du nombre de cellules kp-ir et de la densité de fibres kp-ir dans les deux régions est observée en période pubertaire jusqu'à l'âge adulte. Cette augmentation va avoir lieu à des périodes différentes en fonction du sexe et de la région. Chez les femelles, spécifiquement, l'augmentation de la densité de

fibres kp-ir est amorcée en premier dans l'ARC, entre la période juvénile et pubertaire, et plus tardivement dans le RP3V, entre la période pubertaire et adulte. De plus, cette augmentation a lieu sous des niveaux constants et bas d'œstradiol.

En conclusion, cette étude démontre que les différences sexuelles au niveau de l'immunoréactivité kp s'établissent en période néonatale et persistent tout au long du développement post-natal. De plus, nos résultats suggèrent l'existence de régulations en période pré- et post-pubertaires qui ont lieu en décalage en fonction du sexe et de la région étudiés. En effet, chez le mâle les variations de densité de fibres kp-ir vont être similaires entre les deux régions. En revanche, chez la femelle, une désynchronisation du RP3V et de l'ARC est observée pour l'augmentation de la densité de fibres kp-ir autour de la puberté indépendamment des niveaux d'œstradiol.

1 **Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region**  
2 **specific manner across rat postnatal development**

3  
4 **Desroziers E. <sup>1</sup>, Mikkelsen J.D <sup>2</sup>, Duittoz A. <sup>1</sup>, and Franceschini I. <sup>1</sup>**

5  
6 <sup>1</sup> UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours/Haras Nationaux, IFR 135, 37380 Nouzilly, France

7 <sup>2</sup> Neurobiology Research Unit, University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

8  
9 **Correspondance and requests for reprints to:**

10 Dr. I. Franceschini

11 Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements

12 UMR 6175 INRA/CNRS/Univ.Tours

13 37380 NOUZILLY

14 tel: 0247427967

15 fax: 0247427743

16 e-mail: isabelle.franceschini@tours.inra.fr

17  
18 **Short title:** Postnatal development of kisspeptin neurones in rat

19  
20 **Keywords:** Kisspeptin, hypothalamus, development, immunohistochemistry, estradiol, rat

21  
22 **Disclosure summary:** The authors have nothing to disclose.

25 **Abstract**

26

27 Kisspeptins are potent secretagogues of gonadotropin-releasing hormone, playing a key role in  
28 puberty onset. These peptides are produced by distinct neuronal populations of the  
29 hypothalamus located in the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V) and  
30 arcuate nucleus (ARC). The present immunohistochemical study aimed to determine the  
31 spatiotemporal onset of kisspeptin-ir (kisspeptin-ir) in the neonatal hypothalamus of male and  
32 female rats and to evaluate changes in kisspeptin-ir around puberty. Kisspeptin-ir cells and  
33 fibres could be detected from the day of birth in the ARC of both males and females. At this  
34 stage only females displayed some kisspeptin-ir fibres in the RP3V. From postnatal day 7 to  
35 adulthood, males displayed lower levels of kisspeptin-ir than females in both regions. During  
36 infancy, kisspeptin-ir fibre density in the female decreased in the ARC while it increased in  
37 the RP3V. A sex-independent decline in RP3V kisspeptin-ir fibre density was observed in the  
38 juvenile, followed by a peri-pubertal increase in RP3V and ARC kisspeptin-ir. These peri-  
39 pubertal increases in kisspeptin-ir occurred at different timings dependent on sex and region.  
40 In females specifically, the increase in kisspeptin-ir fibre density occurred first in the ARC and  
41 later in the RP3V, under constant levels of circulating oestradiol. In conclusion, this study  
42 highlights the expression of hypothalamic kisspeptins soon after birth and the neonatal  
43 establishment of a strong and persisting sex difference in ARC kisspeptin-ir in rats. Moreover  
44 a female-specific desynchronization of the ARC and RP3V was observed with respect to the  
45 increase in kisspeptin-ir fibre density around puberty, not related to peri-pubertal variations in  
46 circulating oestradiol.

47

48

49

50



51 **Introduction**

52

53           Recently, a breakthrough has been made in the understanding of the neuroendocrine control of  
54 mammalian reproduction, with the identification of two key populations of hypothalamic neurones  
55 located respectively in the arcuate nucleus (ARC) and in the rostral periventricular area of the third  
56 ventricle (RP3V, or preoptic area in non-rodent mammals) (1). These neurones express the *Kiss1* gene  
57 whose translational products, kisspeptins, are potent secretagogues of gonadotropin-releasing hormone  
58 (GnRH), the key neurohormone in the control of reproductive function (2), through activation of the  
59 *Kiss1* receptor (*Kiss1r*) (3, 4). In adult rats and mice oestradiol and testosterone strongly inhibit *Kiss1*  
60 expression in the ARC while these sex steroids stimulate *Kiss1* expression in the RP3V (5-11).  
61 Differences in kisspeptin immunoreactivity have also been reported between specific physiological  
62 conditions characterized by different circulating levels in sex steroids in mice (12), rats (5), hamsters  
63 (13), sheep (14-16) and humans (17). It has been suggested that these two populations of kisspeptin  
64 neurones mediate most of the positive and negative feedback effects of gonadal steroid hormones on  
65 GnRH secretion during reproductive life (18). Whether ARC and RP3V kisspeptin neurones mediate  
66 their effects on GnRH neurones directly at both their cell body and terminal level or also indirectly via  
67 interneurones is currently unknown. Our previous mapping of kisspeptin fibres in female rats (19)  
68 together with a recent tract tracing study by Yeo and Herbison in mice (20) clearly suggest that the  
69 ARC and RP3V kisspeptin neurones project to various brain areas and may thus target different cell  
70 types.

71

72           The fundamental role played by the *Kiss1* gene in reproductive function was discovered in the  
73 context of pubertal development as both mice and humans bearing mutations of *Kiss1* receptor  
74 displayed hypophysiotropic hypogonadism and delayed puberty (21, 22). In rodent models, genetic  
75 ablation of *Kiss1* or of kisspeptin cells during the juvenile period similarly impairs pubertal gonad  
76 development (23-25) while precocious administration of kisspeptins is able to advance female puberty  
77 demonstrating that kisspeptins are both necessary and sufficient for the triggering of puberty, at least  
78 in female rodents (26, 27). If kisspeptin cells are ablated at earlier developmental stages however,

79 compensation mechanism can occur to assure normal pubertal development (23). Navarro et al. (28)  
80 were the first to highlight important fluctuations in the levels of hypothalamic *Kiss1* expression across  
81 post-natal development in rats. This was followed by the discovery that the number of kisspeptin  
82 immunoreactive cells increased around puberty onset in the RP3V of mice and was greater in females  
83 than males (12). Part of this sex difference may relate to the differential *Kiss1* transcription between  
84 sexes that develops in this region during mice mid-infancy (29).

85

86 In mice, the fundamental role that early sex steroid signalling plays on the ontogenesis of  
87 kisspeptin neurones has since been well highlighted with the study of specific mutant or genetically  
88 engineered strains (6, 7, 10, 30-33). Manipulation of gonadal steroids were also performed during  
89 restricted developmental time windows and showed that infantile gonadal hormones, already  
90 positively regulate *Kiss1* expression and kisspeptin content in RP3V neurones whatever the sex (29,  
91 31) and negatively regulate *Kiss1* expression in the female ARC specifically (29). In males this  
92 negative regulation developed later than in females (29). The respective role of the two kisspeptin  
93 neuronal populations with respect to puberty onset is still unresolved (18, 33).

94

95 In rats, acute manipulation of sex steroids during the neonatal period can sexually reverse the  
96 adult phenotype in *Kiss1* expression suggesting that the kisspeptin system of male rat is neonatally  
97 programmed by the testosterone surge (9, 11). In female rats, acute manipulations of sex steroids at  
98 restricted times of peri-pubertal development suggest that oestrogen's inhibitory effect on *Kiss1*  
99 expression in the ARC diminishes while its stimulating effect on *Kiss1* expression in the RP3V  
100 increases between the early juvenile period and adulthood (34). This latter result fits well with the  
101 gonadostat hypothesis put forward 60 years earlier stating that pubertal maturation may be regulated  
102 by a progressive decrease of oestrogen's negative feedback action on GnRH secretion (35). More  
103 recently, developmental variations in the number of *Kiss1*-expressing neurones have been shown in  
104 both the RP3V and ARC of intact rats by the means of *in situ* hybridization (36, 37). The number of  
105 *Kiss1* expressing cells was shown to increase around puberty in females (37) and in males (36) in both  
106 the RP3V and ARC. Peri-pubertal increases in *Kiss1* expression have also been reported in the RP3V

107 of mice (38), preoptic area of sheep (39) and mediobasal hypothalamus of monkey (40) A significant  
108 sex difference was noted in both the RP3V and ARC, with female rats displaying more *Kiss1* cells  
109 than males in both regions across most developmental stages studied (37). It is however still not clear  
110 whether this sex difference in the ARC persists in adulthood (9, 37).

111

112 The functional importance of the numerous changes observed in *Kiss1* expression across  
113 postnatal development is unclear. Very few observations have been made so far at the kisspeptin  
114 peptide level during development in species other than mice (12). Recently, we validated a new anti-  
115 kisspeptin antibody sufficiently sensitive and specific for analysis of kisspeptins at the fibre level by  
116 immunohistochemistry on intact rat brains (19). In this present study, we reasoned that such an  
117 immunohistochemical approach in intact male and female rats throughout development should enable  
118 to better understand the timely and sex-specific implication of this neuropeptide during postnatal  
119 maturation of the hypothalamus. We therefore designed our study to answer the following questions:  
120 1) How early in postnatal life can kisspeptins be detected in the hypothalamus?, 2) Are there sex  
121 differences in kisspeptin-ir and when do these develop? 3) In females, can one correlate  
122 developmental changes in kisspeptin immunoreactivity to developmental variations in circulating  
123 oestradiol (E2) level? 4) How do developmental changes in kisspeptin-ir compare between males and  
124 females?

125

126

## 127 **Materials and methods**

128

129 Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Lyon, France).  
130 All animal procedures were performed in accordance with the European legislation for animal  
131 experimentation (directive 86/609/EEC for animal experiments).

132

133

134

135 *Animals*

136 Wistar rats initially obtained from Charles River Breeding Laboratories (Arbresle, France)  
137 were reared in our own animal facility. Following weaning (postnatal day (PND) 24), rats were housed  
138 in groups of four per cage under a 12:12h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*.

139 A first group of rats was used to determine the pubertal period in females and was performed  
140 on 12 females. From the day of weaning, daily observations for vaginal openings (VO) were  
141 performed to determine the beginning of puberty. Daily vaginal smears were performed to determine  
142 the time when 50% of female have done their first oestrus and the time when 50% of the females had  
143 completed two regular oestrus cycles,

144 A second group of rats was used to analyse hypothalamic kisspeptin-ir across post-natal  
145 development. Sixty rats were used for kisspeptin immunohistochemistry at different post-natal days  
146 (PND) representative of previously defined endocrine stages of postnatal development (35). PND0 and  
147 PND07 (neo-natal stages, 5 rats/sex/age), PND11 and PND19 (infantile stages, 4 rats/sex/age), PND29  
148 (juvenile stage, 4 rats/sex), PND49 (pubertal stage, 4 rats/sex) and PND61 (beginning of adulthood).  
149 PND61 was defined as adulthood based on morphological parameters for females (see results) and  
150 based on the literature for males (35).

151 A third group of female rats was used for determining the levels of circulating E2 across post-  
152 natal development. Blood samples were collected from 40 female rats euthanised at the following  
153 ages: PND11 (n=8), PND19 (n=8), PND29 (n=10) and PND49 (n=10) and PND 61 (n = 4). After 15  
154 min centrifugation at 3500g, plasma supernatants were collected and stored at -20 °C until processed  
155 for E2 radio-immunological assays.

156

157 *Preparation of brain cryosections*

158 Euthanasia, brain tissue collection, fixation, cryoprotection, and storage were performed as  
159 previously described except for the volume of intracardiac perfusion solutions which were reduced by  
160 half (125mL of nitrite sodium and 250mL of paraformaldehyde 4%/picric acid 0.2%) for PND0,  
161 PND07 and PND11 rats (19). Brain sections were cut from the rostral preoptic area to the  
162 premamillary nucleus on a cryostat (CM3050S, Leica Microsystemes SAS, Nanterre, France). For

163 PND0 and PND07, six serial sets of coronal sections (20µm thick) were mounted on SuperfrostPlus®  
164 Slide and stored at -20°C until immunolabelled. For brains aged over PND11, four serial sets of free-  
165 floating coronal sections (30µm thick) were collected in a cryoprotectant solution (30% sucrose, 1%  
166 PVP40, 30% EthyleneGlycol, 0.9% NaCl in 0.1M pH 7.4 phosphate buffer) and stored at -20°C until  
167 immunolabelled.

168

### 169 *Kisspeptin immunohistochemistry*

170 The primary antibody used was directed against rat kisspeptin-52. Its specificity has been fully  
171 characterised both by Western blot and preadsorption tests with all other known RF-amide peptides  
172 (19). It does not cross-react with any other RFamide peptide on rat brain tissue and showed good  
173 sensitivity for analysis at the fibre level. Brain sections from each age (PND11, PND19, PND29,  
174 PND41 and PND 61) and from each sex were processed at the same time for kisspeptin  
175 immunoperoxidase labelling on free floating sections as previously described (19). For kisspeptin  
176 immunohistochemistry on slide-mounted brain sections (PND0 and PND07), the protocol was adapted  
177 from Desroziers and collaborators (19) as follow: all antibodies were applied to the slides in wet  
178 chambers, with the same incubation times and temperatures as for the free-floating protocol and all  
179 PBS rinses were performed in 200ml glass tanks.

180

### 181 *Oestradiol radio-immunologic assays*

182 A first batch of plasma samples was assayed for oestradiol (E2) as previously described (19)  
183 using the <sup>125</sup>I E2 Diasorin RIA Kit (Sorin Diagnostic, Antony, France). Unfortunately production of  
184 this kit was arrested by the manufacturer during the course of this study and we had to turn to the <sup>125</sup>I  
185 E2 Diasource RIA Kit (KIP0629, DiaSource, Neuville, Belgique) for assaying a second batch of  
186 plasma samples. The intra-assay coefficient of variation averaged 11.5% for the former kit and 8% for  
187 the latter kit and assay sensitivity was 0.39 pg/ml and 3.2 pg/ml respectively. Some samples already  
188 measured with the first E2 RIA kit were included as standards when using the second E2 RIA kit.

189

190

191 *Data and image analysis*

192 For quantification of kisspeptin-ir cell numbers, all immunoreactive cells of each section (40  
193 sections per rat of each age) were counted. For quantification of kisspeptin-ir fibre density, three  
194 RP3V sections separated by 120  $\mu\text{m}$  and six ARC sections separated by 120  $\mu\text{m}$  were analysed. For  
195 each area (ARC and RP3V), the first section to be analysed was selected with the help of precise  
196 anatomical marks as illustrated in supplemental figure 1. The next 2 caudal sections for the RP3V and  
197 the next 5 rostral sections for the ARC were also analysed. This sampling encompassed about a third  
198 of the rostrocaudal extent of the RP3V (from 0.26 to 0.62 posterior to the bregma, (41)) corresponding  
199 to the area of maximal *Kiss1*-expressing cells in the region and about a third of the rostrocaudal extent  
200 of the ARC (from 2.7 to 3.3 posterior to the bregma, thereafter referred to as the middle ARC, (41)).  
201 The way the ARC sections were sampled enabled to avoid the great number of more posteriorly  
202 located kisspeptin-ir cell bodies that would have interfered with our fibre analysis (19). For each  
203 section through the ARC or RP3V, one area (92 x 72  $\mu\text{m}$ ) on each side of the third ventricle  
204 (supplemental Fig. 1) was captured on a bright field microscope (Olympus BX51; Olympus, Tokyo,  
205 Japan) using x100 objective (UPlanF1, x 100/1.30 oil iris, Japan) with the Spot insight image capture  
206 system CCD camera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA). Each image was  
207 randomly coded and quantified. On each photomicrograph, the kisspeptin-ir fibre density was  
208 evaluated by the number of black pixels per surface unit obtained after an analysis with the Image J®  
209 software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) as previously described (42). Some  
210 representative photomicrographs were also taken with an x 20 objective (UPlanF1, x 20/0.50).

211

212 *Statistical analysis*

213 All data were expressed as the mean  $\pm$  SEM and represented by histograms. Means for the  
214 number of kisspeptin-ir cell bodies in the ARC took into account those rats with undetectable  
215 kisspeptin-ir cell bodies. All statistical analyses were performed using R software. R is a language and  
216 environment for statistical computing and graphics and is a GNU project (<http://gnu.org>). Normality  
217 was tested using Shapiro-Wilcoxon normality test and variance homogeneity was tested using F-test  
218 for homogeneity of variances for two-samples comparisons, and Bartlett test for multiple samples

219 comparisons. Since for most samples, normality of parameter distribution and variance homogeneity  
220 between samples were not verified, we used non parametric rank sum tests. For multiple comparisons  
221 we used the Kruskal-Wallis test. Post hoc tests were performed using a Wilcoxon test with Bonferroni  
222 adjustment. Specific tests for each histogram are specified in the corresponding figure legends.

223

224

## 225 **Results**

226

### 227 **Kisspeptin immunoreactivity during the neonatal period**

228

229 **In the caudal ARC**, kisspeptin-ir cell bodies (approximately 5 cell bodies/section) could be  
230 detected from PND0 in some females (n= 2/5 rats, Fig. 1A) and some males (n=2/5 rats, Fig. 1G).  
231 Kisspeptin-ir fibres in those area were detected in most PND0 females (n=4/5 rats, Fig. 1A) and males  
232 (n=4/5 rats, Fig. 1G). At this early stage no obvious sex difference in the amount, distribution or  
233 intensity of kisspeptin-ir fibres was noticeable in this area. At PND07, none of the 5 males and only  
234 one of the 5 females studied displayed kisspeptin-ir cell bodies (Fig. 1B and H, respectively).  
235 Kisspeptin-ir fibres were detected in the caudal ARC of all females (n=5/5 rats, Fig. 1B) and males  
236 (n=5/5 rats, Fig. 1H). While the number of kisspeptin-ir fibres appeared to increase between PND0  
237 and PND07, the overall intensity of kisspeptin-ir appeared to decrease as kisspeptin-ir fibres became  
238 generally thinner (compare 1A with 1B and 1G with 1H). This decrease appeared more pronounced in  
239 males compared to females, resulting in a clear difference between sexes at PND07 (compare Fig. 1B  
240 with 1H).

241

242 **In the female middle ARC**, a few thin kisspeptin-ir fibres were already detectable at PND0  
243 (n=3/5 rats) and increased in number between PND0 and PND07 (n = 4/5 rats), to reach a similar  
244 density as in the caudal ARC. The presence of kisspeptin-ir fibres was more difficult to ascertain in the  
245 PND0 males due to a generally high background in this area at this age. By PND07, the background

246 was much reduced and clear thin kisspeptin-ir fibres could also be seen in males (n=5/5 rats), albeit  
247 less numerous than in females.

248

249 **In the median eminence** (which could not be entirely recovered from all neonatal rats), we  
250 also detected kisspeptin-ir fibres (n=1/1 PND0 female rats, n=2/3 PND0 male rats, n=3/3 PND07  
251 females rats and n=3/3 PND07 males rats). The number and thickness of kisspeptin-ir fibres appeared  
252 to increase between PND0 and PND07 and this increase was accentuated in females compared to  
253 males (Fig. 1). The majority of kisspeptin-ir fibres were found in the internal layer as previously  
254 described in the adult pro-oestrus rat (19). The medio-lateral gradient in kisspeptin-ir described in the  
255 adult median eminence (19) appeared to develop between PND0 and PND07.

256

257 **In the RP3V**, we were unable to detect any kisspeptin-ir cell bodies whatever stage of  
258 development studied as previously described in the adult (19). Kisspeptin-ir fibres could however be  
259 detected in this region as early as PND0 in females (approximately 3 kisspeptin-ir fibres on one  
260 section per animal for n=3/5 rats, Fig. 2A). In contrast no kisspeptin-ir fibres could be detected in any  
261 of the 5 males RP3V analysed at this age (Fig. 2C). At PND07, we could detect some kisspeptin-ir  
262 varicose fibres on 2/5 females (Fig. 2B) and on 1/5 males (Fig. 2D). In females, these were more  
263 numerous than at PND0.

264

### 265 **Physiological indexes related to puberty**

266 Vaginal opening occurred at PND34 $\pm$ 2. The time when 50% of the female rats displayed  
267 their first oestrus was detected at PND49 $\pm$ 3 and was considered as pubertal stage. The time when  
268 50% of the female rats had displayed two regular oestrus cycles was detected at PND63 $\pm$ 2 and can  
269 be considered as the adult stage (5, 9, 28). E2 levels were not significantly different between PND11  
270 and PND19 (Fig. 3). A significant decrease of circulating E2 levels was however detected between the  
271 infantile (PND11/19) and the juvenile (PND29) period. Thereafter, E2 levels remained low and no  
272 significant difference could be detected between PND29, PND49 and PND61 (Fig. 3).

273



274 **Kisspeptin immunoreactivity from infancy to adulthood**

275 From PND11, quantification of kisspeptin-ir cell numbers and fibre density was performed  
276 followed by statistical analysis for differences between ages and between sexes.

277

278 **Kisspeptin-ir cell bodies**

279 Kisspeptin-ir cells were readily detected in the caudal ARC of most rats analysed (for female,  
280 PND11 = 4/4 rats; PND19 = 3/4 rats; PND29 = 3/4 rats; PND49 = 3/4 rats; PND61 = 4/4 rats and for  
281 males, PND11 = 3/4 rats; PND19 = 1/4 rats; PND29 = 0/4 rats; PND49 = 4/4 rats; PND61 = 3/4 rats).  
282 Global analysis for each sex showed a statistically significant effect of age on the number of  
283 kisspeptin-ir cells. At the end of the infantile period (PND19), the mean number of kisspeptin-ir cell  
284 bodies in the ARC was 3,5 and 2 fold lower than at PND11 in females and males respectively. Despite  
285 this apparent difference, statistical analysis showed only a trend ( $p=0.1$ ) for a difference between these  
286 two age groups, presumably related to the low numbers of cells counted at these ages. Between  
287 PND19 and PND29 no significant changes were observed whatever the sex (Fig. 4). Between PND29,  
288 PND49 and PND61, the mean number of kisspeptin-ir cell bodies increased in both sexes (Fig. 4). A  
289 statistical significant increase was detected between PND29 and PND49 in males and between PND29  
290 and PND61 in females. These results highlight that changes in the number of kisspeptin-ir cells  
291 occurred across the pubertal period. A significant sex difference was detected for each stage of  
292 development analysed, with females displaying always a higher number of kisspeptin-ir cell bodies  
293 than males. The undetectability of kisspeptin-ir cells in the RP3V, whatever the sex, made such an  
294 analysis impossible in this brain area.

295

296 **Kisspeptin-ir fibre density between infantile and juvenile stages.**

297 All rats examined displayed kisspeptin-ir fibres in the RP3V and in the ARC. Their density  
298 was much higher in the ARC than in the RP3V and several statistically significant differences were  
299 measured between age groups as detailed below. Global analysis for each sex and each brain area  
300 showed a significant effect of age on fibres density.

301

302           **In the middle ARC**, a statistically significant decrease in the kisspeptin-ir fibre density was  
303 detected between PND11 and PND19 and between PND11 and PND29 in females (Fig. 5 A and B) .  
304 In males this decrease reached statistical significance between PND11 and PND29, and between  
305 PND19 and PND29 (Fig. 5 A and B). During this pre-pubertal period, females displayed a  
306 significantly higher level of kisspeptin-ir fibre density compared to males, whatever age analysed (Fig.  
307 5 A and B).

308

309           **In the RP3V**, the mean kisspeptin-ir fibre density increased about 2.5 fold during the infantile  
310 period in females as in males (Fig. 6 A and B). Statistical analysis revealed a significant difference  
311 between PND11 and PND19 in males (Fig. 6 A and B), and a trend for a statistically significant  
312 difference in females (Fig. 6 A and B). This was followed by a significant decrease between PND19  
313 and PND29 in females as in males (Fig. 6 A and B).

314

#### 315           **Kisspeptin-ir fibre density around puberty.**

316           **In the middle ARC** of females, the mean level of kisspeptin-ir fibre density increased  
317 between PND29, PND49 and PND61 (Fig. 5 A and B). A statistically significant difference could be  
318 detected between the juvenile and pubertal/adult stages (PND29 versus PND49/PND61) (Fig. 5 A). In  
319 the middle ARC of males, the mean level of kisspeptin-ir fibre density increased significantly between  
320 PND29 and PND49 (Fig. 5 A and B).

321

322           **In the RP3V**, a significant increase in the kisspeptin-ir fibre density was detected between  
323 PND49 and PND61 in females (Fig.6 A and B) and between PND29 and PND49 in males (Fig. 6 A  
324 and B).

325

326

327

328

329

330 **Discussion**

331

332 This is the first study to describe and quantify both at the cell body and fibre level the relative  
333 changes in kisspeptin-ir between the RP3V and ARC and between males and females under full  
334 postnatal development in rats. Kisspeptin-ir fibres and cell bodies were clearly detected in the  
335 hypothalamus as early as the day of birth. This encourages further studies on the spatio-temporal  
336 appearance of this peptide during brain embryonic development, a period during which kisspeptins  
337 could already signal GnRH neurones (43, 44).

338

339 **Distribution of kisspeptin immunoreactivity in cell bodies and fibres in developing rats**

340 Kisspeptin-ir cells were detected in the caudal ARC throughout postnatal development but no  
341 kisspeptin-ir cell bodies could be found in the RP3V at any developmental stage, which is in  
342 agreement with previous studies on intact rats using a variety of kisspeptin antibodies (5, 19, 36, 45).  
343 In contrast numerous kisspeptin-ir cells have been detected in the rat RP3V after colchicine treatment  
344 (8, 34, 45) suggestive of a rapid transport of the peptide outside the cell body. This situation is clearly  
345 different from the mouse (12) and may reflect a species difference in the turnover/transport of these  
346 peptides. At all postnatal stages examined, the highest density of kisspeptin-ir fibres was observed in  
347 the ARC and a substantial amount was also found in the RP3V as previously reported in the adult rat  
348 (19). Although recent tract tracing studies may suggest reciprocal projections between the two  
349 kisspeptin neuronal populations (20, 46), in female rats there is indirect evidence (using double  
350 immunolabelling with an anti-neurokinin B antibody (47) that most of the ARC kisspeptin fibres  
351 originate from the ARC KDNy neurones (so called based on their specific co-expression of kisspeptin,  
352 dynorphin and neurokinin B (48). The fact that the developmental changes in kisspeptin-ir observed at  
353 the ARC fibre level were similar to those observed at the ARC kisspeptin cell body level also favour  
354 the hypothesis of a local origin of these fibres. These ARC KDNy neurones have been implicated in  
355 the regulation of GnRH pulsatile release through reciprocal local connections (49). The double  
356 immunolabelling study by True and collaborators further showed that in the RP3V only a minority of  
357 kisspeptin-ir fibres co-labelled with neurokinin B antibodies suggesting that these RP3V fibres rather

358 originate from the local RP3V population of kisspeptin cells. This population is predominant in  
359 females and has been implicated in the regulation of the pre-ovulatory GnRH surge (8, 50). The  
360 possibility also remains that our analysis of the RP3V took into account additional kisspeptin fibres  
361 originating from the more recently discovered population of *Kiss1* expressing cells in the medial  
362 amygdala of rats (of unknown function) (51).

363

364 **Changes in kisspeptin-immunoreactivity across rat postnatal development may involve both**  
365 **transcriptional and post-transcriptional regulations**

366 The fluctuations of kisspeptin-ir fibre densities observed across the different postnatal stages  
367 of development mostly coincided with changes previously reported for *Kiss1* mRNA around these  
368 periods suggestive of transcriptional regulations. For example the decline in kisspeptin-ir fibre  
369 densities that was observed in the female ARC during the infantile period correlates well with the  
370 recently reported decrease in *Kiss1* mRNA levels of this region (52). During the peri-pubertal period,  
371 we measured significant increases in ARC and RP3V kisspeptin-ir, as has been reported for *Kiss1*  
372 mRNA in these regions (34, 36, 37). A peri-pubertal increase in both *Kiss1* expression and kisspeptin-  
373 ir has also been described in the RP3V of mice with the difference that in this species kisspeptin-ir  
374 changes could be quantified in terms of numbers of kisspeptin-ir cells (12, 31, 38). Conversely, we  
375 also detected some developmental changes in kisspeptin-ir at periods when *Kiss1* mRNA was reported  
376 to be stable suggestive of post-transcriptional regulations. For example in male rats, a marked  
377 decrease in ARC kisspeptin-ir levels was observed during the neonatal stage and in the RP3V  
378 kisspeptin-ir fibre density increased during infancy and decreased during the infantile/juvenile  
379 transition but the levels of *Kiss1* mRNA do not appear to fluctuate around these periods (36, 37, 52).  
380 These kisspeptin-ir changes could be the reflection of changes in the storage and release of the  
381 peptide. There are other examples in rats of unrelated changes in *Kiss1* mRNA and kisspeptin-ir levels  
382 (5, 36, 47).

383

384

385

386 **Establishment of sex differences in kisspeptin-ir during the neonatal period**

387 No obvious sex difference was noted at birth in the ARC which displayed a similar amount of  
388 fibre- and cell body-associated kisspeptin-ir between males and females. One can however note that  
389 the detectability of kisspeptin-ir cell bodies varied greatly between individuals (regardless of sex)  
390 which may be related to particularly low levels of *Kiss1* expression and kisspeptin synthesis at this  
391 precocious developmental stage. During the neonatal period, the kisspeptin-ir fibre network of the  
392 ARC and median eminence clearly increased regardless of gender, and was accompanied by a shift of  
393 intense kisspeptin-ir from the caudal ARC (including within cell bodies) to median eminence fibres.  
394 This may reflect a possible rapid transport/release of the peptide towards nerve terminals as axons gain  
395 access to the developing median eminence whose portal vasculature finishes developing around this  
396 period (35). By PND07, a clear sex difference had developed in the ARC and median eminence, with  
397 the intensity of kisspeptin-ir fibres that became much lower in males than in females, consistent with a  
398 recent report (45). Whether this male-specific decrease in kisspeptin-ir is related to sex specific  
399 morphogenesis/remodelling of kisspeptin circuits remains to be investigated. The ARC is a well  
400 known site for the neonatal action of sex-steroids in shaping sex specific circuits in rats.

401

402 In contrast to the ARC, a sex difference was already detected on the day of birth in the RP3V  
403 since only females displayed the presence of a few kisspeptin-ir fibres in this area. This sex difference  
404 was maintained during the neonatal period with the number of kisspeptin-ir fibres increasing for both  
405 sexes between PND0 and PND07. Recent *in situ* hybridisation studies have however failed to detect  
406 any kisspeptin cells in this area that early in rat development (37, 52) nor in mice (53). This may  
407 reflect a higher sensitivity of the present immunohistochemical study over those *in situ* hybridization  
408 studies or the presence of RP3V kisspeptin fibres originating from elsewhere. Further comparative  
409 tracing studies of kisspeptin neurones between males and females will be particularly interesting to  
410 test the possibility that kisspeptin projections from the ARC or from the amygdala may be pre-natally  
411 wired in a sex-specific manner.

412

413

## 414 **Changes in kisspeptin-ir and circulating E2 levels during female postnatal development**

415           The recent study of genetically engineered female mice in which estrogen receptor  $\alpha$  was  
416 specifically mutated in kisspeptin neurones has demonstrated that estrogens can act directly on these  
417 neurones before puberty onset to control *Kiss1* transcription and/or post-transcriptional processing in a  
418 way that is determinant for the timing of puberty onset (33). This prompted us to compare the post-  
419 natal variations of kisspeptin-ir measured in the ARC and RP3V of females to their levels of  
420 circulating E2. Interestingly, the kisspeptin-ir changes in each region could not always be correlated  
421 with changes in circulating E2 levels. Some of these kisspeptin-ir developmental changes may be the  
422 result of intrinsic and sex-specific neural differentiation mechanisms leading to a sex-specific  
423 postnatal maturation of the negative and positive feedback of estradiol on GnRH secretion as detailed  
424 below for each developmental period.

425

### 426 *Infantile period*

427           Opposite variations of kisspeptin-ir fibre density were measured in the ARC and RP3V during  
428 the infantile period and were similar to the changes recently reported in the numbers of detectable  
429 local *Kiss1* cells (37). Furthermore they occurred in the same way as induced by E2 on *Kiss1*  
430 expression in these respective nuclei in adulthood (6, 9, 33). Circulating E2 levels were high and  
431 constant during this period, consistent with previous reports (54, 55) but it has been proposed that  
432 oestrogen's access to the brain increases during this period in relation to a progressive decrease in  
433 alpha-fetoprotein plasmatic levels (35, 56). Therefore we would like to favour the hypothesis that  
434 estrogen receptor signalling within kisspeptin neurones is being revealed during this period, resulting  
435 in a down- and up-regulation of kisspeptins in the ARC and RP3V, respectively. Accordingly, both the  
436 negative and positive feedback actions of E2 on luteinizing hormone (LH) secretion can already be  
437 experimentally induced at the end of the infantile stage in female rats (57, 58). In adult females, RP3V  
438 kisspeptin neurones have clearly been implicated in the stimulation of the GnRH/LH surge (5, 50) and  
439 it is therefore tempting to speculate a functional link between the particularly high levels of kisspeptin-  
440 ir measured in this brain area at the end of the infantile period and the frequent LH surges  
441 characteristic of the infantile period in female rat (55). In the latter study, peripheral LH levels were

442 reported to be particularly variable among infantile female rats as here observed for RP3V kisspeptin-  
443 ir fibre density in the PND19 group.

444

#### 445 *Infantile/juvenile transition*

446 The subsequent infantile/juvenile decrease in E2 level is consistent with previous studies and has been  
447 proposed to be the consequence of a higher clearance rate of free oestrogens over their  $\alpha$ -fetoprotein-  
448 bound counterparts which are more stable (35). It was concomitant to a decrease in RP3V fibre density  
449 supporting the notion that the positive feedback of E2 on kisspeptin expression in this region is already  
450 operative and dose dependant (57). In contrast, this decrease in E2 level did not translate into a  
451 significant increase in the number of kisspeptin-ir neurones in the ARC as could have been expected  
452 from the known repressive effect of E2 on ARC *Kiss1* expression. No significant increase in *Kiss1*  
453 mRNA was detected neither during this period (28, 37). This is consistent with what is known from  
454 the negative feedback induced by estrogens on LH secretion in immature rats: a minute amount of E2  
455 is sufficient to fully display the negative feedback (59). The decrease in RP3V kisspeptin-ir that was  
456 measured between the end of the infantile and juvenile period is reminiscent of the well known decline  
457 in GnRH/LH release that occurs prior to puberty onset in developing rats (54, 55, 58, 60). Although  
458 this association may not be causative, the contribution of decreased RP3V kisspeptins to the juvenile  
459 brake in GnRH/LH release deserves further investigation.

460

#### 461 *Peri-pubertal period*

462 Despite no significant changes in E2 levels which remained low until adulthood as previously  
463 observed (55), kisspeptin immunoreactivity in the ARC at both cell body and fibre level was  
464 significantly higher after vaginal opening compared to the juvenile period. This peri-pubertal increase  
465 in ARC kisspeptin-ir despite unchanging levels of peripheral E2 is consistent with the study of Takase  
466 and collaborators predicting that the repressive effect of E2 on ARC *Kiss1* transcription may diminish  
467 between PND26 and PND70/PND84 (34). It can be temporally correlated to an increase in circulating  
468 LH levels in Wistar rats (34, 54, 55) and may thus represent an essential step in the re-activation of  
469 GnRH/LH pulsatile release that occurs at the onset of puberty. There is increasing evidence that this

470 brain region is the principal site of kisspeptin action for stimulation of GnRH pulsatile release  
471 including at the onset of puberty (49, 61, 62).

472

473 A significant increase in RP3V kisspeptin-ir fibre density was then detected during the  
474 transition from pubertal to adult stage between PND49 and PND61, which appeared specific to the  
475 females and may hence be related to the acquisition of competence for E2-induced pre-ovulatory  
476 GnRH surges. This was detected later than the increase in ARC kisspeptin-ir, consistent with the  
477 hypothesis that the release of E2's negative feedback on ARC kisspeptin neurones initiates a positive  
478 feedback on RP3V kisspeptin neurones (33).

479

#### 480 **Evolution of sex differences in kisspeptin-ir across postnatal development**

481 In the ARC, the sex difference in kisspeptin-ir fibre density established during the neonatal  
482 period persisted throughout postnatal development and was much more accentuated than in the RP3V,  
483 with an average of 5 times less immunoreactivity in males than in females. This sex difference may  
484 result from a combination of lower *Kiss1* transcription (37), lower kisspeptin synthesis and/or higher  
485 peptide release in males compared to females. In support of the later mechanism, no obvious sex  
486 difference was found in the density or distribution of kisspeptin-ir in the ARC of colchicine-treated  
487 rats (8). A similar sex difference in ARC kisspeptin-ir has been observed in adult sheep (16) and  
488 humans (17) but not in mice (12). Another interesting sex-difference concerns the relative kinetics of  
489 the peri-pubertal changes in kisspeptin-ir fibre density between the ARC and RP3V. For instance in  
490 males kisspeptin-ir changes in the ARC around puberty appeared synchronised with those observed in  
491 the RP3V. In contrast in females, kisspeptin-ir fibre density increased first in the ARC, smoothly and  
492 over a longer period of time and only later in the RP3V. This may relate to a female-specific E2  
493 negative feedback maturation mechanism exerted on ARC kisspeptin neurones to postpone puberty  
494 onset until the ovary is sufficiently mature to respond to the first pre-ovulatory LH surge. In line with  
495 this idea, genetically engineered female mice in which estrogen receptor  $\alpha$  has been specifically  
496 ablated in kisspeptin cells display a dramatic advance in puberty onset but no effect on males has yet  
497 been reported (33).



498 **Conclusion**

499           The present study showed an important sexual dimorphism in kisspeptin-ir in both the RP3V  
500 and ARC of rats, with males bearing fewer kisspeptin-ir cell bodies and/or lower fibre densities than  
501 females. This difference was already detectable at birth in the RP3V whereas in the ARC it developed  
502 during the first post-natal week to persist throughout post-natal development. During the infantile  
503 period, oestradiol levels are high and kisspeptin-ir in the RP3V increases while that in the ARC  
504 decreases consistent with the prediction that the kisspeptin neurones of these two regions are  
505 precociously sensitive to estrogens whose access to the brain increases with the infantile decline of  $\alpha$ -  
506 fetoprotein. Kisspeptin-ir changes around puberty were sex specific, with a sequential increase in  
507 females, first in the ARC and then in the RP3V, under constant low peripheral oestradiol levels. This  
508 is consistent with the hypothesis that the negative feedback of E2 on ARC kisspeptin neurones is  
509 progressively weakened during the juvenile period, leading to increased kisspeptin release and  
510 enabling oestrogen-dependent amplification of kisspeptins in the RP3V (31, 33, 34). Further *in vitro*  
511 studies will be of great help to test the hypothesis of a direct effect of estrogens on both ARC and  
512 RP3V kisspeptin neurones and help dissect out the molecular mechanisms involved in the change of  
513 their response to estrogens as cells mature. In males, a peri-pubertal increase in kisspeptin-ir was also  
514 observed, with a peak of immunoreactivity detected in both regions around puberty onset, and further  
515 investigations remain necessary to understand the factors regulating this increase and the respective  
516 roles if any of the two kisspeptin neurone populations in the timing of male puberty.

517

518

519 **Acknowledgements**

520

521           We gratefully thank Dr. Yves Tillet , Dr. A. Caraty and Dr. M. Keller for helpful discussions  
522 and critical reading of an earlier version of the manuscript, Dr S. Bouret for advices on Image J®  
523 analysis protocol, Lionel Lardic and Cindy Gassaud for technical assistance in the radioimmunological  
524 assay and immunohistochemical procedures, and Claude Cahier and his team for the care of animals.  
525 This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, France), the

526 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), NOVO Nordisk Foundation, and the  
527 University of Tours (France). Elodie Desroziers was supported by a fellowship from the INRA and the  
528 Region Centre (France).

529

530

### 531 **Legends**

532

### 533 **Supplemental Fig. 1 Scheme and photomicrographs of the areas sampled for the fibre density** 534 **analysis.**

535 Schematic drawing representing sections at the RP3V level (A) and at the ARC level (B). The boxed  
536 area in (A) and (B) pictures the localization of photomicrographs in (C) and (D), respectively. Each  
537 boxed area in (C) and (D) represents one photomicrograph obtained with objective x100 for the  
538 analysis of kisspeptin fibre density with Image J<sup>®</sup> software. AC; anterior commissure, LV; lateral  
539 ventricle, 3V; third ventricle, OC; optic chiasma. Scale bar: (C, D) 400µm.

540

### 541 **Fig. 1. Kisspeptin-ir fibres and cell bodies in the ARC and ME of neonatal male and female rats.**

542 A, B, D, E, F, G, and H are representative photomicrographs of female (A and B), and male ARC (G  
543 and H) and female ME (E and F). C and D represent schemes of the kisspeptin-ir fibre distribution at  
544 PND0 and PND07, respectively. Kisspeptin-ir cell bodies (arrows) were detected in the ARC at PND0  
545 in females (A) and in males (G). Inset of A and G represent a higher magnification of the boxed area.  
546 At PND0 the amount of ARC kisspeptin-ir fibres was similar in both sexes (A, G). At PND07, ARC  
547 kisspeptin-ir fibres were detected in females (B) and to a lesser extent in males (H). Insets represent  
548 higher magnification of corresponding boxed area; putative kisspeptinergic fibres are shown. PND,  
549 post-natal day; 3V, third ventricle; ZI, internal zone; ZE, external zone. Scale bar (A, B, G and  
550 H):100µm, (inset in A, B, G and H): 20µm and (E and F): 20µm.

551

552

553

554 **Fig. 2. Kisspeptin-ir fibres in the RP3V of neonatal male and female rats.**

555 A to D are representative photomicrographs of female (A and B) and male RP3V (C and D) at PND0  
556 (A and C) and PND07 (B and D). In females, some kisspeptin-ir fibres (arrow heads) were detected in  
557 the RP3V at PND0 (A) and PND07 (C). In males, no kisspeptin-ir fibres was observed at PND0 (B)  
558 but some kisspeptin-ir fibres could be detected at PND07 (arrow heads in D). PND; post-natal day,  
559 3V; third ventricle. Scale bar (A, B, C, D) 20µm.

560

561 **Fig. 3. Post-natal changes in Oestradiol level.**

562 Circulating E2 levels in female rats at different post-natal ages. Bars labelled with different letters are  
563 significantly different from each other at  $p < 0.05$  (Kruskall-Wallis followed by Wilcoxon test with  
564 Bonferroni adjustment). Alpha: significant difference ( $p < 0.01$ , Wilcoxon test). PND, post-natal day.

565

566 **Fig. 4. Post-natal changes in kisspeptin-ir cell bodies in ARC.**

567 Kisspeptin-ir cell body numbers were quantified in females (white bars) and in males (grey bars) at  
568 different stages of development: infantile, juvenile, pubertal and adult. Bars labelled with different  
569 letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  (Kruskall-Wallis followed by Wilcoxon  
570 test with Bonferroni adjustment). Beta: significant difference ( $p < 0.03$ , Wilcoxon test). PND, post-natal  
571 day.

572

573 **Fig. 5. Kisspeptin-ir fibres in the developing ARC of male and female rats.**

574 Kisspeptin-ir fibre density in the ARC (A) at different stages of female (white bars) and male (grey  
575 bars) peri-pubertal development. Bars labelled with different letters are significantly different from  
576 each other at  $p < 0.01$  (Kruskall-Wallis followed by Wilcoxon test with Bonferroni adjustment).  
577 Statistical differences between sexes are represented by asterisks \*\*  $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  (Wilcoxon  
578 test). Beta: significant difference ( $p < 0.03$ , Wilcoxon test). (B) are representative photomicrographs of  
579 kisspeptin-ir in the ARC of female and male rats respectively, at different stages of post-natal  
580 development: infantile (PND11 and PND19), juvenile (PND29), pubertal (PND49) and adult  
581 (PND61). PND, post-natal day; 3V, third ventricle. Scale bar 20µm.

582 **Fig. 6. Kisspeptin-ir fibres in the developing RP3V of male and female rats.**

583 Kisspeptin-ir fibre density in the RP3V (A) at different stages of female (white bars) and male (grey  
584 bars) peri-pubertal development. Bars labelled with different letters are significantly different from  
585 each other at  $p < 0.01$  (Kruskall-Wallis followed by Wilcoxon test with Bonferroni adjustment).  
586 Statistical differences between sexes are represented by asterisks \*\*  $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  (Wilcoxon  
587 test). (B) are representative photomicrographs of kisspeptin-ir in the RP3V of female and male rats  
588 respectively, at different stages of post-natal development: infantile (PND11 and PND19), juvenile  
589 (PND29), pubertal (PND49 ) and adult (PND61). PND, post-natal day; 3V, third ventricle. Scale bar  
590 20 $\mu$ m.

591

592

593

594 References

595

596

- 597 1. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF,  
598 Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin  
599 secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004; **145**(9): 4073-7.
- 600 2. Gore AC. GnRH: The Master Molecule. New York City: Springer 2002.
- 601 3. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR,  
602 Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin directly  
603 stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc*  
604 *Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**(5): 1761-6.
- 605 4. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castano JP, Malagon MM,  
606 Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M. Ontogeny and mechanisms of  
607 action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of  
608 the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; **257-875-83**.
- 609 5. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Yoshihisa Uenoyama, Iwata K,  
610 Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K-I. Involvement of Central Metastin in  
611 the Regulation of Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Estrous Cyclicity in Female  
612 Rats. *Endocrinology*. 2005; **146**(10): 4431-8.
- 613 6. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1  
614 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005; **146**(9): 3686-92.
- 615 7. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK,  
616 Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain  
617 of the male mouse. *Endocrinology*. 2005; **146**(7): 2976-84.
- 618 8. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H,  
619 Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of  
620 anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action  
621 on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 2007; **53**(2): 367-78.
- 622 9. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE,  
623 Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of  
624 the rat. *Endocrinology*. 2007; **148**(4): 1774-83.

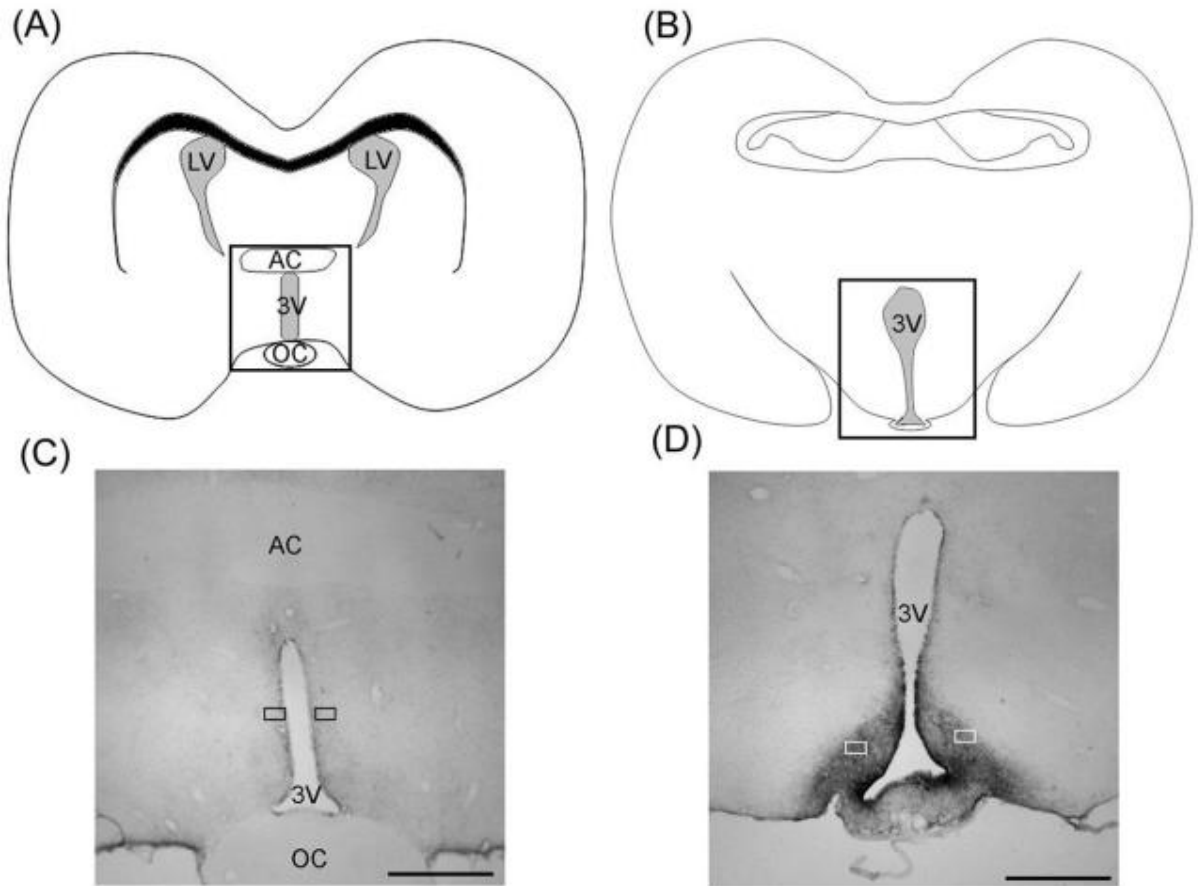
- 625 10. Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, Clifton  
626 DK, Levine JE, Steiner RA. Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine  
627 brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci.* 2009; **29**(29):  
628 9390-5.
- 629 11. Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa  
630 T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H.  
631 Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular  
632 kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol Reprod.* 2009; **81**(6):  
633 1216-25.
- 634 12. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse  
635 hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone  
636 neurons. *Endocrinology.* 2006; **147**(12): 5817-25.
- 637 13. Greives TJ, Humber SA, Goldstein AN, Scotti MA, Demas GE, Kriegsfeld LJ.  
638 Photoperiod and testosterone interact to drive seasonal changes in kisspeptin expression in  
639 Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol.* 2008; **20**(12): 1339-47.
- 640 14. Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M,  
641 Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN.  
642 Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal  
643 connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for  
644 seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology.* 2008; **149**(11): 5770-82.
- 645 15. Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus  
646 and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology.*  
647 2009; **150**(12): 5530-8.
- 648 16. Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN. The  
649 Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Cell Population of the Arcuate Nucleus: Sex  
650 Differences and Effects of Prenatal Testosterone in the Sheep. *Neuroendocrinology.* 2010;  
651 **151**(1): 301-11.
- 652 17. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghati  
653 MA, Dhillon WS, Liposits Z, Kallo I. The kisspeptin system of the human hypothalamus:  
654 sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B  
655 neurons. *Eur J Neurosci.* 2010; **31**(11): 1984-98.
- 656 18. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.*  
657 2009; **30**(6): 713-43.
- 658 19. Desroziers E, Mikkelsen J, Simonneaux V, Keller M, Tillet Y, Caraty A, Franceschini  
659 I. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol.* 2010;  
660 **22**(10): 1101-12.
- 661 20. Yeo SH, Herbison AE. Projections of Arcuate Nucleus and Rostral Periventricular  
662 Kisspeptin Neurons in the Adult Female Mouse Brain. *Endocrinology.* 2011; **152**(6): 2387-  
663 99.
- 664 21. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E.  
665 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide  
666 receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; **100**(19): 10972-6.
- 667 22. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK,  
668 Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB,  
669 Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA,  
670 Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003; **349**(17):  
671 1614-27.
- 672 23. Mayer C, Boehm U. Female reproductive maturation in the absence of  
673 kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat Neurosci.* 2011; **14**(6): 704-10.

- 674 24. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG,  
675 Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH.  
676 Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad*  
677 *Sci U S A*. 2007; **104**(25): 10714-9.
- 678 25. Lapatto R, Pallais JC, Zhang DS, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman  
679 GE, Seminara SB. Kiss1(-/-) mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54(-/-) mice.  
680 *Endocrinology*. 2007; **148**:4927-36.
- 681 26. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML,  
682 Gaytan F, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M. Advanced vaginal opening and  
683 precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of  
684 GPR54. *J Physiol*. 2004; **561**(Pt 2): 379-86.
- 685 27. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-  
686 Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M. Critical roles of kisspeptins in  
687 female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist.  
688 *Endocrinology*. 2010; **151**(2): 722-30.
- 689 28. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-  
690 Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally  
691 regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54,  
692 in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide.  
693 *Endocrinology*. 2004; **145**(10): 4565-74.
- 694 29. Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton D, Steiner RA. Sex Differences in the  
695 Regulation of Kiss1/NKB Neurons in Juvenile Mice: Implications for the Timing of Puberty.  
696 *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; **297**:1212-21.
- 697 30. Gonzalez-Martinez D, Mees CD, Douhard Q, Szpirer C, Bakker J. Absence of  
698 Gonadotropin-Releasing Hormone 1 and Kiss1 Activation in  $\alpha$ -Fetoprotein Knockout Mice:  
699 Prenatal Estrogens Defeminize the Potential to Show Preovulatory Luteinizing Hormone  
700 Surges. *Endocrinology*. 2008; **149**(5): 2333-41.
- 701 31. Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal development of an  
702 estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*.  
703 2009; **150**(7): 3214-20.
- 704 32. Bakker J, Pierman S, Gonzalez-Martinez D. Effects of aromatase mutation (ArKO) on  
705 the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus  
706 opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav*. 2010; **57**(4-5): 390-5.
- 707 33. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Levine  
708 JE. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor {alpha}-  
709 signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; **107**(52): 22693-8.
- 710 34. Takase K, Uenoyama Y, Inoue N, Matsui H, Yamada S, Shimizu M, Homma T,  
711 Tomikawa J, Kanda S, Matsumoto H, Oka Y, Tsukamura H, Maeda KI. Possible role of  
712 oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas  
713 of female rats. *J Neuroendocrinol*. 2009; **21**(6): 527-37.
- 714 35. Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP, White SS. Recent advances in the endocrinology  
715 of puberty. *Endocr Rev*. 1980; **1**(3): 228-57.
- 716 36. Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Tena-Sempere M, Juul A, Mikkelsen JD.  
717 Maturation of kisspeptinergic neurons coincides with puberty onset in male rats. *Peptides*.  
718 2010; **31**(2): 275-83.
- 719 37. Takumi K, Iijima N, Ozawa H. Developmental changes in the expression of kisspeptin  
720 mRNA in rat hypothalamus. *J Mol Neurosci*. 2010; **43**(2): 138-45.
- 721 38. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner  
722 RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a  
723 neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005; **25**(49): 11349-56.

- 724 39. Redmond JS, Baez-Sandoval GM, Spell KM, Spencer TE, Lents CA, Williams GL,  
725 Amstalden M. Developmental changes in hypothalamic Kiss1 expression during activation of  
726 the pulsatile release of luteinising hormone in maturing ewe lambs. *J Neuroendocrinol.* 2011;  
727 **23**(9): 815-22.
- 728 40. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased  
729 hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates.  
730 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**(6): 2129-34.
- 731 41. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates (Second Edition). In:  
732 press A, ed. 2007.
- 733 42. Porteros A, Gomez C, Valero J, Calvo-Baltanas F, Alonso JR. Chemical organization  
734 of the macaque monkey olfactory bulb: III. Distribution of cholinergic markers. *J Comp*  
735 *Neurol.* 2007; **501**(6): 854-65.
- 736 43. Constantin S, Caraty A, Wray S, Duittoz AH. Development of gonadotropin-releasing  
737 hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinology.* 2009; **150**(7): 3221-7.
- 738 44. Fiorini Z, Jasoni CL. A novel developmental role for kisspeptin in the growth of  
739 gonadotrophin-releasing hormone neurites to the median eminence in the mouse. *J*  
740 *Neuroendocrinol.* 2010; **22**(10): 1113-25.
- 741 45. Iijima N, Takumi K, Sawai N, Ozawa H. An immunohistochemical study on the  
742 expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly  
743 developed anti-kisspeptin antibody. *J Mol Neurosci.* 2010; **43**(2): 146-54.
- 744 46. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain  
745 projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and  
746 monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience.* 2010; **166**(2): 680-97.
- 747 47. True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS. Characterisation of arcuate nucleus  
748 kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J*  
749 *Neuroendocrinol.* 2010; **23**(1): 52-64.
- 750 48. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin  
751 B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of  
752 gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 2010; **151**(8): 3479-89.
- 753 49. Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, Okamura  
754 H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus.  
755 *Brain Res.* 2010; **1364**:103-15.
- 756 50. Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, Kisspeptin, GPR54 and the Pre-Ovulatory  
757 Luteinising Hormone Surge. *Journal of Neuroendocrinology.* 2009; **21**(4): 305-11.
- 758 51. Kim J, Semaan SJ, Clifton DK, Steiner RA, Dhamija S, Kauffman AS. Regulation of  
759 Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology.* 2011;  
760 **152**(5): 2020-30.
- 761 52. Cao J, Patisaul HB. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors  
762 alpha and beta and kiss1 in neonatal male and female rats. *J Comp Neurol.* 2011; **519**  
763 (15):2954-77
- 764 53. Semaan SJ, Murray EK, Poling MC, Dhamija S, Forger NG, Kauffman AS. BAX-  
765 dependent and BAX-independent regulation of Kiss1 neuron development in mice.  
766 *Endocrinology.* 2010; **151**(12): 5807-17.
- 767 54. Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Fernandez-Mendez C, Garcia-San Frutos M,  
768 Botella-Cubells LM, Fernandez-Vazquez G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene  
769 expression during pubertal development of female rats. *Biol Reprod.* 2004; **70**(2): 348-55.
- 770 55. Dohler KD, Wuttke W. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to  
771 puberty in female and male rats. *Endocrinology.* 1974; **94**(4): 1003-8.

- 772 56. Greenstein BD. Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free  
773 fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors.  
774 *Endocrinology*. 1992; **130**(6): 3184-90.
- 775 57. Andrews WW, Mizejewski GJ, Ojeda SR. Development of estradiol-positive feedback  
776 on luteinizing hormone release in the female rat: a quantitative study. *Endocrinology*. 1981;  
777 **109**(5): 1404-13.
- 778 58. Ojeda SR, Kalra PS, McCann SM. Further studies on the maturation of the estrogen  
779 negative feedback on gonadotropin release in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1975;  
780 **18**(3): 242-55.
- 781 59. Ramirez DV, Mc CS. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH)  
782 secretion in immature and adult rats. *Endocrinology*. 1963; **72**:452-64.
- 783 60. Hompes PG, Vermes I, Tilders FJ, Schoemaker J. In vitro release of LHRH from the  
784 hypothalamus of female rats during prepubertal development. *Neuroendocrinology*. 1982;  
785 **35**(1): 8-12.
- 786 61. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can  
787 stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve  
788 terminals. *Endocrinology*. 2008; **149**(8): 3926-32.
- 789 62. Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E. An increase in kisspeptin-  
790 54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1  
791 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology*. 2008;  
792 **149**(8): 4151-7.  
793  
794





Supplemental figure 1

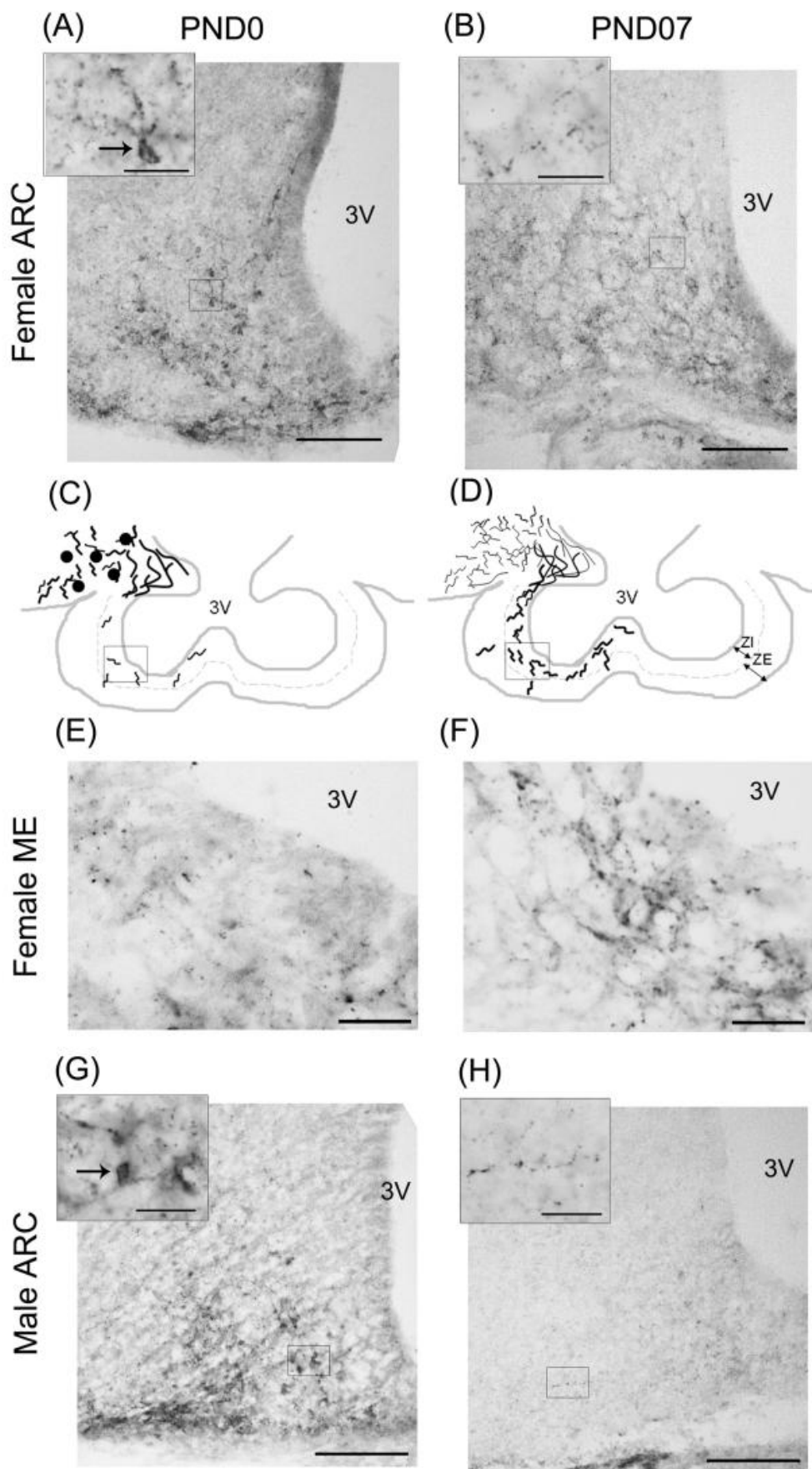


Figure 1

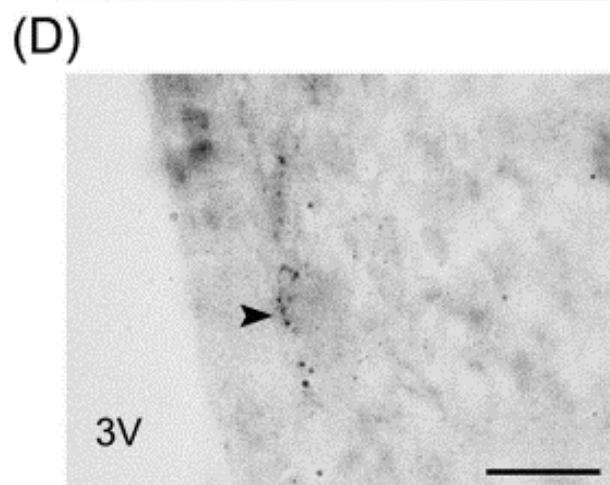
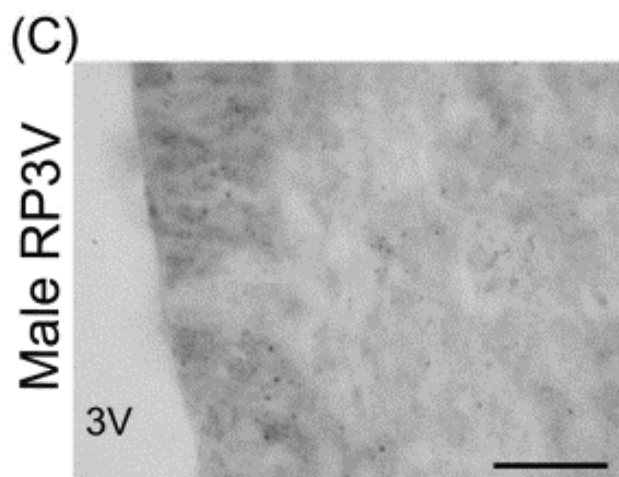
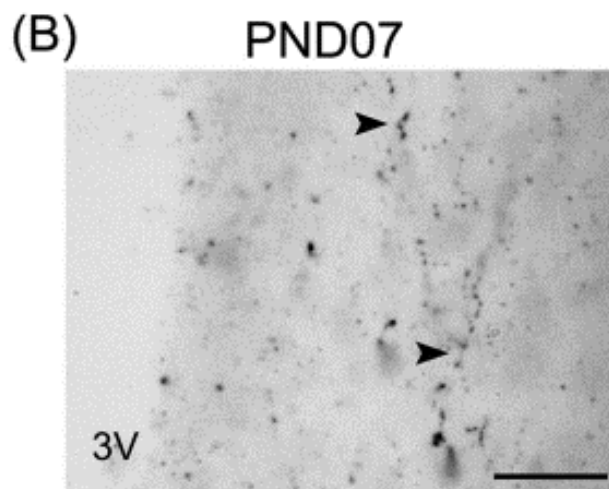
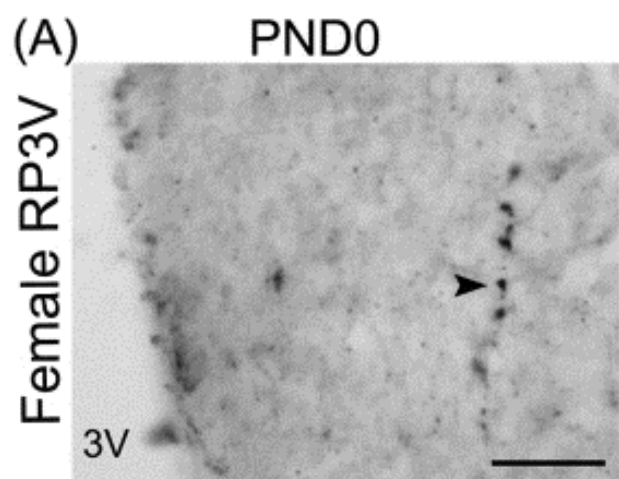


Figure 2

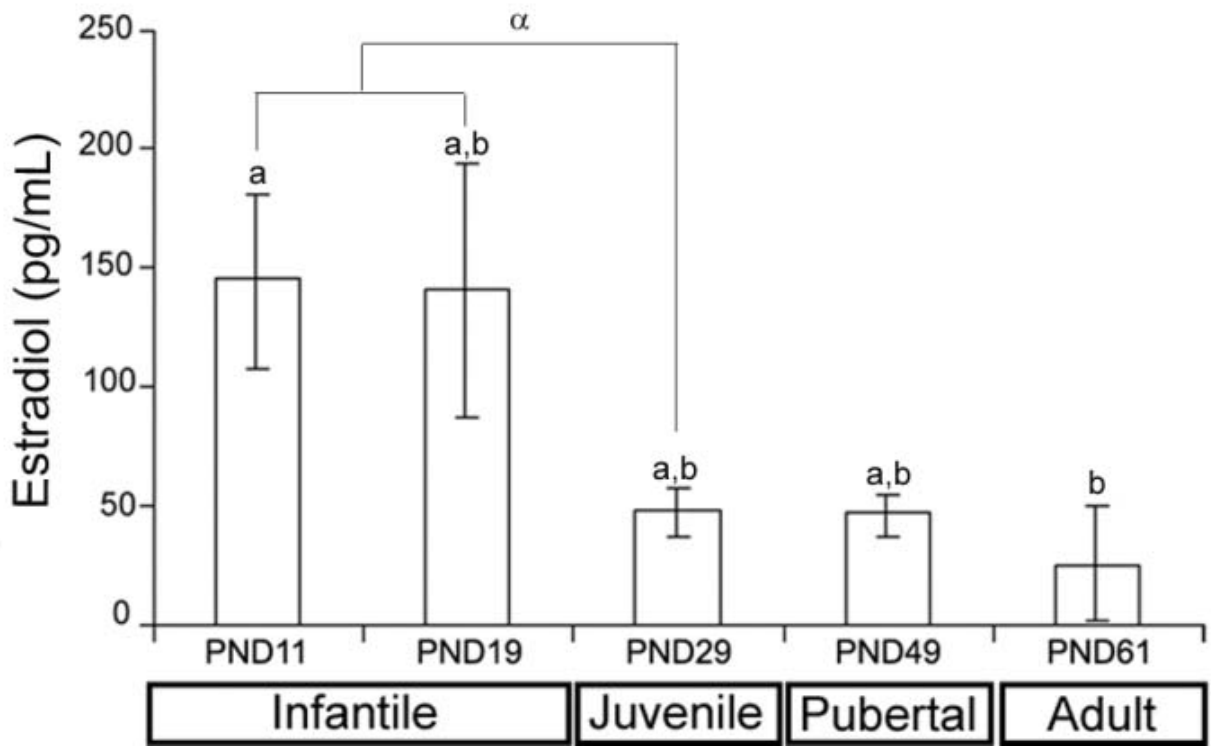


Figure 3

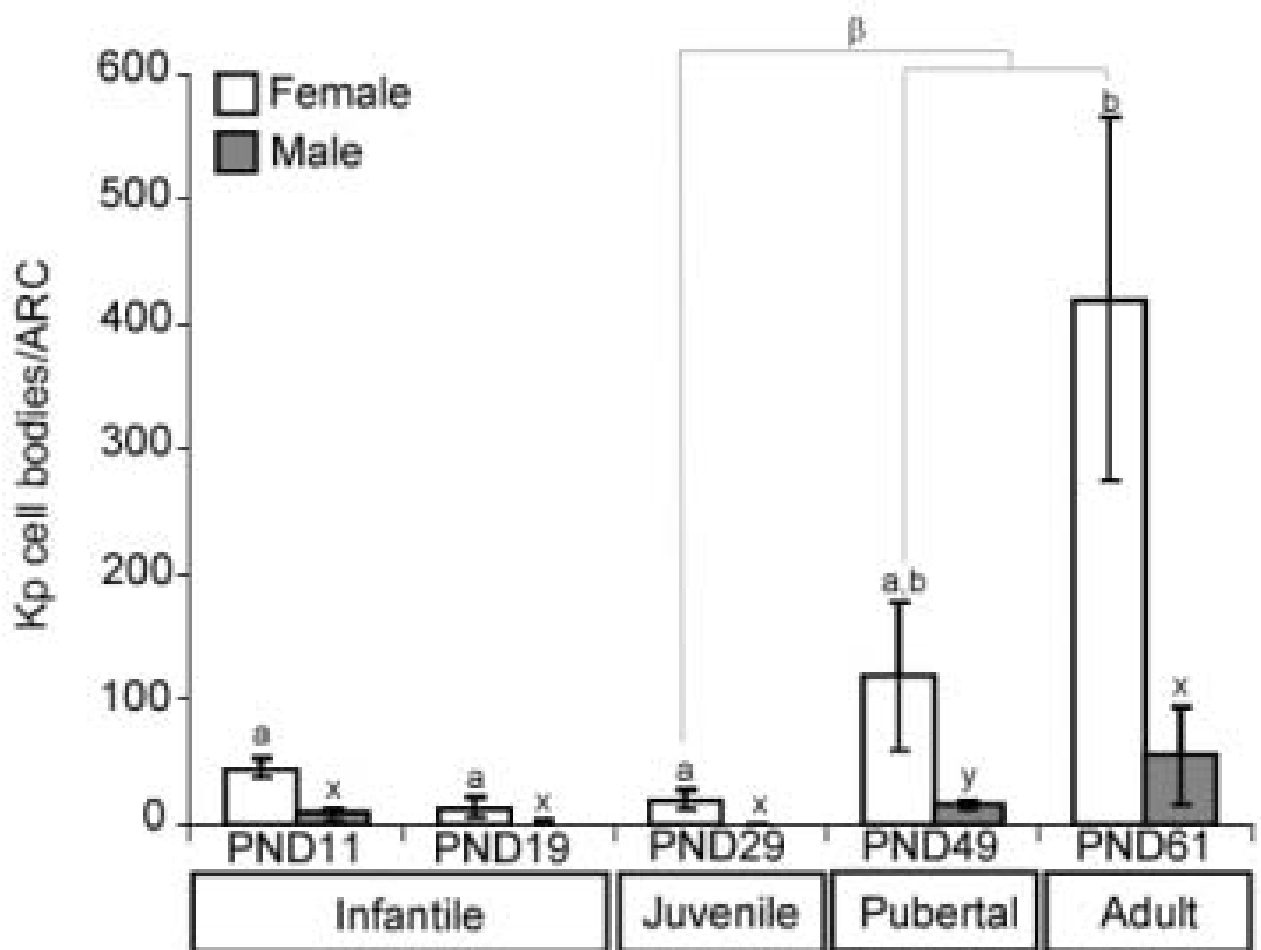


Figure 4

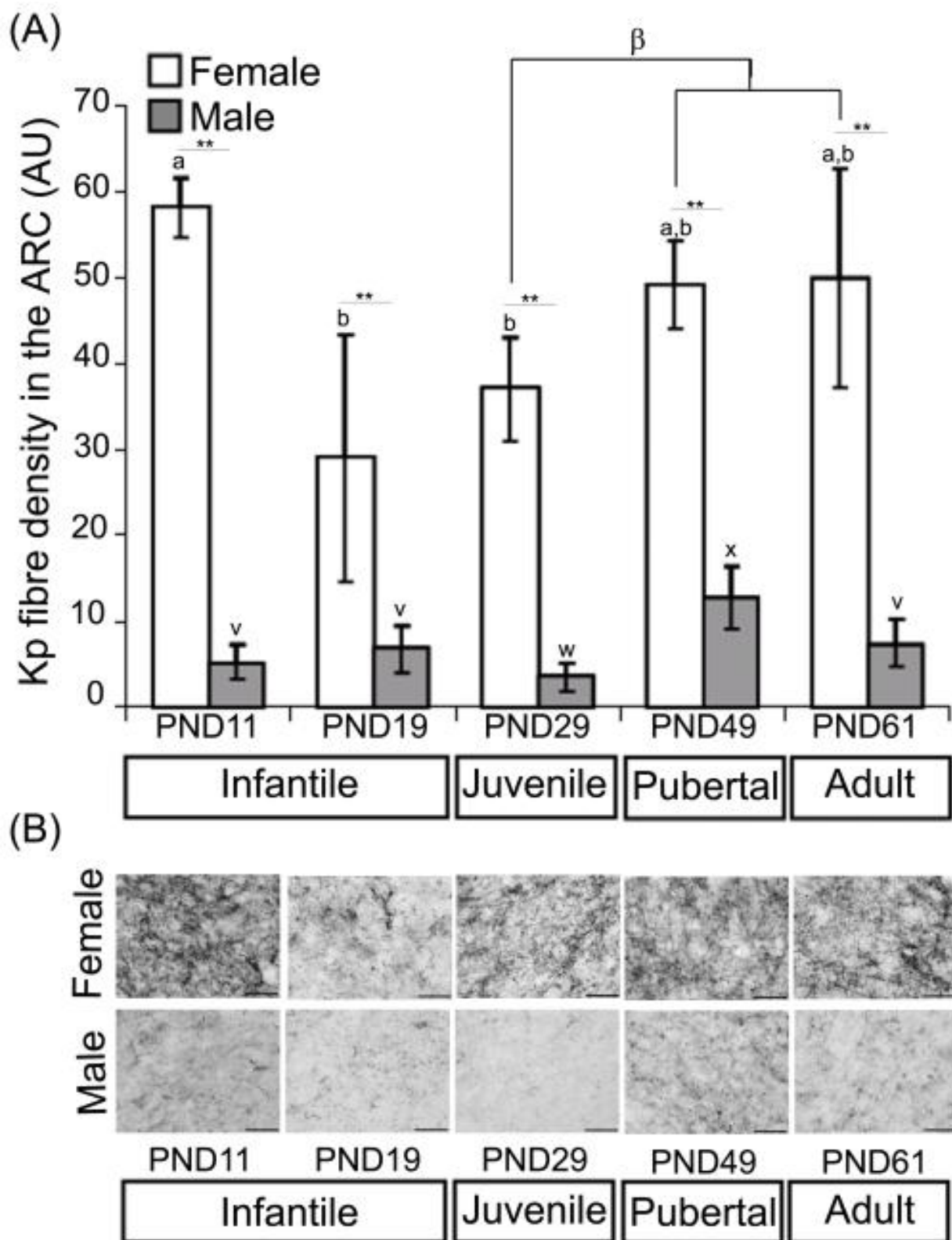


Figure 5

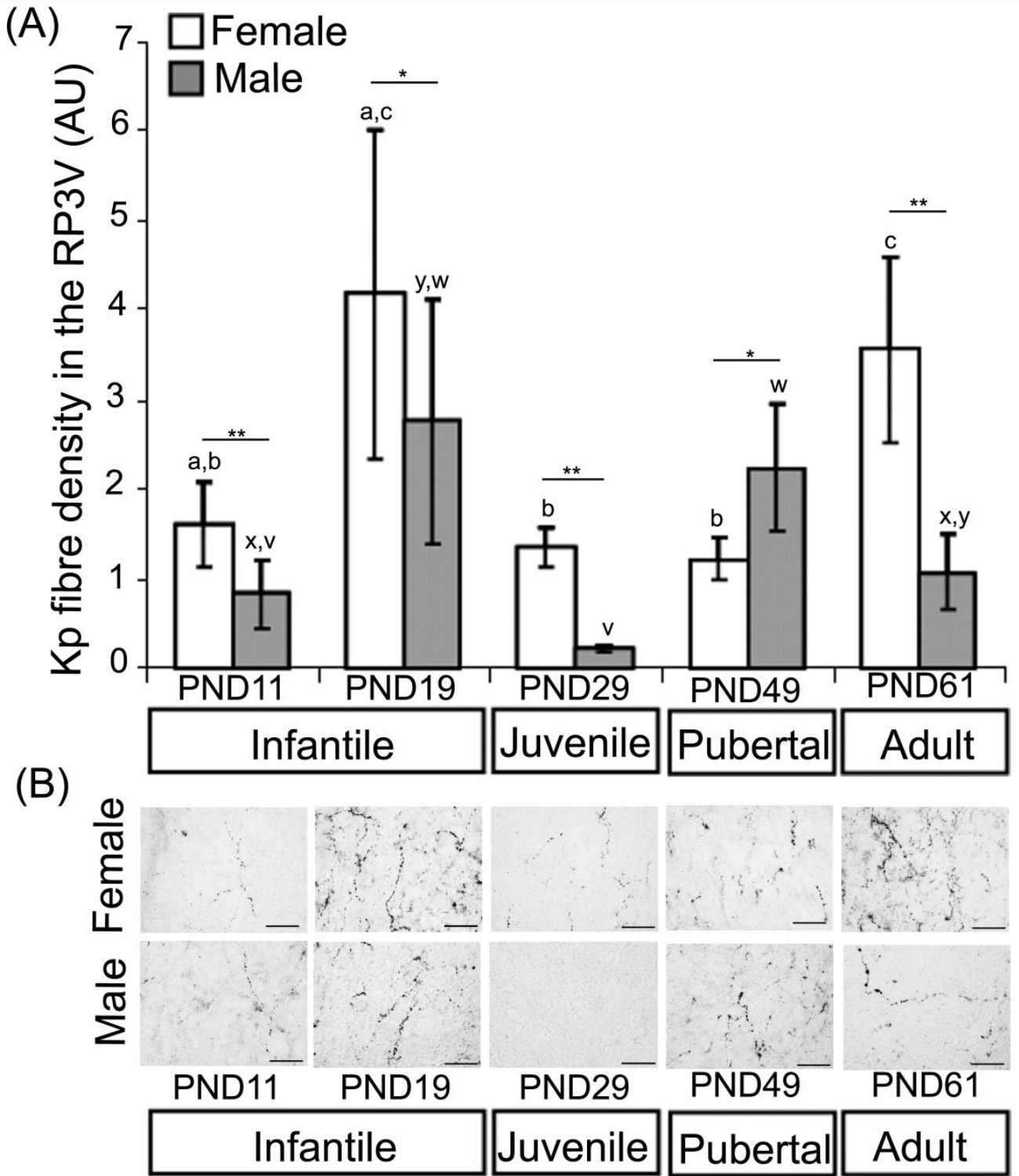
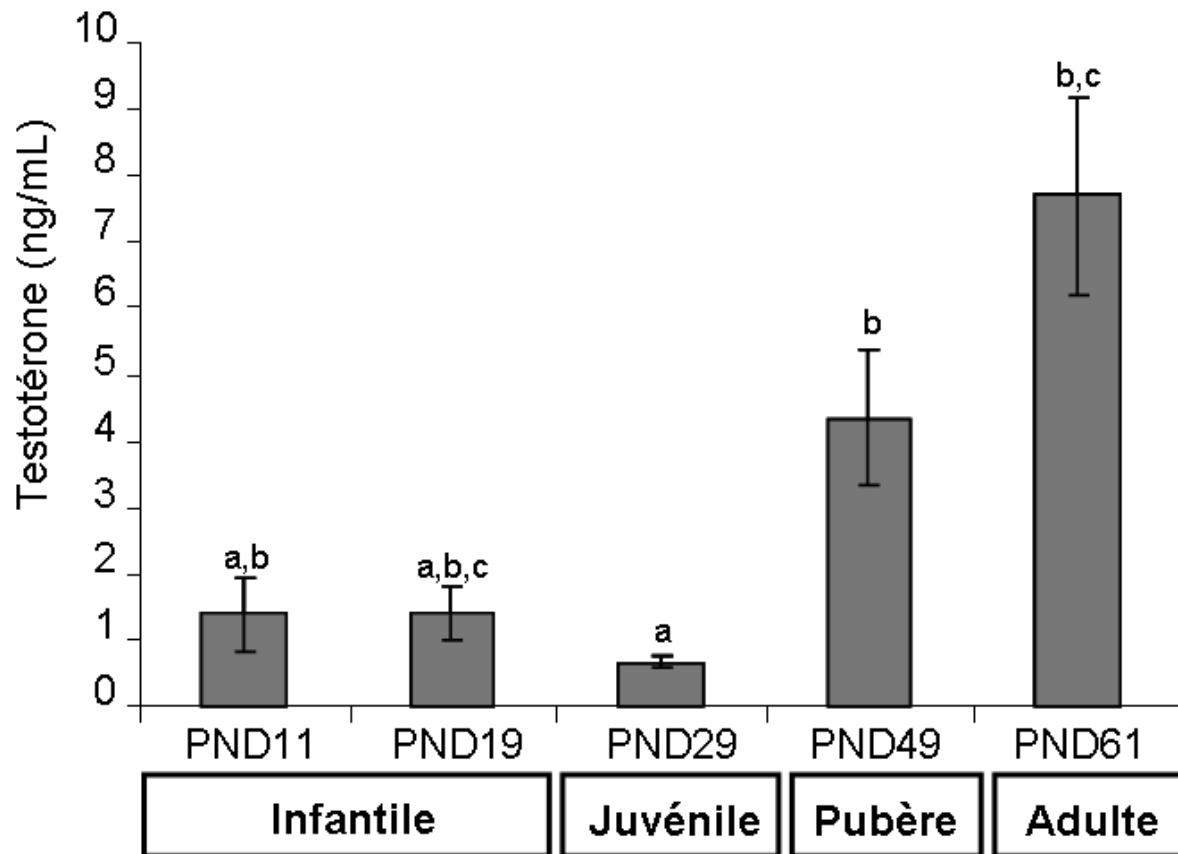
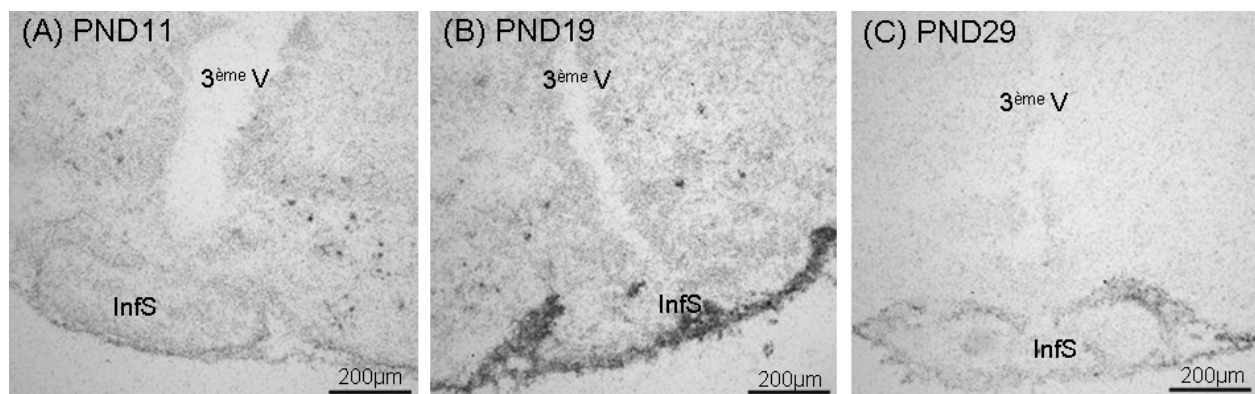


Figure 6



**Figure 20: Niveaux de testostérone plasmatique au cours du développement péri-pubertaire chez le rat mâle.** Les barres avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres à  $p < 0,05$ . PND: jours post-natal.



**Figure 21: Détection de cellules kiss-1 par hybridation in situ au cours du développement pré-pubertaire dans le noyau arqué postérieur des femelles.** Des clusters de grains d'argent sont détectés dans le noyau arqué chez des femelles à PND11 (A), et PND19 (B) mais aucun cluster n'est observé à PND29 (C). 3<sup>ème</sup> V: 3<sup>ème</sup> ventricule, InfS: tige infundibulaire, PND: jours post-natal.



### **III. Résultats complémentaires :**

#### **III.1. Dosage de la testostérone au cours du développement péri-pubertaire chez les mâles.**

Nous avons prélevés des échantillons de sang sur des mâles aux différents stades de développement étudiés. Les résultats obtenus après dosage radio-immunologique de la testostérone plasmatique montrent que les niveaux de testostérone sont bas en période infantile et juvénile (Figure 24). En période pubertaire, les niveaux de testostérone augmentent et sont significativement plus élevés en période pubertaire (PND49) comparé à la période juvénile (PND29) ( $p < 0,05$ , Figure 24). Enfin, chez l'adulte, les niveaux de testostérone sont significativement supérieurs à ceux observés en début de période infantile (PND11) ( $p < 0,05$ ), et en période juvénile (PND29) ( $p < 0,05$ ) (Figure 24). Ainsi, ces résultats montrent que les niveaux de testostérone plasmatique augmentent après la période juvénile jusqu'à l'âge adulte.

#### **III.2. Résultats préliminaires des variations de l'ARN messenger en période pré-pubertaire chez la femelle :**

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le but originel de l'étude était de comparer les variations des niveaux d'ARN messenger *Kiss1* avec l'immunoréactivité kp au cours du développement péri-pubertaire. Cette comparaison aurait permis de discriminer si les variations observées pouvaient être dû à une régulation d'expression génique ou à une régulation post-transcriptionnelle. Malheureusement, la mise en place de la technique d'hybridation *in situ* s'est avérée plus compliquée que prévu (voir Annexe 2). Cependant, nous avons réussi à avoir des résultats positifs avec cette technique dans le noyau arqué sur une femelle de chaque âge en période infantile et juvénile : PND11, PND19 et PND29 (Figure 30). En effet, nous avons pu détecter des clusters de grains d'argent au niveau du noyau arqué sur un animal à PND11 (Figure 30 A) et PND19 (Figure 30 B). A PND29, sur une femelle ayant été traitée en même temps que les deux précédentes, aucun cluster n'a été détecté au sein du noyau arqué (Figure 30 C).

#### **IV. Conclusion**

Dans cette étude au cours du développement post-natal, nous avons démontré l'établissement des différences sexuelles au niveau de l'immunoréactivité kp en période néonatale qui persistent tout au long du développement. Les résultats de l'analyse de l'immunoréactivité kp au cours du développement péri-pubertaire ont montré des variations du nombre de corps cellulaires et des densités de fibres kp-ir en fonction des deux régions et du sexe étudiés..

Chapitre 3 :  
Cartographie de kp chez l'adulte

Article 3

**Mapping of Kisspeptin Fibers in the Brain of the  
Pro-Oestrous Rat**

Publié dans Journal of Neuroendocrinology 22:1101-1112 (2010)

Référence Anti-kisspeptine	Caractéristiques	Immunogène utilisé	Première publication
<b>Phoenix Pharma</b>	Lapin polyclonal	kp10-NH2 humain	Dun et al., 2003
<b>Takeda #254</b>	Souris monoclonal	kp(aa36-52)-NH2 de rat	Kinoshita et al., 2005
<b>AC#564/AC#566 (Millipore)</b>	Lapin polyclonal	kp10-NH2 de souris	Franceschini et al., 2006 d'Anglemont de Tassigny 2007
<b>Bachem T-4771</b>	Lapin polyclonal	kp10-NH2 humain	Greives et al., 2007
<b>GQ2</b>	Mouton polyclonal	kp54-NH2 humain	Ramaswamy et al, 2008
<b>JLV</b>	Lapin polyclonal	kp52-NH2 de rat	Mikkelsen et al, janvier 2009

**Tableau 12: Différents anticorps anti-kisspeptine publiés au début de la thèse et leurs caractéristiques.** En rouge, anticorps montré comme non spécifique; en vert, anticorps utilisés au cours de la thèse.

## **I. Rappel du contexte bibliographique de l'étude:**

Lorsque l'on compare les différents résultats publiés obtenus par immunohistochimie anti-kp, des différences sont observées entre les études au sein d'une même espèce mais également entre les données obtenues par HIS et celles obtenues par IHC (cf. page 34 paragraphe III.1 et page 35 paragraphe III.2 de l'introduction et Tableau 1 et 2). Ces différences peuvent être dues à des méthodes différentes mais également à l'utilisation de différents anticorps (Tableau 11). Pour rappel, les kp sont une famille de petits neuropeptides issus d'une protéine précurseur. Différents sites de clivages protéolytiques théoriques suggèrent que cette protéine précurseur donnerait une grande isoforme de kp, le kp-52 chez le rat, et une petite isoforme le kp-16. Des isoformes encore plus petites ont été purifiées à partir d'extraits de placenta humains (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Cependant, l'existence de ces différentes isoformes dans le cerveau n'est pas encore connue. Toutes ces isoformes ont en commun la partie C-terminal du kp qui présente un motif RF-NH<sub>2</sub>. D'autres peptides appartenant à la famille des RF-amides, à laquelle appartient le kp, présentent également ce motif amidé très immunogène. Au début de la thèse, de nombreux anticorps anti-kp avaient été développés et tous avaient été générés à l'aide d'immunogènes contenant le motif RF-amide (Tableau 11). La majorité de ces anticorps avaient été générés avec du kp-10 reconnaissant toutes les isoformes. Certains avaient été générés avec l'isoforme longue kp-52 de rat ou kp-54 humain reconnaissant majoritairement la longue isoforme.

Une cartographie des corps cellulaires et des fibres à kp était publiée chez le rat mâle (Brailoiu *et al.*, 2005). Mais la spécificité de l'immunomarquage obtenu avec l'anticorps utilisé (Dun *et al.*, 2003), fourni par Phoenix Pharmaceuticals®, avait été mise en doute quelques années plus tard (Goodman *et al.*, 2007). L'anticorps le plus utilisé au début de la thèse était l'anticorps produit dans notre laboratoire par le Dr Alain Caraty : l'anti-kp-10 C-term de souris (AC#564/AC#566) (Clarkson & Herbison, 2006b; Franceschini *et al.*, 2006). Néanmoins, la capacité de cet anticorps à reconnaître spécifiquement les différentes isoformes de kp selon les espèces et la méthode commençait à être mise en doute (First world conference on kp signalling in the brain, Cordoue, Novembre 2008) (Oakley *et al.*, 2009). En effet, la présence de cellules kp-ir dans le dorsomédian, région dans laquelle aucune cellule *Kiss1* n'avait été détectée, était très controversée. Nous avons donc obtenus par collaboration avec le Dr Mikkelsen (University of Copenhagen) l'anti-kp 52 de rat (JLV) (Mikkelsen & Simonneaux, 2009) qui n'était pas encore publié et qui semblait reconnaître majoritairement

la longue isoforme du kp de rat. **Notre premier objectif a donc été d'établir une cartographie détaillée de l'immunoréactivité kp chez des rates adultes en proestrus avec les deux anticorps l'un reconnaissant toutes les isoformes : l'anti-kp10 C-term (AC#564); et, l'autre la longue isoforme : l'anti-kp-52 (JLV) de rat.** Cette étude, nous a permis de publier une cartographie comparée des cellules et des fibres à kp dans l'hypothalamus de rate en proestrus en fonction de l'anticorps utilisé. Dans un premier temps, nous résumerons les données obtenues dans cet article puis nous détaillerons les résultats complémentaires non publiés obtenus dans le dorsomédian.

## **II. Résumé de l'article :**

Au début de la thèse, aucune cartographie des corps cellulaires et des fibres kp chez la rate adulte n'avait été publiée avec un anticorps permettant d'obtenir un marquage spécifique. Nous avons donc **établi une cartographie détaillée de l'immunoréactivité kp chez des rates.**

Pour ce travail, des marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur 4 rates en proestrus, stade du cycle où le nombre de cellule kp-ir est maximal dans l'ARC chez la rate (Kinoshita *et al.*, 2005). Des coupes consécutives de cerveaux de chacune de ces rates ont été immunomarquées avec soit l'anti-kp-10 C-term (AC #564) soit l'anti-kp-52 (JLV). Ce dernier n'ayant pas été caractérisé, des tests de pré-adsorption ainsi qu'une étude par Western blot ont été réalisés pour démontrer sa spécificité.

Premièrement, l'étude par Western blot a permis de montrer que l'anti-kp 52 (JLV) reconnaissait bien l'isoforme kp-52 synthétique ainsi qu'une bande de même poids moléculaire dans des extraits de noyau arqué de rates en proestrus. De plus, la pré-adsorption de l'anticorps avec de kp-52 synthétique de rat abolit complètement le marquage. Pour finir, l'étude par tests de pré-adsorption a montré que le marquage kp observé dans le noyau arqué avec l'anti-kp-52 (JLV) n'était pas abolit par les différents neuropeptides de la famille des RF-amides contrairement à la pré-adsorption à l'aide de l'anti-kp 52 synthétique de rat. L'observation de l'immunoréactivité obtenue lors d'une pré-adsorption avec le kp-52 synthétique de rat montre toutefois une réaction croisée de l'anticorps avec certains épendymocytes de types tanocytes tout de même discriminable du marquage de type kp. En effet, le marquage des fibres kp-ir est de type variqueux tandis que le marquage de type tanocytaire est beaucoup plus lisse.

Deuxièmement, l'étude comparative a démontré que la majorité des structures ir suite à l'utilisation des deux anticorps étaient les mêmes. Les corps cellulaires kp-ir sont détectés uniquement dans le noyau arqué, plus particulièrement en grande nombre dans le tiers postérieur du noyau arqué. Aucun corps cellulaire immunoréactif n'est détecté dans le RP3V. En ce qui concerne les fibres ir pour le kp, elles ont été détectées dans de nombreuses régions du continuum hypothalamique : l'aire pré-optique, la bande diagonale de Broca, le noyau du septum hypothalamique, le RP3V, les noyaux supra-chiasmatiques, supra-optique, para- et péri-ventriculaire, le noyau dorsomédian, le noyau arqué ainsi que l'éminence médiane. Il est important de noter que dans cette dernière, les fibres kp-ir sont observées en plus grande densité dans la zone interne de l'éminence et seulement quelques fibres sont détectées dans la zone externe de l'éminence médiane. Ce patron d'immunoréactivité est également observé dans la tige infundibulaire.

Troisièmement, quelques différences ont été observées entre l'immunoréactivité obtenue avec l'anti-kp-10 C-term (AC#564) et celle obtenue avec l'anti-kp-52 (JLV). En effet, certaines régions présentent des fibres kp-ir lors d'un marquage avec l'anti-kp-10 C-term (AC#564) et aucunes fibres lors de l'utilisation de l'anticorps kp-52 (JLV): le septum dorsomédian, le fornix antérieur, le noyau accumbens et le noyau latéral de la lie de la strie terminale.

Pour conclure, notre étude montre la présence de fibres kp-ir dans de nombreuses régions de l'hypothalamus chez le rat suggérant ainsi que le kp pourrait avoir un rôle en dehors de la fonction de reproduction chez le rat. De plus, nos résultats indiquent quelques différences de marquages entre l'anticorps anti-kp-10 C-term de souris (AC#564) et l'anticorps anti-kp-52 de rat (JLV) dans certaines régions de l'hypothalamus suggérant soit la présence de petites isoformes ou d'une réaction croisée de l'anticorps dans ces régions chez le rat.

## Mapping of Kisspeptin Fibres in the Brain of the Pro-Oestrous Rat

E. Desroziers\*, J. Mikkelsen†, V. Simonneaux‡, M. Keller\*, Y. Tillet\*, A. Caraty\* and I. Franceschini\*

\*UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours/Haras Nationaux, Nouzilly, France.

†Neurobiology Research Unit, University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

‡Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département de Neurobiologie des Rythmes, UPR CNRS 3212, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

### Journal of Neuroendocrinology

Kisspeptins are a family of small peptides that play a key role in the neuroendocrine regulation of the reproductive function through neural pathways that have not yet been completely identified. The present study aimed to investigate the distribution of kisspeptin neurone fibres in the female rat brain by comparing precisely the immunoreactive pattern obtained with two antibodies: one specifically directed against kisspeptin-52 (Kp-52), the longest isoform, and the other directed against kisspeptin-10 (Kp-10), whose sequence is common to all putative mature isoforms. With both antibodies, immunoreactive cell bodies were exclusively observed in the arcuate nucleus, and immunoreactive fibres were confined to the septo-preoptico-hypothalamic continuum of the brain. Fibres were observed in the preoptic area, the diagonal band of Broca, the septohypothalamic area, the anteroventral periventricular, suprachiasmatic, supraoptic, paraventricular and periventricular nuclei, the dorsal border of the ventromedian nucleus, the dorsomedial and arcuate nuclei, and the median eminence. In the latter structure, varicose fibres were mainly distributed in the internal layer and were detected to a lesser extent throughout the external layer, including around the deeper part of the infundibular recess. Most regions of immunoreactive cells and fibres matched perfectly for the two antibodies. However, fibres in the dorsolateral septum, anterior fornix, accumbens nucleus and the lateral bed nucleus of the stria terminalis were only recognised by antibody anti-Kp-10, suggesting that anti-Kp-10 may recognise a wider range of kisspeptin isoforms than anti-Kp-52 or cross-react with molecules other than kisspeptin in rat tissue. Overall, these results illustrate the variety of projection sites of kisspeptin neurones in the rat and suggest that these peptides play a role in different functions.

#### Correspondence to:

Dr I. Franceschini, Unité de  
Physiologie de la Reproduction et des  
Comportements, UMR 6175  
INRA/CNRS/Univ.Tours, 37380  
NOUZILLY France. (e-mail:  
isabelle.franceschini@tours.inra.fr).

**Key words:** kisspeptin, rat, antibody, hypothalamus, median eminence.

doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02053.x

Kisspeptin neurones have recently been identified as a key neuroendocrine system one step upstream of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones, and they have emerged as fundamental integrators of environmental and internal factors for the regulation of reproduction (1–5). Although the cells expressing the *Kiss1* gene have now been consistently mapped to the arcuate nucleus and preoptic area in the brain of numerous mammalian species including the mouse, hamster, rat, sheep, pig, monkey and human, precise data on kisspeptin peptide innervation are largely incomplete (3). To date, Kisspeptin fibres have been mainly studied across species for their proximity to GnRH soma and terminals (2, 6, 7) and, other than

one study in mice (8), a complete picture of the kisspeptin projection pattern is lacking. The localisation of these peptides is further complicated by the fact that expression of *Kiss1* mRNA is regulated rapidly (6). Four isoforms with 54, 14, 13 and ten amino acids and sharing a common ten amino acids at their C-terminal amidated end were initially isolated from the human placenta (9). Furthermore, preliminary data suggest that several isoforms also exist in the hypothalamus (10). The different anti-kisspeptin antisera show heterogeneity in their affinity for these various isoforms and this may partly account for the discrepancies between various studies on kisspeptin localisation in the brain. For example, it is not yet clear



whether fundamental species differences exist in kisspeptin transport to the external layer of the median eminence or in kisspeptin synthesis by a subpopulation of dorsomedial nucleus cells.

In rats, a study by Brailoiu *et al.* (11) determined the complete distribution of kisspeptins in the brains of both sexes. However, the antibody used in that study (from Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA) was later shown to cross-react with a number of other RFamide peptides (12) feeding the current controversy in the literature about the specificity of kisspeptin antisera in general (13–15). Other immunohistochemical investigations on kisspeptin in rats focused on the preoptic area and arcuate nucleus and were mostly performed under nonphysiological conditions (i.e. after gonadectomy and/or colchicine treatment) (2, 16–24). Therefore, the present study aimed to re-examine kisspeptin distribution in the intact female rat brain. Because concerns have been raised regarding antibody specificities, we undertook a precise comparative analysis of the immunoreactive patterns obtained with two different anti-kisspeptin antibodies: one generated against the shortest Kp-10 form and the other against the longest Kp-52 form.

## Materials and methods

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Lyon, France). All animal procedures were performed in accordance with French law (authorisation A37-120 of the French Ministry of Agriculture).

## Animals

Adult (13–14 weeks of age) female Wistar rats were initially obtained from Charles River Breeding Laboratories (Arbresle, France) and reared in our own animal facility. After weaning (P24), females were housed in groups of four per cage under a 12 : 12 h light/dark cycle with food and water available *ad lib*. From P69 until euthanasia, vaginal smears were checked daily to determine the stage of the oestrous cycle of each rat. Animals which had shown at least two consecutive 4-day oestrous cycles were used. The rats ( $n = 4$ ) were euthanised between 9:00 h and 12:00 h am on the morning of pro-oestrus (determined by vaginal cytology).

## Tissue preparation for immunohistochemistry

Rats were euthanised using an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (CEVA Santé Animale, France; 55 mg/250 g body weight) and perfused with 250 ml of sodium nitrite followed by 500 ml of 0.2% picric acid/4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) directly through the left ventricle of the heart. The brains were removed and post-fixed in the same fixative for 1 h at 4 °C, and then transferred to a 30% sucrose solution (phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4, with 0.1% azide) for 3 days at 4 °C. Brains were then embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, The Netherlands), frozen in an isopentane solution (Carlo Erba Reactifs-SDS, Val de Reuil, France) at –50 °C and stored at –20 °C until use. Four sets of coronal sections (30 µm thick) from the rostral preoptic area to the premamillary nucleus were cut on a cryostat (CM3050S; Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) and stored in a cryoprotectant solution (30% sucrose, 1% PVP40, 30% ethyleneglycol, 0.9% NaCl in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) at –20 °C until the immunohistochemistry procedure. An additional brain from a pro-oestrous rat was cut into eight sets of coronal sections (30 µm thick) for the pre-adsorption tests with the different RFamide peptides.

## Oestrogen radioimmunoassays

Blood was collected from the thoracic aorta immediately prior to intracardial perfusion (see above) and the plasma collected was centrifuged for 15 min at 3500 g and stored at –20 °C until assayed. The oestrogen ( $E_2$ ) concentrations were assayed using the  $^{125}I$   $E_2$  Diasorin RIA Kit (Sorin Diagnostic, Antony, France). The intra-assay coefficient of variation averaged 11.5% and assay sensitivity was 0.39 pg/ml. Duplicate 200-µl aliquots of plasma samples were extracted in 3 ml of ethyl-acetate/cyclohexane (V/V), mixed for 5 min and incubated for 2 h. Tubes were then centrifuged for 15 min and frozen in liquid nitrogen. The solvent layer was decanted, transferred into glass tubes, and evaporated under nitrogen. Standards and samples were reconstituted in 150 µl of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). The samples were then incubated with primary antibody (150 µl) and  $^{125}I$   $E_2$  (100 µl, 30 000 c.p.m.) for 24 h at 4 °C. The secondary antibody (500 µl of precipitating solution) was added, mixed and incubated for 1 h at 4 °C. Subsequently, 2 ml of 0.025 M Tris HCl buffer (pH 7.4) was added and then tubes were centrifuged for 30 min. The supernatant was discarded and radioactivity was measured.

## Antisera against kisspeptin

Polyclonal antibody #564 (thereafter referred to as anti-Kp-10) was raised in rabbits against mouse Kp-10 as described previously (25). Radioimmunoassay analyses have shown that this antibody has a slightly higher affinity to mouse Kp-10 than #566, at the same time as having the same specificity to mouse Kp-10 as that described previously for #566 (25). The polyclonal anti-Kp-10 antibody #564 is the one most currently described in the literature and is available from Millipore (Billerica, MA, USA) (AB9754). Polyclonal antibody JLV-1 (hereafter referred to as anti-Kp-52) was raised in rabbits against full-length rat Kp-52 and subsequently affinity-purified on a Kp-52 column (Davids Biotechnologie, Regensburg, Germany) (14).

## Single-label immunohistochemistry for kisspeptin

To remove the cryoprotectant solution, sections were rinsed six times in PBS. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 10 min to quench endogenous peroxidase activity and then rinsed three times in PBS. Sections were then incubated for 30 min at room temperature in a blocking solution (PBS + 0.3% triton + 0.1% azide + 2% normal sheep serum + 0.25% human serum albumin). After blocking, the first of the four sets of sections was incubated with anti-Kp-10 at a dilution of 1 : 100 000 and the second (consecutive) set of sections with anti-Kp-52 at a dilution of 1 : 500 in the same blocking solution for three nights at 4 °C with agitation. Sections were rinsed four times in PBS before being incubated in a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, UK) at a dilution of 1 : 500 in blocking solution for 90 min at room temperature with agitation. After subsequent washing in PBS, the sections were incubated in AB complex (Vector Elite PK-1600, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at a dilution of 1 : 200 in a novel blocking solution (PBS + 0.3% triton + 0.25% human serum albumin) for 90 min at room temperature with agitation. Sections were then washed twice with PBS and twice with Tris-HCl buffer (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.6) and immunoreactivity was revealed using nickel-enhanced diaminobenzidine hydrochloride (0.1 mg/ml diaminobenzidine) and 0.001%  $H_2O_2$  in Tris-HCl buffer. The sections were washed thoroughly (four times for 10 min) in Tris-HCl buffer, mounted onto gelatine-coated glass slides, dried for 48 h at 37 °C, dehydrated in ethanol followed by toluene and then cover-slipped with Depex (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK). Adjacent sections were stained with cresyl violet to determine anatomical structures.

## Specificity controls

Specificity of staining was confirmed by omission of the kisspeptin antisera from the primary antibody incubation step which resulted in the absence of staining. To control the specificity of the primary antibody staining, pre-adsorption tests were conducted with the Kp-52 form of rat kisspeptin. Kp-52 (Phoenix Lab, Strasbourg, France) was incubated at different concentrations (0.1, 1 and 10  $\mu\text{M}$ ) with primary antibody anti-Kp-10 (dilution 1 : 100 000) or primary antibody anti-Kp-52 (dilution 1 : 500) overnight at 4 °C with agitation prior to the immunohistochemical procedure.

Kisspeptin is a member of a large family of RF-amide peptides, and this has raised questions about the specificity of the staining obtained with anti-kisspeptin antibodies. The anti-Kp-52 used in the present study has not yet been fully characterised. Therefore, we performed a series of pre-adsorption tests with synthetic preparations of all known mammalian RFamides: RFRP-1 and RFRP-3 were purchased from Abgent, Inc. (San Diego, CA, USA). NPFF, 26RFa, and PrRP were kindly provided by Jerome Leprince and Hubert Vaudry (INSERM U982; University of Rouen, France). The five peptide preparations exhibited over 80% purity as measured using mass spectrometry. Each of the eight sets of consecutive sections from one brain was processed for immunolabelling with primary antibody anti-Kp-52 (dilution 1 : 500) that had been pre-incubated overnight with either no peptide, Kp-52 (0.1  $\mu\text{M}$ ), Kp-10 (0.1  $\mu\text{M}$ ) or one of the above RFamide peptides (1  $\mu\text{M}$ ).

## Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis

Protein samples from the arcuate nucleus and median eminence (ARC-ME) region were prepared as previously described (23). Briefly, the ARC-ME tissues were dissected from adult female rat brains under a dissecting microscope and frozen in liquid nitrogen. Proteins were extracted in a lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 138 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.0 (Promega, Madison, WI, USA), 10% glycerol (ProLabo, Fontenay-sous-bois, France) and protease inhibitors (Calbiochem; Merck Chemicals Ltd, Beeston Nottingham, UK), and after 30 min centrifugation at 20 000 g, the supernatant was collected. The protein concentration was evaluated by Bradford's method using Coomassie reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and various amounts of protein were loaded onto 17% SDS-PAGE. Ten nanograms of synthetic rat Kp-52 (representing the minimum amount detectable on dot blots with the Super Signal West pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), as determined in a preliminary experiment) was loaded together with the molecular weight ladder (Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Germany) to serve as a positive size control. After separation using 17% SDS-PAGE, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (0.22  $\mu\text{m}$ ; Whatman, Dassel, Germany). The membranes were fixed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde for 15 min at room temperature before being washed and blocked for 30 min at room temperature in Tris-Tween buffered saline (0.2% Tween-20, 20 mM Tris, 150 mM NaCl) containing 5% dry milk. The saturated blots were probed overnight with anti-Kp52 (dilution 1 : 500, with or without prior pre-adsorption with 0.1  $\mu\text{M}$  Kp-52) and were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (dilution 1 : 3000; GE Healthcare, Orsay, France). Using the Super Signal West pico substrate system, we were unable to detect any bound antibodies in the sample and only a faint band corresponding to the synthetic Kp-52. By increasing the sensitivity using a 1 : 1 mixture of Super Signal West pico and Super Signal West femto substrate systems (Thermo Scientific) we visualised the band in the sample; however, the band corresponding to the synthetic Kp-52 was accompanied by a smear.

## Analysis

For single immunohistochemistry, each set of sections (40 sections per set) was examined on a bright field microscope (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) using a  $\times 25$  objective (170/017 25/0.50; Leica Microsystems SAS). The distribution of kisspeptin-immunoreactive cell bodies and fibres was mapped on corresponding plates of the rat brain atlas (26). Photomicrographs were captured on a bright field microscope (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) using a  $\times 20$  (UPlanF1,  $\times 20/0.50$ ),  $\times 40$  (UPlanF1,  $\times 40/0.75$ ) and  $\times 100$  (UPlanF1,  $\times 100/1.30$  oil iris, Japan) objective with the Spot insight image capture system CCD camera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA).

## Results

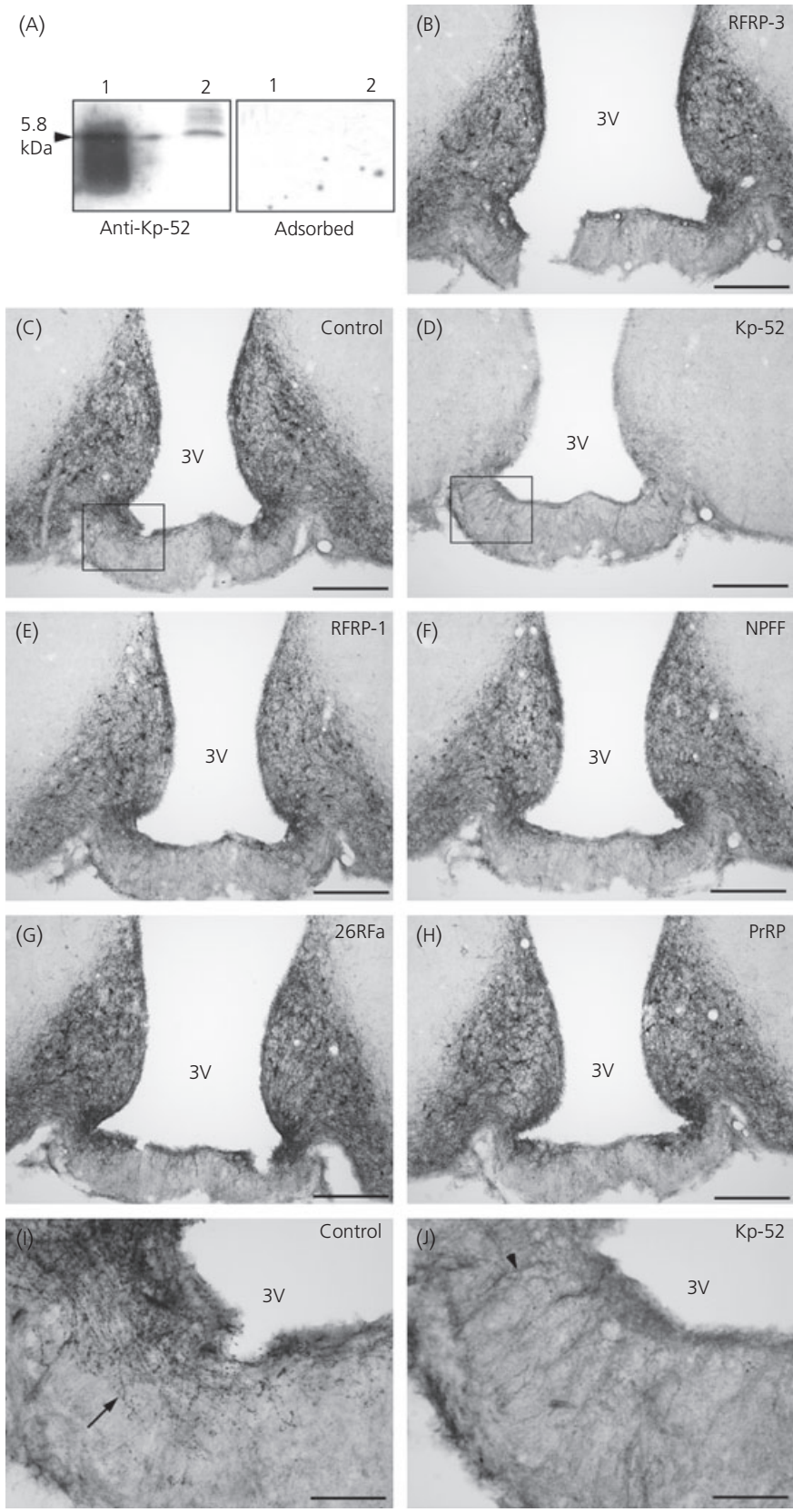
The present study aimed to provide a comprehensive mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous female rat. This stage was chosen because a previous study suggested that kisspeptin immunoreactivity in the hypothalamus is maximal at this stage (2). The group of rats analysed had an elevated mean plasma level of oestrogen of  $215 \pm 37$  pg/mL ( $n = 4$ ), which is consistent with this stage of the oestrous cycle.

## Specificity controls

Pre-adsorption of anti-Kp-10 with 0.1  $\mu\text{M}$  rat Kp-52 abolished all staining throughout all brain sections (data not shown). To date, anti-Kp-52 has not been as well characterised as anti Kp-10, and we therefore performed a series of additional specificity tests (Fig. 1). We first performed a western blot analysis of ARC-ME tissue extract, which showed that this antibody recognises a band migrating to the same level as synthetic rat Kp-52 (approximately 5.8 kDa; Fig. 1A). Both the immunoreactive band corresponding to synthetic Kp-52 and the band from the protein extract disappeared after antibody preadsorption with 0.1  $\mu\text{M}$  rat Kp-52. Thus, this antibody is able to bind Kp-52 in tissue extracts from the ARC-ME on western blots. A series of antibody pre-adsorption tests with all known mammalian RFamide peptides was also performed to further ensure the specificity of the staining obtained on tissue sections. The immunostaining was consistently diminished by pre-adsorption with rat Kp-52 but not by any other RFamide peptides, as shown at the level of the arcuate nucleus, the area of the brain the most rich in kisspeptin-immunoreactive fibres (Fig. 1). With 0.1  $\mu\text{M}$  rat Kp-52, immunostaining throughout the brain was completely abolished from all varicose fibres and cell bodies, although a faint and diffuse cross-reactivity persisted on some ependymocytes including tanyocyte-like cells and processes (Fig 1D). This small cross-reactivity, confined to posterior sections, remained with higher concentrations of Kp-52 in the pre-adsorption mixture (data not shown).

## Overall kisspeptin distribution

The precise distribution of kisspeptin-like immunoreactivity obtained with each antibody on consecutive sections throughout the preoptico-hypothalamic continuum is depicted on the brain maps of a



representative rat in Fig. 2. Except for a few anterior sections presenting fibres only labelled with anti-Kp-10 (detailed below), the pattern of immunoreactive fibres and cell bodies was identical for both antibodies. A higher intensity of labelling was generally obtained with anti-Kp-52 at both cell-body and fibre levels.

With anti-Kp-10, a few anterior regions displayed some immunoreactive fibres but none were labelled by anti-Kp-52. The labelled areas include the dorsal aspect of the lateral septum (Figs 2A–F and 3A,B), the nucleus accumbens (Fig. 2A–C), the anterior fornix (Fig. 2D–F), and the lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis (Fig. 2D–F).

Elsewhere, the pattern of immunoreactivity was identical with both antibodies. At the level of the anterior preoptic area, long bundles of parallel fibres appeared to stream dorsally and laterally along the vertical and horizontal limb of the diagonal band of Broca up to the ventral aspect of the lateral septum (Fig. 2A–C). Some scattered fibres were observed in two other structures: the medial septum (Fig. 2A–C) and the intermediate aspect of the lateral septum where fibres generally ran parallel to the lateral ventricle (Fig. 2A–C). Numerous fibres running parallel to the wall of the third ventricle were observed throughout the entire rostrocaudal extension of the periventricular nucleus (PeVN; Figs 2D–P and 3C,D) and appeared to extend laterally into a variety of regions: the preoptic area (Fig. 2D–F), the organum vasculosum of the lamina terminalis, the septohypothalamic area (Fig. 2D–F), the anteroventral periventricular nucleus (AVPV; Fig. 2D–F), the supra-chiasmatic nucleus (Fig. 2G–I), the supraoptic nucleus (Fig. 2G–I), the paraventricular nucleus (Fig. 2G–I), the dorsal border of the ventromedial hypothalamic nucleus (Fig. 2J–L, N–P), the dorsal hypothalamic area (Fig. 2J–L), the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH; Figs 2N–P and 3E,F), the arcuate nucleus (Figs 2J–P and 4A,B) and the median eminence (Figs 2J–S and 5).

Immunoreactive fibres of the preoptic area and anterior hypothalamic area were distributed along a density gradient which decreased along the medio-lateral and the antero-posterior axes. Fibres observed in the AVPV (data not shown), PeVN (Fig. 3C,D), DMH (Fig. 3E,F), arcuate nucleus (Fig. 4A,B) and median eminence (Fig. 5) were mostly disorganised with occasional basket-like profiles. A few fibres were also observed perpendicular to the wall of the third ventricle, appearing to cross the ependymal lining to reach the cerebroventricular fluid (Fig 3b).

At the level of the arcuate nucleus, a particularly dense network of disorganised fibres was detected, surrounding immunoreactive cell bodies (Figs 1 and 4). Its maximal density was at the rostrocaudal level where the ventromedial nucleus is largest (Fig. 2N–P). At

this level, we also observed a particularly high density of parallel fibres converging towards the median eminence (Fig. 4A,B, arrow). The core of the ventromedial nucleus was completely devoid of immunoreactivity, although this spheric structure appeared entirely surrounded by immunoreactive fibres (Fig. 2N–P). In the posterior third of the arcuate nucleus, numerous ovoid immunoreactive cell bodies were detected (Fig. 4C,D) with a maximal diameter of approximately 10  $\mu\text{m}$  (Fig. 4E,F). In this area, the number of immunoreactive cell bodies with both antibodies was the same (32 and 35 on two consecutive sets of four sections from a representative rat, for anti-Kp-10 and anti-Kp-52, respectively). Surprisingly, no immunoreactive cells bodies were observed in other regions of the brain.

In the median eminence, varicose fibres were observed in both the internal and external layer, including around the deeper part of the infundibular recess (Fig. 5). Fibres were the most abundant in the internal layer and appeared to run along the wall of the ventricular recess (Fig. 5C,D) or the infundibular recess (Fig. 5E,F). In this layer, the lateral part of the median eminence displayed a higher density of immunoreactive fibres than the ventral part (Fig. 1i). In the external layer, fibres appeared perpendicular to those in the internal layer (Fig. 5C,D, arrows) and no density gradient was observed along the ventrolateral axis.

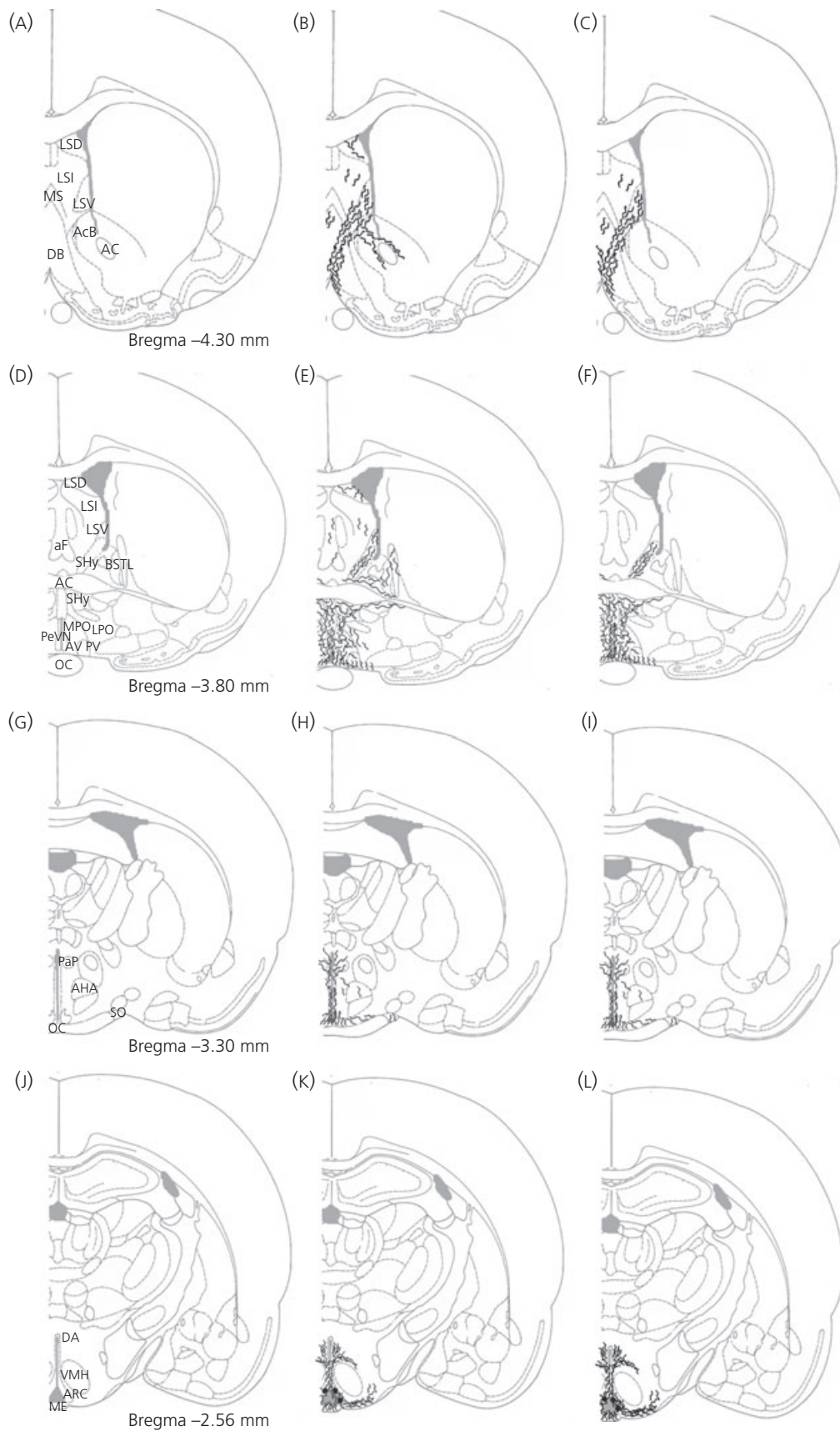
## Discussion

Cells expressing *Kiss1* mRNA or displaying kisspeptin-like immunoreactivity in the central nervous system have now been mapped for a large number of vertebrate species (3). However, precise mapping of kisspeptin fibres in the brain is lacking for most species as a result of recent concerns in the literature about the specificity of currently available antibodies generated against kisspeptins (12–15). In the present study, the immunoreactivity pattern obtained with the anti-Kp-10 #564 generated in our laboratory, which is the most widely used anti-kisspeptin for immunohistochemical studies so far (4, 12, 15, 17, 18, 20, 22, 27–32), was compared with that of the more recently developed anti-Kp-52 (14, 18), whose specificity has been further characterised in the present study. Our pre-adsorption controls definitely exclude any possibility of cross-reactivity of this antibody with other RFamide peptides.

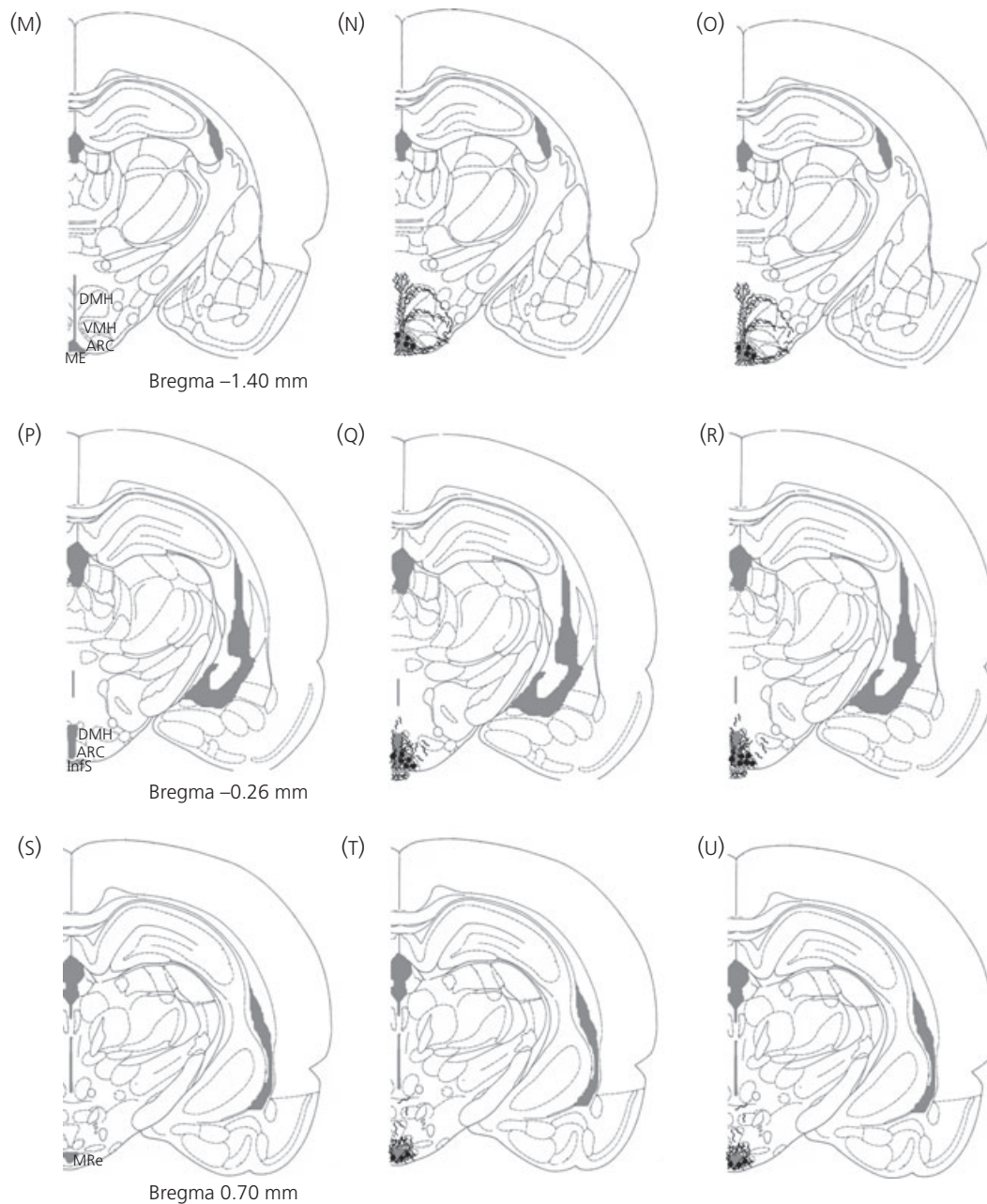
We carried out a precise comparative study of both antibodies on consecutive rat brain sections. In most areas, regions of immunoreactive cell bodies and fibres matched perfectly for the two antibodies, providing evidence for the true kisspeptinergic nature of these fibres. Immunoreactive areas were confined to the septo-preoptico-hypothalamic continuum. Regardless of the antibody used,

**Fig. 1.** Characterisation of anti-Kp-52 (JVL-1) on rat tissue. Representative western blot (A) of synthetic rat Kp-52 (1: 10 ng of synthetic rat Kp-52 loaded) and arcuate nucleus–median eminence tissue extract (2: 60  $\mu\text{g}$  of total protein loaded) showing an immunopositive band migrating from the tissue extract at the same level as synthetic Kp-52 (left blot probed with anti-Kp-52). This immunopositivity disappeared after pre-adsorption of the primary antibody with the specific peptide Kp-52 (right blot). Note that the immunopositive band corresponding to Kp-52 (1: left blot) was accompanied by a smear extending towards lower molecular weights reflecting partial synthesis and/or degradation of the peptide. Kisspeptin-like immunoreactivity in consecutive sections through the arcuate nucleus (B–H) labelled with anti-Kp-52 under control conditions (c) and after pre-adsorption with 0.1  $\mu\text{M}$  Kp-52 (b) or 1  $\mu\text{M}$  of RFRP-3 (b), RFRP-1 (e), NPFF (f), 26RFa (g) and PrRP (h). (i, j) Higher magnifications of the boxed area in (c) and (b), respectively. The arrow in (i) points to an immunoreactive varicose fibre in the external layer of the lateral median eminence and the arrowhead in (j) points to the faint cross-reactivity that persists in this region on a tanyocyte-like process. 3V, third ventricle. Scale bar (B–H): 200  $\mu\text{m}$  and (i, j): 50  $\mu\text{m}$ .

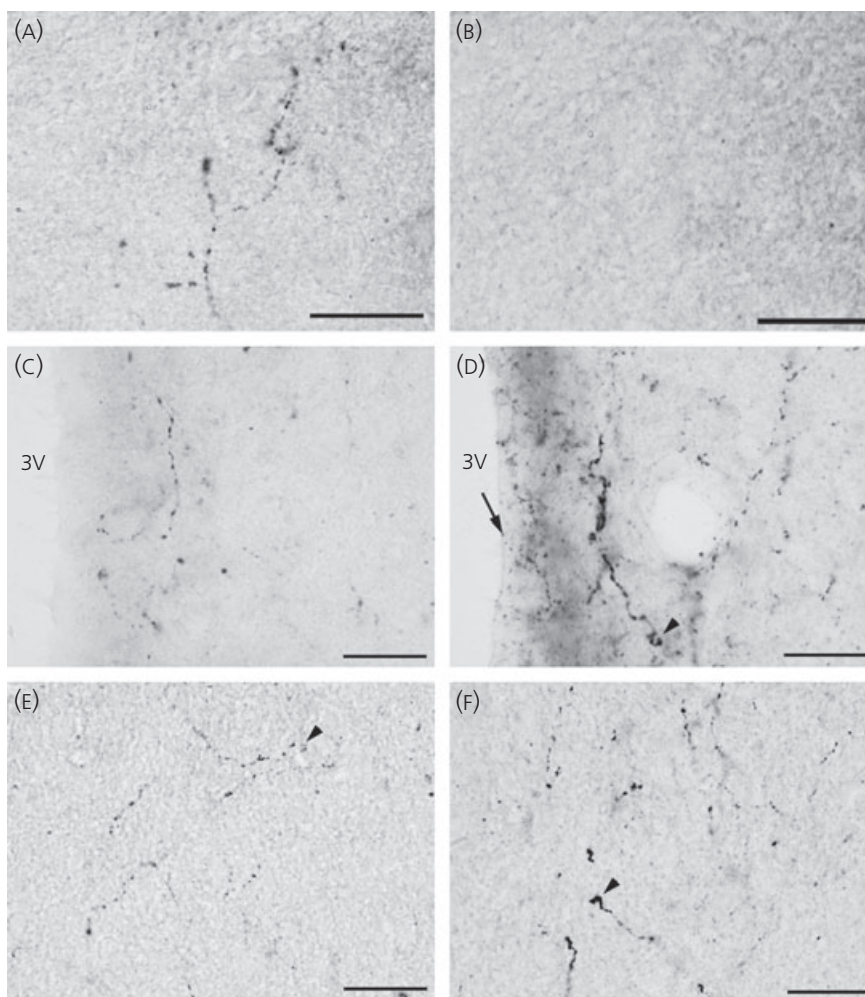




**Fig. 2.** Distribution of kisspeptin-like immunoreactivity in the brain. The annotation of brain structures (A–S) and the pattern of kisspeptin-like immunoreactivity with anti-Kp-10 (B, E, H, K, N, O and T) and anti-Kp-52 (C, F, I, L, Q, R and U) are depicted on this series of brain maps modified from Paxinos and Franklin (26). Kisspeptin-like immunoreactive fibres are represented by black lines and cells bodies by black circles. AC, anterior commissure; AcB, accumbens nucleus; MS, median septum; DB, diagonal band of Broca; OC, optic chiasma; LSD, lateral dorsal septum. LSI, lateral intermediate septum; LSV, lateral ventral septum; AVPV, anteroventral paraventricular nucleus; LPO, lateral preoptic area; MPO, medial preoptic area; PeVN, periventricular nucleus; Shy, septohypothalamic nucleus; aF, anterior fornix; BSTL, lateral bed nucleus of stria terminalis; AHA, anterior hypothalamic area; PaP, paraventricular hypothalamus; SO, supraoptic nucleus; DA, dorsal area; ARC, arcuate nucleus; ME, median eminence VMH, ventro-medial hypothalamus; DMH, dorsomedian hypothalamus; InfS, infundibular stem; MRe, mammillary recess.



**Fig. 2.** (Continued)



**Fig. 3.** Kisspeptin-like immunoreactive fibres in different hypothalamic areas. Immunoreactive fibres were detected with anti-Kp-10 in the lateral dorsal septum (A; section corresponding to level A in Fig. 2) but not with anti-Kp-52 (B). Numerous parallel immunoreactive fibres run along the wall of the third ventricle in the periventricular nucleus (C, D, with anti-Kp-10 and anti-Kp-52, respectively; section corresponding to level G in Fig. 2). Some rare immunoreactive fibres appear to cross the ependymal lining to reach the cerebroventricular fluid (arrow in D). Some varicose immunoreactive fibres were labelled in the dorso-medial nucleus (E, F, with anti-Kp-10 and anti-Kp-52, respectively; section corresponding to level M in Fig. 2). Occasional basket-like profiles were detected in this region (arrows). Scale bar (A–F): 20  $\mu$ m.

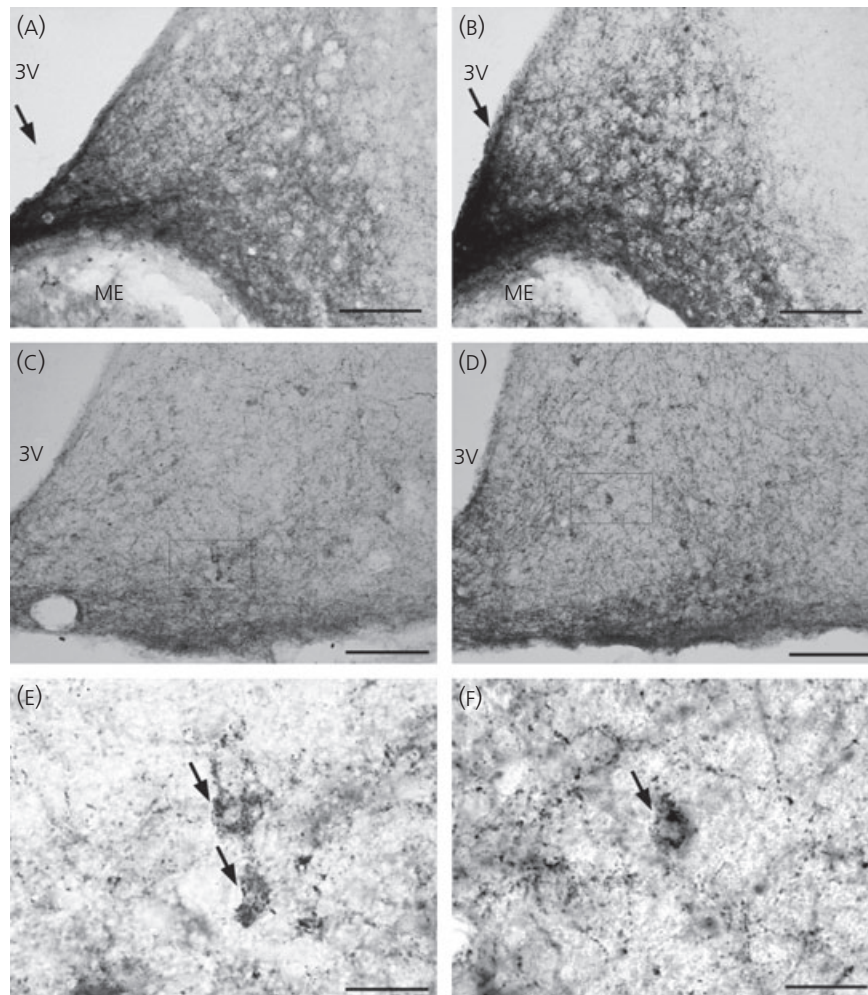
projection patterns extended far beyond GnRH neurones and we detected numerous fibres, including some basket-like structures, in several nuclei such as the AVPV, the dorsomedial nucleus and the arcuate nucleus. Further investigations using retrograde labelling are required to determine the precise cellular origins of these kisspeptin fibres. In the meantime, certain indications have been provided by some correlative analyses. For example, a recent study in mice suggests that the great majority of kisspeptin fibres in the arcuate nucleus originate from kisspeptin neurones in the AVPV. This is based on the finding that aromatase deletion by genetic mutation induced a simultaneous disappearance of immunoreactivity of fibres in the arcuate nucleus and cell bodies in the AVPV, without affecting the immunoreactive cell bodies in the arcuate nucleus (33).

Interestingly, we observed a few discrepancies in labelling between anti-Kp-10 and anti-Kp-52; some structures were exclu-

sively labelled by anti-Kp-10, including fibres in the dorsal aspect of the lateral septum, the accumbens nucleus, the medial fornix and the lateral bed nucleus of the stria terminalis. Thus, anti-Kp-10 may recognise a wider range of kisspeptin isoforms than anti-Kp-52 raised against the longest form (14, 18). Although the number of kisspeptin isoforms produced in the brain remains to be described, preliminary data from our laboratory suggest that the four isoforms initially described in human placenta also exist in the ovine brain (Dr A. Caraty, unpublished results). Another possibility is that anti-Kp-10 cross-reacted with molecules other than kisspeptins in the brain regions labelled only with anti-Kp-10.

Because a hypophysiotropic action of kisspeptin (34, 35) as well as a potential action on GnRH nerve terminals (36, 37) has been suggested, particular care was taken in fibre analysis at the level of the median eminence. A particularly high concentration of kisspeptin immunoreactive fibres were detected in the internal layer of the





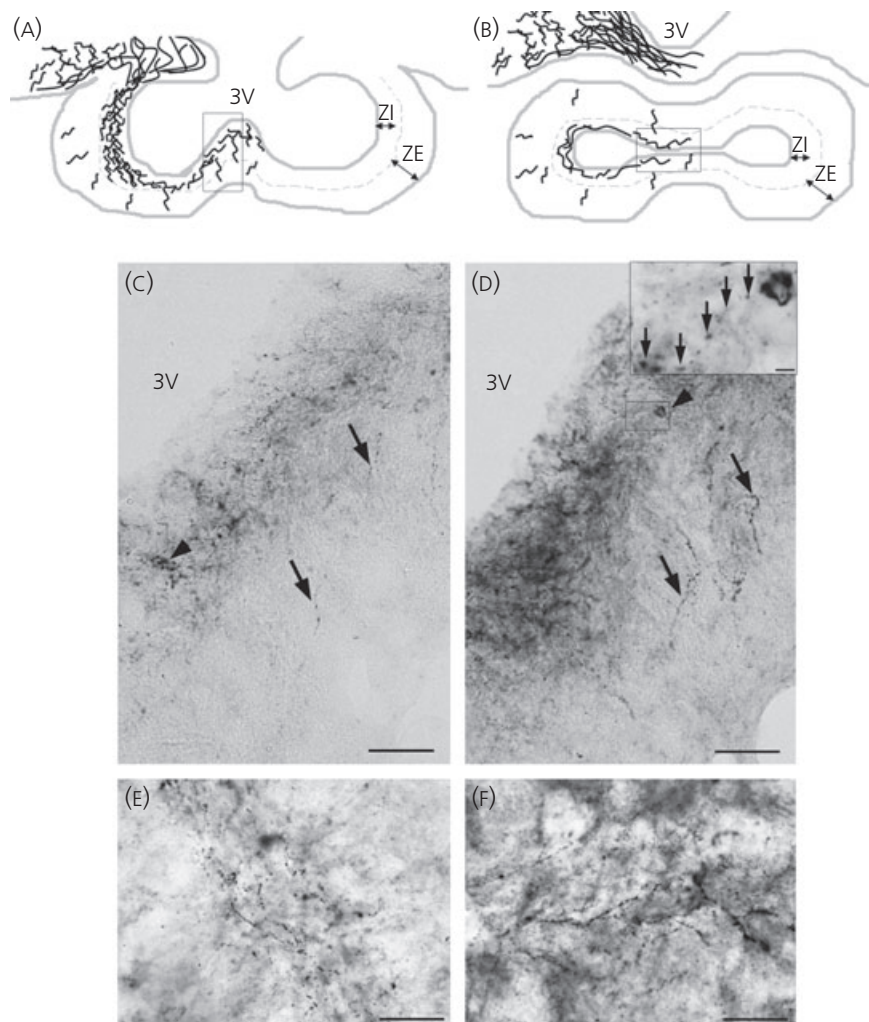
**Fig. 4.** Kisspeptin-like immunoreactive cell bodies and fibres in the arcuate nucleus. Extensive convergence of immunoreactive fibres towards the infundibular stem was observed in the posterior arcuate nucleus (A, B, arrow, with anti-Kp-10 and anti-Kp-52 respectively; section corresponding to level M in Fig. 2). Kisspeptin-like immunoreactive cell bodies were only observed in the posterior part of the arcuate nucleus with anti-Kp-10 (A, C) and anti-Kp-52 (B, D); sections corresponding to level P in Fig. 2 (E, F) represent higher magnifications of the boxed area in (C) and (D), respectively. At this higher magnification, immunoreactive cell bodies (arrows) can be observed (E and F with anti-Kp-10 and anti-Kp-52, respectively). 3V, third ventricle; ME, median eminence. Scale bar (A–D): 100  $\mu$ m and (E, F): 20  $\mu$ m.

median eminence and the deeper part of the infundibular recess as observed previously in other species (8, 25, 30, 37). The distribution of kisspeptin fibres in the internal layer of the median eminence appears to match the topography of other neuropeptides, such as neurokinin B, dynorphin and tyrosine hydroxylase (38). This is in line with a recent study showing the presence of kisspeptin in a subpopulation of neurokinin B and dynorphin neurones (12). The presence of kisspeptin projections in the internal layer suggests that this peptide could act directly on neurohypophysis and may regulate oxytocin and vasopressin release. Interestingly, it has recently been suggested that kisspeptin may play a role during lactation and parturition (24, 39, 40). A few kisspeptin immunoreactive fibres were also observed in the external layer of the median eminence. To date, this feature has only been observed in nonrodent species such as the sheep (25), horse (41), goat (42) and monkey (37). Recent studies suggest that part of kisspeptin's positive action

on GnRH release operates at the level of the median eminence (36, 43) and some immunohistochemical studies using confocal microscopy have shown close apposition of kisspeptin terminals on GnRH terminals, suggesting direct synaptic contacts in mares (30), sheep (44) and monkeys (37). According to the results of the present study, this direct mode of action on GnRH terminals does not appear to be predominant in rats. Indeed, the pattern of kisspeptin fibres observed in the external layer does not match that observed for GnRH terminals (45). A potential hypophysiotropic action via kisspeptin release in the portal circulation (46) cannot be excluded. Another possibility is that kisspeptin acts on GnRH release via the surrounding tanycytes, as suggested by the presence of basket-like profiles in the internal layer. Further studies are under way to test this hypothesis.

Further comparison of the present mapping obtained in rats with that recently reported in mice (8), reveals some interesting





**Fig. 5.** Kisspeptin-like immunoreactive fibres in the median eminence and infundibular stem. Distribution of kisspeptin-like immunoreactive fibres is depicted on schematic sections through the median eminence (A) and infundibular stem (B). Immunoreactive varicose fibres were detected in the internal layer and, to a lesser extent, in the external layer (C, D, arrows, with anti-Kp-10 and anti-Kp-52, respectively; these sections are at the level of the boxed area in A). In the internal layer, occasional basket-like structures were observed (C, D, arrowheads). In the inset in (D) (representing a higher magnification of the boxed area), arrows delineate a putative kisspeptinergic fibre terminating in a basket-like profile in the internal layer. Varicose immunoreactive fibres were also observed along the lumen of the infundibular stem (E, F, with anti-Kp-10 and anti-Kp-52, respectively; these sections are at the level of the boxed area in B). ZI, zona interna; ZE, zona externa; 3V, third ventricle. Scale bar (C and D): 50  $\mu\text{m}$  and (E, F): 20  $\mu\text{m}$ .

differences. First, we were unable to detect any immunoreactive cell bodies in the AVPV/PeVN area. This is probably not a result of the less sensitive immunohistochemical method employed in the present study, nor a result of differences in the stage of the cell cycle analysed in the two studies. Indeed, this absence of immunoreactive cell bodies was also observed when using a biotinylated tyramide amplification procedure and on brain sections from females at other stages of the oestrous cycle (E. Desroziers, unpublished results). A similar observation was previously made on intact male rats (18) and intact female rats with another antibody (2). Numerous *Kiss1* mRNA-expressing cells have, however, been observed in the AVPV/PeVN of intact female rats using *in situ* hybridisation (20), and kisspeptin immunoreactive cell bodies can be detected in this area after colchicine treatment (2, 16, 23). Thus, in rats, there is less peptide stored in cell bodies compared to mice

and this may reflect different dynamics in kisspeptin release between both species. A second difference between mice and rats resides in the kisspeptinergic cell population of the dorsomedial nucleus. Unlike mice, our pro-oestrous group of rats did not reveal any kisspeptin immunoreactive cell bodies in the DMH, whatever the antibody used, and, for fibres, we did not detect any kisspeptin-like immunoreactivity in the paraventricular thalamic nucleus, amygdala and periaqueducal gray, which have been immunolabelled in mice (8). By contrast, Clarkson *et al.* did not detect any kisspeptin-like immunoreactivity in the dorsal aspect of the lateral septum and the lateral bed nucleus of the stria terminalis, regions, where we detected some immunoreactivity with anti-Kp-10. Whether this reflects a real species difference, a specific physiological regulation, or methodological variations between the studies, remains to be investigated.

Finally, all the areas of the rat brain where we consistently detected immunoreactive fibres with both antibodies have previously been shown to express GPR54/Kiss1r in rats or mice (47, 48). However, both these studies also detected abundant GPR54 expression within the cortex, hippocampus, periaqueducal gray and amygdaloid nuclei, which comprise areas where we were unable to detect any kisspeptin projections. This may reflect an absence of GPR54 post-transcriptional processing or insufficient sensitivity of our immunohistochemical method in those structures. In addition, the existence of an additional ligand for GPR54 cannot be ruled out.

In conclusion, the present study shows, for the first time, a wide range of kisspeptin projections in the adult female rat brain. The presence of kisspeptin fibres in the internal and external layer of the median eminence supports the recent view that the median eminence is a primary site of kisspeptin action on GnRH release. It also suggests a possible hypophysiotropic activity of kisspeptins. The presence of immunoreactive fibres in numerous brain regions could indicate indirect modes of action of kisspeptins on GnRH activity via other neurochemicals that remain to be investigated and an action of this neuropeptide beyond the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

## Acknowledgements

This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, France), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), the University of Tours (France), the NOVO Nordisk Foundation, the Danish Medical Research Council and grants from the Institut National de la Recherche Medicale (INSERM-PNR-RE 0702) and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR Blan-07-0056). We are particularly grateful to Dr Hubert Vaudry and Dr Jerome Leprince for their generous gifts of NPFf, PrRP and 26RFa peptides, to Lionel Lardic for the oestradiol assays and to Dr Pascale Crépieux for help with the western blots. Elodie Desrozier was supported by a fellowship from INRA and the Region Centre (France).

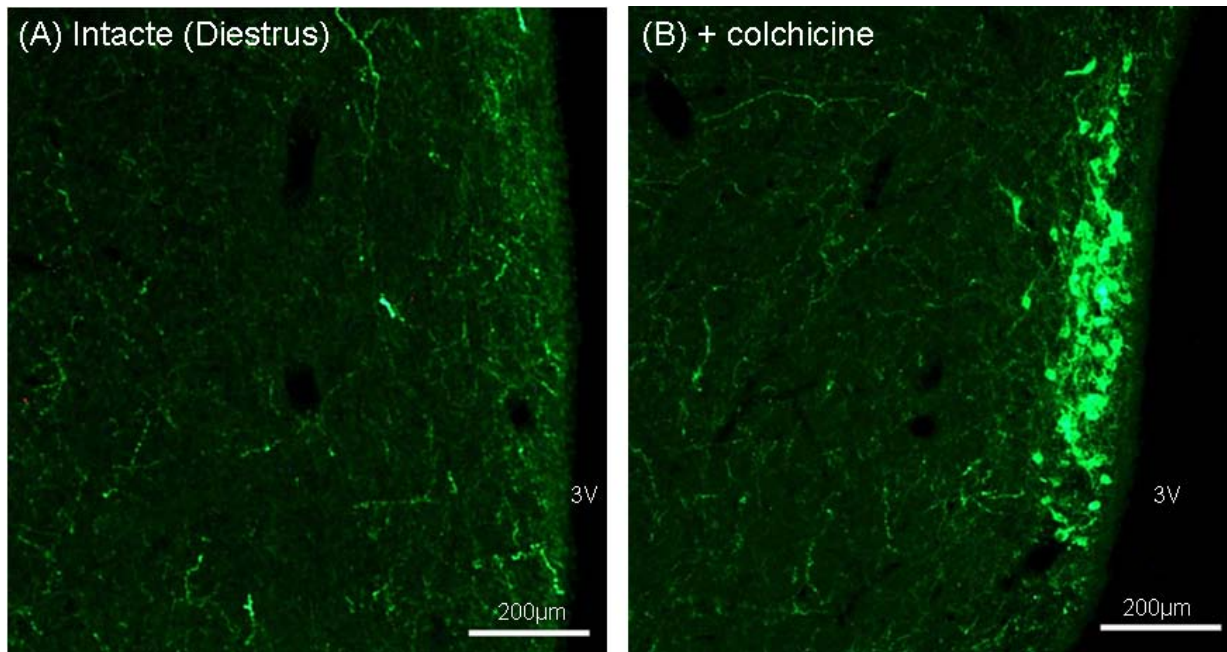
Received 12 February 2010,  
revised 4 June 2010,  
accepted 27 June 2010

## References

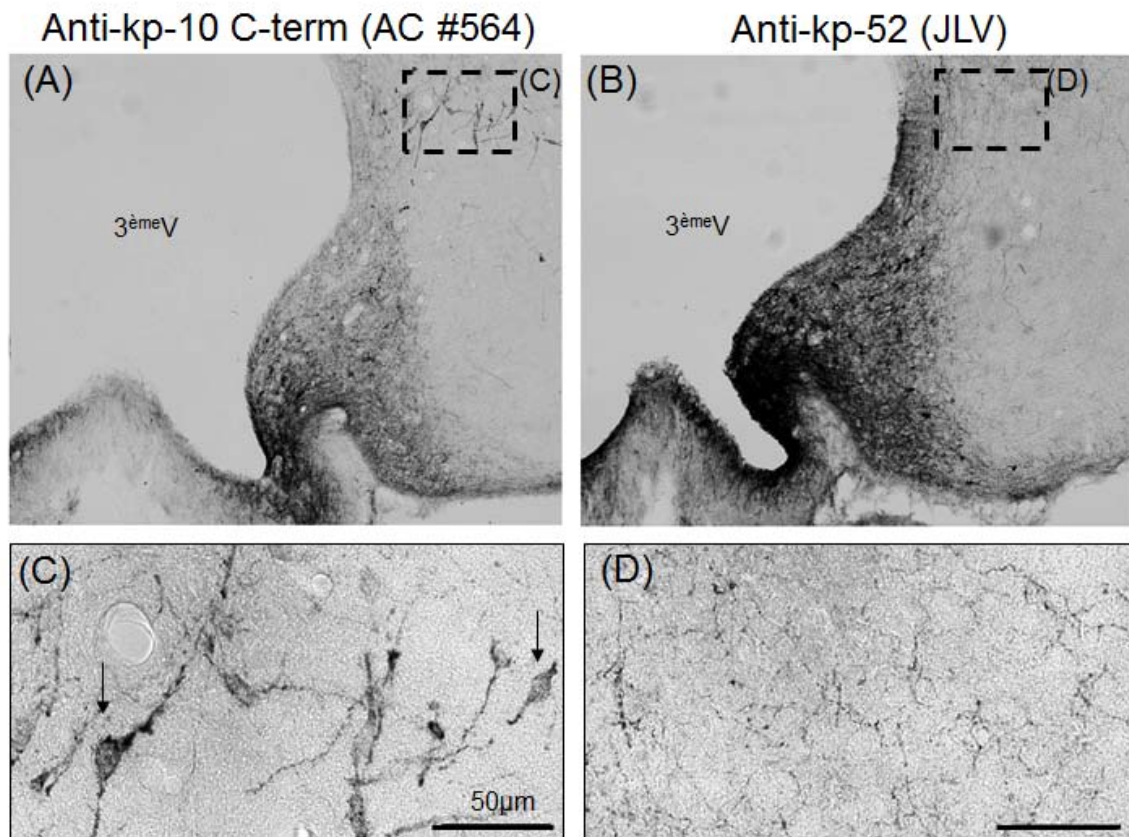
- Kalamatianos T, Grimshaw SE, Poorun R, Hahn JD, Coen CW. Fasting reduces KiSS-1 expression in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV): effects of fasting on the expression of KiSS-1 and neuropeptide Y in the AVPV or arcuate nucleus of female rats. *J Neuroendocrinol* 2008; **20**: 1089–1097.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K-I. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 2005; **146**: 7.
- Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; **30**: 713–743.
- Revel FG, Saboureaux M, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 2006; **16**: 1730–1735.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005; **146**: 3686–3692.
- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006; **26**: 6687–6694.
- Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; **147**: 5817–5825.
- Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 2009; **21**: 673–682.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; **411**: 613–617.
- Sebert M-E, Franceschini I, Lomet D, Leprince J, Vaudry H, Caraty A. Kp10, shortest peptide of the kisspeptin family, is a very minor form in the sheep hypothalamus: an immunological study. *Proc First World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, Cordoba, Spain*. 2008.
- Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, Brailoiu E, Dun NJ. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol* 2005; **481**: 314–329.
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 2007; **148**: 5752–5760.
- Kriegsfeld LJ. Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. *Horm Behav* 2006; **50**: 655–666.
- Mikkelsen JD, Simonneaux V. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*. 2009; **30**: 26–33.
- Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN. 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* 2008; **149**: 5770–5782.
- Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 2007; **53**: 367–378.
- Bateman HL, Patisaul HB. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*. 2008; **29**: 988–997.
- Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Tena-Sempere M, Juul A, Mikkelsen JD. Maturation of kisspeptinergic neurons coincides with puberty onset in male rats. *Peptides*. 2010; **31**: 275–283.
- Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol Reprod* 2009; **81**: 1216–1225.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; **148**: 1774–1783.
- Lederman MA, Lebesgue D, Gonzalez W, Shu J, Merhi ZO, Etgen AM, Neal-Perry G. Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus

- kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. *Neuropharmacology* 2010; **58**: 314–320.
- 22 Patisaul HB, Todd KL, Mickens JA, Adewale HB. Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology* 2009; **30**: 350–357.
  - 23 Takase K, Uenoyama Y, Inoue N, Matsui H, Yamada S, Shimizu M, Homma T, Tomikawa J, Kanda S, Matsumoto H, Oka Y, Tsukamura H, Maeda KI. Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J Neuroendocrinol* 2009; **21**: 527–537.
  - 24 Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H. Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 2007; **148**: 2226–2232.
  - 25 Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 2006; **401**: 225–230.
  - 26 Paxinos G, Watson C *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn*. San Diego, CA: Academic Press, 1986.
  - 27 Bakker J, Pierman S, Gonzalez-Martinez D. Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav* 2010; **57**: 390–395.
  - 28 Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in the sheep. *Neuroendocrinology* 2010; **151**: 301–311.
  - 29 d'Anglemont deTassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10714–10719.
  - 30 Decourt C, Tillet Y, Caraty A, Franceschini I, Briant C. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus: interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat* 2008; **36**: 131–137.
  - 31 Gonzalez-Martinez D, Mees CD, Douhard Q, Szpirer C, Bakker J. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in  $\alpha$ -fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 2008; **149**: 2333–2340.
  - 32 Lapatto R, Pallais JC, Zhang DS, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB. Kiss1(–/–) mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54(–/–) mice. *Endocrinology* 2007; **148**: 4927–4936.
  - 33 Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 2009; **150**: 3214–3220.
  - 34 Gutierrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagon MM, Castano JP. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2007; **19**: 521–530.
  - 35 Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2008; **4**: 360–365.
  - 36 d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 2008; **149**: 3926–3932.
  - 37 Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 2008; **149**: 4387–4395.
  - 38 Ciofi P, Leroy D, Tramu G. Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 2006; **141**: 1731–1745.
  - 39 Torricelli M, Galleri L, Voltolini C, Biliotti G, Florio P, De Bonis M, Petraglia F. Changes of placental Kiss-1 mRNA expression and maternal/cord kisspeptin levels at preterm delivery. *Reprod Sci* 2008; **15**: 779–784.
  - 40 Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34631–34636.
  - 41 Magee C, Foradori CD, Bruemmer JE, Arreguin-Arevalo JA, McCue PM, Handa RJ, Squires EL, Clay CM. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology* 2009; **150**: 8.
  - 42 Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 2009; **21**: 813–821.
  - 43 Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cognie J, Dough-ton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 2007; **148**: 5258–5267.
  - 44 Tillet Y, Picard S, Franceschini I. Hypothalamic neuropeptides and control of GnRH neurones. Neuroanatomical study in the ewe. *J Soc Biol* 2009; **203**: 19–28.
  - 45 Barry J, Hoffman GE, Wray S LHRH-containing systems. In: Björklund A, Hökfelt T, eds. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1985.
  - 46 Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin *in vivo*. *Endocrinology* 2008; **149**: 1951–1959.
  - 47 Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999; **446**: 103–107.
  - 48 Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH. Distribution and post-natal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2010; **151**: 312–321.





**Figure 22: Détection des corps cellulaires kp-ir dans le RP3V.** (A) Chez des rates intactes, seules des fibres kp-ir sont détectées dans le RP3V. (B) Chez des rates traitées à la colchicine, de nombreux corps cellulaires kp-ir sont détectés en plus des fibres kp-ir dans cette région. 3V: 3<sup>ème</sup> ventricule.



**Figure 23: Immunoréactivité pour le kisspeptine dans le noyau dorsomédian de rates traitées à la colchicine.** (A et C) De nombreux corps cellulaires kp-ir sont détectés avec l'anticorps anti-kp-10 C-term (AC#564) dans le dorsomédian. (B et D) En revanche, aucun corps cellulaires n'est détecté avec l'anti-kp-52 (JLV) dans la même région. 3ème V: 3<sup>ème</sup> ventricule.

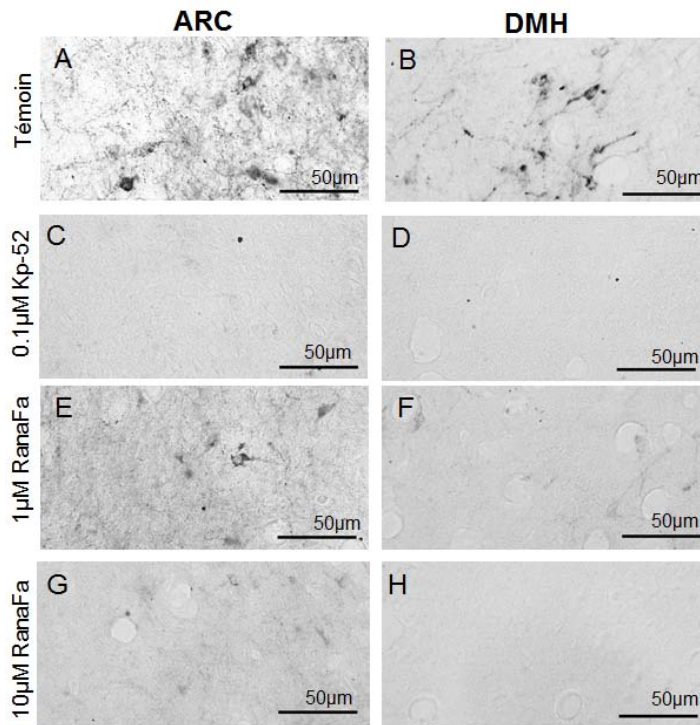
### III. Résultats complémentaires :

#### III.1. Détection des corps cellulaires kp-ir du RP3V :

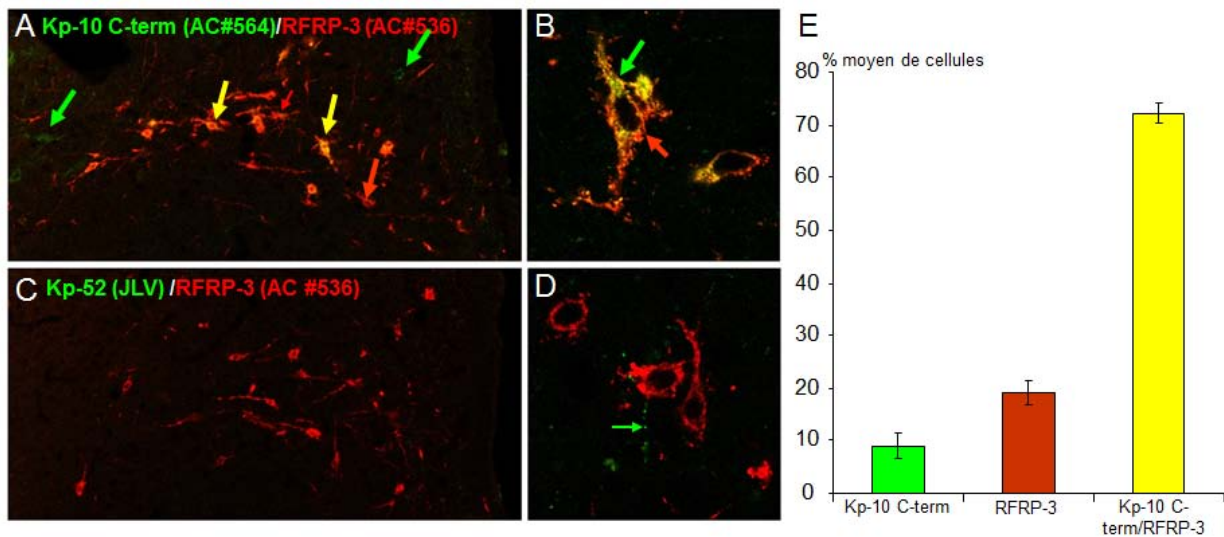
Tout d'abord, aucun corps cellulaire immunoréactif dans le RP3V n'a été détecté chez la femelle adulte intacte quel que soit l'anticorps utilisé. Pourtant, des cellules *Kiss1* avaient été détectées par hybridation *in situ* dans cette région (Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007). De plus, des études sur des animaux ovariectomisés avec implant d'œstradiol et/ou traités à la colchicine réussissaient à détecter par immunohistochimie des cellules kp-ir dans cette région (Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007). Ces résultats suggéraient donc une régulation post-transcriptionnelle des neurones à kp du RP3V. Afin de déterminer, si cette régulation était associée à une régulation au niveau de la synthèse ou du transport du kp chez des femelles intactes, nous avons injecté par voie intracérébroventriculaire chez des rates intactes 48h avant l'euthanasie de la colchicine à 15µg/15µL, qui bloque le transport des protéines du cytoplasme vers les terminaisons synaptiques. Puis, après fixation du cerveau au PAF 4% en intracardiaque, coupes frontales de 30µm, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques. Nous avons alors pu observer la présence de nombreuses cellules kp-ir tout au long du 3<sup>ème</sup> ventricule dans le RP3V chez les rates traitées à la colchicine (Figure 22 B) comparés aux femelles non traitées (Figure 22 A). Ainsi, ces résultats suggèrent une régulation post-transcriptionnelle dû à un transport rapide du kp des neurones du RP3V vers les fibres chez la rate.

#### III.2. Spécificité de l'immunoréactivité obtenue avec l'anticorps anti-kp-10 C-term

Sur les rates traitées à la colchicine, nous avons pu détecter la présence de corps cellulaires ir dans le noyau dorsomédian uniquement lors de l'utilisation de l'anticorps anti-kp-10 C-term (Figure 23 A and B). Cette différence de marquage associée aux différences observées dans certaines régions chez la rate intacte en proestrus entre le marquage obtenue avec l'anti-kp-10 C-term de souris et l'anti-kp-52 de rat suggèrent soit la présence uniquement de petites isoformes de kp soit une réaction croisée de l'anti-kp-10 C-term de souris avec les neuropeptides de la famille des RF-amides : les RFRPs. En effet, le noyau dorsomédian est le siège des corps cellulaires à RFRP (Rizwan *et al.*, 2009). De plus, les régions où des fibres



**Figure 24: Spécificité de l'anti-kp-10 C-term dans les noyaux arqué et dorsomédian de rates traitées à la colchicine.** Immunoréactivité pour le kisspeptine dans l'ARC (A, C, E, G) et le noyau dorsomédian (DMH) (B, D, F, H) en présence de l'anti-kp-10 C-term seul (A et B), et suite à une pré-adsorption de l'anticorps avec 0,1μM de kp-52 (C et D), 1μM de RanaFa (E et F) ou 10μM de RanaFa (G et H).



**Figure 25: Immunoreactivité pour le kisspeptine/RFRP-3 dans le noyau dorsomédian de rates traitées à la colchicine.** (A et B) Cellules immunoréactives pour le kisspeptine avec l'anti-kp-10 C-term (rouge) (flèche rouge), pour le RFRP-3 (vert)(flèche verte) et doublement marquées (jaune) (flèche jaune). (C et D) Cellules immunoréactives pour le RFRP-3 (rouge) et fibres immunoréactives pour le kisspeptine avec l'anti-kp-52 (vert) (flèche verte). (E) Histogramme représentant le pourcentage de cellules kp-10 C-term-ir (barre verte), RFRP-3-ir(barre rouge) et double kp-10 C-term/RFRP-3 (barre jaune) dans le dorsomédian entier d'une rate traité à la colchicine.

immunomarquées sont détectées uniquement par l'anti-kp-10 C-term sont des régions où des fibres à RFRP sont également immunodétectées (Rizwan et al, 2008). Nous avons donc réalisés des tests de pré-adsorption ainsi que des doubles immunomarquages contre le kp/RFRP afin d'étudier une possible réaction croisée de l'anti-kp-10 C-term avec les RFRPs. Les résultats des tests de pré-adsorption en présence de kp-52 synthétique de rat et de RanaRFa, un orthologue de RFRP-1 chez la grenouille (obtenu par collaboration avec le Dr Vaudry et Jérôme Leprince, université de Rouen), montrent que le marquage obtenu dans le DMH et le noyau arqué avec l'anti-kp-10 C-term peut être abolit par une faible concentration de kp-52 mais également par une forte concentration de RanaRFa (Figure 24). Ainsi, l'anticorps anti-kp-10 C-term reconnaît le RanaRFa, à plus faible affinité que le kp. Les résultats de doubles marquages montrent également une forte co-localisation entre le marquage obtenu avec l'anti-kp-10 C-term et l'anti-RFRP-3 (produit par le Dr Alain Caraty AC#536) (Figure 25 A et B). En revanche, aucune co-localisation n'est observée entre l'immunoréactivité obtenue avec l'anti-kp-52 (JLV) et l'anti-RFRP-3 (Figure 25 C et D). Des comptages ont été réalisés sur toutes les coupes immunomarquées sur une rate colchicine et ont montrés que 70% des cellules dans le noyau dorsomédian étaient doublement marqués kp-10-C-term/RFRP-3 (Figure 25 E). Tous ces résultats suggèrent fortement que l'anti-kp-10 C-term de souris reconnaît le RFRP-1 lorsque ce dernier est présent en forte concentration chez le rat.

#### **IV. Conclusion**

En conclusion, le travail présenté dans l'article a permis d'établir une cartographie détaillée des corps cellulaires et surtout des fibres kp-ir chez la rate adulte en proestrus. Au cours de cette étude, les différences de marquages observées chez des rates intactes ainsi que traitées à la colchicine entre l'anti-kp-10 C-term de souris (AC#564) et l'anti-kp-52 de rat (JLV) suggéraient une réaction croisée de l'anti-kp-10 C-term (AC#564) de souris contre les RFRPs. Nous avons donc mené différentes expériences préliminaires qui suggèrent que l'anti-kp-10 C-term de souris (AC#564) peut réagir avec les RFRPs chez le rat. Ces résultats ont été à la base de la fabrication de nouveaux anticorps anti-kp générés contre 14 acides aminés de la partie N-term du kp 52 (anti-kp-52 N-term) de rat (AC #067) dont la caractérisation chez l'adulte fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

## Discussion générale et Perspectives



Au commencement de ce travail de thèse, un peptide mettait en ébullition le monde de la recherche sur le contrôle central de la fonction de reproduction: le kp. De nombreuses études montrent son rôle stimulateur sur les neurones à GnRH au cours du développement pubertaire et à l'âge adulte. En revanche, aucune donnée n'existe sur la date de naissance des neurones à kp et l'évolution de l'expression de *Kiss1* et de kp au cours du développement embryonnaire. Des études ont montré que l'ontogenèse des neurones à kisspeptine pouvait être perturbée précocement par les stéroïdes sexuels mais également d'autres facteurs tels que la nutrition et le stress. Néanmoins, les périodes clés de régulations et le rôle des deux populations de neurone à kisspeptine au cours du développement restent indéterminées.

**L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'ontogenèse des neurones à kisspeptine en déterminant la période de neurogenèse et les variations spatio-temporelles de kp de l'embryon à l'âge adulte chez le rat.**

Notre travail permet une meilleure compréhension de l'ontogenèse des neurones à kp par l'apport de résultats complètement nouveaux et marquants par rapport aux données bibliographiques actuelles. En effet, notre travail a tout d'abord permis de déterminer différentes périodes clés de régulation du kisspeptine. Nous avons défini **la période de neurogenèse des neurones à kp de l'ARC chez le rat**. Nous avons déterminé l'existence d'une **sous-expression périnatale de kp dans l'ARC indépendamment du sexe de l'animal**. Notre travail a permis de montrer **l'établissement de différences sexuelles en période néonatale**. Nous avons également montré l'existence de **variations de l'ir kp tout au long de la période post-natale suggérant l'existence de mécanismes de régulations différents en fonction du sexe et de la région étudiée**. Pour finir, nos résultats obtenus chez l'adulte suggèrent un **rôle de kp dans diverses fonctions en dehors de la fonction de reproduction**.

Toutes ces nouvelles données permettent d'envisager de nouvelles pistes dans l'étude de la régulation du kp et d'émettre des hypothèses sur son rôle au cours de ces différents stades de développement.

Dans cette discussion générale, nous reprendrons chacun de ces points et nous les discuterons par rapport aux données publiées et nous présenterons également les différentes *perspectives* que nos résultats ouvrent.

## **I. Neurogenèse et variations de kisspeptine au cours du développement embryonnaire et néonatal**

Cette étude est la première à décrire la période de neurogenèse des neurones à kp ainsi que l'évolution spatio-temporelle de l'immunoréactivité kp au cours du développement embryonnaire et néonatal chez les rongeurs. Quelques études montrent la présence de l'ARNm *Kiss1* dans l'hypothalamus chez le fœtus murin et ovin (Bellingham *et al.*, 2009; Fiorini & Jasoni, 2010) et en période néonatale chez le rat (Navarro *et al.*, 2004a; Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011). Une étude montre la présence de cellules kp-ir dans l'épithélium olfactif au cours du développement embryonnaire à un seul stade chez le fœtus humain (Morelli *et al.*, 2008). Les seules données par immunohistochimie publiées chez le rongeur décrivent à partir de photos à faible résolution la présence de cellules kp-ir dans l'ARC qu'à partir de la fin de la période néonatale (Iijima *et al.*, 2010).

### ***1.1. Neurogenèse des neurones à kp***

Dans l'ARC, nos résultats montrent que les neurones à kp naissent sur une période étendue : à partir de E12,5 et au-delà de E17,5. Le pic de neurogenèse se situe autour de E15,5. Les résultats obtenus par marquage immunohistochimique montrent que les premiers corps cellulaires kp-ir sont détectés dans l'ARC à E14,5. Tous ces résultats suggèrent que les neurones à kp de l'ARC naissent directement dans la région où ils sont localisés à l'âge adulte et sont capable de synthétiser le peptide rapidement après leur naissance. Par la suite, l'augmentation du nombre de corps cellulaire kp-ir entre E14,5 et E18,5 peut être associée à l'augmentation de la neurogenèse dont le maximum est atteint à E15,5.

A E18,5, la même densité de cellules kp-ir est détectée tout au long de l'axe rostro-caudal de l'ARC chez l'embryon contrairement à l'adulte où la quantité de cellules kp-ir est 4 fois supérieure dans le 1/3 postérieur comparée au 1/3 antérieur de l'ARC. De plus, le nombre de cellules kp-ir quantifié à E18,5 correspond à la moitié des cellules kp-ir comptées chez la femelle adulte en dioestrus. Deux hypothèses pourraient expliquer ces résultats : 1) une augmentation de l'expression du gène et/ou de la synthèse/stockage du peptide pourrait avoir lieu spécifiquement dans l'ARC caudal au cours du développement post-natal ; 2) l'existence d'une deuxième période de neurogenèse après la naissance localisée spécifiquement dans le 1/3 postérieur de l'ARC. Nos résultats préliminaires par hybridation *in situ* ont montré qu'aucune cellule *Kiss1* n'était détectée au cours du développement embryonnaire dans cette région tandis que des cellules *Kiss1* sont détectées au cours du développement pré-pubertaire

confortant ainsi la première hypothèse. Néanmoins, la démonstration de l'existence d'une neurogenèse hypothalamique chez différentes espèces sous des conditions physiologiques particulières au cours du développement post-natal (Rankin *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008) et adulte (voir pour revue (Migaud *et al.*, 2010)) ne permet pas d'écarter la deuxième hypothèse qui reste à déterminer.

*Suite aux résultats d'Ahmed et ses collaborateurs montrant l'existence d'une neurogenèse au sein du RP3V autour de la puberté, nous avons réalisés des injections de BrdU sur des rates autour de la période de l'ouverture vaginale afin de déterminer si la neurogenèse observée par Ahmed au sein du RP3V s'appliquait aux neurones à kp de cette région. Les premières observations sur ces rates après traitement à la colchicine n'ont pas permis de montrer l'existence d'une neurogenèse des neurones à kisspeptine du RP3V autour de la puberté. Néanmoins, les coupes au niveau du noyau arqué n'ont pas été immunomarquées ni analysées et pourraient être utilisées afin de déterminer si la différence du nombre de neurones à kp observé entre E18,5 et l'âge adulte serait due à une neurogenèse des neurones à kp de l'ARC postérieur autour de la puberté.*

Dans le RP3V, l'absence de corps cellulaires kp-ir chez la femelle adulte intacte a rendu impossible l'étude de la date de naissance des neurones à kp de cette région. L'utilisation de la colchicine était proscrite compte tenu d'une part, d'un déménagement de l'animalerie qui a eu lieu au cours de la deuxième année de thèse et qui ne permettait plus d'avoir les conditions adéquates pour pratiquer de la stéréotaxie sur les rongeurs et d'autre part, l'utilisation de la colchicine a été récemment interdite par le comité d'éthique local. Nous avons donc essayé de nombreux protocoles de démasquage et d'amplification pour tenter de visualiser ces corps cellulaires par immunohistochimie chez la rate intacte sans grand succès.

*L'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'hormone précurseur des différentes isoformes de kisspeptine permettrait plus facilement de détecter les corps cellulaires à kp du RP3V à condition que cette dernière ne soit pas elle aussi transportée rapidement dans les fibres et clivée directement dans les terminaisons près de leurs sites de relargage. Une autre possibilité pourrait être d'analyser les cellules Kiss1 par HIS en utilisant l'isotope radioactif P33 comme nous l'avons stipulé précédemment. Pour finir, la propriété des neurones à kisspeptine à co-exprimer certaines enzymes ou neuropeptides tels que la TH, la galanine et la met-enképhaline (cf. partie II.4.a. de l'introduction) pourrait être utilisé afin d'évaluer la neurogenèse des neurones à kp du RP3V. En effet, il pourrait être envisagé d'étudier la*

neurogenèse des cellules *kp-ir* pour les enzymes ou neuropeptides co-exprimés par les neurones à *kp* du RP3V uniquement dans la région connue des neurones à *kp*. La neurogenèse des neurones *kp-ir* pour la TH a déjà été réalisé sur l'hypothalamus entier dont le pic semble avoir lieu entre E11 et E14 (Markakis & Swanson, 1997). Pour la galanine, une étude montre la date de naissance de ces neurones dans le BNST mais aucune étude n'a été réalisé au sein du RP3V (Han & De Vries, 1999). Enfin, aucune donnée n'est pour le moment publiée sur la date de naissance de neurones à Met-enképhaline. Néanmoins, ces résultats nous permettraient juste de suggérer que les neurones à *kp* du RP3V naissent aux mêmes périodes que les neurones à dopamine, galanine et met-enképhaline.

### ***1.2. Localisation extra-hypothalamique de cellules *kp-ir* chez l'embryon***

Dans l'aire pré-optique, seulement 2 à 3 cellules *kp-ir* ont été détectées mais de façon répétable (sur chacun des ¼ de cerveau immunomarcué) au-dessus du chiasma optique essentiellement à E18,5 ce qui est en accord avec leur localisation à l'âge adulte (Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007). Malheureusement, ce faible nombre n'a pas permis de réaliser des tests de pré-adsorption sur des coupes consécutives. L'absence de cellules *kp-ir* aux autres âges et le faible nombre détecté à E18,5 pourrait être expliqué soit par une neurogenèse et une différenciation plus tardive des neurones à *kp* du RP3V soit par l'acquisition précoce de leur propriété intrinsèque adulte c'est-à-dire le transport rapide de *kp* vers les fibres empêchant sa détection par immunohistochimie au sein des corps cellulaires dans cette région.

Pour discriminer l'une de l'autre, il serait nécessaire de déterminer la période de neurogenèse des neurones à *kp* du RP3V ainsi que la première date à laquelle l'ARNm est détectable. En ce qui concerne la date d'apparition des premières cellules *Kiss1*, l'utilisation de l'hybridation *in situ* n'a pour le moment pas permis de détecter des cellules *Kiss1* chez l'embryon y compris dans l'ARC. Des micro-prélèvements (micro-punchs, microdissection laser) pourraient également être effectués afin de détecter la présence ou non d'ARNm *Kiss1* dans le RP3V et dans l'ARC. Néanmoins, pour une localisation précise des cellules exprimant le *Kiss1*, l'*HIS* à l'aide d'un isotope radioactif tel que le  $P^{33}$  augmentant la sensibilité de la technique me semble être la plus approprié.

Nos résultats préliminaires montrent également la présence de cellules *kp-ir* dans deux autres régions extra-hypothalamiques : l'amygdale et le tronc cérébral, plus particulièrement

le noyau du pons. Cependant, la spécificité de cette immunoréactivité doit être vérifiée par des tests de pré-adsorption. En ce qui concerne l'amygdale, ce résultat ne semble pas aberrant puisque nos résultats préliminaires par hybridation *in situ* chez l'adulte suggèrent la présence de cellules *Kiss1* dans l'amygdale. Ces résultats ont été rapidement confortés par une étude récemment publiée montrant la présence de cellule *Kiss1* dans cette région chez le rat adulte (Kim *et al.*, 2011). Pour les cellules détectées dans le tronc cérébral, une étude récente montre la présence de cellules kp-ir dans le tronc cérébral chez la souris mais les régions indiquées (péri-aqueductal gray, locus coeruleus) (Clarkson *et al.*, 2009b) ne correspondent pas à nos résultats chez l'embryon de rat (le noyau du pont).

### ***1.3. Sous-expression pré-natale du kp dans l'ARC***

Nos résultats montrent une diminution de l'immunoréactivité kp entre E18,5 et E22,5 dans l'ARC et l'éminence médiane. En effet, le nombre de corps cellulaire kp-ir chute dramatiquement entre E18,5 et E22,5. De plus, aucune fibre kp-ir n'est détectée dans l'ARC et l'éminence médiane à E22,5. Ces résultats suggèrent que les neurones à kp seraient fortement régulés en période pré-natale. Aucune différence sexuelle n'ayant été observée, cette régulation semble être indépendante du sexe de l'animal. L'impossibilité de détecter des cellules *Kiss1* par HIS chez l'embryon, ne nous permet pas de discriminer si cette régulation négative pré-natale est de type transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

*Dans cette optique, nous mettons au point à l'heure actuelle au laboratoire, la détection de l'ARNm *Kiss1* sur des micro-punchs d'ARC prélevés à E18,5 et E22,5 afin de déterminer si la régulation négative observé sur le kp par IHC est retrouvé sur les niveaux d'ARNm *Kiss1*.*

Différents facteurs provenant de la mère et liés à la fin de la gestation et à la préparation de la parturition pourraient intervenir dans cette régulation. En effet, la fin de la gestation et la préparation de la mise-bas sont associées chez la mère à de grands changements hormonaux tels qu'une diminution de progestérone et de leptine ainsi qu'une augmentation de prolactine et d'œstradiol (Brunton & Russell, 2010). Des études récentes que nous avons détaillées dans l'introduction (cf. page 41 paragraphe III.4.b et page 35 paragraphe III.2 de l'introduction) ont montré que les neurones à kp possédaient les récepteurs à ces différentes hormones chez l'adulte (Kinoshita *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005a; Smith *et al.*, 2005b; Franceschini *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006a; Smith *et al.*, 2006b; Smith *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Kokay *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011) et que certaines

étaient capables de réguler l'ARNm *Kiss1* et/ou le kp à l'âge adulte (Navarro *et al.*, 2004a; Kinoshita *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007; Roa *et al.*, 2008). *Des études sont encore nécessaires pour déterminer si les neurones à kp chez l'embryon possèdent les récepteurs de ces hormones et seraient donc ainsi capable d'être sous-régulés directement par ces dernières.*

#### ***1.4. Rôle potentiel de kp en période embryonnaire et néonatale***

Nos résultats montrent la présence de cellules et de fibres kp-ir mais également la détection de kp-ir par un anticorps reconnaissant majoritairement la forme amidée du kisséptine, c'est-à-dire la forme active biologiquement, suggère que les neurones à kp pourraient déjà être physiologiquement actifs en période embryonnaire et néonatale.

L'apparition de fibres kp-ir dans l'éminence médiane à E18,5 peut être corrélée avec l'apparition des premières fibres GnRH observées par microscopie électronique dans l'éminence médiane au même âge chez le rat (Ugrumov *et al.*, 1985). Chez la souris, les neurones à GnRH expriment le *Kiss1r* dès E13,5 et des neurones à GnRH issus de placodes olfactives embryonnaires sont capable de répondre à une stimulation par du kp (Constantin *et al.*, 2009a; Constantin *et al.*, 2009b). Enfin, une étude récente suggère un rôle chémo-attracteur de kp sur les neurites des neurones à GnRH en culture issus d'explant d'aire pré-optique d'embryon (Fiorini & Jasoni, 2010). Ces résultats *in vitro* suggèrent donc un rôle potentiel de kp sur la poussée axonale des neurones à GnRH vers l'éminence médiane.

A E22,5, aucune fibre kp-ir n'est observée dans l'éminence médiane alors que des fibres kp-ir sont détectées à PND0 dans cette région. Ces résultats corrélés à la diminution du nombre de cellules kp-ir dans l'ARC pourraient suggérer une libération de kp à cet âge. Il est intéressant de noter que l'analyse de la concentration de GnRH dans le plasma de fœtus et de nouveau-nés de rats suggère une forte sécrétion de GnRH peu de temps avant la naissance (Ugrumov *et al.*, 2005). Ce relargage de GnRH pourrait être lié à un relargage important de kp à cette même période.

De nombreuses études tendent à montrer que le gène *Kiss1* est impliqué dans l'inhibition de l'invasion trophoblastique au cours du développement du placenta (Bilban *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011) mais également dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale et

placentaire (Cho *et al.*, 2009; Ramaesh *et al.*, 2010). Ce rôle de kp est intéressant en relation avec la mise en place du système sanguin porte hypothalamo-hypophysaire au cours de la période périnatale et néonatale (Dearden & Holmes, 1976; Ojeda *et al.*, 1980). Chez la souris, les premiers vaisseaux sanguins se mettent en place à E17,5 et le système porte hypothalamo-hypophysaire termine sa maturation vers PND05 (Dearden & Holmes, 1976). Nos résultats montrent la présence de fibres kp-ir dans l'éminence médiane dès E18,5 et une augmentation de la densité de fibres au cours de la période néonatale entre PND0 et PND07 dans la zone interne comme dans la zone externe. Ainsi, il est tentant d'imaginer que le kp pourrait également avoir un rôle dans l'angiogenèse du système porte hypothalamo-hypophysaire au cours du développement néonatal.

*L'hypothèse d'un rôle potentiel du kp sur la neuritogenèse des neurones à GnRH et/ou l'angiogenèse des vaisseaux porte-hypothalamo-hypophysaire au cours du développement embryonnaire et néonatal, respectivement, pourrait être étudié in vivo à l'aide des souris KO pour le Kiss1 ainsi qu'avec le nouveau modèle de souris transgéniques dont l'ablation des cellules kp est inductible (Mayer & Boehm, 2011). Chez les souris Kiss1 KO, aucune étude n'a été réalisé sur la vascularisation de l'éminence médiane ni de quantification de la densité de fibres GnRH-ir. Une induction de l'ablation de ces cellules à différents moments de la période embryonnaire ou néonatale suivi d'une étude par microscopie en lumière transmise des fibres GnRH-ir et des vaisseaux porte-hypothalamo-hypophysaire au sein de l'éminence médiane pourrait être envisagée quelques jours après l'ablation ainsi qu'à l'âge adulte afin de déterminer si un mécanisme de compensation peut se mettre en place au cours du développement. En effet, l'étude de Mayer sur ces souris dont l'ablation des neurones à kp est inductible montre que l'ablation des neurones à kisspeptine dès le début du développement embryonnaire ne provoque aucun défaut de mise en place de la fonction de reproduction ni de fertilité. En revanche, l'induction de l'ablation des cellules à kisspeptine chez l'adulte rend les souris infertiles. L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes compensateurs qui se mettraient en place en l'absence de la cellule entière dès le début du développement (Mayer & Boehm, 2011).*

### ***1.5. Etablissement des différences sexuelles***

Dans l'ARC, aucune différence sexuelle n'est observée quel que soit l'âge étudié au cours de la période embryonnaire (de E14,5 à E18,5) et périnatale (E22,5 et PND0). En

revanche, à PND07, la densité de fibres kp-ir est plus élevée chez la femelle que chez le mâle en accord avec les résultats obtenus par Iijima et ses collaborateurs (Iijima *et al.*, 2010). Nos résultats suggèrent que les différences sexuelles au niveau peptidique se mettent en place au cours de la première semaine de vie post-natale. Des études récentes par HIS montrent que la mise en place des différences sexuelles au niveau de l'expression de *Kiss1* a également lieu au cours de la période néonatale dans cette région (Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011). Nos résultats sont en accord avec les différentes études qui ont démontré l'effet organisationnel des stéroïdes sexuels au cours de la période néonatale sur les différences sexuelles des neurones à kp observées à l'âge adulte (Kauffman *et al.*, 2007; Bateman & Patisaul, 2008; Navarro *et al.*, 2008; Homma *et al.*, 2009; Patisaul *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires de la différenciation sexuelle des neurones à kp par les stéroïdes sexuels restent encore à déterminer.

*La mise en place de cultures primaires de neurones à kp me semble être un outil approprié pour mieux comprendre et définir les mécanismes impliqués dans la régulation de l'ARNm et de kp par les stéroïdes sexuels ou d'autres régulateurs. Notre étude démontre que les neurones à kp de l'ARC naissent dans la région où on les retrouve à l'âge adulte sur une période étendue dont le pic de neurogenèse se situe autour de E15,5. Les premiers corps cellulaires kp-ir sont observés à E14,5 et leur nombre augmente jusqu'à E18,5. Cette propriété pourrait être utilisée pour mettre en place des cultures de neurones à kp à partir de cellules dissociées d'ARC d'embryons à E15,5. Cette technique a déjà été utilisée pour mettre en place des cultures de neurones à vasopressine et ocytocine. En effet, par IHC, les premiers corps cellulaires AVP et OT-ir ont été détectés dans l'hypothalamus d'embryon de rat à partir de E16 (Whitnall & Gainer, 1985). Récemment des cultures de neurones à AVP et OT ont été réalisées à partir d'hypothalami d'embryon de rat à E17 qui ont été dissociés mécaniquement (Moreno *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, aucune culture primaire de neurones à kp n'a été décrite. De plus, la suggestion de l'absence de différence sexuelle au niveau du peptide tout du moins au cours de cette période embryonnaire permet d'imaginer que les neurones à kp en culture ne seraient pas encore sexuellement différenciés et ainsi pourraient être utilisés pour l'étude des mécanismes de différenciation sexuelle de ces neurones in vitro. Bien entendu, la perspective de l'étude des mécanismes de différenciation sexuelle sur les neurones à kp in vitro nécessitera tout d'abord la mise en place de ces cultures et surtout une caractérisation précise de ces neurones et de leurs caractéristiques in vitro avant toute manipulation.*



Dans l'aire pré-optique, 2 à 3 cellules kp-ir sont détectées systématiquement à E18,5 aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Par la suite et comme pour l'adulte, aucune cellule kp-ir n'est détectée dans cette région chez des animaux intacts. En revanche, à partir de PND0, les premières fibres kp-ir sont détectées uniquement chez les femelles. Puis, à PND07, des fibres kp-ir sont détectées dans les deux sexes mais la densité de fibres kp-ir reste plus élevée chez les femelles que chez les mâles. Aucune cellule *Kiss1* n'ayant été détectée au cours du développement néonatal (Takumi *et al.*, 2010; Cao & Patisaul, 2011), il est difficile de discriminer si cette mise en place d'une différence sexuelle au niveau des fibres à kp dans le RP3V reflète l'établissement des différences sexuelles des neurones à kp de cette région ou d'une autre région projetant vers le RP3V.

Dans l'amygdale, les cellules kp-ir sont détectées uniquement chez les femelles à E18,5 suggérant la mise en place de différences sexuelles dans cette région en période embryonnaire. Chez l'adulte, les cellules *Kiss1* ont récemment été montrées comme sexuellement différentes avec un plus grand nombre de cellules *Kiss1* chez les mâles que chez les femelles (Kim *et al.*, 2011). Ces différences peuvent être dues au stade de développement et/ou à une régulation post-transcriptionnelle. *Des tests de pré-adsorption restent nécessaires pour vérifier la spécificité de ce marquage dans l'amygdale chez l'embryon.*

## **II. Variations d'immunoréactivité kp au cours du développement péri-pubertaire**

Notre étude est la première à quantifier les variations du nombre de corps cellulaires kp-ir dans l'ARC et la densité de fibres kp-ir dans les deux régions RP3V et ARC tout au long du développement péri-pubertaire de la période infantile à l'âge adulte chez les deux sexes et de comparer ces variations aux taux circulants de stéroïdes sexuels chez des animaux intacts. En effet, trois études par immunohistochimie sont actuellement publiées chez le rat : la première décrit sans quantifier l'immunoréactivité kp tout au long du développement péri-pubertaire chez les deux sexes (Iijima *et al.*, 2010) ; la seconde quantifie le nombre de corps cellulaires et la densité de fibres kp-ir mais essentiellement en période infantile et juvénile chez les deux sexes (Losa *et al.*, 2010) et la troisième quantifie uniquement chez le mâle le nombre de cellules kp-ir au cours du développement de la période infantile à l'âge adulte (Bentsen *et al.*, 2010).

### ***II.1. Persistances des différences sexuelles jusqu'à l'âge adulte***

Les différences sexuelles en faveur des femelles qui se sont établies en période néonatale vont persister presque tout au long du développement.

Dans l'ARC, le nombre de corps cellulaires ainsi que la densité de fibres sont plus élevés chez les femelles que chez les mâles tout au long du développement post-natal jusqu'à l'âge adulte. Jusqu'à présent, l'existence d'une différence sexuelle au sein de l'ARC chez les rongeurs était controversée (voir pour revue (Kauffman, 2010) et cf. page 43 paragraphe III.5 de l'introduction). Notre étude démontre pour la première fois chez le rat que les neurones à kp de cette région sont aussi sujet, comme précédemment montré pour les neurones à kp du RP3V (Kauffman *et al.*, 2007) à des différences sexuelles et qu'elles se mettent en place en période néonatale pour perdurer tout au long du développement jusqu'à l'âge adulte.

Dans le RP3V, la densité de fibres kp-ir est plus élevée chez les femelles comparées aux mâles tout au long du développement excepté en période pubertaire. En effet, à PND49, la densité de fibre kp-ir des mâles est significativement plus élevée que celle des femelles aux mêmes âges. Cette différence pourrait être due à l'action de la testostérone. En effet, nos résultats préliminaires montrent une augmentation significative de testostérone à PND49. A l'âge adulte, la densité de fibres kp-ir chez la femelle redevient plus élevée que chez les mâles.

### ***II.2. Variations développementales de l'immunoréactivité kp***

Chez les mâles, notre étude est la première à quantifier les variations de densité de fibres kp-ir chez le rat mâle tout au long du développement. Deux études récentes ont étudié l'immunoréactivité kp au cours du développement : l'une sans quantification (Iijima *et al.*, 2010) et l'autre en quantifiant uniquement le nombre de corps cellulaires kp-ir dans l'ARC chez le rat mâle (Bentsen *et al.*, 2010). Les résultats obtenus dans notre étude sur le nombre de corps cellulaires kp-ir dans l'ARC sont en accord avec la précédente étude (Bentsen *et al.*, 2010) et montrent une augmentation du nombre de corps cellulaires kp-ir entre la période juvénile et la période pubertaire qui atteint son maximum à l'âge adulte. Cette augmentation est corrélée à l'augmentation de testostérone plasmatique (Desroziers *et al.*, résultats non publiés). Il est intéressant de noter que chez les mâles contrairement à la femelle, la densité de fibres kp-ir suit le même patron de variations entre les deux régions RP3V et ARC. La diminution de densité de fibres kp-ir observée entre la fin de la période infantile et la période juvénile n'est pas corrélée à une variation de la concentration plasmatique de testostérone

laissant ouverte la possibilité de changements intrinsèques ou d'une régulation par d'autres facteurs. L'augmentation de la densité de fibres kp-ir détectée entre la période juvénile et la période pubertaire est associée à une augmentation significative du taux de testostérone (Desroziers et al, résultats non publiés). Nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si c'est l'augmentation de testostérone qui provoque une augmentation de kp ou si c'est l'augmentation de kp qui a provoqué l'augmentation de testostérone. Néanmoins, des données récentes d'injection de kp i.p. montrent un effet stimulateur de kp en période pubertaire sur la concentration plasmatique de testostérone chez le mâle. Cette action stimulatrice de kp injecté en i.p. sur les taux circulant de testostérone étant bloquée par un antagoniste de GnRH, les auteurs suggèrent alors un rôle majeur de kp dans le déclenchement de la puberté chez le mâle (Bentsen *et al.*, 2010). Les mécanismes du déclenchement de la puberté chez les mâles sont moins étudiés que chez les femelles, y compris le rôle de kp ainsi de nombreuses questions restent en suspens telle que l'action du kisspeptine sur les neurones à GnRH chez le mâle ? Il a été montré que les neurones à kisspeptine du RP3V seraient impliqués dans le pic pré-ovulatoire chez la femelle (Kinoshita *et al.*, 2005; Clarkson *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009a; Sebert *et al.*, 2010) mais quel rôle le kisspeptine joue-t'il chez le mâle ? Les études chez les souris *Kiss1* KO montrent des défauts de maturation des gonades ainsi qu'un retard dans le déclenchement de la puberté chez les mâles (pour revue (Colledge, 2009)) mais peu d'étude ont étudié aussi précisément que chez la femelle le rôle de kisspeptine dans le déclenchement de la puberté chez le mâle (Bentsen *et al.*, 2010). Par exemple, les souris Kiss-ER $\alpha$ KO (Mayer *et al.*, 2010) ou les souris dont l'ablation totale des cellules kisspeptine est inductible (Mayer & Boehm, 2011) ont été caractérisées uniquement chez les femelles. Aucune étude n'a pour le moment été publiée sur l'effet de l'ablation totale des cellules *Kiss1* ou du retrait du récepteur ER $\alpha$  spécifiquement dans les cellules exprimant le *Kiss1* chez le mâle.

Ainsi, notre étude identifie pour la première fois l'existence de périodes de régulation de l'expression de kp spécifiques au mâle et cible ainsi des périodes clés du développement péri-pubertaire chez les mâles pour de futures études.

Chez les femelles, à partir la période juvénile jusqu'à l'âge adulte, l'ir kp dans le RP3V et dans l'ARC vont augmenter avec un timing différent en fonction de la région et sous taux circulant d'œstradiol constant et bas. En effet, le nombre de corps cellulaire kp-ir et la densité de fibres kp-ir dans l'ARC vont augmenter entre la période juvénile et adulte alors que les taux circulant d'œstradiol ne fluctuent pas. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse

avancée par Takase et ses collaborateurs d'une répression de l'effet inhibiteur de l'œstradiol sur l'expression de *Kiss1* dans l'ARC entre la période juvénile et l'âge adulte. Dans le RP3V, la densité de fibres kp-ir augmente entre la période pubertaire et l'âge adulte sous des taux circulants bas d'œstradiol. Ces données suggèrent que les neurones à kp deviennent de plus en plus sensibles à des taux faibles d'œstradiol et présentent donc une sensibilité qui augmente entre la période pubertaire et l'âge adulte. De plus, ces changements de sensibilité (répression du feedback négatif de l'E2 pour les neurones à kp de l'ARC et augmentation de la sensibilité à l'E2 des neurones à kp du RP3V) sont corrélés à une augmentation des taux plasmatiques de LH chez le rat (Dohler & Wuttke, 1974; Zapatero-Caballero *et al.*, 2004). Tous ces résultats suggèrent un changement de sensibilité des neurones à kisspeptine du RP3V et de l'ARC se déroulant avec un décalage. Ce dernier aurait lieu plus précocement dans l'ARC que dans le RP3V et serait impliqué dans la réactivation du système GnRH.

*Pour étudier la capacité des neurones à kp à répondre à l'œstradiol et la possibilité d'un changement de sensibilité de ces neurones à l'œstradiol au cours du développement péri-pubertaire, il serait intéressant d'étudier par immunohistochimie la co-expression des récepteurs à l'œstradiol dans les cellules kp-ir de l'ARC tout du moins et les variations de cette co-expression au cours des différentes phases de développement étudiées ici. De plus, là encore, les cultures de neurones à kp pourraient être utilisées pour nous éclairer sur les mécanismes intracellulaires impliqués dans la maturation de ces feedbacks.*

### **III. Cartographie de kisspeptine chez la rate adulte**

#### ***III.1. Cartographie de kisspeptine***

Au début de la thèse, une cartographie détaillée des cellules et des fibres kp-ir avait été réalisée chez le rat mâle (Brailoiu *et al.*, 2005). Cependant, la spécificité du marquage obtenu avec l'anticorps utilisé dans cette étude avait été mise en doute quelques années plus tard (Goodman *et al.*, 2007). En effet, cet anticorps reconnaissait un autre peptide de la famille des RF-amides : les RFRPs. Notre étude a donc permis d'établir une cartographie détaillée des cellules et des fibres kp-ir chez la femelle en proestrus en prenant garde à la spécificité du marquage.

Des cellules kp-ir sont détectées uniquement dans l'ARC. Chez la rate intacte, aucune cellule kp-ir n'est détectée dans le RP3V comparé à la souris (Clarkson & Herbison, 2006b; Clarkson *et al.*, 2009a; Clarkson *et al.*, 2009b). La présence de cellules *Kiss1* chez la rate dans cette région (Irwig *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2007; Kalamatianos *et al.*, 2008) suggérait une potentielle régulation post-transcriptionnelle du kp. Pour vérifier cette possibilité, nous avons réalisé des injections de colchicine, un bloqueur du transport des protéines des corps cellulaires vers les fibres et de l'exocytose. Après traitement à la colchicine, des cellules kp-ir sont détectées dans le RP3V en accord avec les résultats précédemment publiés (Adachi *et al.*, 2007; Takase *et al.*, 2009). Tous ces résultats démontrent une régulation post-transcriptionnelle des neurones à kp du RP3V chez la rate, qui pourrait être dû à un transport rapide du kisspeptine vers les synapses juste après sa synthèse, et suggèrent une différence d'espèce dans la régulation post-transcriptionnelle de la population des neurones à kp du RP3V.

En ce qui concerne les fibres kp-ir, elles sont détectées dans de nombreuses régions hypothalamiques tout au long de l'axe rostro-caudal suggérant que le kp pourrait jouer un rôle dans diverses fonctions en dehors de la fonction de reproduction :

1) Des fibres immunoréactives pour le kisspeptine sont observées dans les régions où les corps cellulaires exprimant l'ARN messager et le peptide ont été détectés : le RP3V pour les et l'ARC. La présence des fibres à kisspeptines autour des corps cellulaires à kisspeptine suggère d'une part, une action autocrine du kisspeptine, et d'autre part, une communication entre les deux sous-populations de neurones à kisspeptine. Il est actuellement impossible de différencier par simple immunohistochimie les fibres provenant de l'une ou l'autre des deux populations et donc de discriminer une relation entre les deux populations ou une action autocrine. Néanmoins, des études récentes à l'aide de traçage antérograde chez la souris femelle (Yeo & Herbison, 2011) mais également de double immunomarquages kp/NKB chez la rate (True *et al.*, 2010) suggèrent que certains neurones à kisspeptine du RP3V projetteraient vers l'ARC et que certains neurones à kisspeptine de l'ARC projetteraient vers l'ARC. Une troisième explication à la présence des fibres à kisspeptine au sein de ces régions pourrait être d'avoir une action sur les autres types cellulaires présents dans ces régions comme par exemple les neurones à NPY (neuropeptide Y). Ces derniers reçoivent des afférences kisspeptine et leur activité électrophysiologique est inhibée par le kisspeptine par un mécanisme synaptique indirect chez la souris (Fu & van den Pol, 2010).

2) Des fibres kp-ir sont détectées dans le noyau paraventriculaire et supra-optique où l'on retrouve une forte densité de neurones à ocytocine qui interviennent dans le déclenchement des contractions lors de la parturition. De plus, deux études récentes montrent que le kp est capable de moduler l'expression du gène de l'ocytocine ainsi que l'activité électrophysiologique des neurones à ocytocine (Rao *et al.*, 2011; Scott & Brown, 2011).

3) La présence de fibres kp-ir en grande densité dans la zone interne de l'éminence médiane chez la rate est en faveur de l'existence d'un rôle direct de kp sur l'hypophyse.

4) Des fibres kp-ir sont détectées dans le noyau dorsomédian, où des neurones à RFRPs sont retrouvés. Nos résultats préliminaires de doubles marquages RFRP-3/kp avec l'anticorps anti-kp-52 (JLV) montrent des fibres kp-ir à proximité de corps cellulaire RFRP-3-ir. Il est intéressant de noter que la présence de l'ARNm du *Kiss1r* a déjà été démontrée dans le DMH mais l'expression de *Kiss1r* n'a pas été démontrée au sein même des cellules exprimant les RFRPs (Lee *et al.*, 1999; Herbison *et al.*, 2010). Néanmoins, l'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence d'une relation entre les neurones à kp et les neurones à RFRPs. Cette hypothèse me semble intéressante à creuser de par l'action opposée de ces deux neuropeptides sur les neurones à GnRH : le kp en tant que stimulateur et le RFRP-3 en tant qu'inhibiteur de la sécrétion de GnRH (voir pour revue (Kriegsfeld *et al.*, 2010)).

*Afin de tester l'hypothèse d'un potentiel dialogue direct entre les neurones à kp et les neurones à RFRP-3, il serait nécessaire :1) de compléter nos observations préliminaires dans le DMH et de préciser les relations des fibres kp-ir avec les corps cellulaires RFRP-3-ir en quantifiant précisément les appositions kp sur les corps cellulaires RFRP-3 par immunohistochimie mais également 2) de vérifier la présence du Kiss1r dans les neurones à RFRPs. Une fois ces études réalisées, d'autres études pourraient être envisagées telles que les effets de l'injection i.c.v de kp sur l'expression du gène et la synthèse du RFRP-3 dans le DMH. Il pourrait également être intéressant de déterminer les appositions RFRP-3 versus kp sur les neurones à GnRH en fonction du cycle ou des différentes phases de développement post-natal afin de mieux comprendre les interactions entre les régulations négatives et positives des neurones à GnRH au cours des différentes phases de la vie reproductive.*

### **III.2. Spécificité du marquage kp**

Une différence importante entre nos résultats et la cartographie publiée chez la souris (Clarkson *et al.*, 2009b) est l'absence chez la rate de cellules kp-ir dans le DMH alors que des cellules kp-ir y sont détectées chez la souris intacte. Nos résultats après traitement à la

colchicine montrent que des cellules kp-ir sont observées dans cette région uniquement avec l'anticorps anti-kp-10 C-term (AC#564). Aucune cellule *Kiss1* n'a pour le moment été détectée dans cette région ni chez la souris ni chez le rat (Gottsch *et al.*, 2004; Irwig *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006b; Adachi *et al.*, 2007). Les marquages obtenus dans le DMH avec l'anticorps anti-kp-10 C-term (AC#564) restent à l'heure actuelle très controversés. En effet, le kp a la particularité de posséder en sa partie C-term un motif LRF-NH2 qui est, d'une part, très immunogène et d'autre part, la caractéristique d'une famille de neuropeptide se terminant eux-aussi par ce motif : les RF-amides. Parmi les RFamides, les RFRPs possèdent un motif C-terminal très proche de celui du kp : le RFRP-1, possède un motif identique LRF-NH2 et le RFRP-3 présente un motif qui ne diffère que d'un acide aminé QRF-NH2 (voir pour revue (Tsutsui *et al.*, 2010) et cf. figure 4 de l'introduction). Il est maintenant bien établi que les cellules exprimant l'ARNm des RFRPs et immunopositives pour le précurseur des deux isoformes RFRP-1 et RFRP-3 se situent dans le noyau dorsomédian (Rizwan *et al.*, 2009). Nos résultats préliminaires suggèrent une potentielle réaction croisée de l'anti-kp-10 C-term avec les RFRP-1. En revanche, aucune co-localisation n'est observée entre l'ir RFRP-3 et l'ir obtenue avec l'anti-kp-52 (JLV). Ces résultats suggèrent donc que l'ir kp obtenue dans le DMH avec l'anti-kp-10 C-term dans notre étude chez la rate traitée à la colchicine ainsi que chez la souris (Clarkson & Herbison, 2006b; Clarkson *et al.*, 2009b) pourrait être le résultat d'une réaction croisée de l'anticorps envers les RFRPs. Néanmoins, l'immunomarquage obtenu avec l'anti-kp-10 C-term est aboli dans le DMH avec des concentrations de RanaRFA (un orthologue de RFRP-1 chez la grenouille) 100 fois supérieures à la concentration de kp-52 nécessaire pour abolir l'immunoréactivité kisspeptine de l'ARC. De plus, des données récentes obtenues par Alain Caraty en collaboration avec Jérôme Leprince et Hubert Vaudry (Université de Rouen) suggèrent que l'existence de petites isoformes de kp, en particulier de kp-16, au sein de l'hypothalamus ovin (Alain Caraty, résultats non publiés). Il est donc également possible que l'anti-kp-10 C-term ne reconnaisse que des petites isoformes dans cette région et que l'ARNm *Kiss1* soit rapidement dégradé et/ou en quantité insuffisante pour être détecté dans cette population expliquant ainsi l'absence de cellules *Kiss1* par hybridation *in situ*. Néanmoins, ces hypothèses étant difficile à confirmer, notre étude montre qu'il est important de prendre des précautions dans l'analyse des résultats obtenus avec l'anticorps anti-kp-10 C-term.

Le marquage obtenu avec l'anti-kp-52 (JLV) nécessite également de prendre quelques précautions lors de l'analyse. En effet, nos résultats montrent que cet anticorps reconnaît des

structures de types tanocytes au sein de l'éminence médiane. Ce marquage de type tanocyte est tout de même discernable des fibres variqueuses kp-ir mais rend impossible une quantification de la densité de marquage dans cette région qui aurait pu être intéressante par exemple pour l'étude développementale.

L'ensemble de ces résultats nous ont amené à développer un nouvel anticorps dirigé contre la partie N-term du kp-52 qui a pu être utilisé lors de la dernière année de la thèse pour l'étude sur l'ontogenèse des neurones à kisséptine chez l'embryon.



## Conclusion

Depuis sa découverte en tant qu'acteur majeur de la fonction de reproduction en amont des neurones à GnRH, le kisspeptine est l'objet de nombreuses investigations. Certaines ont montré une régulation et un rôle précoce des neurones à kisspeptine au cours du développement. Paradoxalement, les périodes clés de l'ontogenèse des neurones à kisspeptine telles que leur période de neurogenèse ainsi que les régulations du système kisspeptine au cours du développement n'avaient pas encore été bien définies.

L'objectif de notre travail de thèse était donc de déterminer la période de neurogenèse des neurones à kisspeptine puis de décrire l'évolution spatio-temporelle d'immunoréactivité kisspeptine tout au long du développement de l'embryon à l'âge adulte chez le rat.

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de déterminer la période de neurogenèse des neurones à kisspeptine de l'ARC.

Dans un second, l'étude des variations d'immunoréactivité kisspeptine au cours du développement a permis de définir des périodes critiques du développement des neurones à kisspeptine pendant lesquels le kisspeptine semblent être fortement régulés ouvrant ainsi de nouvelles pistes dans l'étude des mécanismes de régulations et du rôle du kisspeptine au cours du développement.

Pour finir, notre étude chez l'adulte a permis d'identifier différentes cibles des neurones à kisspeptine et suggère un rôle de kisspeptine dans d'autres fonctions en dehors de la fonction de reproduction qui reste à déterminer.

## Annexes

Annexe 1 : Article de synthèse “The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity”, Isabelle Franceschini, Elodie Desroziers, Alain Caraty and Anne Duittoz, 2010

Contribution au travail :

Au cours de mon stage de Master 2 sous la direction d'Isabelle Franceschini et Anne Duittoz, j'ai réalisé une étude sur le rôle de la PSA-NCAM, une molécule d'adhésion membranaire, dans les interactions entre les neurones à GnRH et leurs cellules gliales environnantes. Pour ce projet, nous avons utilisé un modèle de culture primaire de neurones à GnRH issus de placodes embryonnaires olfactives murines précédemment mis au point au laboratoire. Mes résultats ont permis de montrer le rôle de cette molécule d'adhésion dans les interactions morphologiques entre les neurones à GnRH et leur environnement glial et suggère également un rôle de la PSA-NCAM et des communications neurone-glie dans la régulation de la sécrétion de GnRH.

Dans cette revue, une partie des résultats obtenus au cours de mon stage de master 2 est décrite en s'appuyant sur deux figures issues de mon travail (les figures 2 et 3). J'ai également participé à la relecture de cette revue avant publication.

## CELLULAR PLASTICITY

# The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity

Isabelle Franceschini,<sup>1,2,3,4,5</sup> Elodie Desroziers,<sup>1,2,3,4,5</sup> Alain Caraty<sup>1,2,3,4,5</sup> and Anne Duittoz<sup>1,2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France

<sup>2</sup>Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA/CNRS/University of Tours, F-37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup>Université de Tours, Tours, France

<sup>4</sup>Haras Nationaux, Nouzilly, France

<sup>5</sup>IFR135 Imagerie Fonctionnelle, Tours, France

**Keywords:** astrocyte, brain, cell adhesion molecule, olfactory

## Abstract

The neurohormone gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is critical for all the aspects of reproductive life in vertebrates. GnRH is secreted by a small number of neurons dispersed within the preoptic-hypothalamic region. These neurons are derived from the embryonic olfactory pit. They then migrate along olfactory, vomeronasal and terminal nerves to their final destination. Classical approaches to study the regulation of GnRH secretion during the reproductive cycle have focused on the various neuronal inputs on GnRH neurons and their regulation by ovarian steroids. However, it is well known that steroids will change the microenvironment of neuronal networks and can induce plasticity and functional changes. In this review, we will focus on the intimate relationship of developing and adult GnRH neurons with the polysialylated form of neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), a major molecular actor in the morphogenesis and adult plasticity of the nervous system. We will first recapitulate the spatiotemporal relationship between PSA-NCAM and migrating GnRH neurons during embryogenesis of various vertebrate species and discuss its importance for GnRH neuron development as shown by various loss of function studies. In the adult, we will review the relationships between PSA-NCAM and GnRH neurons across various physiological states, and open the discussion to the use of new model systems that can help to unravel the function and mechanism of action of PSA-NCAM on GnRH neuronal network activity and GnRH release.

## Introduction

The neural cell adhesion molecule (NCAM) is one of the most abundant cell surface-associated adhesion molecules of the nervous system. Originally characterized as a homophilic cell adhesion molecule that mediates cell–cell adhesion, NCAM can also interact with a number of other cell surface-associated or matrix-associated molecules, and is now being considered as a signaling receptor on its own (Ditlevsen *et al.*, 2008 for review). The five most represented splice variants of NCAM can all be modified post-transcriptionally on their extracellular domain by either of the two polysialyltransferases (ST8SiaII and ST8SiaIV) that assemble long homopolymers of  $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked sialic acids, termed polysialic acid (PSA) (Franceschini *et al.*, 2001). NCAM is, in fact, the major carrier of PSA in the nervous system (Cremer *et al.*, 1994). Polysialylation of NCAM

results in reduced homophilic binding of NCAM, and it has been proposed that this is an important mechanism by which this post-translational modification facilitates cell movements (Rutishauser, 2008 for review). Accordingly, the spatiotemporal pattern of polysialylated NCAM (PSA-NCAM) expression in the brain correlates well with areas of cell migration and axonal outgrowth during morphogenesis of the nervous system, and in the adult it is retained in areas of both morphological and synaptic plasticity (Seki & Arai, 1993 for review). Much has been learned about the critical role of PSA-NCAM in brain development and plasticity from the use of NCAM and polysialyltransferase knockout mice, as well as from the use of endoneuraminidase N (endo N), a glycosidase that is able to specifically cleave the PSA chains. It appears that PSA-NCAM plays a major role in fine-tuning the spatial and temporal control of neural circuit formation during both development and adult plasticity. For instance, during retinal development, enzymatic loss of PSA was associated with projection errors of ganglion cells (Monnier *et al.*, 2001). In the hippocampus, it resulted in aberrant mossy fiber innervation and ectopic synapse formation (Seki & Rutishauser,

*Correspondence:* Dr I. Franceschini, <sup>2</sup>Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, as above.

E-mail: isabelle.franceschini@tours.inra.fr

Received 24 August 2010, revised 12 October 2010, accepted 13 October 2010

1998). In the postnatal visual cortex, premature removal of PSA resulted in precocious GABAergic innervation and enhanced inhibitory synaptic transmission (Di Cristo *et al.*, 2007). The recent analysis of mice lacking both polysialyltransferases also pointed to an important role of PSA-NCAM in the migration and differentiation of embryonic neural progenitors (Angata *et al.*, 2007). In the adult, the role of PSA-NCAM in functional synaptic plasticity, such as long-term potentiation and long-term depression, has been well demonstrated in the hippocampus (Muller *et al.*, 1996). Since the pioneering work on the hypothalamic magnocellular nuclei (Theodosis *et al.*, 1999), PSA-NCAM has also been shown to be essential for activity-induced neuroglial structural remodeling at synapses in a number of other neuroendocrine systems. In addition, PSA-NCAM appears to regulate the survival, migration and differentiation of adult neural progenitor cells (Gascon *et al.*, 2007a; Burgess *et al.*, 2008; Battista & Rutishauser, 2010).

The mechanisms by which PSA-NCAM performs this large variety of functions in the nervous system are not completely understood. During the past decade, it has become very clear that PSA on NCAM not only reduces cell–cell adhesion to facilitate cell movements, but is also an important modulator of cell signaling. As an example, we showed, through a gain of function approach, that PSA can play an instructive role in the guidance and differentiation of neural progenitor cells (Franceschini *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 2007). Among identified signaling partners of PSA-NCAM, one can cite the fibroblast growth factor receptor, as well as both AMPA and NMDA receptors. Interactions with the neurotrophin receptor P75, platelet-derived growth factor receptor and ciliary neurotrophic factor receptor have also been suggested (Gascon *et al.*, 2007b for review).

The neurohormone gonadotropin-releasing hormone (GnRH) represents the final output of the central nervous system circuitry for the control of every important step of reproductive function. This neurohormone is liberated in a finely tuned pulsatile manner at the level of GnRH neuron terminals in the hypothalamo-hypophyseal portal vasculature of the median eminence (Skinner & Caraty, 2002 for review). GnRH neurons represent a very interesting model with which to study PSA-NCAM-associated plasticity events throughout development and adult physiology, as it is present in their microenvironment during most of their migratory journey, and is highly regulated on their surface during physiological regulation in adulthood. These neuroendocrine cells have an unconventional extracerebral origin and must migrate a long distance to reach their final location in the hypothalamus (Wierman *et al.*, 2010 for review). Figure 1 depicts the neuroanatomy of the GnRH system in the embryonic and adult rodent brain. The first step of this migration is along a peripheral tangential pathway that spans from the region of the olfactory placode to the nasal–forebrain junction. It should be noted that the nomenclature used for this peripheral migratory pathway varies between species and studies. It is usually referred to as the olfactory nerves in chicks, vomeronasal and/or terminal nerve in rodents, and terminal nerves in primates. For convenience, we will use the common term ‘olfactory migratory pathway’ for this peripheral portion of the GnRH neuron migratory route. After crossing the nasal–forebrain junction at the ventromedial aspect of the developing forebrain, their tangential migration continues caudally within the brain (we will refer to this as the ‘central tangential migratory pathway’). They then disperse radially to become very disseminated in septal, preoptic and anterior hypothalamic areas, and develop long axonal processes that target the median eminence, the site of GnRH release. In all species studied, PSA-NCAM has been found all along the olfactory migratory pathway, and in chicks and rats it has also been

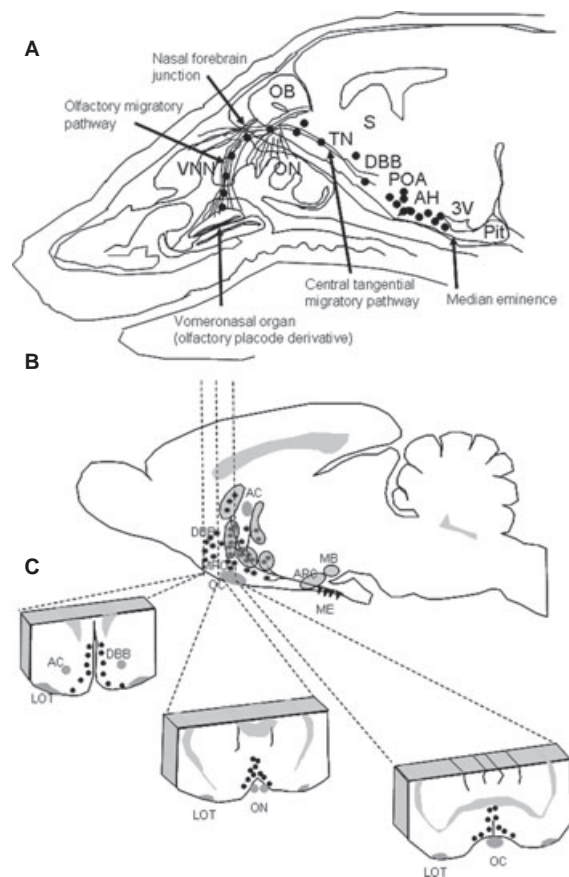


FIG. 1. Neuroanatomy of the GnRH system in the embryonic and adult rodent brain. (A) Schematic view of a sagittal section through the head of an E17.5 mouse, showing the migratory route of GnRH neurons (black dots) along vomeronasal and terminal nerves and within the forebrain. Although most GnRH neurons have already reached the preoptic-hypothalamic area, some neurons are still found close to the vomeronasal organ (derived from the medial part of the olfactory placode) and along vomeronasal nerves. ON, olfactory nerves; OB, olfactory bulb; VNN, vomeronasal nerves; TN, terminal nerve; S, septum; DBB, diagonal band of Broca; POA, preoptic area; AH, anterior hypothalamus; 3 V, third ventricle; Pit, pituitary. (B) Schematic view of a sagittal section through the head of an adult rat, showing the wide dispersion of GnRH cell bodies (black dots) throughout the basal forebrain. Most GnRH neurons are hypophysiotropic and project posteriorly (black line) to the median eminence, (ME, black triangles), where they release their neurohormone in capillaries of the hypothalamo-hypophyseal portal system. AC, anterior commissure; AHN, anterior hypothalamic nucleus; ARC, arcuate nucleus; BNST, bed nucleus of the stria terminalis; DBB, diagonal band of Broca; LOT, lateral olfactory tract; MB, mammillary bodies; MSN, medial septal nucleus; OC, optic chiasm; ON, optic nerves; OVLT, organum vasculosum of the lamina terminalis; POA, preoptic area. (C) Schematic view of coronal sections through the head of an adult rat, showing the lateral dispersion of GnRH neurons (black dots) at three rostrocaudal levels (dashed lines). LOT, lateral olfactory tract; DBB, diagonal band of Broca; OC, optic chiasm; AC, anterior commissure; POA, preoptic area. (B) was modified from Sagrillo *et al.* (1996). (C) was modified from Hoffman *et al.* (1982).

described along the central tangential pathway. PSA-NCAM is also present in the microenvironment of GnRH neurons throughout adulthood, where it becomes highly regulated upon physiological stimulation. The importance of this cell surface molecule for GnRH neuronal migration during embryogenesis has been established in various *in vivo* models. In contrast, its precise function in adulthood remains largely speculative, and it is difficult to address *in vivo*, owing to the particularly dispersed distribution of these neurons within the adult brain. On the basis of other model systems, however (Theodosis

*et al.*, 2004 for review), the hypothesis has been put forward that PSA-NCAM could offer a permissive microenvironment for the numerous structural cellular rearrangements that have been observed around these neurons during transition periods of reproductive function [puberty (Witkin & Romero, 1995; Perera & Plant, 1997); seasonal transitions (Xiong *et al.*, 1997); estrus cycle (Prevot *et al.*, 1999)], and that the regulation of PSA-NCAM cell surface expression could modulate GnRH neuron activity. This review will summarize our current knowledge on the spatiotemporal appearance and role of PSA-NCAM during development and adult plasticity of the GnRH system, and propose new experimental models that should enable us, in the near future, to assess the role and mechanism of action of PSA-NCAM in the modulation of GnRH release.

### PSA-NCAM and the developing GnRH system

The presence of PSA-NCAM along the migratory pathway of GnRH neurons during embryogenesis received much attention during the 1990s. Within the developing primary olfactory system, this adhesion molecule was initially described in mice in relation to the unique, lifelong regenerative capacity of olfactory neurons (Miragall *et al.*, 1989). The major time frame of GnRH neuron migration along this peripheral pathway [embryonic day (E)10–13 in mice] was unfortunately omitted from this initial study, which was published a few months before the first reports on the olfactory placode origin of GnRH neurons (Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1989; Wray *et al.*, 1989). Nevertheless, this first report remains a reference in the field, as it is the only one that describes the distribution of NCAM and PSA-NCAM on the olfactory migratory pathway of GnRH neurons at the ultrastructural level. Both olfactory axons and their associated ensheathing glial cells were shown by electron microscopy to bear PSA-NCAM on their plasma membranes.

Schwanzel-Fukuda & Pfaff (1991), Schwanzel-Fukuda *et al.* (1992) and Murakami *et al.* (1991) were the first to report on the close spatial association of migrating GnRH neurons with this particular cell adhesion molecule in mouse and chick embryos respectively. At

around that time, the primordial role of another cell adhesion molecule in GnRH neuron development, anosmin (product of the *Kal-1* gene), was brought to light (Franco *et al.*, 1991). This accelerated investigations into the role of cell adhesion molecules in the regulation of GnRH neuron migration. In the following years, several groups examined in detail the spatiotemporal relationship of GnRH neurons with PSA-NCAM in embryonic chicks, mice and rats during natural development and in various *in vivo* models of lesions, transplantations and pharmacological treatments, as well as in primary cultures. Whereas some of these studies used antibody markers specifically targeting the PSA moiety of NCAMs (anti-PSA), others used either monoclonal or polyclonal antibodies recognizing the major NCAM isoforms irrespective of their polysialylation status (anti-total NCAM; Table 1). From the few studies that have precisely compared the immunoreactive patterns obtained with anti-PSA and anti-total NCAM, it can be inferred that the general patterns of both types of immunostaining match during the main time frame of GnRH neuron peripheral migration in chicks (Norgren & Brackenbury, 1993), mice (Miragall *et al.*, 1989), and rats (Daikoku & Koide, 1998), suggesting that polysialylation occurs on most NCAM-positive structures at this time. There is also one study on human embryos, showing that, in the nose, polysialylation of NCAM is more restricted, occurring only along the migratory route of GnRH neurons. This analysis was performed at an embryonic stage when the first GnRH neurons have already entered the brain (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1996).

The spatiotemporal relationship of GnRH and PSA-NCAM has been examined by immunohistochemical procedures across normal embryonic development in chicks (Murakami *et al.*, 1991, 2000; Norgren & Brackenbury, 1993; Miyakawa *et al.*, 1997), mice (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1992), rats (Daikoku & Koide, 1998), and humans (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1996), with various time and spatial resolutions (Table 1). A common line that emerges from these studies is that PSA-NCAM is always present in the microenvironment of GnRH neurons from their exit out of the medial portion of the olfactory pit to their entry into the brain at the ventromedial aspect of the olfactory bulb primordium.

TABLE 1. Main studies describing total NCAM or PSA-NCAM immunoreactivity in relation to GnRH neuron development

Reference	Embryonic age analyzed (days)	Spatial resolution	Anti-GnRH	Anti-PSA-NCAM	Anti-total NCAM
<b>Chick</b>					
Murakami <i>et al.</i> (1991)	7, 13	16 $\mu\text{m}$ , double IF	mAb LRH13	mAb 12E3	
Norgren & Brackenbury (1993)	3, 4, 7, 10	20 $\mu\text{m}$	LR1	mAb 5A5	mAb NCAM1
Miyakawa <i>et al.</i> (1997)	2.5, 3, 3.5, 4, 5	10 $\mu\text{m}$	mAb LRH13	mAb 12E3	
Murakami <i>et al.</i> (2000)	5, 6.5, 7, 7.5	16 $\mu\text{m}$	mAb LRH13	mAb 12E3	
<b>Mouse</b>					
Schwanzel-Fukuda <i>et al.</i> (1992)	10, 11, 12, 13, 14, 16	8 $\mu\text{m}$	LR1		R569
Yoshida <i>et al.</i> (1999)	12, 15	70 $\mu\text{m}$	LR1	mAb 5A5	
<b>Rat</b>					
Yoshida <i>et al.</i> (1995)	16, 18	20 $\mu\text{m}$	LR1	mAb 5A5	
Tarozzo <i>et al.</i> (1998)	20	Confocal, double IF	LR1	mAb MenB	
Daikoku & Koide (1998)	12.5, 13.5, 14.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5, 20.5	7 $\mu\text{m}$	rGAP	mAb 12E3	R569
Toba <i>et al.</i> (2001)	13, 16	5 $\mu\text{m}$	rGAP		mAb AF-11
<b>Human</b>					
Schwanzel-Fukuda <i>et al.</i> (1996)	28–32, 42, 46	8 $\mu\text{m}$	LR1	mAb MenB	R569

IF, immunofluorescence; mAb, monoclonal antibody. Various antibodies to GnRH were used including, mAb LRH13 (Park & Wakabayashi, 1986), rabbit polyclonal rGAP (Daikoku-Ishido *et al.*, 1990), and rabbit polyclonal LR1 (R. Benoit, Montréal, Canada). Antibodies against PSA-NCAM included mAb 5A5 (Acheson *et al.*, 1991), mAb MenB (Rougon *et al.*, 1986), and mAb 12E3 (Seki & Arai, 1991). Antibodies against NCAM total (recognizing the main splice variants of NCAM independently of their polysialylation status) included mAb NCAM1 (Hoffman and Edelman, 1982), mAb AF-11 (Ono *et al.*, 1992), and rabbit polyclonal antibody R569 (Chuong *et al.*, 1982).



### Olfactory migratory pathway

Prior to the onset of the first GnRH immunoreactivity, a continuum of process-bearing PSA-NCAM-positive cells aligned in a cord-like manner could be observed, forming a cellular bridge between the medial portion of the olfactory pit and the ventromedial forebrain. This was observed at E3 in chicks (Murakami *et al.*, 1991; Norgren & Brackenbury, 1993 and Miyakawa *et al.*, 1997), E10 in mice (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1992), and E12.5 in rats (Daikoku & Koide, 1998). In both chicks and mice, visualization of the PSA-NCAM cellular bridge was closely followed by the appearance of cords of GnRH cells along the pathway formed by PSA-NCAM-positive cells and fibers. This was first seen at late E3 in chicks and E11.5 in mice. The close morphological association of GnRH cells with PSA-NCAM fibers and/or processes was maintained following olfactory placode lesions experiments in chick (Arai *et al.*, 1994) as well as in cultures derived from olfactory chick and rat olfactory placodes (Murakami *et al.*, 1991, 1995; Daikoku & Koide, 1994). In cultures derived from mouse olfactory placodes, not all GnRH cells were associated with NCAM-immunoreactive fibers, which may be explained by differences in antibody sensitivities/specificities (Fushko & Wray, 1994). PSA-NCAM immunoreactivity in the nose was not exclusively associated with the migratory pathway of GnRH neurons, as it was also seen on adjacent lateral portions of the olfactory nerve in chicks and on the olfactory nerves, which course more laterally in rodents. It is therefore unlikely that PSA-NCAM plays a strict guiding role for GnRH neurons in this peripheral portion of the migratory pathway.

### Central tangential migratory pathway

In chick embryos aged between E5 and E6.5, small cords of GnRH-positive cells were seen in the brain, always adjacent to PSA-NCAM-positive fibers crossing the nasal–forebrain junction (Murakami *et al.*, 2000). Likewise, a strong morphological association between GnRH cells and PSA-NCAM fibers was also observed at the nasal–forebrain junction in mice at E14 (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1992) and in rats at E14.5 (Daikoku & Koide, 1998). In mice, it is interesting to note that the entrance of short PSA-NCAM-positive fibers at the nasal–forebrain junction was seen to precede by a day and a half that of the first GnRH-immunoreactive cells detected in the forebrain. Regardless of the species, GnRH neurons were never seen ahead of these PSA-NCAM-positive fibers and/or processes. In rats, two intracerebral pathways for GnRH neuron migration have been determined, defined as a dorsal and a caudal branch of the vomeronasal nerve (Yoshida *et al.*, 1995). At E16 and E18, most GnRH neurons were found along the caudal branch, which is the branch followed by the hypophysiotropic subpopulation of GnRH neurons. This branch could be distinguished from the dorsal branch by its specific high immunoreactivity for PSA-NCAM (Yoshida *et al.*,

1995). In chicks, the central tangential migration pathway could be delineated by its strong PSA-NCAM immunoreactivity up to the stage (E10) when GnRH neurons have reached their most caudal positions, with most of them already dispersed laterally (Norgren & Brackenbury, 1993). Thus, at least in chicks and rats, the hypothesis that PSA-NCAM could play a guiding role for the intracerebral migration of GnRH neurons emerged.

### Role of PSA-NCAM in GnRH neuron development: loss of function approaches

The role of PSA-NCAM was analysed through genetic and/or pharmacological manipulations in mice and chicks at various time points of GnRH neuron development, as indicated in Table 2.

The first loss of function approach to study the role of PSA-NCAM in the development of GnRH neurons was performed by injecting an antiserum against total NCAM into the area of the olfactory pit at E10, that is, just prior to the emergence of the first GnRH immunoreactivity in mice. This resulted in a significant decrease in the number of GnRH-immunoreactive cells seen on the day following the injection, in both the olfactory pit epithelium and the olfactory migratory pathway (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1994). It was inferred that inductive signals leading to the differentiation of the luteinizing hormone-releasing hormone-positive cells in the placode were interrupted by the antibody treatment.

At about the same time, total NCAM genetic inactivation was achieved, and adult mutants were reported to be fertile (Cremer *et al.*, 1994). The distribution of GnRH cells was investigated at E15 in these NCAM null mice, and it was found to be no different from that of wild-type mice (Yoshida *et al.*, 1999). As expected, these NCAM null mice displayed no PSA immunoreactivity at all along the migratory pathway of GnRH neurons (Cremer *et al.*, 1994, Yoshida *et al.*, 1999). This study also examined the distribution of GnRH cells in mice in which only the NCAM 180 isoform of NCAM was deleted. In these mice, PSA-NCAM at E15 persisted in the peripheral portion of the migratory pathway and intracranially in a dorsal pathway leading to the accessory olfactory bulb, where it was presumably associated with the persisting NCAM 140 isoform. The main central pathway of migration, which coursed caudally along the medial forebrain, was, however, totally deprived of PSA-NCAM immunoreactivity, as opposed to the wild-type mice, and this resulted in twice as many GnRH neurons following a dorsal route towards the accessory olfactory bulb. This experiment showed that, when confronted with a choice situation, GnRH neurons preferentially follow a PSA-NCAM-positive pathway over an NCAM one.

The use of endoneuraminidase N (endo N), a glycosidase that degrades PSA on NCAM, enabled the role of this carbohydrate moiety along the migratory route of GnRH neurons to be investigated more specifically. Considering the reduced adhesiveness that this special

TABLE 2. Main studies involving acute PSA-NCAM perturbation during GnRH neuron development

Reference	Species	Approach	Time of administration	Time of analysis	Results
Schwanzel-Fukuda <i>et al.</i> (1994)	Mouse	Anti-NCAM total in olfactory pit	E10	E11–12	Reduced number of GnRH cells
Murakami <i>et al.</i> (1998)	Chick	Endo N in nasal mesenchyme	E3.5–4.5 ± E6.5–7.5	E.5	No effect on GnRH cell migration
Yoshida <i>et al.</i> (1999)	Mouse	Endo N in nasal mesenchyme	E12	E15	Accumulation of GnRH cells at nasal–forebrain junction
Murakami <i>et al.</i> (2000)	Chick	Endo N in nasal mesenchyme	E2.5 + E4.5	E6.5	Premature intracranial dispersion of GnRH cells



carbohydrate moiety provides to NCAM, it was hypothesized that PSA along the migratory pathway of GnRH neurons may facilitate cell movements. Endo N injection experiments producing total PSA removal from the entire migratory pathway of GnRH neurons yielded different results in mice and chicks. In mice, PSA removal induced significant accumulation of GnRH neurons at the nasal–forebrain junction, and a reduced number of GnRH neurons was seen in the brain (Yoshida *et al.*, 1999). Although not directly assessed in this study, this negative effect of PSA removal on GnRH neuron migration may be a consequence of defects in olfactory axon outgrowth, as suggested by a similar experiment performed later in rats (Aoki *et al.*, 1999). In embryonic chicks, a first experiment with endo N treatment by the group of Arai showed no effect on GnRH neuron migration (Murakami *et al.*, 1998). In a second study by the same authors, it was shown that the mean proportion of GnRH cells remaining in the nasal septum was slightly increased in endo N-treated animals as compared with controls, but this difference did not reach statistical significance as it did in mice (Murakami *et al.*, 2000). In this study, a significant effect was observed within the forebrain, where PSA removal had induced premature lateral dispersion of the cells from their central tangential pathway (Murakami *et al.*, 2000). This lateral dispersion was an aspect that was not analyzed in the endo N-treated mice (Yoshida *et al.*, 1999).

Taken together, these loss of function studies yielded quite different results; this may be related to differences in the time windows of PSA-NCAM perturbation and in the times of analysis (Table 2).

The precise mechanisms of action implicated in the effects obtained with specific PSA removal will be difficult to envision until the precise nature of the PSA-NCAM-positive neural elements associated with GnRH neuron migration is resolved. Depending on the studies, PSA-NCAM in the GnRH migratory pathway has been attributed to olfactory/vomeroneasal axons, migrating cells, and processes of the terminal nerve, including GnRH neurons, neuroblasts, and glioblasts. This will be the topic of the following section.

### Identity of the neural elements expressing PSA-NCAM along the GnRH migratory pathway

In most cells, PSA-NCAM is very rapidly translocated to the plasma membrane, being transported along the constitutive and/or regulated pathway, depending on the cell type and/or differentiation stage (Kiss *et al.*, 1994; Bonhomme *et al.*, 2001). It can also be distributed on cell surfaces in a very polarized fashion, often being concentrated at sites of cell–cell contact. A perfect illustration of this is found in the ultrastructural study of Shen *et al.* (1999), which showed, in the supraoptic nucleus of rats, that PSA-NCAM immunoreactivity on the surface of astrocytes was exclusively associated with their very fine distal processes apposed to the soma of neurons. This makes the precise cellular origin of PSA-NCAM very difficult to ascertain *in vivo* with the limited resolution offered by light microscopy. In addition to olfactory axons, a huge number of cell types have been reported to migrate along this medial olfactory pathway during early embryogenesis (Von Bartheld, 2004 for review). Although ultrastructural studies on the central pathway of GnRH migration are lacking, one study examined the ultrastructure of migrating GnRH neurons along the peripheral course of their migration. Between E12.5 and 14.5 in mice, it was shown that GnRH neurons maintain close membrane apposition to each other but also with axonal fibers and ensheathing glial processes. Glial ensheathment appeared to spare migrating neurons to contact the surrounding mesenchymal tissue (Livne *et al.*, 1993). In this section, we will consider the possibility that any of these three cell types may bear PSA-NCAM on their membranes.

The ultrastructural study of the developing olfactory nerves by Miragall *et al.* (1989) clearly showed that PSA-NCAM immunoreactivity was associated with the surface of axons and ensheathing glia. The presence of PSA-NCAM on olfactory ensheathing cells was also confirmed later in development, by flow cytometry purification of these cells followed by immunostaining for PSA-NCAM on the first hours of culture (Franceschini & Barnett, 1996). Much more debated is the possibility that migrating GnRH neurons themselves express PSA-NCAM. On the basis of double immunofluorescent labeling of 10- $\mu$ m-thick cryosections of chick embryos, Miyakawa *et al.* (1997) considered that GnRH neurons did express PSA-NCAM from the time that they were first detected in the olfactory pit at E3.5. In older E7 chicks, Murakami *et al.* (1991) reported strong PSA-NCAM immunoreactivity in most GnRH neurons. Similarly, Tarozzo *et al.* (1998) proposed that migrating GnRH neurons coexpressed PSA-NCAM, on the basis of confocal microscopy analysis of E20 rat olfactory nerves. More recently, a study by the group of Herbison reported coexpression of PSA-NCAM on a cluster of GnRH neurons in the nasal septum (Gamble *et al.*, 2005), although no evidence for NCAM expression by mouse GnRH neurons could be found in an earlier *in vitro* study (Fueshko & Wray, 1994).

### PSA-NCAM and the developing GnRH system: future directions

To resolve the issue of the cell type specificity of PSA-NCAM surface expression along the GnRH neuron migratory pathway, the use of *in situ* hybridization for NCAM and its polysialyltransferases in conjunction with cell type-specific markers could be a first approach. It is not well established up to which stage of their long migratory journey GnRH neurons are associated with PSA-NCAM. There is one study in urodele brains suggesting that, during development, this association is maintained up to the median eminence (Gianola *et al.*, 2001). The study of Murakami *et al.* (1991) on embryonic chicks reported that PSA-NCAM disappeared from the surface of GnRH neurons after these neurons reached the positions that they occupy in the adult brain. Confocal microscopy analysis at the cellular level during the lateral dispersion stage of GnRH neuron migration as well as during the later stage of axonal outgrowth and pubertal maturation will be of great interest. Future analysis of the distribution of PSA-NCAM at the ultrastructural level and at different stages of development remain necessary.

If it can indeed be shown that PSA-NCAM is expressed on the surface of GnRH neurons at some stage of their development, this will be of tremendous interest for deciphering potential novel mechanisms of action by which PSA-NCAM can affect GnRH neuron differentiation and migration, and functional maturation. As mentioned in the Introduction, PSA has been shown to interact with a number of signaling molecules. For example, it can activate NCAM-mediated fibroblast growth factor receptor signaling and interfere with glutamate signaling through both NMDA and AMPA receptors (Vaithianathan *et al.*, 2004; Kiselyov *et al.*, 2005; Kochlamazashvili *et al.*, 2010). All of these signaling pathways have been implicated at some stage of GnRH neuron development (Simonian & Herbison, 2001; Chung & Tsai, 2010 for review).

The cords of PSA-NCAM-positive and GnRH-positive cells observed along the migratory pathway are reminiscent of the tangential migration of PSA-NCAM-positive olfactory neuroblasts in the rostral migratory stream. These olfactory neuroblasts migrate in chains whose direction is, in part, guided by glial tubes (Peretto *et al.*, 1997; Belvindrah *et al.*, 2007). Whether similar glial tubes also guide

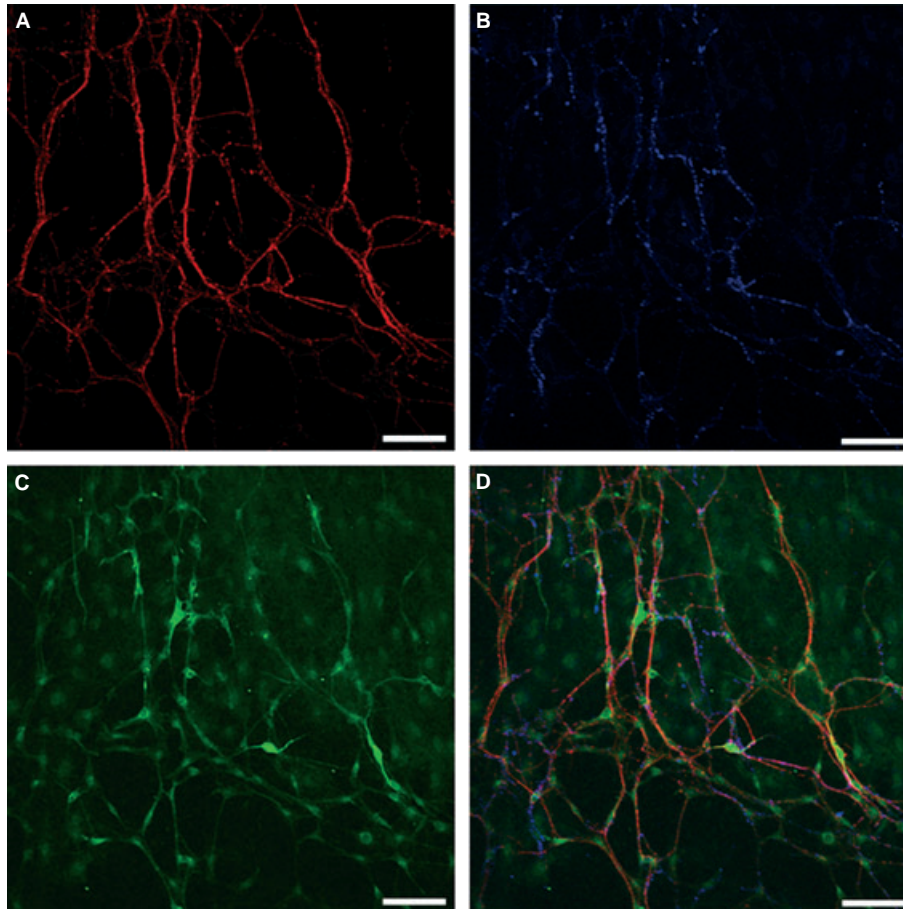


FIG. 2. PSA-NCAM immunoreactivity in relation to GnRH-immunoreactive neurites and GFAP-immunoreactive glial cells in 3-week-old cultures of embryonic mouse nasal explants. Triple immunofluorescence for PSA-NCAM (A), GnRH (B) and GFAP (C) shows that PSA-NCAM immunoreactivity (delineates a large network of fibers, many of which are associated with GnRH immunoreactivity and GFAP immunoreactivity. (D) Merged images of A, B, and C. Primary antibodies are anti-PSA-NCAM monoclonal antibody MenB (Rougon *et al.*, 1986), anti-GnRH monoclonal antibody SMI141 (Sternberger, Baltimore, MD, USA), and rabbit polyclonal anti-cow GFAP (Dako). The monoclonal antibody to GnRH, directed against the secreted form of the decapeptide, mainly labeled neurites but not cell bodies in these cultures. Confocal optic sections were taken with an Olympus  $\times 20$  objective ( $z$  resolution:  $1 \mu\text{m}$ ). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ .

GnRH neuron tangential migration requires further analysis. One study on the migration of GnRH neurons in opossums provided some evidence of an uninterrupted S100 pathway as GnRH neurons enter the brain (Cummings & Brunjes, 1995). Both S100 and PSA-NCAM are known markers of olfactory ensheathing cells (Franceschini & Barnett, 1996; Astic *et al.*, 1998). This unique glial cell type appears to be fundamental for the initial entry of pioneer olfactory and vomeronasal axons into the forebrain, and for the continuous entry of regenerating olfactory axons, which they ensheath up to their synaptic olfactory bulb targets (Marin-Padilla & Amieva, 1989; Tennent & Chuah, 1996). Further analysis of the presence of ensheathing glia in the entire migratory route of GnRH neurons and of their effect on GnRH neuron migration and differentiation is needed. PSA-NCAM may be one important modulator of their interactions.

### PSA-NCAM and the mature GnRH system

In 1992, a precise mapping of PSA-NCAM was established in the mature nervous system of the rat (Bonfanti *et al.*, 1992), following the discovery a few years earlier that this particular isoform of NCAM, so far called the embryonic form, was retained in two adult systems capable of remarkable morphological rearrangements

throughout life: the olfactory system (Miragall *et al.*, 1988), and the hypothalamo-neurohypophyseal system (Theodosios *et al.*, 1991). Bonfanti *et al.* (1992) reported that the hypothalamus contained structures showing the strongest PSA-NCAM immunoreactivity. In addition to the two magnocellular systems (supraoptic nucleus and paraventricular nucleus), strong PSA-NCAM immunoreactivity was detected in the suprachiasmatic nuclei, arcuate nucleus, medial preoptic area, and median eminence, these last two structures housing, respectively, most of GnRH neuron cell bodies and terminals. By means of double immunohistochemistry, it was found that a subpopulation of GnRH neurons occupied an area of intense PSA-NCAM immunoreactivity in the mediobasal hypothalamus of castrated monkeys (Perera *et al.*, 1993). A functional role for this molecule in the secretory activity of GnRH neurons was first suggested by the discovery that a photoperiodic treatment switching hamsters to a non-reproductive state (minimal pulsatile GnRH secretion) was associated with downregulation of the PSA-NCAM content of GnRH-rich hypothalamic tissues (Lee *et al.*, 1995). Using confocal microscopy, the study by Viguié *et al.* (2001) was the first to report on particularly strong PSA-NCAM coverage of many GnRH neuronal cell bodies and terminals in the ovine preoptic area and median eminence respectively (Viguié *et al.*, 2001). This study also showed that the extent of GnRH neuron ensheathment

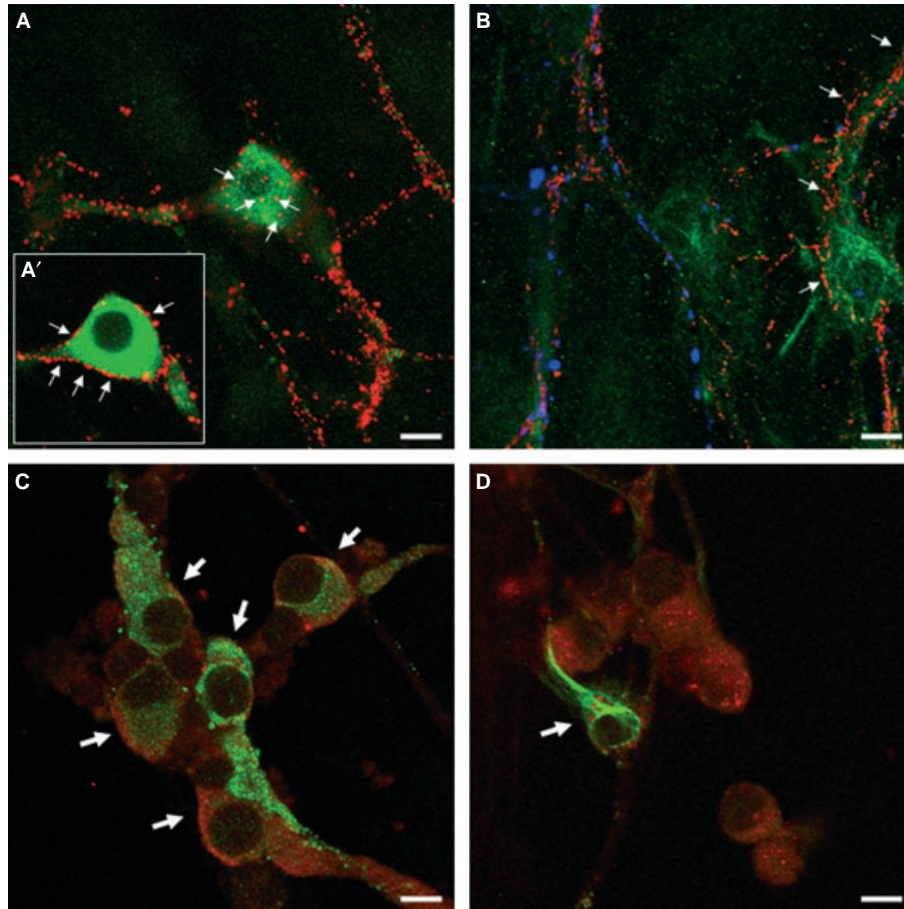


FIG. 3. Dual neuronal and glial origin of surface PSA-NCAM in 3-week-old cultures of embryonic mouse nasal explants. Multiple immunofluorescence with anti-PSA-NCAM (red) coupled to anti-GnRH (green in A and C, and blue in B) and/or coupled to anti-GFAP (green in B and D) in control conditions (A and B) or after degradation of surface PSA with endo N, followed by overnight cooling of the cultures (C and D). Primary antibodies are anti-PSA-NCAM monoclonal antibody MenB (Rougon *et al.*, 1986) and anti-GnRH rabbit polyclonal antibody SW1 (Wray *et al.*, 1988). This polyclonal antibody to GnRH, directed against proGnRH, strongly labeled cell bodies and, to a lesser extent, neurites in these cultures. Arrows in A/A' and B point to PSA-NCAM immunoreactivity potentially delineating the surface of a GnRH-positive neuronal soma and of a GFAP-positive glial cell, respectively. A and A' represent two optic sections through the same GnRH neuron, at the level of its surface and nucleus respectively. Arrows in C and D point, respectively, to GnRH neurons and to a GFAP-positive glial cell that have accumulated PSA-NCAM in their cytoplasm following cooling-induced blockade of exocytosis. Confocal optic sections were taken with an Olympus  $\times 60$  objective ( $z$  resolution:  $0.26 \mu\text{m}$ ). Scale bar:  $20 \mu\text{m}$ .

by PSA-NCAM immunoreactivity changed with seasons in ewes, being higher during the breeding season, the period of maximal GnRH neuron activity. More recently, it was shown that a photoperiodic shift capable of reactivating a dormant hypothalamus–pituitary–gonadal axis likewise enhanced the average PSA-NCAM ensheathment of these neurons in sheep (Chalivoix *et al.*, 2010). Hence, PSA-NCAM levels on GnRH neuron surfaces may be regulated by activity, as shown in other adult plastic systems subject to morphological rearrangements upon physiological stimulation (Soares *et al.*, 2000; Glass *et al.*, 2003). The period of maximal GnRH activity occurs during the proestrus stage of the estrous cycle in females. This prompted the team of Kaur to further investigate possible regulation of the GnRH neuron-associated PSA-NCAM across the estrus cycle of rats. They first showed, at the tissue level, that the PSA-NCAM content of the preoptic area and median eminence was significantly higher during the proestrus phase than during the diestrus phase of the cycle (Kaur *et al.*, 2002). A subsequent epifluorescence analysis through the median eminence showed that the proportion of GnRH immunoreactivity associated with PSA-NCAM immunoreactivity was higher during the proestrus phase than during the diestrus phase of both natural and estradiol-

induced cycles (Parkash & Kaur, 2005). These changes were specifically associated with reduced glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the median eminence external layer. A similar quantification of immunofluorescence on confocal images throughout the preoptic area showed increased intensities of PSA-NCAM and GnRH immunoreactivities paralleled by a decrease in GFAP immunoreactivity during the proestrus phase as compared with the diestrus phase (Parkash & Kaur, 2007a). Morphometric analysis showed a decrease in the average length of GFAP-positive processes associated with GnRH soma, suggesting decreased glial ensheathment during proestrus. This study also strongly suggested that levels of PSA-NCAM on the surface of GnRH neurons may be controlled, at least in part, by transcription of the polysialyltransferase ST8-SialIV within GnRH neurons. All of the changes in immunoreactivity (PSA-NCAM, GnRH, and GFAP) observed on proestrus at the level of both GnRH soma and terminals could be inhibited by administration of either GABA or an  $\alpha$ -adrenergic antagonist on the morning of proestrus, suggesting that PSA-NCAM expression on GnRH neurons is regulated by excitatory and inhibitory inputs (Parkash & Kaur, 2007b). Nevertheless, all of these observations remain correlative, and the precise functional link between neuronal activity,



PSA-NCAM expression, morphological remodeling and GnRH release is still not resolved.

### Towards new model systems with which to study the function and mechanism of action of PSA-NCAM in GnRH neuron physiology

To test for the importance of PSA-NCAM in the regulation of GnRH release *in vivo*, the sheep, studied for many years in our laboratory, is a very convenient physiological model, as it enables direct access to the portal vasculature or to the base of the third ventricle in such a way that the dynamics of GnRH release can be measured with great accuracy (Skinner and Caraty, 2002 for review). Using endo N stereotaxic injections, we have recently managed to remove surface PSA from > 65% of the GnRH cell population of the preoptic area, where most hypophysiotropic GnRH neurons reside in sheep, and this produced a significant decrease in the amplitude of estradiol-induced GnRH surges (Franceschini *et al.*, 2010). As a first approach to investigate the molecular mechanism involved, we turned to an *in vitro* model. Recent work from our laboratory has established a primary culture system derived from embryonic mice nasal explants, in which pulsatile release of GnRH develops with culture time in a manner reminiscent of that seen *in vivo* (Constantin *et al.*, 2009). These cultures responded to kisspeptin, an important excitatory peptide of GnRH neurons *in vivo*, by increasing average pulse duration and pulse amplitude (Constantin *et al.*, 2009). More recently, we have analyzed the presence of PSA-NCAM and its spatial relationship with GnRH neurons in these mature cultures by confocal microscopy. A large network of PSA-NCAM-positive processes developed in these cultures, many of which were associated with GnRH immunoreactivity (Fig. 2A, B and D). Whether these processes represent a network of interconnected GnRH neuron dendrites, as recently shown *in vivo* (Campbell *et al.*, 2009), is currently being investigated at the ultrastructural level. We also found the presence of GFAP-positive glial cells in these cultures, some of which displayed very long GFAP-positive processes that were closely associated with PSA-NCAM and GnRH immunoreactivity (Fig. 2C and D). Analysis of high-resolution optic sections suggested that PSA-NCAM is present around GnRH soma as well as on the surface of GFAP-positive glial cells along which GnRH neurites coursed (Fig. 3A and B) (Franceschini *et al.*, 2010). Cooling-induced blockade of exocytosis following degradation of cell surface PSA by endo N enabled us to detect strong PSA-NCAM immunoreactivity in the cytoplasm of both cell types, thus attesting to a dual neuronal and glial origin of surface-associated PSA-NCAM (Fig. 3C and D) (Franceschini *et al.*, 2010). These glial cells may be related to olfactory ensheathing cells, which represent a very plastic type of glial cell whose similarity with the tanycytes of the median eminence goes well beyond PSA-NCAM expression (Franceschini & Barnett, 1996; Alonso *et al.*, 1997; Barnett & Franceschini, 1999; Gudiño-Cabrera & Nieto-Sampedro, 2000). PSA-NCAM may play a role at the level of synaptic inputs to GnRH neurons in these primary cultures. Pharmacological studies clearly show that GnRH neuron activity in this model is regulated by a variety of excitatory neurotransmitters including GABA, glutamate, and cholecystokinin, and there is some morphological evidence for direct synaptic inputs onto GnRH neurons (Giacobini & Wray, 2007; Constantin & Wray, 2010). In addition, the use of a GnRH antagonist also suggests autocrine regulation of GnRH neuron activity in these cultures (A. Duittoz, unpublished data). As shown in Fig. 3A, PSA-NCAM was often found in varicose-like structures at the surface of GnRH

neurons. It will be of tremendous interest to investigate whether this immunoreactivity is associated with a particular neurotransmitter, and to determine more precisely its location at the ultrastructural level. This primary cell culture system will constitute a very good model with which to analyze the function of PSA-NCAM in GnRH release. The effect of PSA removal on GnRH release could, for example, be tested under both basal and stimulated conditions, together with its potential associated morphological rearrangements of synapses and glial cells.

### Conclusion

PSA-NCAM is present to a remarkable extent in the microenvironment of GnRH neurons during their embryonic migration, and in adulthood appears to be regulated on their surface upon physiological stimulation. However, the absence of any major reproduction-associated defects in the NCAM null mice reported 15 years ago, together with the variable results obtained from loss of function approaches, has discouraged research on the role and mechanism of action of this cell adhesion molecule in the development and regulation of GnRH neurons. Recently, total inactivation of PSA by genetic inactivation of the two polysialyltransferases was achieved in mice, and brought to light its essential role in the development of the nervous system (Weinhold *et al.*, 2005). During the last decade, this carbohydrate moiety has been shown to modulate a large variety of signaling pathways, and appears to be a key molecule for activity-induced synaptic plasticity. Our results show that both GnRH neurons and their ensheathing glia can synthesize PSA moieties on their cell surfaces. Whether and how PSA could participate in the cross-talk between these two friends along their long tangential migratory pathway and/or during critical periods of intense physiological stimulation, such as during the preovulatory GnRH surge, certainly needs to be further investigated.

### Acknowledgements

We are particularly grateful to Geneviève Rougon for her generous gift of the MenB monoclonal antibody against PSA and endo N, and to Susan Wray for providing the SW1 antibody against GnRH. This work received financial support from the INRA Physiology department (PHASE), and benefited from a PhD fellowship from the INRA and Region Centre (ED).

### Abbreviations

E, embryonic day; endo N, endoneuraminidase N; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; NCAM, neural cell adhesion molecule; PSA, polysialic acid; PSA-CAM, polysialylated neural cell adhesion molecule.

### References

- Acheson, A., Sunshine, J.L. & Rutishauser, U. (1991) NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J. Cell Biol.*, **114**, 143–153.
- Alonso, G., Prieto, M., Legrand, A. & Chauvet, N. (1997) PSA-NCAM and B-50/GAP-43 are coexpressed by specific neuronal systems of the adult rat mediobasal hypothalamus that exhibit remarkable capacities for morphological plasticity. *J. Comp. Neurol.*, **384**, 181–199.
- Angata, K., Huckaby, V., Ranscht, B., Terskikh, A., Marth, J.D. & Fukuda, M. (2007) Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 6659–6668.
- Aoki, K., Nakahara, Y., Yamada, S. & Eto, K. (1999) Role of polysialic acid on outgrowth of rat olfactory receptor neurons. *Mech. Dev.*, **85**, 103–110.

- Arai, Y., Murakami, S. & Seki, T. (1994) Removal of olfactory placode prevents the development of LHRH neurons in the forebrain of the chick embryo: possible interaction between migrating LHRH neurons and highly polysialylated form of neural cell adhesion molecule (NCAM-H). *Acta Biol. Hung.*, **45**, 155–168.
- Astic, L., Pellier-Monnin, V. & Godinot, F. (1998) Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neuroscience*, **84**, 295–307.
- Barnett, S. & Franceschini, I. (1999) Adhesion molecule expression and phenotype of glial cells in the olfactory tract. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **468**, 297–307.
- Battista, D. & Rutishauser, U. (2010) Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J. Neurosci.*, **30**, 3995–4003.
- Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B.L. & Müller, U. (2007) Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J. Neurosci.*, **27**, 2704–2717.
- Bonfanti, L., Olive, S., Poulain, D.A. & Theodosis, D.T. (1992) Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, **49**, 419–436.
- Bonhomme, R., Dupouy, B., Poulain, D.A. & Theodosis, D.T. (2001) The polysialylated neural cell adhesion molecule reaches cell surfaces of hypothalamic neurons and astrocytes via the constitutive pathway. *Neuroscience*, **103**, 133–142.
- Burgess, A., Wainwright, S.R., Shihabuddin, L.S., Rutishauser, U., Seki, T. & Aubert, I. (2008) Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Dev. Neurobiol.*, **68**, 1580–1590.
- Campbell, R.E., Gaidamaka, G., Han, S.K. & Herbison, A.E. (2009) Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 10835–10840.
- Chalivoix, S., Malpoux, B. & Dufourny, L. (2010) Relationship between polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and beta-endorphin- or gonadotropin releasing hormone (GnRH)-containing neurons during activation of the gonadotrope axis in short daylength in the ewe. *Neuroscience*, **169**, 1326–1336.
- Chung, W.C. & Tsai, P.S. (2010) Role of fibroblast growth factor signaling in gonadotropin-releasing hormone neuronal system development. *Front. Horm. Res.*, **39**, 37–50.
- Chuong, C.M., McClain, D.A., Streit, P. & Edelman, G.M. (1982) Neural cell adhesion molecules in rodent brains isolated by monoclonal antibodies with cross-species reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4234–4238.
- Constantin, S., Klenke, U. & Wray, S. (2010) The calcium oscillator of GnRH-1 neurons is developmentally regulated. *Endocrinology*, **151**, 3863–3873.
- Constantin, S., Caraty, A., Wray, S. & Duittoz, A.H. (2009) Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinology*, **150**, 3221–3227.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P. & Scheff, S. (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, **367**, 455–459.
- Cummings, D.M. & Brunjes, P.C. (1995) Migrating luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and processes are associated with a substrate that expresses S100. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **88**, 148–157.
- Daikoku, S. & Koide, I. (1994) In vitro development of placode-derived LHRH neurons: possible involvement of alpha-fetoprotein. *Horm. Behav.*, **28**, 328–335.
- Daikoku, S. & Koide, I. (1998) Spatiotemporal appearance of developing LHRH neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **393**, 34–47.
- Daikoku-Ishido, H., Okamura, Y., Yanai, N. & Daikoku, S. (1990) Development of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone-containing neuron system in the rat: in vivo and in vitro transplantation studies. *Dev. Biol.*, **140**, 374–387.
- Di Cristo, G., Chattopadhyaya, B., Kuhlman, S.J., Fu, Y., Bélanger, M.C., Wu, C.Z., Rutishauser, U., Maffei, L. & Huang, Z.J. (2007) Activity dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. *Nat. Neurosci.*, **10**, 1569–1577.
- Ditlevsen, D.K., Povlsen, G.K., Berezin, V. & Bock, E. (2008) NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 727–743.
- Franceschini, I. & Barnett, S. (1996) Low affinity NGF-receptor and E-NCAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev. Biol.*, **173**, 327–343.
- Franceschini, I., Angata, K., Ong, E., Hong, A., Doherty, P. & Fukuda, M. (2001) Polysialyltransferase ST8Sia II (STX) polysialylates all of the major isoforms of NCAM and facilitates neurite outgrowth. *Glycobiology*, **11**, 231–239.
- Franceschini, I., Vitry, S., Padilla, F., Casanova, P., Tham, T., Fukuda, M., Rougon, G., Durbec, P. & Dubois-Dalq, M. (2004) Migrating and myelinating potential of neural precursors engineered to overexpress PSA-NCAM. *Mol. Cell. Neurosci.*, **27**, 151–162.
- Franceschini, I., Desroziers, E., Lomet, D., Ottogali, M., Duittoz, A. & Caraty, A. (2010) A role for PSA-NCAM dependent neuron–glia interactions in the control of GnRH neuron activity. In Vaudry, H., Plant, T. & Nahon, J.L. (Eds), *Proceedings of the VII International Congress of Neuroendocrinology*. Publication des Universités de Rouen et du Havre, Rouen, pp. 92. July 11–15.
- Franco, B., Guioli, S., Pragliola, A., Incerti, B., Bardoni, B., Tonlorenzi, R., Carozzo, R., Maestrini, E., Pieretti, M. & Taillon-Miller, P. (1991) A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*, **353**, 529–536.
- Fueshko, S. & Wray, S. (1994) LHRH cells migrate on peripherin fibers in embryonic olfactory explant cultures: an in vitro model for neurophilic neuronal migration. *Dev. Biol.*, **166**, 331–348.
- Gamble, J.A., Karunadasa, D.K., Pape, J.R., Skynner, M.J., Todman, M.G., Bicknell, R.J., Allen, J.P. & Herbison, A.E. (2005) Disruption of ephrin signaling associates with disordered axophilic migration of the gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Neurosci.*, **25**, 3142–3150.
- Gascon, E., Vutskits, L., Jenny, B., Durbec, P. & Kiss, J.Z. (2007a) PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival. *Development*, **134**, 1181–1190.
- Gascon, E., Vutskits, L. & Kiss, J.Z. (2007b) Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res. Rev.*, **56**, 101–118.
- Giacobini, P. & Wray, S. (2007) Cholecystokinin directly inhibits neuronal activity of primary gonadotropin-releasing hormone cells through cholecystokinin-1 receptor. *Endocrinology*, **148**, 63–71.
- Gianola, S., Clairambault, P. & Franzoni, M.F. (2001) Relationships between neuronal cell adhesion molecule and LHRH neurons in the urodele brain: a developmental immunohistochemical study. *Eur. J. Histochem.*, **45**, 229–238.
- Glaser, T., Brose, C., Franceschini, I., Hamann, K., Smorodchenko, A., Zipp, F., Dubois-Dalq, M. & Brüstle, O. (2007) Neural cell adhesion molecule polysialylation enhances the sensitivity of embryonic stem cell-derived neural precursors to migration guidance cues. *Stem Cells*, **25**, 3016–3025.
- Glass, J.D., Watanabe, M., Fedorkova, L., Shen, H., Ungers, G. & Rutishauser, U. (2003) Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **117**, 203–211.
- Gudiño-Cabrera, G. & Nieto-Sampedro, M. (2000) Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia*, **30**, 49–63.
- Hoffman, S. & Edelman, G.M. (1982) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5762–5766.
- Hoffman, G.E., Wray, S. & Goldstein, M. (1982) Relationship of catecholamines and LHRH: light microscopic study. *Brain Res. Bull.*, **9**, 417–430.
- Kaur, G., Heera, P.K. & Srivastava, L.K. (2002) Neuroendocrine plasticity in GnRH release during rat estrous cycle: correlation with molecular markers of synaptic remodeling. *Brain Res.*, **954**, 21–31.
- Kiselyov, V.V., Soroka, V., Berezin, V. & Bock, E. (2005) Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J. Neurochem.*, **94**, 1169–1179.
- Kiss, J.Z., Wang, C., Olive, S., Rougon, G., Lang, J., Baetens, D., Harry, D. & Pralong, W.F. (1994) Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *EMBO J.*, **13**, 5284–5292.
- Kochlamazashvili, G., Senkov, O., Grebenyuk, S., Robinson, C., Xiao, M.F., Stummeyer, K., Gerardy-Schahn, R., Engel, A.K., Feig, L., Semyanov, A., Suppiramaniam, V., Schachner, M. & Dityatev, A. (2010) Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid regulates synaptic plasticity and learning by restraining the signaling through GluN2B-containing NMDA receptors. *J. Neurosci.*, **30**, 4171–4183.
- Lee, W., Watanabe, M. & Glass, J.D. (1995) Photoperiod affects the expression of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in the hypothalamus of the Siberian hamster. *Brain Res.*, **690**, 64–72.
- 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.
- Marin-Padilla, M. & Amieva, M.R. (1989) Early neurogenesis of the mouse olfactory nerve: golgi and electron microscopic studies. *J. Comp. Neurol.*, **288**, 339–352.

- Miragall, F., Kadmon, G., Husmann, M. & Schachner, M. (1988) Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of N-CAM. *Dev. Biol.*, **129**, 516–531.
- Miragall, F., Kadmon, G. & Schachner, M. (1989) Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. *Dev. Biol.*, **135**, 272–286.
- Miyakawa, M., Seki, T. & Arai, Y. (1997) Supportive role of cellular bridge of neurons expressing a highly polysialylated of NCAM (NCAM-H) at the initial stage of migration of LHRH neurons. *Zool. Sci.*, **14**, 489–495.
- Monnier, P.P., Beck, S.G., Bolz, J. & Henke-Fahle, S. (2001) The polysialic acid moiety of the neural cell adhesion molecule is involved in intraretinal guidance of retinal ganglion cell axons. *Dev. Biol.*, **229**, 1–14.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G. & Kiss, J.Z. (1996) PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, **17**, 413–422.
- Murakami, S., Seki, T., Wakabayashi, K. & Arai, Y. (1991) The ontogeny of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) producing neurons in the chick embryo: possible evidence for migrating LHRH neurons from the olfactory epithelium expressing a highly polysialylated neural cell adhesion molecule. *Neurosci. Res.*, **12**, 421–431.
- Murakami, S., Kamiya, M., Akutsu, S., Seki, T., Kuwabara, Y. & Arai, Y. (1995) Straying phenomenon of migrating LHRH neurons and highly polysialylated NCAM in the chick embryo. *Neurosci. Res.*, **22**, 109–115.
- Murakami, S., Seki, T., Rutishauser, U. & Arai, Y. (1998) LHRH neurons migrate into the trigeminal nerve when the developing olfactory nerve fibers are physically interrupted in chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **112**, 312–321.
- Murakami, S., Seki, T., Rutishauser, U. & Arai, Y. (2000) Enzymatic removal of polysialic acid from neural cell adhesion molecule perturbs the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing chick forebrain. *J. Comp. Neurol.*, **420**, 171–181.
- Norgren, R.B. Jr & Brackenbury, R. (1993) Cell adhesion molecules and the migration of LHRH neurons during development. *Dev. Biol.*, **160**, 377–387.
- Ono, K., Asou, H., Yamada, M. & Tokunaga, A. (1992) Gradient expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in the pontine migratory stream of fetal rats. *Neurosci. Res.*, **15**, 221–223.
- Park, M.K. & Wakabayashi, K. (1986) Preparation of a monoclonal antibody to common amino acid sequence of LHRH and its application. *Endocrinol. Jpn.*, **33**, 257–272.
- Parkash, J. & Kaur, G. (2005) Neuronal-glia plasticity in gonadotropin-releasing hormone release in adult female rats: role of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule. *J. Endocrinol.*, **186**, 397–409.
- Parkash, J. & Kaur, G. (2007a) Transcriptional regulation of PSA-NCAM mediated neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus. *Neuron Glia Biol.*, **3**, 299–307.
- Parkash, J. & Kaur, G. (2007b) Potential of PSA-NCAM in neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus: role of noradrenergic and GABAergic neurotransmitters. *Brain Res. Bull.*, **74**, 317–328.
- Perera, A.D. & Plant, T.M. (1997) Ultrastructural studies of neuronal correlates of the pubertal reaugmentation of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.*, **385**, 71–82.
- Perera, A.D., Lagenaur, C.F. & Plant, T.M. (1993) Postnatal expression of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in the hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, **133**, 2729–2735.
- Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A. & Bonfanti, L. (1997) Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res. Bull.*, **42**, 9–21.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G.B. & 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.
- Rougon, G., Dubois, C., Buckley, N., Magnani, J.L. & Zollinger, W. (1986) A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J. Cell Biol.*, **103**, 2429–2437.
- Rutishauser, U. (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 26–35.
- Sagrillo, C.A., Grattan, D.R., McCarthy, M.M. & Selmanoff, M. (1996) Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH gene expression and related reproductive behaviors. *Behav. Genet.*, **26**, 241–277.
- Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D.W. (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*, **338**, 161–164.
- Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D.W. (1991) Migration of LHRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode rationalizes olfacto-hormonal relationships. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 565–572.
- Schwanzel-Fukuda, M., Abraham, S., Crossin, K.L., Edelman, G.M. & Pfaff, D.W. (1992) Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice. *J. Comp. Neurol.*, **321**, 1–18.
- Schwanzel-Fukuda, M., Reinhard, G.R., Abraham, S., Crossin, K.L., Edelman, G.M. & Pfaff, D.W. (1994) Antibody to neural cell adhesion molecule can disrupt the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons into the mouse brain. *J. Comp. Neurol.*, **342**, 174–185.
- Schwanzel-Fukuda, M., Crossin, K.L., Pfaff, D.W., Bouloux, P.M., Hardelin, J.P. & Petit, C. (1996) Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J. Comp. Neurol.*, **366**, 547–557.
- Seki, T. & Arai, Y. (1991) Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat. Embryol.*, **184**, 395–401.
- Seki, T. & Arai, Y. (1993) Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res.*, **17**, 265–290.
- Seki, T. & Rutishauser, U. (1998) Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J. Neurosci.*, **18**, 3757–3766.
- Shen, H., Glass, J.D., Seki, T. & Watanabe, M. (1999) Ultrastructural analysis of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nuclei of the adult mouse. *Anat. Rec.*, **256**, 448–457.
- Simonian, S.X. & Herbison, A.E. (2001) Differing, spatially restricted roles of ionotropic glutamate receptors in regulating the migration of GnRH neurons during embryogenesis. *J. Neurosci.*, **21**, 934–943.
- Skinner, D.C. & Caraty, A. (2002) Measurement and possible function of GnRH in cerebrospinal fluid in ewes. *Reprod. Suppl.*, **59**, 25–39.
- Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Vincent, J.D. & Nothias, F. (2000) Morphofunctional plasticity in the adult hypothalamus induces regulation of polysialic acid-neural cell adhesion molecule through changing activity and expression levels of polysialyltransferases. *J. Neurosci.*, **20**, 2551–2557.
- Tarozzo, G., De Andrea, M., Feuilloley, M., Vaudry, H. & Fasolo, A. (1998) Molecular and cellular guidance of neuronal migration in the developing olfactory system of rodents. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **839**, 196–200.
- Tennent, R. & Chuah, M.I. (1996) Ultrastructural study of ensheathing cells in early development of olfactory axons. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **95**, 135–139.
- Theodosis, D.T., Rougon, G. & Poulain, D.A. (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5494–5498.
- Theodosis, D.T., Bonhomme, R., Vitiello, S., Rougon, G. & Poulain, D.A. (1999) Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J. Neurosci.*, **19**, 10228–10236.
- Theodosis, D.T., Piet, R., Poulain, D.A. & Oliet, S.H. (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem. Int.*, **45**, 491–501.
- Toba, Y., Ajiki, K., Horie, M., Sango, K. & Kawano, H. (2001) Immunohistochemical localization of calbindin D-28k in the migratory pathway from the rat olfactory placode. *J. Neuroendocrinol.*, **13**, 683–694.
- Vaithianathan, T., Matthias, K., Bahr, B., Schachner, M., Suppiramaniam, V., Dityatev, A. & Steinhauser, C. (2004) Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents. *J. Biol. Chem.*, **279**, 47975–47984.
- Viguié, C., Jansen, H.T., Glass, J.D., Watanabe, M., Billings, H.J., Coolen, L., Lehman, M.N. & Karsch, F.J. (2001) Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinology*, **142**, 1317–1324.
- Von Bartheld, C.S. (2004) The terminal nerve and its relation with extrabulbar 'olfactory' projections: lessons from lampreys and lungfishes. *Microsc. Res. Tech.*, **65**, 13–24.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlhoff, M., Schertzing, F., Conzelmann, S., Marth, J.D., Gerardy-Schahn, R. & Hildebrandt, H. (2005) Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects



- rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.*, **280**, 42971–42977.
- Wierman, M.E., Kiseljak-Vassiliades, K. & Tobet, S. (2010) Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.*, doi:10.1016/j.yfrne.2010.07.005 [Epub ahead of print].
- Witkin, J.W. & Romero, M.T. (1995) Comparison of ultrastructural characteristics of gonadotropin-releasing hormone neurons in prepubertal and adult male rats. *Neuroscience*, **64**, 1145–1151.
- Wray, S., Gähwiler, B.H. & Gainer, H. (1988) Slice cultures of LHRH neurons in the presence and absence of brainstem and pituitary. *Peptide*, **9**, 1151–1175.
- 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.
- Xiong, J.J., Karsch, F.J. & Lehman, M.N. (1997) Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology*, **138**, 1240–1250.
- Yoshida, K., Tobet, S.A., Crandall, J.E., Jimenez, T.P. & Schwarting, G.A. (1995) The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J. Neurosci.*, **15**, 7769–7777.
- Yoshida, K., Rutishauser, U., Crandall, J.E. & Schwarting, G.A. (1999) Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons. *J. Neurosci.*, **19**, 794–801.

## Annexe 2 : Hybridation *in situ*

Au cours de nos études immunohistochimiques chez la rate adulte, nous avons pu constater que les neurones à kisséptine du RP3V n'étaient pas détectables. Néanmoins, au début de la thèse, certaines études montraient la présence de cellules *Kiss1* par hybridation *in situ* dans cette région chez des rates intactes (Smith *et al.*, 2006b; Kauffman *et al.*, 2007). L'une d'entre-elles montrait même des variations du nombre de cellules *Kiss1* dans cette région au cours du cycle (Smith *et al.*, 2006b).

Afin de détecter les neurones à kisséptine du RP3V pour nos futures études au cours du développement, nous avons tenté de mettre en place l'hybridation *in situ* chez l'adulte. De plus, la comparaison des variations développementales des niveaux d'expression et des variations de l'immunoréactivité nous aidera à différencier les variations dues à des régulations de types transcriptionnelles de celles de types post-transcriptionnelles au cours des différentes périodes de développement.

Ainsi, dans cette annexe, nous décrivons le protocole d'hybridation *in situ* utilisé.

### **Matériels et méthodes pour l'hybridation *in situ***

Le principe de l'hybridation *in situ* repose sur la complémentarité des acides nucléiques. Ainsi, en utilisant une ribosonde marquée complémentaire de l'ARN messager recherché, il est possible de localiser l'ARNm d'intérêt sur des coupes de cerveau. Différents types de marqueurs de sondes peuvent être utilisés : radioactifs, enzymatiques, fluorescent ou des haptènes. Dans notre cas, nous avons utilisé le soufre 35 ( $S^{35}$ ), qui est un isotope radioactif qui est révélé par autoradiographie.

#### **1. Choix et préparation des sondes pour l'hybridation *in situ***

Nous avons choisi de tester différentes ribosondes de tailles différentes. Nous avons tout d'abord construit une ribosonde que nous appellerons sonde Tours faisant 487pb. Nous avons également obtenu par collaboration une sonde provenant du laboratoire du Dr Pierre Yves Risold (Université de Besançon) que nous nommerons sonde Besançon, de plus petite taille 187 pb.

##### *1.a. Construction de la ribosonde « Tours »*

La ribosonde « Tours » a été construite à partir de tissus hypothalamiques de rates adultes. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation puis le cerveau a immédiatement été



prélevé. Un bloc correspondant à l'hypothalamus a été réalisé : pour cela, nous avons coupé en avant du chiasma optique ainsi qu'à l'avant des corps mamillaires. Puis, le bloc est affiné en retirant toute la partie dorsale au-dessus de la commissure antérieure. Les blocs d'hypothalami sont ensuite congelés rapidement dans l'azote liquide jusqu'à l'extraction des ARN messager totaux. Cette dernière est réalisée à l'aide d'un kit RNeasy lipid Tissue (Qiagen). Une transcription des ARN totaux est ensuite réalisée afin d'obtenir des ADNc à l'aide d'une reverse transcriptase (AMV reverse transcriptase, Promega). Puis, l'ADNc d'intérêt est amplifié à l'aide des amorces. Le produit de PCR est ensuite purifié à l'aide d'un kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) afin d'éliminer les sels et de supprimer les enzymes et dNTP. Une fois cette purification réalisée, l'ADNc d'intérêt est inséré dans un plasmide : pBluescripts KS, qui sera lui-même transféré dans des bactéries afin de permettre son amplification et de pouvoir le conserver en gardant les bactéries à -80°C (annexe 3). La digestion, la ligation et la transformation du plasmide dans les bactéries sont détaillées dans l'annexe 3. Après avoir laissé sélectivement pousser les bactéries qui ont intégré le plasmide pendant une nuit à 37°C. Puis, une purification des plasmides est réalisée à l'aide d'un kit Qiagen Plasmid purification (Qiagen). Enfin, un séquençage est réalisé afin de vérifier notre construction.

En ce qui concerne la sonde « Besançon », nos collaborateurs nous avaient envoyé directement les bactéries recombinantes contenant le plasmide recombiné. Après culture des bactéries, les plasmides contenus dans ces dernières ont donc été directement purifiés. Une vérification de la taille de l'insert a été réalisée par digestion du plasmide avec les enzymes de restriction spécifiques suivi d'une migration sur gel d'agarose 1 %.

#### *1.b. Fabrication des ribosondes marquées au S<sup>35</sup>*

Après linéarisation des plasmides contenant les différentes sondes, la synthèse des sondes est réalisée à l'aide d'un kit Dig RNA labelling (Roche) en accord avec les instructions du fournisseur. Un microgramme de plasmide linéarisé est utilisé dans un volume final de 4µL auquel on ajoute les dUTP marquées au S<sup>35</sup> (250µCi) (Perkin Elmer), un mélange d'oligonucléotides (dATP, dGTP et dCTP) à 33mM, un tampon de transcription fournit dans le kit, un inhibiteur de RNase et de l'ARN polymérase. Ce mélange est incubé 2h à 37°C afin de permettre la synthèse de la sonde. Suite à la synthèse, les restes du plasmide sont éliminés à l'aide de DNase qui a été ajoutée au mélange précédent et incubée à 37°C pendant 15 minutes. Ensuite, la ribosonde est purifiée à l'aide d'un nouveau kit RNeasy Clean Up

(Qiagen) en accord avec les instructions du fournisseur. Suite à cette purification, la quantité de ribosondes marquées au S35 est évaluée grâce à la quantité de radioactivité obtenue en coup par minute (cpm) à l'aide d'un compteur de radioactivité. En effet, on déposera sur les coupes non pas une quantité de sonde mais une quantité de radioactivité précise. Les sondes sont ensuite conservées jusqu'à utilisation à -20°C.

## 2. Hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde marqué au S<sup>35</sup>

### *2.a. Récupération des tissus et préparations des coupes histologiques*

Différents protocoles de récupération de tissus et de coupes ont été testés (c'est-à-dire : fixation des tissus avant congélation avec 1% PAF ou 4% PAF ou après coupe avec 4% PAF, coupes à 14µm ou à 20µm). Nous avons choisi ici de détailler le protocole ayant donné des résultats positifs. Après un suivi de la cyclicité des rates par frottis vaginaux pendant minimum quinze jours avant l'euthanasie, les rates en proestrus (n=5) ou dioestrus (n=2) sont euthanasiées par décapitation. Le cerveau est prélevé puis enrobé dans un bloc de tissu tek®. Ce bloc contenant le cerveau est ensuite congelé à l'aide d'isopentane refroidi à -55°C puis conservé à -80°C jusqu'à la coupe. Des coupes frontales de 20µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et récupérées directement sur lames Superfrost®. Elles sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde 4%, rincées avec du tampon phosphate 0,1M et sécher à température ambiante à l'aide d'un ventilateur. Enfin, elles sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation pour le marquage à l'aide de sondes radiomarquées au S<sup>35</sup>. Pour le protocole d'hybridation *in situ* radioactive, nous avons utilisé une sonde contre l'ARN messager de la somatostatine sur des coupes de cerveaux en parallèle comme témoin positif du protocole d'HIS (Bruneau et al, 1998).

### *2.b. Protocole d'HIS radioactive*

Les protocoles de préparation des tampons utilisés pour l'hybridation *in situ* radioactive sont listés dans l'annexe 4.

Tout comme le protocole d'HIS pour la sonde marquée à la DIG, le protocole d'hybridation *in situ* radioactive nécessite une partie pré-hybridation qui consiste à préparer les coupes à l'hybridation. Ainsi, après avoir sorti les lames du congélateur à -80°C et une remontée à température de 30 minutes, les coupes sont rincées en PBS1X. Ensuite, elles subissent un démasquage par incubation dans un tampon citrate (annexe 4) en ébullition pendant 12 minutes suivi de 20 minutes à température ambiante. Après un rinçage en PBS1X

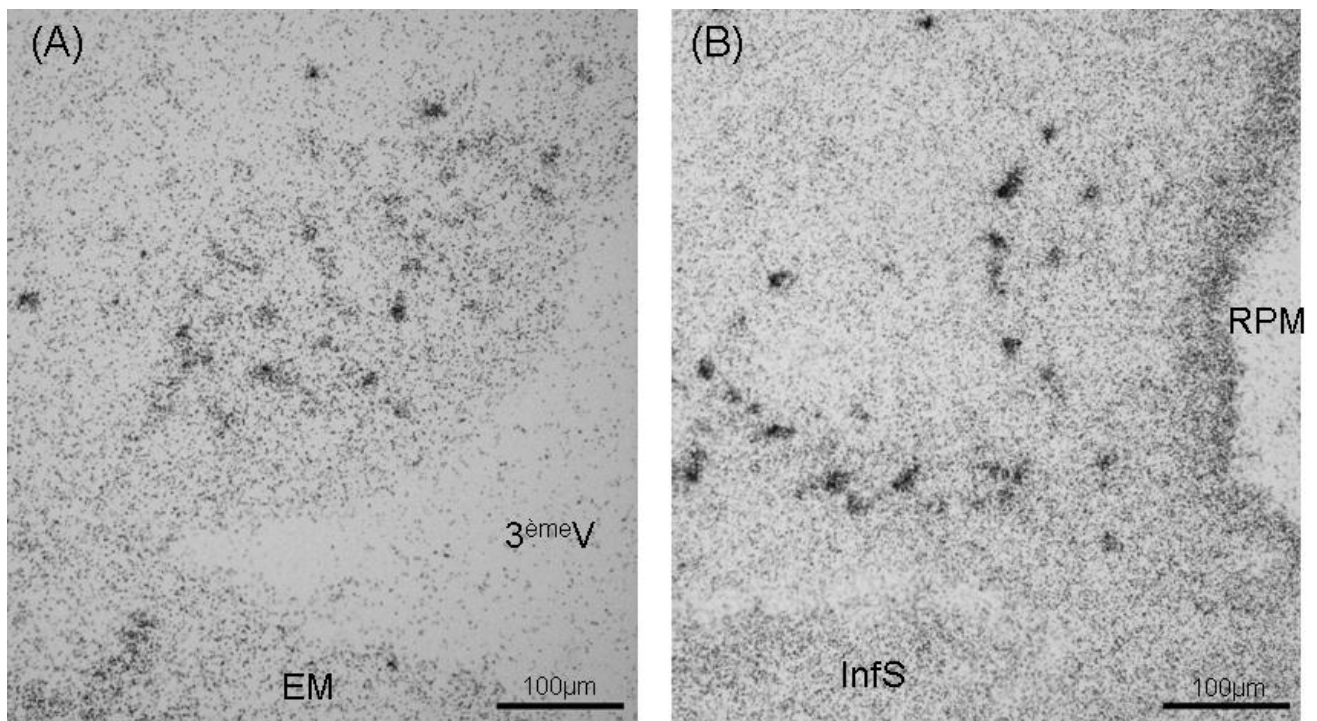
de 5 minutes, elles sont post-fixées dans un bain de PAF4%. Les coupes sont ensuite rincées une nouvelle fois dans du PBS1X avant de les mettre à incuber pendant 20 minutes dans une solution contenant de la protéinase K à 2µg/mL. Après deux rinçages en PBS1X, les coupes sont mises à incuber dans le tampon d'hybridation (annexe 4) pendant 2 heures à 50°C. Ensuite, les coupes sont rincées à l'alcool 75°C puis mises à incuber sur la nuit à 50°C dans le tampon d'hybridation contenant la sonde radiomarquée au S<sup>35</sup>. Cette dernière a d'abord été dénaturée à 92°C pendant 5 minutes puis refroidis dans la glace pendant 5 minutes. Enfin, elle est déposée sur chaque lame à une concentration de 1 million de cpm par lame dans un volume de 30µl par lame (3 coupes/lame). Les étapes de la post-hybridation commence par un bain de tampon NTE (annexe 4) pendant 15 minutes à 37°C, suivi d'une heure d'incubation en tampon NTE contenant de la RNase à 10mg/mL permettant d'éliminer la sonde en excès. Ensuite, une succession de rinçage d'une heure chacun dans un tampon SSC/formamide/DTT de concentration en SSC décroissante : 2X suivi de 0.2X (annexe 4). Pour finir, les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool : 30%, 50%, 70%, 90% de 2 minutes chacun et séchées à température ambiante jusqu'à pose de l'émulsion autoradiographique.

### *2.c. Emulsion autoradiographique et révélation*

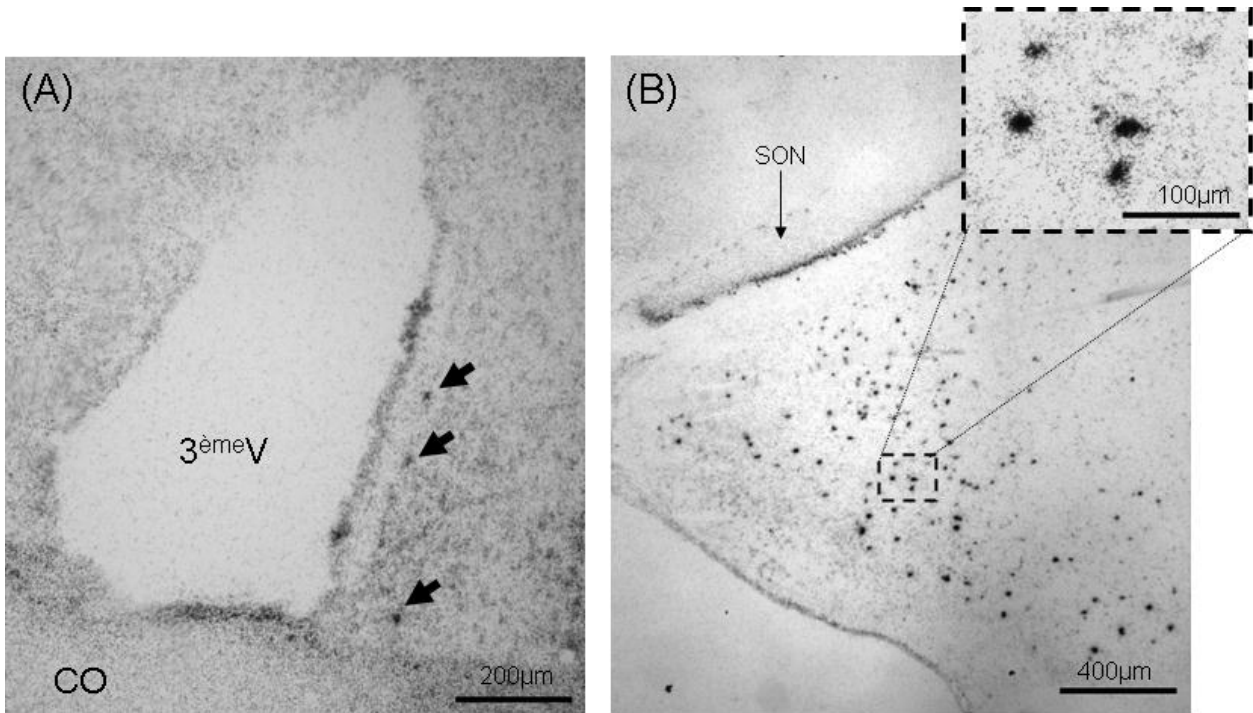
Suite aux séchages des coupes, l'émulsion autoradiographique (NTB2, Kodak) est chauffée à 42°C après dilution volume à volume dans de l'eau déminéralisée dans l'obscurité. Puis, elle est déposée sur les lames toujours dans l'obscurité. Ces dernières sont mises à sécher sur un portoir sur une nuit à température ambiante puis exposer au minimum pendant trois semaines à 4°C à l'obscurité. Au bout des trois semaines, certaines lames contrôles sont révélées par un bain de 10 minutes de révélateur (D19, Kodak), suivi d'un rinçage avec de l'eau courante de 5 min et fixées par un bain de 10 minute de thiosulfate de sodium 30% qui permet de fixer les grains d'argent sur la coupe. Toutes ces étapes doivent être réalisées au noir. Si les lames contrôles présentent du marquage, le reste des lames est révélé sinon elles sont remises en exposition à 4°C pendant plusieurs semaines. Une fois la révélation effectuée, les coupes sont déshydratées et montées entre lames et lamelles avec du Depex®. Pour certaines expérimentations, une coloration au rouge neutre a été réalisée afin de pouvoir discriminer la taille des cellules et surtout distinguer les différentes structures et régions cérébrales.

## **III. Résultats préliminaires**

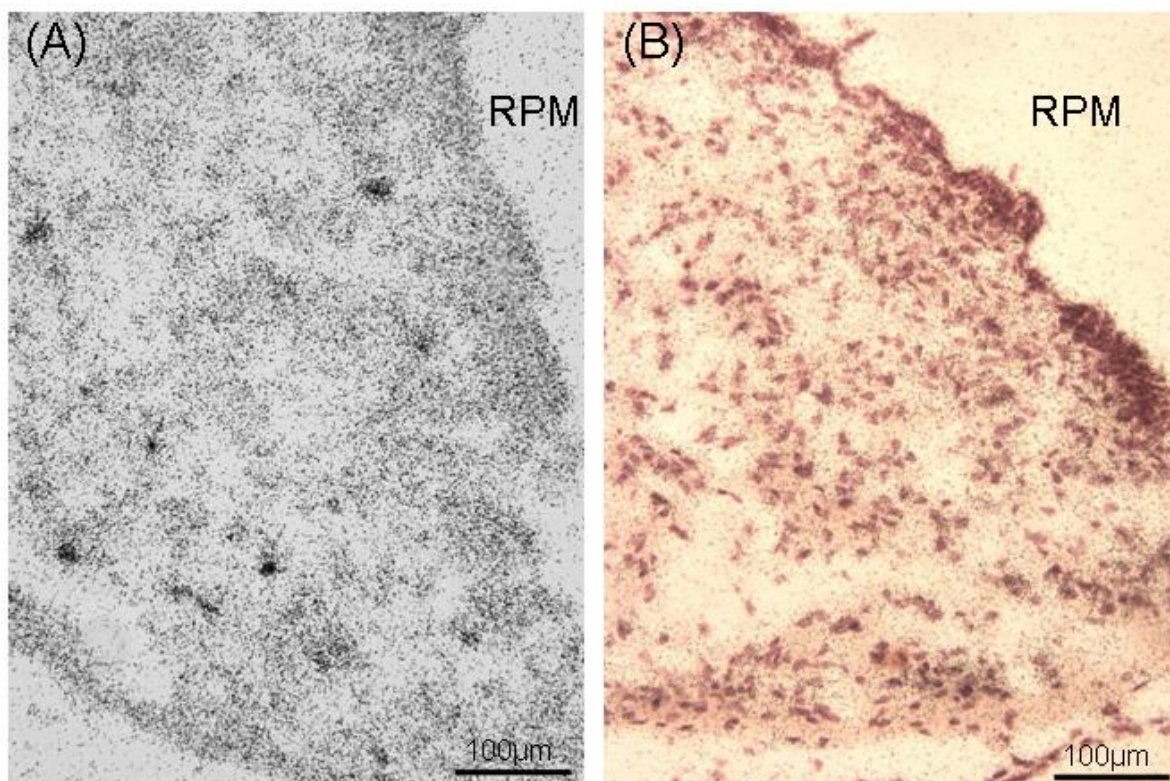
La mise au point de l'hybridation *in situ* à l'aide de la sonde couplée au  $S^{35}$  s'est avérée difficile. Nous avons tout de même réussi sur une dizaine d'essais réalisés à obtenir deux fois des résultats satisfaisants chez l'adulte uniquement sur les femelles en diestrus avec la sonde « Tours ». En effet, des clusters de grains d'argent ont été détectés dans la partie antérieure (Figure 17 A) ainsi que dans la partie postérieure de l'ARC (Figure 17 B) sur les 2 rates adultes à PND61 en diestrus. Nous avons également pu observer deux clusters de grains d'argent le long du 3<sup>ème</sup> ventricule dans le RP3V mais seulement sur une rate sur les deux (Figure 18 A). Enfin, de nombreux clusters de grains d'argent ont été détectés dans l'amygdale des deux rates en diestrus (Figure 18 B).



**Cellules exprimant l'ARN messager *Kiss1* dans le noyau arqué d'une rate au stade diestrus après hybridation *in situ* avec la sonde « Tours » marquée au  $S^{35}$ .** (A) Clusters de grains d'argent détectés dans le 1/3 antérieur de l'ARC. (B) Clusters de grains d'argent détectés dans le 1/3 postérieur de l'ARC. 3<sup>ème</sup>V: 3<sup>ème</sup> ventricule, EM: éminence médiane, RPM: récessus prémammillaire, InfS: tige infundibulaire.



**Cellules exprimant l'ARN messager *Kiss1* dans différentes régions de l'hypothalamus d'une rate adulte en diestrus après hybridation in situ avec la sonde « Tours » marquée au  $S^{35}$ .** (A) Clusters de grains d'argent détectés dans le RP3V. (B) Clusters de grains d'argent détectés dans l'amygdale. 3<sup>ème</sup>V: 3<sup>ème</sup> ventricule, CO: Chiasma optique, SON: noyau supra-optique.



**Spécificité de la sonde « Tours » marquée au  $S^{35}$ .** (A) Clusters de grains d'argent détectés dans le 1/3 postérieur de l'ARC après marquage à l'aide de la sonde antisense. (B) Aucun cluster de grains d'argent n'est détecté sur une coupe consécutive colorée au rouge neutre avec la sonde sense. RPM: récessus prémammillaire.

Ainsi, nous avons pu détecter la présence de cellules exprimant de l'ARN messager kiss-1 dans le RP3V, dans l'ARC mais également dans l'amygdale. Malheureusement, la difficulté de répéter ces résultats, a rendu difficile la confirmation de la reconnaissance de l'ARNm kiss-1 par notre sonde. Malgré tout, nous avons réussi lors d'un des deux essais fructueux à obtenir des clusters de grains d'argent dans l'ARC postérieur avec la sonde antisens et aucun cluster sur la coupe consécutive marquée avec la sonde sens (Figure 19) suggérant que la sonde « Tours » utilisée reconnaît bien l'ARNm kiss-1 sur nos coupes.

#### **IV. Conclusion**

Ainsi, la mise au point de l'hybridation *in situ* chez l'adulte s'est avérée extrêmement difficile. Nous avons tout de même réussi à obtenir des résultats préliminaires avec la méthode présentée au-dessus pour l'étude des variations de l'ARNm kiss-1 au cours du développement qui seront présentés dans le chapitre 2



## Annexe 3 : Digestion de l'ADNc, ligation dans le plasmide et transformation du plasmide dans les bactéries

### Digestion et ligation :

#### **a. Digestion** dans total 25 $\mu$ l **1hr 37°C**

2.5 tampon jaune 10x (GB)	2.5 tampon jaune 10x (GB)
1 $\mu$ l kpnI (SF)	1 $\mu$ l kpnI (SF)
1 $\mu$ l SacI (SF)	1 $\mu$ l SacI (SF)
1 $\mu$ l plasmide pBluescrip tKS (2.3 $\mu$ g)	5 $\mu$ l KiSS cDNA (200 ng estime en OD)
19.5 H2O	15.5 $\mu$ l H2O

**Après 30 minutes ajout d'1 $\mu$ l de chaque enzymes de restrictions**

#### **b. Vérification de l'efficacité de la digestion**

Migration gel agarose 1% + marqueur 100bp

#### **c. Déphosphorylation (plasmide) pour éviter recirculation du vecteur coupe en 1 seul site**

50  $\mu$ l mix digestion plasmide dans 5mM tris

+5.5 $\mu$ l Tampon Antartica 10x

+1 $\mu$ l Enzyme Entartica

Incubation 37°C 30 minutes

Inactivation 65°C 10 min

#### **d. Dispatcher le plasmide déphosphorylé :**

Déposer dans trois eppendorfs 18.5  $\mu$ L de plasmide (soit environ 766 ng de plasmide)

Ajouter dans deux des tubes 12.5 $\mu$ l d'insert (soit environ 100 ng d'insert digéré)

#### **e. Précipitation :**

Ajout de 3 $\mu$ l d'acétate de sodium 3M

Ajouter 80 $\mu$ l d'éthanol 100%

Placer les tubes à -20°C pendant 2 heures minimum

Centrifuger 30 minutes 15000rpm 4°C

Laver les culots avec 500µl d'éthanol 75%

Centrifuger 10 minutes 15000rpm 4°C

Sécher les tubes

#### **f. Ligation :**

Déposer 1µl de tampon 10X

Déposer 0.5µl de ligase dans un tube contenant le plasmide seul et un autre contenant le plasmide avec insert

Ajouter 8.5µl d'eau miliQ pour les deux tubes

Ligation sur la nuit température ambiante

Inactivation 65°C 10 minutes

### Transformation des bactéries :

Pour des colonies comme E. Coli (type TG1)

#### **a. Préparation des boîtes de Pétri et préparation des bactéries :**

Préparation des boîtes de Pétri LB- Ampicilline (100 µg/ml)

Plater également du Xgal (40 µl) et IPTG 40µl (0.1M)

Sortir les bactéries compétentes E. coli (TG1) du congélateur à -80°C et les mettre directement dans la glace laisser remonter à une température de 4°C dans la glace.

#### **b. Transformation :**

- Transférer 100 µl d' E. coli (TG1) compétentes dans un tube Eppendorf de 1,5 ml froid.

- Ajouter l'ADN (pas plus de 50 ng dans un volume maximum de 5 µl) et mélanger doucement.

- Laisser les tubes 15 min dans la glace.

- Incuber ensuite les tubes 90 s à 42°C dans un bain-marie liquide.

- Remettre les tubes 2 minutes dans la glace

- Laisser les tubes revenir à température ambiante.

- Ajouter 1 ml de milieu LB par tube ; incuber à 37°C pendant 45 min avec une agitation douce (expression de la résistance à l'antibiotique).

-déposer 200µl de LB puis Platter la boîte

-Centrifuger 5 min à 13.000 rpm et re-suspendre le culot de bactéries dans 100 µl de milieu LB.



- Platter des nouvelles boites avec cette suspension (sensé être plus concentrée)
- Incuber les boîtes, posées à l'envers, la nuit à 37°C.
  - Les colonies qui auront poussées seront celles ayant intégrées le plasmide (vide ou avec l'insert)
  - Les colonies blanches qui auront poussées auront intégré le plasmide avec l'insert.

## Annexe 4 : Préparations des solutions pour l'HIS radioactive

### Préparation PAF 4%

Faire chauffer 100 ml d'eau miliQ entre 62°C et 65°C avec quelques 1,2µl de NaOH 1N par ml d'eau miliQ dans un erlen

Arrêter le chauffage

Peser 8g de paraformaldéhyde en poudre puis les ajouter dans un erlen

Quand le liquide est transparent, ajouter 100 ml de PBS

Refroidir ensuite dans la glace

### Tampon citrique :

Acide citrique 0.1M

Tricitrate de Na 0.1M

Mettre 1 volume d'acide citrique pour 4 volumes de tricitrate de Na

### Tampon PK :

Tris 20mM

CaCl<sub>2</sub> 2mM

pH 7.5

#### Préparation :

- Mettre 300ml d'eau mili Q

- Mettre 3.152g de Tris

- Mettre 0.222g de CaCl<sub>2</sub>

- Complété à 900 ml

Vérifier le pH et l'ajuster à 7.5 avec HCl 37%

Compléter à un litre

Faire autoclaver

### Préparation du tampon d'hybridation:

- 50% formamide

- 0.6 M NaCl
- 10mM Tris HCl pH8
- 0.5% poids volume SDS
- 200 $\mu$ g/ml Baker yeast tRNA
- 2X Denhardt's
- DTT 8 mM
- PEG 10%
- EDTA 1mM
- Eau DEPC
- pH 8

Préparation :

<b>Produit :</b>	<b>10 ml</b>
-formamide	5 ml
-NaCl 5M	1.2 ml
-Tris HCl 1M pH8	100 $\mu$ l
- SDS 10%	500 $\mu$ l
- Baker yeast tRNA20mg/ml	100 $\mu$ l
-50X Denhardt's	400 $\mu$ l
- DTT 0.75M	106 $\mu$ l
- PEG	1 g
- EDTA 0.5M pH8	20 $\mu$ L
-Eau DEPC	2.574ml

Tampon NTE :

- 10 mM tris HCl pH7.7
- 1 mM EDTA
- 500 mM NaCl
- pH8

Préparation:

Tris HCl 2M :	2.5 ml
NaCl 5M :	50 ml
EDTA 0.5M	1 ml

Qsp 500 ml

**SSC 20X:**

- Citrate de sodium            PM : 294.10
- NaCl                            PM : 58.44

**Préparation :**

- Mettre 500ml d'eau milli Q
  - Mettre 175.3g NaCl
  - Mettre 88.2g de citrate de Na
  - Complété à 1000 ml
- Vérifier le pH et l'ajuster à 7 avec HCl 37%
- Faire autoclaver

## Références bibliographiques

**A**

- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K. & Maeda, K. (2007) Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*, **53**, 367-378.
- Ahmed, E.I., Zehr, J.L., Schulz, K.M., Lorenz, B.H., DonCarlos, L.L. & Sisk, C.L. (2008) Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat. Neurosci.*, **11**, 995-997.
- Andrews, W.W., Mizejewski, G.J. & Ojeda, S.R. (1981) Development of estradiol-positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: a quantitative study. *Endocrinology*, **109**, 1404-1413.
- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A.H., Klosen, P., Mikkelsen, J.D. & 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.

**B**

- Backholer, K., Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., Li, Q. & Clarke, I.J. (2008) Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, **151**, 2233-2243.
- Bai, Y., Chang, F., Zhou, R., Jin, P.P., Matsumoto, H., Sokabe, M. & Chen, L. (2011) Increase of Anteroventral Periventricular Kisspeptin Neurons and Generation of E2-Induced LH-Surge System in Male Rats Exposed Perinatally to Environmental Dose of Bisphenol-A. *Endocrinology*, **152**, 1562-1571.
- Bakker, J., Pierman, S. & Gonzalez-Martinez, D. (2010) Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm. Behav.*, **57**, 390-395.
- Bateman, H.L. & Patisaul, H.B. (2008) Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*, **29**, 988-997.
- Becu-Villalobos, D. & Libertun, C. (1995) Development of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron regulation in the female rat. *Cell Mol Neurobiol*, **15**, 165-176.
- Bellingham, M., Fowler, P.A., Amezaga, M.R., Rhind, S.M., Cotinot, C., Mandon-Pepin, B., Sharpe, R.M. & Evans, N.P. (2009) Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland. *Environ. Health Perspect.*, **117**, 1556-1562.

- Bentsen, A.H., Ansel, L., Simonneaux, V., Tena-Sempere, M., Juul, A. & Mikkelsen, J.D. (2010) Maturation of kisspeptinergic neurons coincides with puberty onset in male rats. *Peptides*, **31**, 275-283.
- Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U., Graier, W., Knofler, M., Andreae, F., Wagner, O., Quaranta, V. & Desoye, G. (2004) Kisspeptin-10, a *Kiss1*/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J. Cell Sci.*, **117**, 1319-1328.
- Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Ohsawa, M., Yin, D., Yang, J., Chang, J.K., Brailoiu, E. & Dun, N.J. (2005) *Kiss1* expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **481**, 314-329.
- Brunton, P.J. & Russell, J.A. (2010) Endocrine induced changes in brain function during pregnancy. *Brain Res*, **1364**, 198-215.

## C

- Cao, J. & Patisaul, H.B. (2011) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors alpha and beta and *kiss1* in neonatal male and female rats. *J. Comp. Neurol.*, **519**, 23.
- Caron, E., Sachot, C., Prevot, V. & Bouret, S.G. (2010) Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J Comp Neurol*, **518**, 459-476.
- Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Romero, M., Garcia-Galiano, D., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Mikkelsen, J.D. & Tena-Sempere, M. (2011) Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology*, **152**, 3396-3408.
- Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sanchez-Criado, J.E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F. & Tena-Sempere, M. (2006a) Expression of *Kiss1* in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*, **147**, 4852-4862.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castano, J.P., Malagon, M.M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2006b) Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **257-8**, 75-83.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M.J., Vigo, E., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C. & Tena-Sempere, M. (2005) Changes in hypothalamic *Kiss1* system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, **146**, 3917-3925.

- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Roa, J., Vigo, E., Pineda, R., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2006c) Expression of hypothalamic *Kiss1* system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes*, **55**, 2602-2610.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Roa, J., Pineda, R., Sanchez-Garrido, M.A., Garcia-Galiano, D., Vigo, E., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2009) Alterations in hypothalamic *Kiss1* system in experimental diabetes: early changes and functional consequences. *Endocrinology*, **150**, 784-794.
- Chalivoix, S., Bagnolini, A., Caraty, A., Cognie, J., Malpoux, B. & Dufourny, L. (2010) Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol*, **22**, 110-118.
- Cheng, G., Coolen, L.M., Padmanabhan, V., Goodman, R.L. & Lehman, M.N. (2010) The Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Cell Population of the Arcuate Nucleus: Sex Differences and Effects of Prenatal Testosterone in the Sheep. *Neuroendocrinology*, **151**.
- Cho, S.G., Yi, Z., Pang, X., Yi, T., Wang, Y., Luo, J., Wu, Z., Li, D. & Liu, M. (2009) Kisspeptin-10, a KISS1-derived decapeptide, inhibits tumor angiogenesis by suppressing Sp1-mediated VEGF expression and FAK/Rho GTPase activation. *Cancer Res.*, **69**, 7062-7070.
- Ciofi, P., Lapirot, O.C. & Tramu, G. (2007) An androgen-dependent sexual dimorphism visible at puberty in the rat hypothalamus. *Neuroscience*, **146**, 630-642.
- Ciofi, P., Leroy, D. & Tramu, G. (2006) Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience*, **141**, 1731-1745.
- Clarke, I.J., Thomas, G.B., Yao, B. & Cummins, J.T. (1987) GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology*, **46**, 82-88.
- Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R. & Herbison, A.E. (2009a) Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*, **150**, 3214-3220.
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A. & Herbison, A.E. (2009b) Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol*, **21**, 673-682.
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A.S., Colledge, W.H. & Herbison, A.E. (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci*, **28**, 8691-8697.



- Clarkson, J. & Herbison, A.E. (2006a) Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. *Mol Cell Endocrinol*, **254-255**, 32-38.
- Clarkson, J. & Herbison, A.E. (2006b) Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **147**, 5817-5825.
- Clarkson, J. & Herbison, A.E. (2011) Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol*, **23**, 293-301.
- Clements, M.K., McDonald, T.P., Wang, R., Xie, G., O'Dowd, B.F., George, S.R., Austin, C.P. & Liu, Q. (2001) FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 1189-1193.
- Colledge, W.H. (2009) Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides*, **30**, 34-41.
- Constantin, S., Caligioni, C.S., Stojilkovic, S. & Wray, S. (2009a) Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology*, **150**, 1400-1412.
- Constantin, S., Caraty, A., Wray, S. & Duittoz, A.H. (2009b) Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinology*, **150**, 3221-3227.
- Cravo, R.M., Margatho, L.O., Osborne-Lawrence, S., Donato, J., Jr., Atkin, S., Bookout, A.L., Rovinsky, S., Frazao, R., Lee, C.E., Gautron, L., Zigman, J.M. & Elias, C.F. (2010) Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*, **173**, 37-56.

## D

- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B. & Colledge, W.H. (2008) Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology*, **149**, 3926-3932.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B., Aparicio, S.A. & Colledge, W.H. (2007) Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10714-10719.
- Daikoku, S. & Koide, I. (1998) Spatiotemporal appearance of developing LHRH neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*, **393**, 34-47.

- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L. & Milgrom, E. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10972-10976.
- Dearden, N.M. & Holmes, R.L. (1976) Cyto-differentiation and portal vascular development in the mouse adenohypophysis. *J Anat*, **121**, 551-569.
- Decourt, C., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I. & Briant, C. (2008) Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat*, **36**, 131-137.
- Desroziers, E., Mikkelsen, J., Simonneaux, V., Keller, M., Tillet, Y., Caraty, A. & Franceschini, I. (2010) Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol*, **22**, 1101-1112.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Patterson, M., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Badman, M.K., McGowan, B.M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2005) Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 6609-6615.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Ramachandran, R., Nijher, G.K., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2007) Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 3958-3966.
- Dickerson, S.M., Cunningham, S.L., Patisaul, H.B., Woller, M.J. & Gore, A.C. (2010) Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology*, **152**, 581-594.
- Dohler, K.D. & Wuttke, W. (1974) Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, **94**, 1003-1008.
- Donato, J., Jr., Cravo, R.M., Frazao, R., Gautron, L., Scott, M.M., Lachey, J., Castro, I.A., Margatho, L.O., Lee, S., Lee, C., Richardson, J.A., Friedman, J., Chua, S., Jr., Coppari, R., Zigman, J.M., Elmquist, J.K. & Elias, C.F. (2011) Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *The Journal of clinical investigation*, **121**, 355-368.
- Ducret, E., Gaidamaka, G. & Herbison, A.E. (2010) Electrical and morphological characteristics of anteroventral periventricular nucleus kisspeptin and other neurons in the female mouse. *Endocrinology*, **151**, 2223-2232.
- Dumalska, I., Wu, M., Morozova, E., Liu, R., van den Pol, A. & Alreja, M. (2008) Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*, **28**, 8003-8013.

Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Parsons, A., Yang, J., Zeng, Q., Chen, X., Chang, J.K. & Dun, N.J. (2003) Metastatin-like immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord. *Neurosci Lett*, **335**, 197-201.

Dungan, H.M., Gottsch, M.L., Zeng, H., Gragerov, A., Bergmann, J.E., Vassilatis, D.K., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2007) The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci*, **27**, 12088-12095.

## E

---

Estrada, K.M., Clay, C.M., Pompolo, S., Smith, J.T. & Clarke, I.J. (2006) Elevated *Kiss1* expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J Neuroendocrinol*, **18**, 806-809.

## F

---

Fernandez-Fernandez, R., Martini, A.C., Navarro, V.M., Castellano, J.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2006) Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*, **254-255**, 127-132.

Fiorini, Z. & Jasoni, C.L. (2010) A novel developmental role for kisspeptin in the growth of gonadotrophin-releasing hormone neurites to the median eminence in the mouse. *J Neuroendocrinol*, **22**, 1113-1125.

Forbes, S., Li, X.F., Kinsey-Jones, J. & O'Byrne, K. (2009) Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett*, **460**, 143-147.

Franceschini, I., Desroziers, E., Caraty, A. & Duittoz, A. (2010) The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity. *Eur J Neurosci*, **32**, 2031-2041.

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y. & Caraty, A. (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, **401**, 225-230.

Fu, L.Y. & van den Pol, A.N. (2010) Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci*, **30**, 10205-10219.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J. & Gustafson, E.L. (2003) The *Kiss1* receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1357-1363.

## G

- Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, J.M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sanchez-Criado, J.E., Millar, R.P., Pellicer, A., Fraser, H.M. & Tena-Sempere, M. (2009) *Kiss1* in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in *Kiss1* mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**, E520-531.
- Gill, J.C., Wang, O., Kakar, S., Martinelli, E., Carroll, R.S. & Kaiser, U.B. (2010) Reproductive hormone-dependent and -independent contributions to developmental changes in kisspeptin in GnRH-deficient hypogonadal mice. *PLoS ONE*, **5**, 11911-11924.
- González-Martínez, D., Mees, C.D., Douhard, Q., Szpirer, C. & Bakker, J. (2008) Absence of Gonadotropin-Releasing Hormone 1 and *Kiss1* Activation in  $\alpha$ -Fetoprotein Knockout Mice: Prenatal Estrogens Defeminize the Potential to Show Preovulatory Luteinizing Hormone Surges. *Endocrinology*, **149**, 2333-2341.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P. & Clarke, I.J. (2007) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, **148**, 5752-5760.
- Gottsch, M.L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2009) From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, **30**, 4-9.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **145**, 4073-4077.
- Greenstein, B.D. (1992) Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors. *Endocrinology*, **130**, 3184-3190.
- Greives, T.J., Humber, S.A., Goldstein, A.N., Scotti, M.A., Demas, G.E. & Kriegsfeld, L.J. (2008) Photoperiod and testosterone interact to drive seasonal changes in kisspeptin expression in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol*, **20**, 1339-1347.
- Greives, T.J., Mason, A.O., Scotti, M.A., Levine, J., Ketterson, E.D., Kriegsfeld, L.J. & Demas, G.E. (2007) Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology*, **148**, 1158-1166.
- Gutierrez-Pascual, E., Leprince, J., Martinez-Fuentes, A.J., Segalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., Pinilla, L., Tonon, M.C., Malagon, M.M., Vaudry, H., Tena-Sempere, M. & Castano, J.P. (2009) In vivo and in vitro structure-activity

relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Mol. Pharmacol.*, **76**, 58-67.

Gutierrez-Pascual, E., Martinez-Fuentes, A.J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, M.M. & Castano, J.P. (2007) Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol*, **19**, 521-530.

## H

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A. & Herbison, A.E. (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*, **25**, 11349-11356.

Han, T.M. & De Vries, G.J. (1999) Neurogenesis of galanin cells in the bed nucleus of the stria terminalis and centromedial amygdala in rats: a model for sexual differentiation of neuronal phenotype. *J Neurobiol*, **38**, 491-498.

Henson, M.C. & Castracane, V.D. (eds) (2003) *Leptin and reproduction*. Plenum Publishers.

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

Hoffman, G.E., Le, W.W., Franceschini, I., Caraty, A. & Advis, J.P. (2011) Expression of fos and in vivo median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe. *Endocrinology*, **152**, 214-222.

Homma, T., Sakakibara, M., Yamada, S., Kinoshita, M., Iwata, K., Tomikawa, J., Kanazawa, T., Matsui, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Maeda, K. & Tsukamura, H. (2009) Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol. Reprod.*, **81**, 1216-1225.

Hori, A., Honda, S., Asada, M., Ohtaki, T., Oda, K., Watanabe, T., Shintani, Y., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Onda, H., Kurokawa, T., Nishimura, O. & Fujino, M. (2001) Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 958-963.

Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B., Horvath, M.C., Keller, E., Caraty, A., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillon, W.S., Liposits, Z. & Kallo, I. (2010) The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **31**, 1984-1998.

**I**

- Iijima, N., Takumi, K., Sawai, N. & Ozawa, H. (2010) An immunohistochemical study on the expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody. *J. Mol. Neurosci.*, **43**, 146-154.
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *Kiss1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, **80**, 264-272.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Fujisawa, S., Kinouchi, R., Gereltsetseg, G., Kuwahara, A., Yasui, T. & Irahara, M. (2011) Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic *Kiss1* expression and the timing of puberty in female rats. *J Physiol*, **588**, 821-829.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Gereltsetseg, G., Fujisawa, S., Kuwahara, A., Yasui, T. & Irahara, M. (2010a) Sensitivities of mRNA expression levels of *Kiss1* and its receptor, *Kiss1r*, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. *J. Endocrinol.*, **207**, 195-202.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Gereltsetseg, G., Yamamoto, S., Kuwahara, A., Yasui, T. & Irahara, M. (2010b) Delayed puberty in prenatally glucocorticoid administered female rats occurs independently of the hypothalamic *Kiss1-Kiss1r*-GnRH system. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **29**, 183-188.

**K**

- Kadokawa, H., Suzuki, S. & Hashizume, T. (2008) Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.*, **105**, 404-408.
- Kalamatianos, T., Grimshaw, S.E., Poorun, R., Hahn, J.D. & Coen, C.W. (2008) Fasting reduces *Kiss1* expression in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV): effects of fasting on the expression of *Kiss1* and neuropeptide Y in the AVPV or arcuate nucleus of female rats. *J Neuroendocrinol*, **20**, 1089-1097.
- Kauffman, A.S. (2009) Sexual differentiation and the *Kiss1* system: Hormonal and developmental considerations. *Peptides*, **30**, 83-93.
- Kauffman, A.S. (2010) Coming of age in the kisspeptin era: sex differences, development, and puberty. *Mol Cell Endocrinol*, **324**, 51-63.
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A. & Tena-Sempere, M. (2007) Sexual differentiation of *Kiss1* gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, **148**, 1774-1783.

- Kauffman, A.S., Navarro, V.M., Kim, J., Clifton, D. & Steiner, R.A. (2009) Sex Differences in the Regulation of Kiss1/NKB Neurons in Juvenile Mice: Implications for the Timing of Puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **297**, 1212-1221.
- Keen, K.L., Wegner, F.H., Bloom, S.R., Ghatei, M.A. & Terasawa, E. (2008) An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology*, **149**, 4151-4157.
- Kim, J., Semaan, S.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Dhamija, S. & Kauffman, A.S. (2011) Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology*, **152**, 2020-2030.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Yoshihisa Uenoyama, Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H. & Maeda, K.-I. (2005) Involvement of Central Metastin in the Regulation of Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Estrous Cyclicity in Female Rats. *Endocrinology*, **146**, 4431-4438.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Knox, A.M., Wilkinson, E.S., Zhu, X.L., Chaudhary, A.A., Milligan, S.R., Lightman, S.L. & O'Byrne, K.T. (2009) Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, *Kiss1r*, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol*, **21**, 20-29.
- Knox, A.M., Li, X.F., Kinsey-Jones, J.S., Wilkinson, E.S., Wu, X.Q., Cheng, Y.S., Milligan, S.R., Lightman, S.L. & O'Byrne, K.T. (2009) Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters hypothalamic Kiss1 and *Kiss1r* mRNA expression in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology*, **21**, 683-689.
- Kokay, I.C., Petersen, S.L. & Grattan, D.R. (2011) Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology*, **152**, 526-535.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G. & Parmentier, M. (2001) The metastasis suppressor gene *Kiss1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34631-34636.
- Kriegsfeld, L.J., Gibson, E.M., Williams, W.P., 3rd, Zhao, S., Mason, A.O., Bentley, G.E. & Tsutsui, K. (2010) The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. *J Neuroendocrinol*, **22**, 692-700.

---

**L**

---

- Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D.S., Chan, Y.M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E. & Seminara, S.B. (2007) Kiss1(-/-) mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54(-/-) mice. *Endocrinology*, **148**., 4927-4936.
- Lederman, M.A., Lebesgue, D., Gonzalez, V.V., Shu, J., Merhi, Z.O., Etgen, A.M. & Neal-Perry, G. (2010) Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. *Neuropharmacology*, **58**., 314-320.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R. & O'Dowd, B.F. (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.*, **446**, 103-107.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E. & Welch, D.R. (1996) *Kiss1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1731-1737.
- Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M. & Goodman, R.L. (2010) Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.*, **1364**, 90-102.
- Levine, J.E., Chappell, P., Besecke, L.M., Bauer-Dantoin, A.C., Wolfe, A.M., Porkka-Heiskanen, T. & Urban, J.H. (1995) Amplitude and frequency modulation of pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone release. *Cell Mol Neurobiol*, **15**, 117-139.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J. & Smith, J.T. (2011) Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J Neuroendocrinol.*
- Losa, S.M., Todd, K.L., Sullivan, A.W., Cao, J., Mickens, J.A. & Patisaul, H.B. (2010) Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod. Toxicol.*

---

**M**

---

- Magee, C., Foradori, C.D., Bruemmer, J.E., Arreguin-Arevalo, J.A., McCue, P.M., Handa, R.J., Squires, E.L. & Clay, C.M. (2009) Biological and Anatomical Evidence for Kisspeptin Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis of Estrous Horse Mares. *Endocrinology*, **150**, 8.
- Markakis, E.A. & Swanson, L.W. (1997) Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev*, **24**, 255-291.



- Mason, A.O., Greives, T.J., Scotti, M.A., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E.D., Demas, G.E. & 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.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. & Ohtaki, T. (2004) Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 383-388.
- Mayer, C., Acosta-Martinez, M., Dubois, S.L., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U. & Levine, J.E. (2010) Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor {alpha}-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 22693-22698.
- Mayer, C. & Boehm, U. (2011) Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat. Neurosci.*, **14**, 704-710.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., 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 U S A*, **102**, 1761-1766.
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I. & Pillon, D. (2010) 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.
- Mikkelsen, J.D., Bentsen, A.H., Ansel, L., Simonneaux, V. & Juul, A. (2009) Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul. Pept.*, **152**, 95-100.
- Mikkelsen, J.D. & Simonneaux, V. (2009) The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*, **30**, 26-33.
- Moenter, S.M., Caraty, A., Locatelli, A. & Karsch, F.J. (1991) Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, **129**, 1175-1182.
- Morelli, A., Marini, M., Mancina, R., Luconi, M., Vignozzi, L., Fibbi, B., Filippi, S., Pezzatini, A., Forti, G., Vannelli, G.B. & Maggi, M. (2008) Sex steroids and leptin regulate the "first Kiss" (KiSS 1/G-protein-coupled receptor 54 system) in human gonadotropin-releasing-hormone-secreting neuroblasts. *J Sex Med*, **5**, 1097-1113.
- Moreno, G., Piermaria, J., Gaillard, R.C. & Spinedi, E. (2011) In vitro functionality of isolated embryonic hypothalamic vasopressinergic and oxytocinergic neurons: modulatory effects of brain-derived neurotrophic factor and angiotensin II. *Endocrine*, **39**, 83-88.

Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L. & Harrison, D.C. (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide *Kiss1*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28969-28975.

---

## N

---

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2004a) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of *Kiss1* and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of *Kiss1* peptide. *Endocrinology*, **145**, 4565-4574.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2005a) Effects of *Kiss1* peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **146**, 1689-1697.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2005b) Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of *Kiss1* peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*, **146**, 156-163.

Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C. & Tena-Sempere, M. (2004b) Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by *Kiss1* peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J. Physiol*, **561**, 379-386.

Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Wu, M., Garcia-Galiano, D., Hobbs, S.J., Bosch, M.A., Pinilla, L., Clifton, D.K., Dearth, A., Ronnekleiv, O.K., Braun, R.E., Palmiter, R.D., Tena-Sempere, M., Alreja, M. & Steiner, R.A. (2011) Regulation of NKB Pathways and Their Roles in the Control of *Kiss1* Neurons in the Arcuate Nucleus of the Male Mouse. *Endocrinology*.

Navarro, V.M., Sanchez-Garrido, M.A., Castellano, J.M., Roa, J., Garcia-Galiano, D., Pineda, R., Aguilar, E., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2008) Persistent Impairment of Hypothalamic *Kiss1* System Following Exposures to Estrogenic Compounds at Critical Periods of Brain Sex Differentiation. *Endocrinology*.

Nazian, S.J. (2006) Role of metastin in the release of gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. *J. Androl.*, **27**, 444-449.

Novaira, H.J., Ng, Y., Wolfe, A. & Radovick, S. (2009) Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, **311**, 126-134.

---

## O

---

Oakley, A.E., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2009) Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr. Rev.*, **30**, 713-743.

Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R.A., Tsukamura, H., Maeda, K.I. & Okamura, H. (2009a) Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol*, **21**, 813-821.

Ohkura, S., Uenoyama, Y., Yamada, S., Homma, T., Takase, K., Inoue, N., Maeda, K. & Tsukamura, H. (2009b) Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides*, **30**, 49-56.

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O. & Fujino, M. (2001) Metastasis suppressor gene *Kiss1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **411**, 613-617.

Ojeda, S.R., Andrews, W.W., Advis, J.P. & White, S.S. (1980) Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev*, **1**, 228-257.

Ojeda, S.R., Kalra, P.S. & McCann, S.M. (1975) Further studies on the maturation of the estrogen negative feedback on gonadotropin release in the female rat. *Neuroendocrinology*, **18**, 242-255.

Ojeda, S.R., Lomniczi, A. & Sandau, U. (2010) Contribution of glial-neuronal interactions to the neuroendocrine control of female puberty. *Eur J Neurosci*, **32**, 2003-2010.

Ojeda, S.R. & Urbanski, H.F. (eds) (1988) *Chapter 39: Puberty in the Rat*. Raven Press, New York.

---

## P

---

Parhar, I.S., Ogawa, S. & Sakuma, Y. (2004) Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*, **145**, 3613-3618.

Patisaul, H.B., Todd, K.L., Mickens, J.A. & Adewale, H.B. (2009) Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology*, **30**, 350-357.

- Patterson, M., Murphy, K.G., Thompson, E.L., Patel, S., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2006) Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol*, **18**, 349-354.
- Paul, M.J., Pyter, L.M., Freeman, D.A., Galang, J. & 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.
- Pheng, V., Uenoyama, Y., Homma, T., Inamoto, Y., Takase, K., Yoshizawa-Kumagaye, K., Isaka, S., Watanabe, T.X., Ohkura, S., Tomikawa, J., Maeda, K. & Tsukamura, H. (2009) Potencies of centrally- or peripherally-injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats. *J Reprod Dev*, **55**, 378-382.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R.P. & Tena-Sempere, M. (2010) Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology*, **151**, 722-730.
- Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K.M. & Clarke, I.J. (2006) Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*, **147**, 804-810.
- Porteous, R., Petersen, S.L., Yeo, S.H., Bhattarai, J.P., Ciofi, P., de Tassigny, X.D., Colledge, W.H., Caraty, A. & Herbison, A.E. (2011) Kisspeptin neurons co-express met-enkephalin and galanin in the rostral periventricular region of the female mouse hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*

## Q

- Quennell, J.H., Howell, C.S., Roa, J., Augustine, R.A., Grattan, D.R. & Anderson, G.M. (2011) Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. *Endocrinology*, **152**, 1541-1550.

## R

- Ramaesh, T., Logie, J.J., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Walker, B.R., Hadoke, P.W. & Reynolds, R.M. (2010) Kisspeptin-10 inhibits angiogenesis in human placental vessels ex vivo and endothelial cells in vitro. *Endocrinology*, **151**, 5927-5934.
- Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B. & Plant, T.M. (2008) Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, **149**, 4387-4395.

- Ramaswamy, S., Seminara, S.B., Ali, B., Ciofi, P., Amin, N.A. & Plant, T.M. (2010) Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, **151**, 4494-4503.
- Rankin, S.L., Partlow, G.D., McCurdy, R.D., Giles, E.D. & Fisher, K.R. (2003) Postnatal neurogenesis in the vasopressin and oxytocin-containing nucleus of the pig hypothalamus. *Brain Res*, **971**, 189-196.
- Rao, Y.S., Mott, N.N. & Pak, T.R. (2011) Effects of kisspeptin on parameters of the HPA axis. *Endocrine*, **39**, 220-228.
- Redmond, J.S., Baez-Sandoval, G.M., Spell, K.M., Spencer, T.E., Lents, C.A., Williams, G.L. & Amstalden, M. (2010) Developmental Changes in Hypothalamic Kiss1 Expression during Activation of the Pulsatile Release of Luteinising Hormone in Maturing Ewe Lambs. *J Neuroendocrinol*, **23**, 815-822.
- Redmond, J.S., Macedo, G.G., Velez, I.C., Caraty, A., Williams, G.L. & Amstalden, M. (2011) Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction*, **141**, 541-548.
- 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. *Curr. Biol.*, **16**, 1730-1735.
- Richard, N., Corvaisier, S., Camacho, E. & Kottler, M.L. (2009) *Kiss1* and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides*, **30**, 123-129.
- Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A. & Kottler, M.L. (2008) *Kiss1* and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol*, **20**, 381-393.
- Rizwan, M.Z., Porteous, R., Herbison, A.E. & 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.
- Roa, J., Vigo, E., Castellano, J.M., Gaytan, F., Garcia-Galiano, D., Navarro, V.M., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Ederveen, A.G., Pinilla, L., van Noort, P.I. & Tena-Sempere, M. (2008) Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology*, **149**, 5783-5790.
- Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L. & Rance, N.E. (2007) Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 2744-2750.

Roseweir, A.K., Kauffman, A.S., Smith, J.T., Guerriero, K.A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., Pineda, R., Gottsch, M.L., Tena-Sempere, M., Moenter, S.M., Terasawa, E., Clarke, I.J., Steiner, R.A. & Millar, R.P. (2009) Discovery of Potent Kisspeptin Antagonists Delineate Physiological Mechanisms of Gonadotropin Regulation. *Journal of Neuroscience*, **29**, 3920-3929.

Roze, C., Touraine, P., Leger, J. & de Roux, N. (2009) [Congenital hypogonadotropic hypogonadism]. *Ann Endocrinol (Paris)*, **70**, 2-13.

## S

Scott, V. & Brown, C.H. (2011) Kisspeptin activation of supraoptic nucleus neurons in vivo. *Endocrinology*, **152**, 8.

Sebert, M.E., Lomet, D., Said, S.B., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J. & Caraty, A. (2010) Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: potential role of estradiol. *Domest. Anim. Endocrinol.*, **38**, 289-298.

Semaan, S.J., Murray, E.K., Poling, M.C., Dhamija, S., Forger, N.G. & Kauffman, A.S. (2010) BAX-dependent and BAX-independent regulation of Kiss1 neuron development in mice. *Endocrinology*, **151**, 5807-5817.

Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Jr., Aparicio, S.A. & Colledge, W.H. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1614-1627.

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R. & 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.

Shibata, M., Friedman, R.L., Ramaswamy, S. & Plant, T.M. (2007) Evidence that down regulation of hypothalamic *Kiss1* expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol.*, **19**, 432-438.

Simerly, R.B. (1989) Hormonal control of the development and regulation of tyrosine hydroxylase expression within a sexually dimorphic population of dopaminergic cells in the hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, **6**, 297-310.

Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2006a) *Kiss1* neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol.*, **18**, 298-303.

- Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A. & Clarke, I.J. (2007) *Kiss1* 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., Bentley, G.E., Clarke, I.J. & Lehman, M.N. (2008a) 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., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2005a) Regulation of *Kiss1* gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, **146**, 3686-3692.
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2005b) Differential regulation of *Kiss1* mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, **146**, 2976-2984.
- Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A. & Clarke, I.J. (2009a) Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, **150**, 5530-5538.
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E. & Steiner, R.A. (2006b) *Kiss1* neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*, **26**, 6687-6694.
- Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, R.P. & Clarke, I.J. (2008b) Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology*, **149**, 1951-1959.
- Smith, J.T., Saleh, S.N. & Clarke, I.J. (2009b) Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the ewe. *Neuroendocrinology*, **90**, 283-291.
- Smith, J.T., Shahab, M., Pereira, A., Pau, K.Y. & Clarke, I.J. (2010) Hypothalamic expression of *KISS1* and gonadotropin inhibitory hormone genes during the menstrual cycle of a non-human primate. *Biol. Reprod.*, **83**, 568-577.
- Sun, Y., Perry, G.N., Yu, J., Chen, B. & Tian, Z. (2010) Effect of nourishing "Yin"-removing "Fire" Chinese herbal mixture on hypothalamic kisspeptin expression in female precocious rats. *J. Ethnopharmacol.*, **127**, 274-279.
- Sun, Y., Tian, Z., Zhao, H., Wong, S.T. & Chen, B. (2007) Characteristic of hypothalamic kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats. *Neurosci Lett*, **420**, 12-17.

Suzuki, S., Kadokawa, H. & Hashizume, T. (2008) Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.*, **103**, 360-365.

## T

Takase, K., Uenoyama, Y., Inoue, N., Matsui, H., Yamada, S., Shimizu, M., Homma, T., Tomikawa, J., Kanda, S., Matsumoto, H., Oka, Y., Tsukamura, H. & Maeda, K.I. (2009) Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J Neuroendocrinol*, **21**, 527-537.

Takumi, K., Iijima, N. & Ozawa, H. (2010) Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J. Mol. Neurosci.*, **43**, 138-145.

Terasawa, E. & Fernandez, D.L. (2001) Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*, **22**, 111-151.

Thibault, C. & Levasseur, M.C. (eds) (2001) *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, Paris.

Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Bewick, G.A., Stamp, G.W., Curtis, A.E., Cooke, J.H., Jethwa, P.H., Todd, J.F., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2006) Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E1074-1082.

Thompson, E.L., Patterson, M., Murphy, K.G., Smith, K.L., Dhillon, W.S., Todd, J.F., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*, **16**, 850-858.

Tillet, Y., Picard, S. & Franceschini, I. (2009) [Hypothalamic neuropeptides and control of GnRH neurones. Neuroanatomical study in the ewe.]. *J. Soc. Biol.*, **203**, 19-28.

Tomikawa, J., Homma, T., Tajima, S., Shibata, T., Inamoto, Y., Takase, K., Inoue, N., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Maeda, K.I. & Tsukamura, H. (2009) Molecular Characterization and Estrogen Regulation of Hypothalamic KISS1 Gene in the Pig. *Biol. Reprod.*

True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K.L. & Smith, M.S. (2010) Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol*, **23**, 52-64.

Tsutsui, K., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., Osugi, T., Seong, J.Y. & Vaudry, H. (2010) Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol*, **22**, 716-727.



---

**U**

---

- Uenoyama, Y., Inoue, N., Pheng, V., Homma, T., Takase, K., Yamada, S., Ajiki, K., Ichikawa, M., Okamura, H., Maeda, K.I. & Tsukamura, H. (2011) Ultrastructural Evidence of Kisspeptin-Gonadotrophin-Releasing Hormone Interaction in the Median Eminence of Female Rats: Implication of Axo-Axonal Regulation of GnRH Release. *J Neuroendocrinol*, **Epub ahead of print**.
- Ugrumov, M.V., Ivanova, I.P., Mitskevich, M.S., Liposits, Z., Setalo, G. & Flerko, B. (1985) Axovascular relationships in developing median eminence of perinatal rats with special reference to luteinizing hormone-releasing hormone projections. *Neuroscience*, **16**, 897-906.
- Ugrumov, M.V., Saprionova, A.Y., Melnikova, V.I., Proshlyakova, E.V., Adamskaya, E.I., Lavrentieva, A.V., Nasirova, D.I. & Babichev, V.N. (2005) Brain is an important source of GnRH in general circulation in the rat during prenatal and early postnatal ontogenesis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **141**, 271-279.

---

**V**

---

- Vida, B., Deli, L., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Caraty, A., Coen, C.W., Liposits, Z. & Kallo, I. (2010) Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*, **22**, 1032-1039.

---

**W**

---

- Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Steiner, R.A. & Okamura, H. (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci*, **30**, 3124-3132.
- Whitnall, M.H. & Gainer, H. (1985) Ultrastructural immunolocalization of vasopressin and neurophysin in neurosecretory cells of dehydrated rats. *Brain Res*, **361**, 400-404.

---

**X**

---

---

**Y**

---

- Yeo, S.H. & Herbison, A.E. (2011) Projections of Arcuate Nucleus and Rostral Periventricular Kisspeptin Neurons in the Adult Female Mouse Brain. *Endocrinology*, **152**, 2387-2399.

---

**Z**

---

- Zapatero-Caballero, H., Sanchez-Franco, F., Fernandez-Mendez, C., Garcia-San Frutos, M., Botella-Cubells, L.M. & Fernandez-Vazquez, G. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of female rats. *Biol Reprod*, **70**, 348-355.
- Zapatero-Caballero, H., Sanchez-Franco, F., Guerra-Perez, N., Fernandez-Mendez, C. & Fernandez-Vazquez, G. (2003) Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol Reprod*, **68**, 1764-1770.
- Zhang, H., Long, Q., Ling, L., Gao, A., Li, H. & Lin, Q. (2011) Elevated expression of *Kiss1* in placenta of preeclampsia and its effect on trophoblast. *Reprod. Biol.*, **11**, 99-115.

## Ontogenèse des neurones à kisspeptine chez le rat

### Résumé

Le kisspeptine (kp) est un peptide, dérivé du gène *Kiss1*, jouant un rôle majeur dans le contrôle central de la fonction de reproduction en régulant la sécrétion du GnRH chez l'adulte mais également au cours du développement. Les neurones exprimant *Kiss1* sont situés dans la région rostrale péri-ventriculaire du 3<sup>ème</sup> ventricule (RP3V) et le noyau arqué (ARC). L'expression de *Kiss1* est hautement régulée par les stéroïdes sexuels, positivement dans RP3V et négativement dans ARC. Ces deux populations de neurones à kp semblent avoir des rôles différents. Les neurones à kp du RP3V seraient impliqués dans la genèse du pic préovulatoire et ceux de l'ARC dans la régulation de la sécrétion pulsatile de GnRH.

L'objectif de la thèse était de déterminer la période de neurogenèse des neurones à kp ainsi que les variations de l'immunoréactivité de kp dans ces deux régions au cours des différentes phases du développement chez le rat mâle et femelle.

Nos résultats ont permis de cibler les périodes clés de l'ontogenèse des neurones à kp en montrant 1) que les neurones à kp de l'ARC naissent sur une période étendue à partir du jour embryonnaire (E)12,5; 2) l'existence d'une baisse pré-natale de l'immunoréactivité kp dans l'ARC indépendante du sexe; 3) la mise en place, en période néonatale, de différences sexuelles dans les niveaux d'expression et la distribution neuroanatomique du kp; 4) l'existence de régulations péri-pubertaires de kp, dépendantes du sexe et de la région; 5) la présence de fibres à kp dans des régions hypothalamiques suggère un rôle de kp au-delà de la fonction de reproduction.

Mots clés : kisspeptine, développement, rat, neurogenèse, différenciation sexuelle

### Résumé en anglais

Kisspeptin (kp) is a neuropeptide, derived from the *Kiss1* gene, which plays a key role in the central control of reproduction by regulating GnRH secretion in adult but also during development. Cells which express *Kiss1* are localized in two distinct hypothalamic regions: the rostral peri-ventricular third ventricle area (RP3V) and the arcuate nucleus (ARC). *Kiss1* expression is highly regulated by sex steroids: positively in the RP3V and negatively in the ARC. RP3V kp neurons have been implicated in the pre-ovulatory GnRH surge whereas ARC kp neurons may predominantly act on GnRH secretion pulsatility.

The aim of this PhD work was to determine the neurogenesis period of kp neurons and changes of *Kiss1* and kp expression in both regions during different stages of development in rats.

Our results highlight key periods of kp neurons ontogenesis and show that: 1) ARC kp neurons are born during an extended embryonic neurogenesis period starting at embryonic day (E) 12,5; 2) a sex independent down-regulation of kp occurs during peri-natal period; 3) sex difference in the expression level and neuroanatomical distribution of kp establishes during neo-natal period; 4) kp was regulated during peri-pubertal period in sex and region dependent manner; 5) kp-ir fibers are detected throughout the septo-hypothalamic continuum suggesting that kp could be implicated in other functions than reproductive function.

Keywords: kisspeptin, development, rat, neurogenesis, sex differentiation