

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies

UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux

Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Equipe : Neurobiologie et Maîtrise des Fonctions saisonnières

THÈSE

présentée par :

Stéphanie CHALIVOIX

soutenue le : 14 janvier 2010

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Transition photopériodique et plasticité
neuronale dans l'hypothalamus ovin :
aspects neuranatomiques et fonctionnels**

THÈSE dirigée par :

Mme Laurence DUFOURNY

Chargée de Recherche, HDR, CNRS, Nouzilly

RAPPORTEURS :

Mme Valérie SIMONNEAUX

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

M. Olivier BOSLER

Directeur de Recherche, CNRS, Marseille

JURY :

M. Jean-Claude BEAUVILLAIN

Directeur de Recherche, INSERM, Lille

M. Olivier BOSLER

Directeur de Recherche, CNRS, Marseille

Mme Laurence DUFOURNY

Chargée de Recherche, HDR, CNRS, Nouzilly

Mme Anne DUITTOZ

Professeur, Université François Rabelais, Tours

Mme Valérie SIMONNEAUX

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

Mme Catherine VIGUIE

Chargée de Recherche, INRA, Toulouse

Résumé

Les mécanismes cellulaires et moléculaires activés par la mélatonine pour synchroniser l'alternance entre la saison de reproduction et l'anoestrus sont encore mal compris. En nous basant sur des travaux antérieurs de l'équipe démontrant l'existence d'un délai de 45 à 60 jours nécessaire à l'activation de l'axe gonadotrope, nous avons privilégié l'existence de remaniements morphologiques induits par un changement de photopériode. L'objectif a été de déterminer si une transition photopériodique était suffisante pour induire des réorganisations morphologiques pouvant avoir des conséquences fonctionnelles sur la fonction saisonnière de reproduction.

Nous avons, dans un premier temps, déterminé les niveaux et l'importance fonctionnelle de la plasticité induite par une transition photopériodique dans des régions du cerveau impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction et/ou dans l'intégration de message mélatoninergique chez l'ovine. Les deux transitions photopériodiques (Jours courts (JC)/Jours longs (JL) et JL/JC) semblent capables d'induire des variations d'un marqueur de la plasticité, la forme polysialylée de la molécule d'adhésion cellulaire neurale (PSA-NCAM), dans différentes régions hypothalamiques (aire préoptique, aire hypothalamique antérieure, hypothalamus ventromédian, noyau arqué et hypothalamus prémamillaire). Ces variations de la PSA-NCAM semblent liées à une modulation du degré de polysialylation de la NCAM plutôt qu'à une régulation de la quantité de NCAM dans les membranes cellulaires. D'un point de vue physiologique, l'altération spécifique de la PSA-NCAM dans l'hypothalamus prémamillaire n'a aucun effet sur les profils de sécrétion de la LH suggérant que les variations de la PSA-NCAM dans cette région pourraient être compensées par d'autres régions. L'inhibition de la PSA-NCAM dans l'aire préoptique a induit un important retard de l'activation de l'axe gonadotrope chez la majorité des brebis suggérant que la plasticité dans cette région serait un élément clé de la synchronisation de la reproduction.

Dans un deuxième temps, nous avons identifié des populations de neurones touchées par des réarrangements morphologiques suite à un changement de traitement photopériodique. Nous avons étudié les populations des neurones à GnRH contrôlant l'activité de reproduction, des neurones à β -endorphine, inhibiteur de l'activité des neurones à GnRH, et des neurones à kisspeptine, stimulateur de l'activité des neurones à GnRH. La PSA-NCAM est plus présente au contact des neurones à GnRH et à β -endorphine au moment le plus opportun pour l'activité du neurone, suggérant que la plasticité affectant ces neurones serait essentielle au déroulement de la reproduction saisonnière de la brebis. Les neurones à kisspeptine sont plus nombreux chez des brebis ayant un axe gonadotrope actif ce qui serait dû à une augmentation de la synthèse du kisspeptine plutôt qu'à une variation de la taille de la population cellulaire. Le kisspeptide serait un des derniers éléments activés par l'augmentation de la durée de sécrétion de la mélatonine.

Nos travaux montrent qu'un changement de photopériode est suffisant pour induire des remaniements morphologiques dans des régions hypothalamiques nécessaires à la synchronisation saisonnière de la reproduction chez les ovins. Ces remaniements affectent des populations neuronales spécifiques.

Mots clés : Brebis, Reproduction saisonnière, Photopériode, Hypothalamus, PSA-NCAM, GnRH, Neuromodulateurs.

Abstract

Cellular and molecular mechanisms induced by melatonin to synchronize seasonal reproduction are still unclear. From previous works performed in the laboratory showing that a delay from 45 to 60 days is necessary to activate the gonadotrope axis, we have privileged the existence of morphological reorganizations induced by a variation of photoperiod. The aim has been to determine whether a photoperiodic transition alone was able to induce morphological reorganizations that could have functional consequences on the seasonal reproduction.

We have first determined the scale and functional significance of neuronal plasticity induced by a photoperiodic transition in brain regions involved in the control of the gonadotrope activity and/or in the integration of the melatonergic signal in the ewe. The two photoperiodic transitions (from Short Days (SD) to Long Days (LD) and from LD to SD) seem able to induce variations of a plasticity marker, the Polysialylated form of neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), in several hypothalamic areas (preoptic area, anterior hypothalamic area, ventromedial hypothalamus, arcuate nucleus and premammillary hypothalamic area). Variations of PSA-NCAM seem to be linked to a modulation of the degree of NCAM polysialylation rather than to a regulation of the expression of NCAM in cell membranes. From a physiological point of view, the absence of effect on LH profiles of PSA-NCAM alteration in the premammillary hypothalamus suggested that PSA-NCAM variations in this region could be compensated by other regions. PSA-NCAM inhibition in the preoptic area has induced an important delay for the onset of gonadotrope axis activation in most of ewes suggesting that plasticity in this area is a key element for the synchronization of seasonal reproduction.

We identified neuronal populations affected by morphological rearrangements following a change of photoperiodic treatment. We studied GnRH neurons controlling the activity of the reproduction, β -endorphin and kisspeptin neurons that inhibit and stimulate the activity of GnRH neurons respectively. PSA-NCAM was present in contact with GnRH and β -endorphin neurons when the neuropeptide secreted by that population is required for the timed control of the physiological function suggesting that plasticity affecting these neurons could be important for the timing of seasonal breeding activity. Kisspeptin neurons were more numerous in ewes having an active gonadotrope axis probably from an increase of kisspeptin synthesis rather than to a variation of the population size. Kisspeptin seems to be one of the last elements activated by the increase of the duration of melatonin secretion.

All together, our results suggest that a change of photoperiod alone is essential to induce morphological reorganizations in hypothalamic regions necessary for the seasonal synchronization of sheep reproduction. Plasticity affects specific neuronal populations.

Key words: Ewes, Seasonal reproduction, Photoperiod, Hypothalamus, PSA-NCAM, GnRH, neuromodulators.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	8
A) La reproduction, une fonction saisonnée	9
I) Définitions	9
1) Les fonctions saisonnées	9
a) La reproduction saisonnée.....	10
b) Les autres fonctions saisonnées.....	12
c) Facteurs modulant ces fonctions	12
2) Le rythme endogène circannuel	13
II) Le cycle oestrien.....	14
1) La gonadolibérine ou GnRH	14
a) Structure du peptide	14
b) Les neurones à GnRH	15
2) Les hormones gonadotropes : LH et FSH	16
3) Les hormones stéroïdiennes gonadiques	18
a) Structure	18
b) Localisation des récepteurs	19
c) Contrôle de la sécrétion de GnRH/LH	22
4) Les neuromédiateurs clés de cette fonction.....	23
a) Les peptides amidés : kisspeptide et RFRP.....	23
(i) Les kisspeptines.....	23
(ii) Les RFRP	24
b) Les opiacés	26
c) La dopamine	27
d) Les autres médiateurs impliqués	28
III) Le cycle saisonnier de la reproduction	31
1) La mélatonine	31
a) Voie de synthèse.....	31
b) Mode de sécrétion et métabolisme	32
c) Les récepteurs à la mélatonine	33
2) Le rôle des hormones thyroïdiennes.....	34
a) Structure et mode de libération	35
b) Action et transport cérébral	35
c) Variations saisonnières et photopériode.....	36
3) La voie de la pars tuberalis.....	37
a) Chez les oiseaux	38
b) Chez les mammifères	38
B) La plasticité dans le système nerveux central	39
I) Définitions et fonctions	39
1) Le concept de « Plasticité structurale »	39
a) La plasticité synaptique	40

b)	La neurogénèse, une forme de plasticité	41
2)	La plasticité associée à quelques fonctions physiologiques.....	42
a)	Le stress.....	43
b)	La prise alimentaire	44
II)	Un marqueur de plasticité, la PSA-NCAM.....	44
1)	Structure et mécanisme d'action	44
a)	La molécule d'adhésion cellulaire neurale : la NCAM.....	44
b)	La NCAM polysialylée : la PSA-NCAM.....	45
2)	Rôles de la NCAM	46
a)	Au cours du développement.....	47
b)	Dans le comportement émotionnel.....	47
c)	Au cours de l'apprentissage et dans la mémoire	48
d)	Au cours de la neurogénèse chez l'embryon et l'adulte.....	48
3)	Rôles de la PSA-NCAM	49
a)	Au cours du développement.....	49
b)	Dans la régulation des rythmes circadiens	50
c)	Au cours de l'apprentissage et la mémoire	51
d)	Dans la régénération du tissu cérébral à la suite d'une lésion ou dans la cancérogenèse.....	52
e)	Au cours de la neurogénèse chez l'adulte	52
C)	Plasticité structurale et reproduction	53
I)	Au cours du développement.....	53
1)	Migration des neurones à GnRH.....	53
2)	Importance des hormones thyroïdiennes.....	54
II)	Au cours de la gestation et la lactation.....	55
III)	Au cours du cycle ovarien.....	56
1)	Chez le rat.....	56
a)	Dans la région antérieure du diencephale	56
b)	Dans le noyau arqué	57
c)	Au niveau de l'éminence médiane et des tanocytes.....	58
2)	Chez la brebis	59
IV)	Au cours du cycle saisonnier de la reproduction.....	59
1)	Neurogénèse	59
a)	Chez les oiseaux et les amphibiens	59
b)	Chez les mammifères	60
2)	Plasticité neuronale	61
a)	Dans l'aire préoptique	61
b)	Dans la région rétrochiasmatisque.....	62
c)	Au niveau de l'éminence médiane et des tanocytes.....	63
	OBJECTIFS	65
	<i>1ER CHAPITRE : UNE TRANSITION PHOTOPERIODIQUE EST-ELLE SUFFISANTE POUR INDUIRE DES REMANIEMENTS MORPHOLOGIQUES ?</i>	68
I)	Introduction	69
II)	Conclusion.....	97

2EME CHAPITRE : QUELLE EST L'IDENTITE DES POPULATIONS NEURONALES POUVANT ETRE AFFECTEES PAR DES REORGANISATIONS MORPHOLOGIQUES ?.....	98
A) 1^{ère} PARTIE : Effet d'un passage en jours courts sur les réorganisations morphologiques au contact des neurones à GnRH et à β-	
END 99	
I) Introduction	99
II) Conclusion.....	122
B) 2^{ème} PARTIE : Effet de la photopériode sur la population des neurones à kisspeptine.....	123
I) Introduction	123
II) Conclusion.....	143
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	144
I) La mélatonine synchronise la reproduction saisonnée grâce à un réseau hypothalamique	145
1) Plasticité au sein de l'hypothalamus prémamillaire et de l'aire préoptique.....	145
a) L'hypothalamus prémamillaire	145
b) L'aire préoptique	147
2) Populations affectées par cette plasticité.....	147
II) Une seconde voix pour l'intégration du signal mélatoninergique : la pars tuberalis	150
III) Place de la génétique dans l'expression de la saisonnalité de la reproduction ..	152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	155

LISTE DES ABREVIATIONS

AHA :	Aire hypothalamique antérieure
APO :	Aire préoptique
ARC :	Noyau arqué
AVPV :	Noyau périventriculaire antéroventral
β -END :	β -endorphine
BrdU :	5'-BromodéoxyUridine
Dio2 :	Déiodinase de type 2
Dio3 :	Déiodinase de type 3
E2 :	Oestradiol
EM :	Eminence médiane
ER :	Récepteur à l'oestradiol
FSH :	Hormone folliculo-stimulante (Folliculo Stimulating Hormone)
GABA :	Acide gamma-aminobutyrique
GAP-43	Growth Associated Protein-43
GFAP :	Glial fibrillary acidic protein
GnIH :	Gonadotropin Inhibitory Hormone
GnRH :	Gonadolibérine (Gonadotropin Releasing Hormone)
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GPR :	Récepteur couplé aux protéines G
HDM :	Hypothalamus dorsomédian
HMB :	Hypothalamus médiobasal
HVC :	High vocal center
HVM :	Hypothalamus ventromédian
HPM :	Hypothalamus prémamillaire
<i>icv</i> :	Intracérébroventriculaire

Kiss :	Kisspeptines
LCR :	Liquide céphalo rachidien
LH :	Hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone)
LTP :	Potentialisation à long terme (Long-term potentiation)
LTD :	Dépression à long terme (Long-term depression)
NCAM :	Molécule d'adhésion cellulaire neuronale (Neural cell adhesion molecule)
MCT :	Famille de transporteurs de monocarboxylates (Monocarboxylate transporter)
NMDA :	N-Methyl-D-Aspartate
NOS :	Synthétase du monoxyde d'azote
NPV :	Noyau paraventriculaire
NPY :	Neuropeptide Y
NSC :	Noyaux supraoptiques
OVLT :	Organe vasculaire de la lame terminale
OATP :	Polypeptides transportant des anions organiques (Organic anion transporting polypeptide)
PR :	Récepteur à la progestérone
PSA-NCAM :	Forme polysialylée de la molécule d'adhésion cellulaire neuronale (PolySialylated form of Neural Cell Adhesion Molecule)
PT :	Pars tuberalis
RA :	Robust nucleus of the arcopallium
RFRP :	RFamide-related peptide
SVZ :	Zone subventriculaire
T2 :	Diiodothyronine
TH :	Tyrosine hydroxylase

T4 : Tétraiodothyronine (Thyroxine)
TSH- β : Thyrotrophine (Thyroid Stimulating Hormone de type β)
TRH : TSH-releasing hormone
T3 : Triiodothyronine
SNC : Système nerveux central

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les variations de la durée de sécrétion de la mélatonine durant l'année illustrant les modifications de la photopériode sont un des principaux facteurs environnementaux régulant la fonction de reproduction des espèces saisonnées auxquelles appartiennent les ovins. L'existence de certains phénomènes de plasticité cérébrale entre la saison de reproduction et la saison de repos sexuel a été démontrée dans plusieurs études effectuées chez la brebis et cette plasticité pourrait participer à l'intégration des variations de la photopériode et à la transformation de cette information en activité ou inactivité sexuelle illustrées par des modifications de la sécrétion de la GnRH puis de la LH. La question reste posée quant à l'implication directe de la photopériode dans ces phénomènes plastiques. L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer si un changement de photopériode seul pouvait induire des réorganisations morphologiques dans certaines régions du cerveau participant au contrôle de la fonction de reproduction ovine. L'introduction bibliographique traitera, dans une première partie, des fonctions saisonnières et en particulier de la reproduction, définira dans une seconde partie les principaux mécanismes liés à la plasticité structurale avant d'aborder, dans une troisième partie, les remaniements morphologiques décrits au cours de différents statuts physiologiques associés à la fonction de reproduction.

A) La reproduction, une fonction saisonnée

I) Définitions

1) Les fonctions saisonnées

Les espèces animales vivant sous des latitudes tempérées sont soumises à des fluctuations saisonnières du climat, de la température et de la disponibilité alimentaire. Sous l'influence de ces changements, des adaptations saisonnières des fonctions physiologiques, des comportements et de la morphologie de ces espèces ont été mises en place (Gwinner, 1986, Bronson, 1988). En effet, les animaux peuvent présenter des cycles d'hibernation, des



L'hermine (*Mustela erminea*)



Le lièvre d'Amérique (*Lepus americanus*)



Figure 1: Photos de deux espèces saisonnées montrant des modifications de la couleur de leur pelage selon les saisons.

périodes migratoires, des modifications de leur pelage (Figure 1) et/ou des variations du stockage énergétique via le dépôt des graisses et des modifications de la température corporelle. De plus, la plupart de ces espèces ont une activité de reproduction restreinte à une période de l'année ce qui leur permet d'obtenir des naissances au moment le plus opportun c'est-à-dire lorsque les conditions environnementales telles que la disponibilité alimentaire et la température sont les plus favorables à la survie des nouveaux nés (Bronson and Heideman, 1994). Ces mécanismes d'adaptation doivent débiter très tôt et les organismes doivent être capables d'anticiper ces modifications climatiques. Pour cela, il existe un repère temporel synchronisant ces événements par rapport au moment de l'année : la photopériode (Baker and Ramsom, 1932, Ortavant, 1988). Les variations de la durée du jour par rapport à celle de la nuit sont en effet un événement saisonnier stable d'une année à une autre ce qui constitue une information prédictive majeure pour coordonner, en fonction des saisons, certaines des fonctions physiologiques.

a) La reproduction saisonnée

Les variations saisonnières de la fonction de reproduction de nombreux mammifères se traduisent par une alternance entre une période d'activité et une période de quiescence. Le moment de l'année où les animaux présentent une reproduction active varie selon les espèces et les latitudes. Chez les mammifères des zones tempérées et froides, les conditions les plus favorables aux naissances sont réunies au printemps et au début de l'été. Chez les mammifères des zones tropicales et semi désertiques, la saison des pluies est souvent le facteur déterminant. Le rythme saisonnier de l'activité de reproduction dépend de la durée de la gestation, mais aussi de la nécessité de synchroniser la gamétogenèse, le comportement sexuel et les périodes de gestation durant l'année (Bronson and Heideman, 1994). Chez le mâle et la femelle, les variations saisonnières de fertilité sont la conséquence de modifications

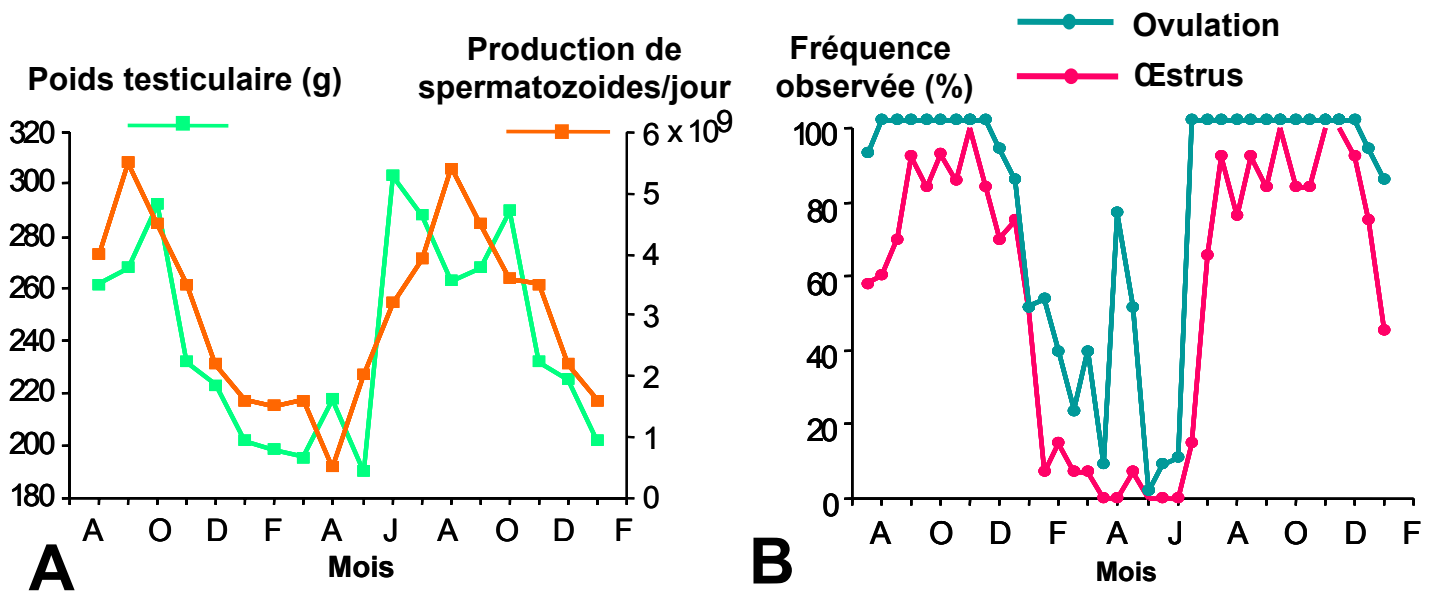


Figure 2: (A) Profils saisonniers du poids testiculaire et de la production journalière de spermatozoïdes chez le bélier « Ile de France » suivi pendant un an. Adaptée de (Dacheux et al., 1981). (B) Fréquences moyennes des ovulations et des cycles oestriens chez la brebis « Ile de France » suivie pendant un an. Adaptée de (Thimonier & Mauléon, 1969) et de (Dacheux et al., 1981).

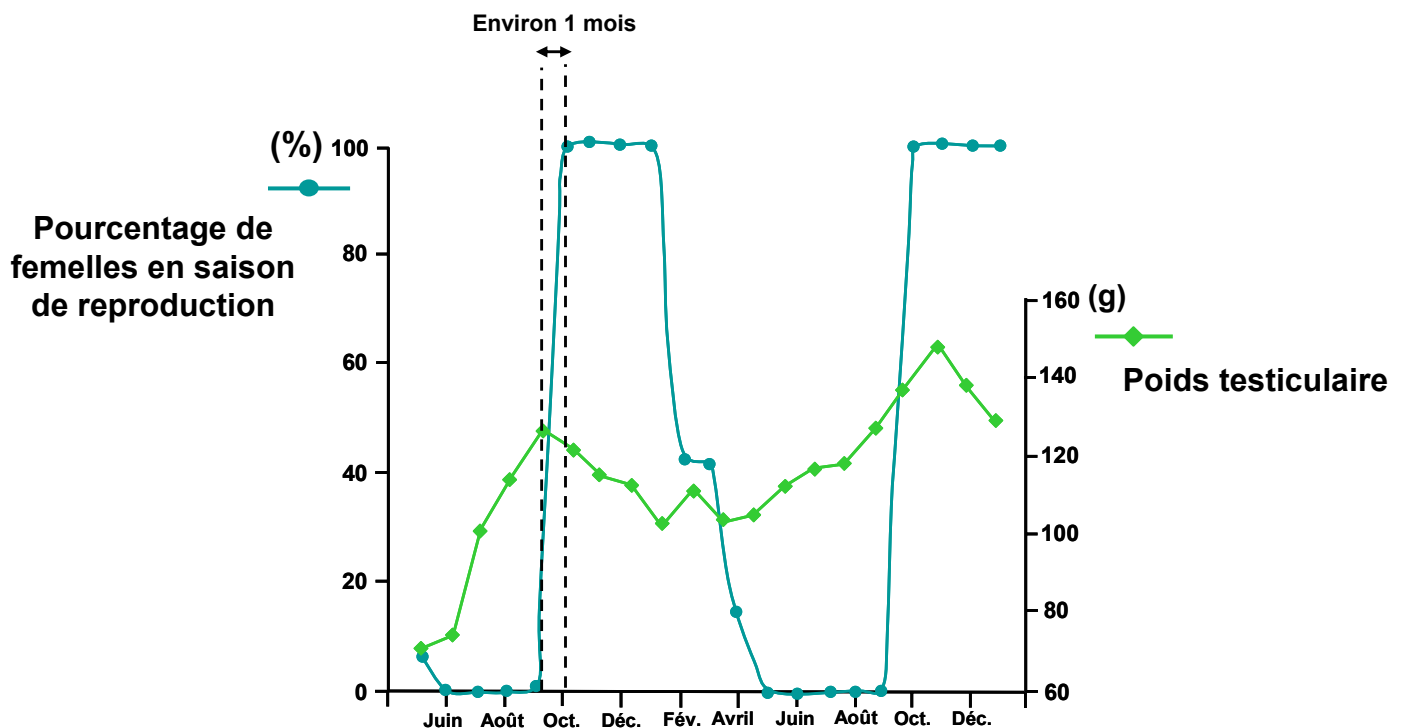


Figure 3: Profils saisonniers du poids testiculaire (courbe verte) chez le bouc et du pourcentage de chèvres en saison de reproduction (courbe bleue) chez la race alpine. Adaptés de (Delgadillo et Chemineau et al., 1992) et (Delgadillo et al., 1991).

saisonniers des rythmes ainsi que des niveaux de sécrétion des hormones gonadotropes, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH).

La variation de la durée du jour ou photopériode est un indicateur précis de la période de l'année pour l'organisme, et contrôle, en partie, la période de reproduction. L'utilisation de la photopériode comme un facteur prédictif de conditions environnementales favorables a été démontrée pour la première fois en 1932, chez le mulot, par Baker et Ramson (Baker and Ramsom, 1932). Les effets de la photopériode sur la fonction de reproduction de nombreux autres mammifères ont ensuite été plus largement étudiés. Chez les ovins, l'activité sexuelle présente un tel caractère saisonnier se manifestant par la succession annuelle de saisons de reproduction et de saisons de repos sexuel (Thimonier, 1989). Le mouton est un animal dit de « jours courts » et la saison de reproduction de la race Ile de France, une espèce très saisonnée, débute à la fin de l'été ou au début de l'automne quand la durée du jour diminue et se termine à la fin de l'hiver ou au début du printemps. Au cours de cette période d'activité sexuelle, les mâles montrent une augmentation de la production spermatique associée à une augmentation du volume testiculaire (Figure 2A) tandis que les femelles présentent une succession de cycles d'environ 17 jours constitués d'une phase folliculaire de 2 à 3 jours suivie d'une phase lutéale durant 14 à 16 jours (Figure 2B). Il existe un décalage temporel au niveau de la reprise de l'activité sexuelle qui débute un mois à un mois et demi plus tôt chez les mâles que les femelles (Lincoln and Short, 1980, Pelletier and Almeida, 1987) (Figure 3). Les six autres mois de l'année, les animaux présentent une inactivité sexuelle avec une absence de cycles ovariens chez la femelle et un volume testiculaire réduit chez le mâle. Cette pause physiologique qualifiée de saison d'anoestrus est associée à une absence de comportement sexuel (Thimonier and Mauléon, 1969, Goodman, 1994). Le mouton présente également des variations saisonnières de sécrétion de la prolactine dont les niveaux sont plus hauts en été qu'en hiver (Pelletier, 1973) cependant le début de la saison de reproduction serait

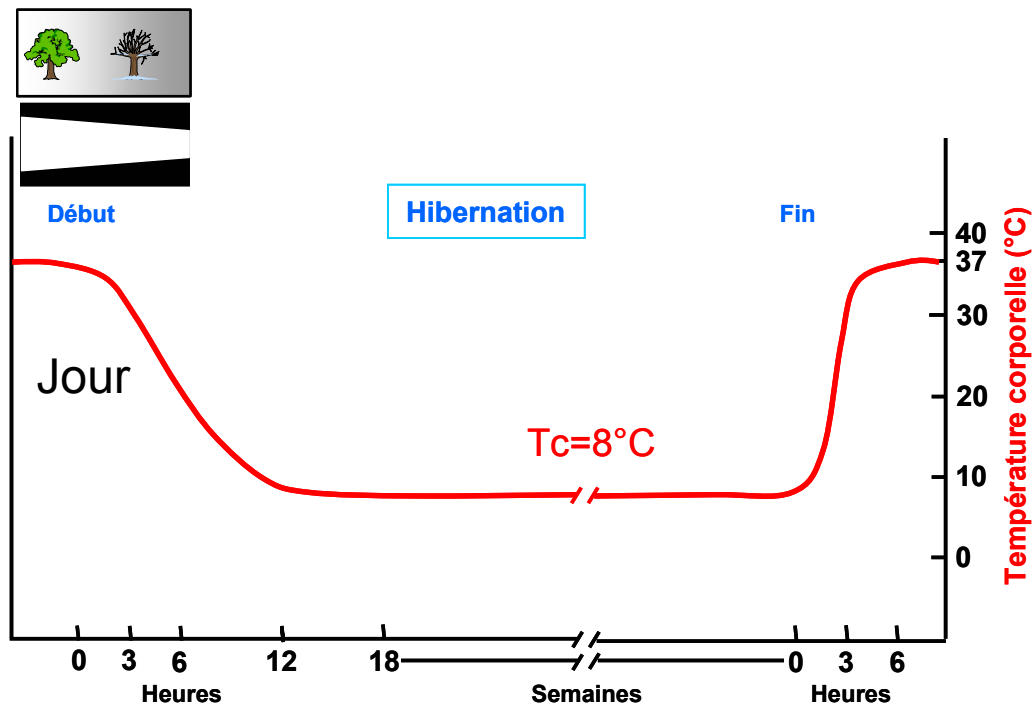
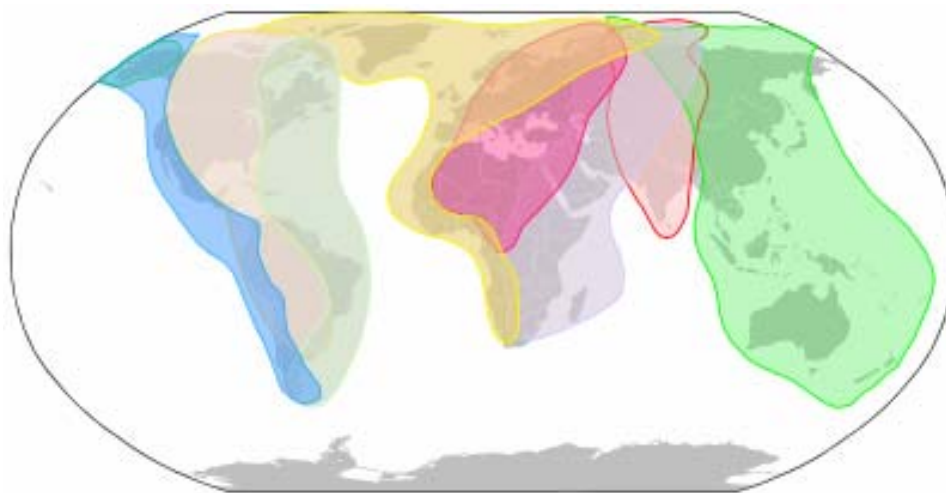


Figure 4: Courbe de la température corporelle moyenne de la marmotte entre le début et la fin de la période d'hibernation. L'entrée en hibernation est en partie sous le contrôle de la photopériode et est induite par la diminution de la durée du jour à la fin de l'été et au début de l'automne illustrée au dessus de la courbe. Adaptée de (<http://hibernation.free.fr/TPE/temperature.html>).



- | | |
|---|--|
| Pacifiques (ex: Le macareux fuligineux) | Méditerranée et Mer noire (ex: La grive mauvis) |
| Mississippi (ex: Le bécasseau Sanderling) | Ouest Asie et Afrique (ex: Le sterne) |
| Est Atlantique (ex: Le tournepierre à collier) | Asie centrale et Inde (ex: L'aigle de Pallas) |
| Ouest Atlantique (ex: L'hirondelle rustique) | Est Asie et Australie (ex: La bécassine des marais) |

Figure 5: Carte du monde représentant les principales voies migratoires empruntées par les oiseaux. D'après (Thompson D. and Byrkjedal, Shorebirds. Colin Baxter, 2001).

indépendant de la diminution des niveaux plasmatiques de la prolactine ((Thimonier et al., 1978, Worthy et al., 1985), voir la revue de (Curlewis, 1992)).

b) Les autres fonctions saisonnées

L'hibernation est sous le contrôle de l'horloge circannuelle et s'observe chez certaines espèces saisonnées telles que la marmotte ou l'écureuil terrestre doré (*Spermophilus lateralis*). Elle se définit par une modification temporaire de la température corporelle interne des animaux. En effet, ils passent d'une température du corps constante à une hypothermie réversible qui peut être proche de 0°C. Ce phénomène entraîne un état de torpeur qui peut se prolonger sur plusieurs semaines (Kortner and Geiser, 2000) (Figure 4).

Des mouvements de migration peuvent également exister chez certains oiseaux ou mammifères à une période bien spécifique de l'année. Ce comportement est sous l'influence de différents types de pression de sélection environnementale. Par exemple, de nombreux oiseaux migrent de la zone tempérée nord vers les régions tropicales sous l'effet des modifications du climat, de la température et de la photopériode (Cox, 1985) (Figure 5). La compétition intra et inter espèces ainsi que la présence de certains prédateurs ou parasites sont également des paramètres importants dans la migration comme cela a été démontré chez un passereau mâle, le bruant mélanocéphale (*Emberiza melanocephala*) (Misra et al., 2004).

c) Facteurs modulant ces fonctions

La photopériode est un bon indicateur de la période de l'année pour l'organisme permettant de moduler des fonctions autres que celle de reproduction. Des facteurs morphologiques tels que la masse corporelle, la couleur et les caractéristiques du pelage ou la croissance des cornes peuvent ainsi varier au cours de l'année. Les changements morphologiques annuels sont orchestrés par les hormones du système endocrinien qui

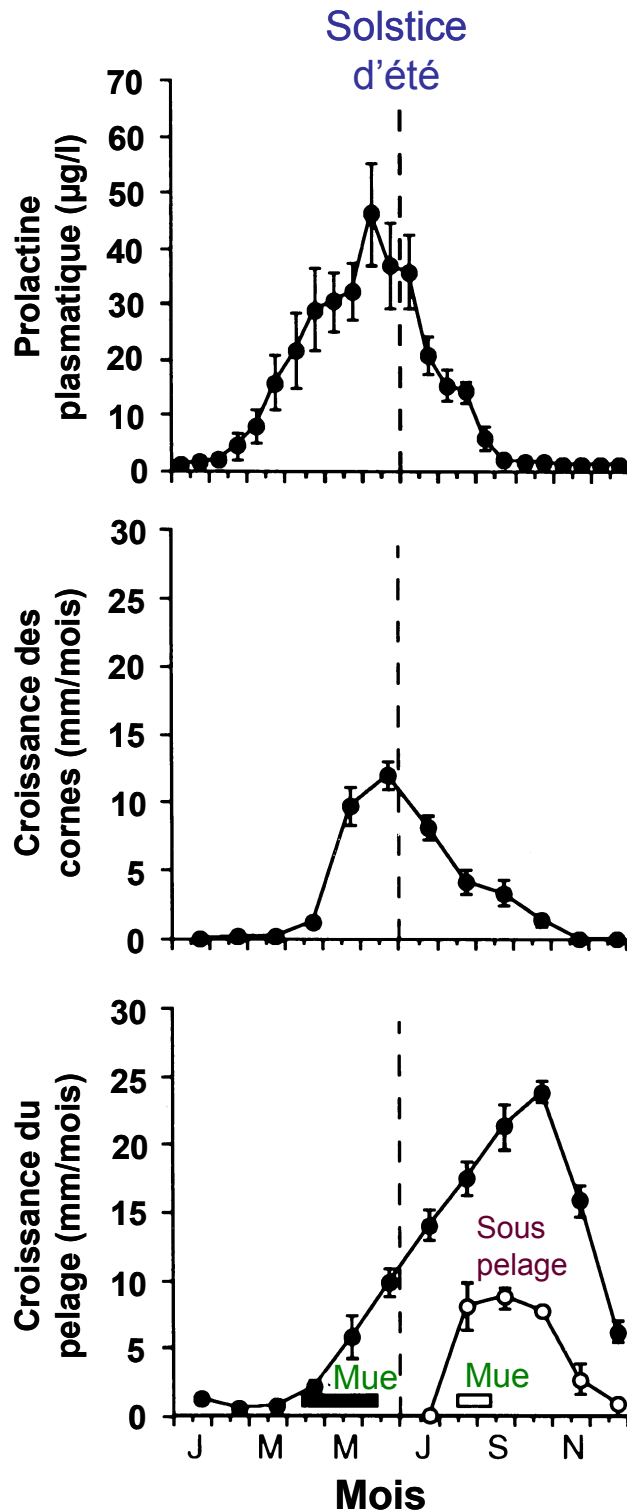


Figure 6: Cycle annuel de la concentration plasmatique de la prolactine ($\mu\text{g/l}$), de la croissance des cornes (mm/mois) et de la croissance du pelage (mm/mois) chez le mouflon mâle (*Ovis musimon*). Les moments des mues printanière (barre noire) et automnale (barre blanche) ainsi que la courbe représentant la croissance du sous pelage d'hiver (cercles blancs) sont illustrés sur la dernière courbe. Adaptée de (Lincoln, 1998).

présentent une sécrétion saisonnière (voir la revue de (Thiery et al., 2002)). La prolactine est un bon exemple de ces variations puisque les jours courts inhibent sa libération chez la brebis alors que les jours longs la stimulent (Thimonier et al., 1978). De plus, cette modulation photopériodique aurait un rôle dans les effets de la prolactine sur la croissance du pelage (Lincoln and Richardson, 1998). Une étude chez le mouflon a en effet permis de montrer que le pic de sécrétion de la prolactine du mois de juin a un effet stimulant sur la croissance du pelage et des cornes (Figure 6) (Lincoln, 1998).

La disponibilité des ressources alimentaires ainsi que la prise alimentaire sont des facteurs qui entrent aussi en ligne de compte chez les espèces hibernantes ou migrantes. En effet, il y a une réduction très marquée des dépenses énergétiques pendant la période d'hibernation, qui implique des modifications saisonnières sous le contrôle de l'horloge circannuelle de la prise alimentaire, du métabolisme et du dépôt de tri-acyl glycérol au niveau du tissu adipeux (Dark, 2005). Il a été également montré chez les ovins ou les cervidés, mammifères non hibernants, que la photopériode pouvait réguler la prise alimentaire de façon saisonnière avec un pic au milieu de l'été soit juste au début de la saison de reproduction (Brown et al., 1979, Loudon et al., 1989). Ces variations impliquent, entre autres, des modifications du contrôle hypothalamique de la prise alimentaire sous l'effet de la photopériode par l'intégration de signaux nutritionnels, endocrines, neuropeptidergiques et monoaminergiques (Morgan and Mercer, 1994).

2) Le rythme endogène circannuel

Un rythme circannuel a une période d'environ un an. Un rythme est défini comme circannuel et endogène à trois conditions. Le cycle doit persister pendant au moins 2 ans, en conditions expérimentales, en l'absence de toute information externe pouvant interférer avec la période du cycle, la période doit également être différente de 365 jours et enfin, parmi les

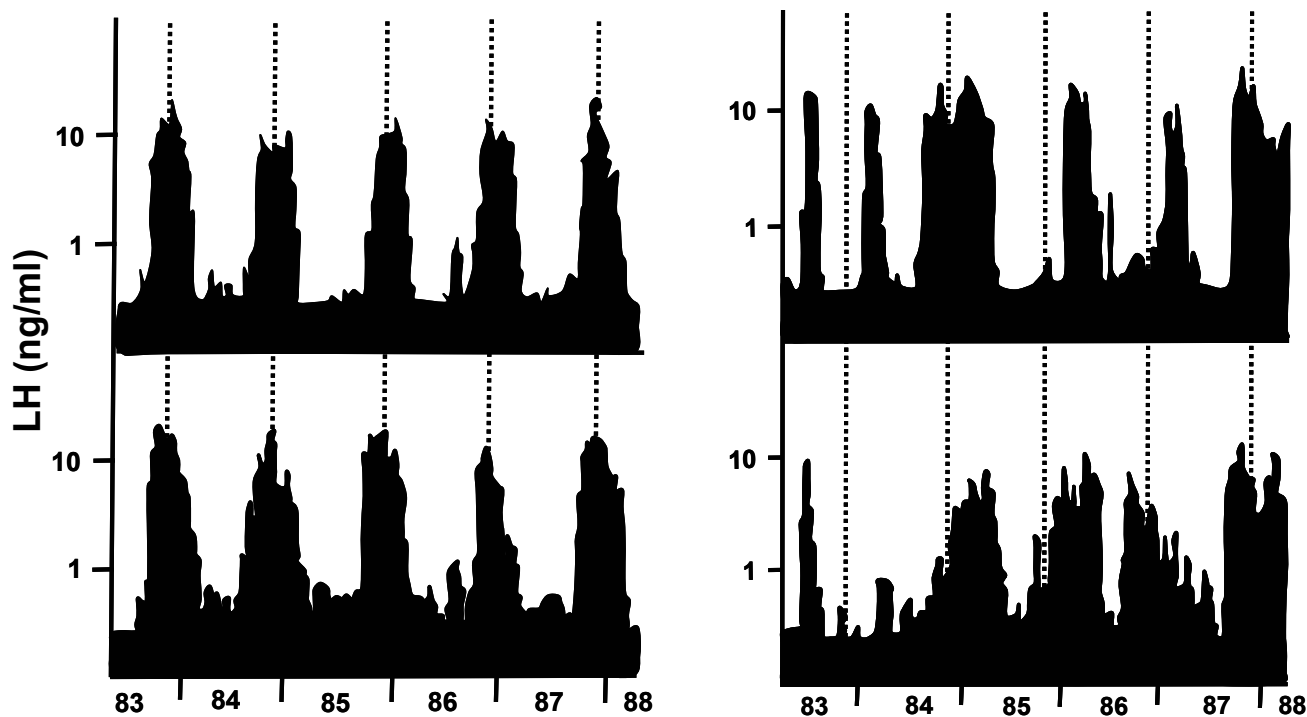


Figure 7: Variations des concentrations plasmatiques de LH pour deux brebis contrôles maintenues en photopériode naturelle (courbes de gauche) et deux brebis maintenues en jours courts constants (courbes de droite) pendant les cinq ans de l'expérimentation (1983-1988). Toutes les brebis sont ovariectomisées et traitées avec un implant d'E2. Adaptée de (Karsch et al., 1989).

animaux étudiés, il doit y avoir une désynchronisation des cycles individuels (Gwinner, 1986). L'existence d'un rythme endogène circannuel est évidente chez les espèces qui hibernent puisqu'elles sont capables de mesurer le temps qui passe en l'absence de toute information sur le moment de l'année. Les rythmes circannuels ont également été décrits chez de nombreuses espèces exposées à des photopériodes constantes afin d'empêcher la lecture de toute information extérieure pouvant indiquer le moment de l'année. Ainsi, des brebis maintenues en jours courts constants (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité) pendant cinq ans ont continué à présenter des cycles de sécrétion de LH élevée qui peuvent être rapprochés des périodes d'ovulation de brebis maintenues en photopériode naturelle ; cependant la période des cycles des animaux en condition artificielle était inférieure à un an et une forte désynchronisation de la sécrétion de LH entre les brebis était observée (Figure 7) (Karsch et al., 1989).

II) Le cycle oestrien

1) La gonadolibérine ou GnRH

a) Structure du peptide

Des études menées dans les années 70 ont permis d'isoler et de purifier la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) à partir d'hypothalamus de porc (Baba et al., 1971, Matsuo et al., 1971) et de mouton (Amoss et al., 1971). Schally a démontré que ce décapeptide est capable de stimuler la sécrétion de LH et de FSH à partir d'explants hypophysaires (Schally et al., 1971a). Cette activité a été confirmée chez de nombreuses espèces.

La séquence en acides aminés de la GnRH est fortement conservée et est presque identique chez tous les mammifères. La GnRH est constituée d'une pyroglutamine en N terminal et d'une glycine amidée en position C terminale : pEHWSYGLRPG-NH₂. Cette

structure a été considérée comme unique chez l'ensemble des vertébrés jusqu'en 1979, date à laquelle une forme différant d'un acide aminé en position 8 a été découverte chez le poulet (King and Millar, 1979, King and Millar, 1982, Miyamoto et al., 1982). A l'heure actuelle, quatorze formes de GnRH ont été découvertes chez les vertébrés. Quatre acides aminés en position 1, 4, 9 et 10 ainsi que les extrémités N et C terminales sont communs à toutes les formes de GnRH chez toutes les espèces. A l'aide du clonage et du séquençage, trois gènes paralogues de la GnRH nommés GnRH1, GnRH2 et GnRH3 dans la nomenclature universelle, ayant évolués à partir de la duplication d'un même gène de départ, ont été mis en évidence dans chez les vertébrés (White and Fernald, 1998, Fernald and White, 1999). Chez le mouton, seul la GnRH1 et la GnRH2 ont pour l'instant été isolées. La fonction de la GnRH2 est pour l'instant mal connue chez cette espèce. La forme GnRH1 dont la fonction sur la sécrétion des hormones gonadotropes est bien caractérisée sera simplement nommée GnRH dans la suite du manuscrit pour des raisons de simplification.

b) Les neurones à GnRH

Au cours du développement embryonnaire, les neurones à GnRH ont une origine extracérébrale puis ils migrent vers le cerveau où leur répartition est diffuse au niveau diencephalique à l'âge adulte. Chez l'humain, les neurones à GnRH ont été détectés principalement dans l'hypothalamus médiobasale (HMB) puis dans l'APO (King et al., 1985). Chez certains mammifères saisonnés (Jennes and Stumpf, 1980) ou non saisonnés (Witkin et al., 1982), les péricaryons des neurones à GnRH ont été observés dans des régions hypothalamiques telles que l'APO, la bande diagonale de Broca et l'AHA mais également dans les régions de l'olfaction comme le bulbe et le tubercule olfactifs, dans le septum, l'hippocampe antérieur et le cortex prépiriforme. Chez le mouton plus particulièrement, ces neurones sont localisés à 60% dans l'OVLTL et dans l'APO et une autre sous population qui

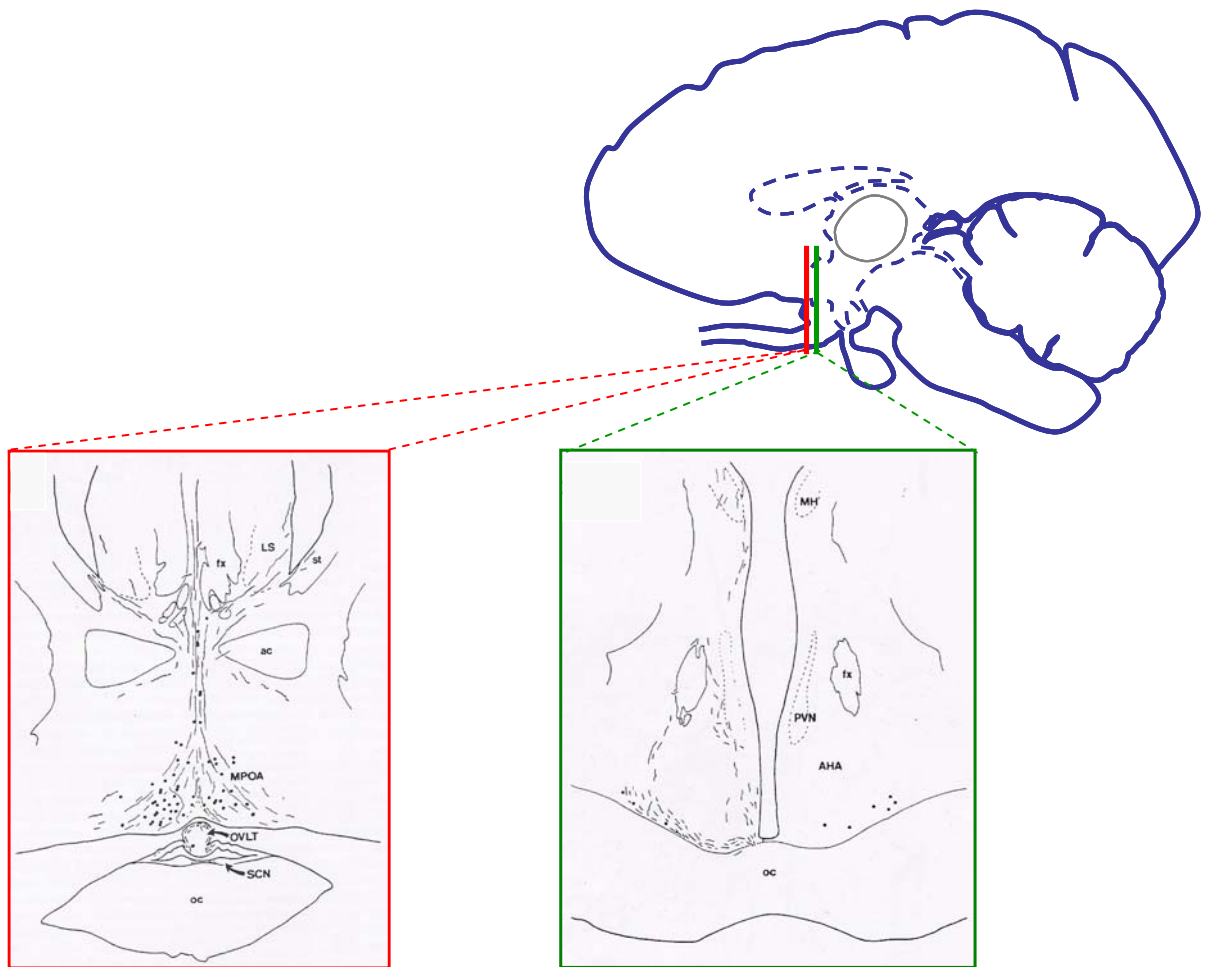


Figure 8: Coupe sagittale d'un cerveau de mouton localisant les deux coupes frontales où sont représentées la distribution des corps cellulaires des neurones à GnRH (cercles noirs) et des fibres à GnRH (traits fins noirs) au niveau de l'OVLT-APO (Encadré rouge) et de l'AHA (Encadré vert). Adaptée de (Lehman et al., 1986).

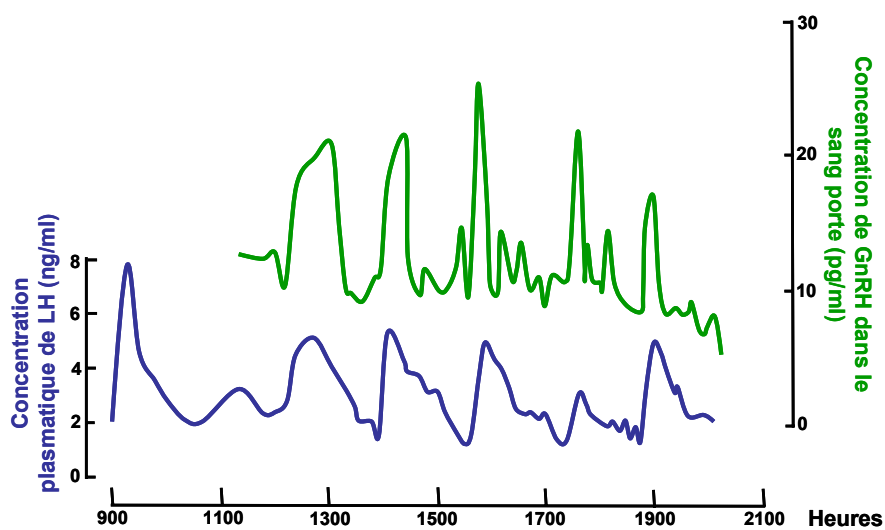


Figure 9: Profils simultanés de la sécrétion pulsatile de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire et de celle de LH dans le plasma chez la brebis ovariectomisée. D'après (Clarke et Cummins, 1982).

représente près de 40% est présente dans l'AVA. Seulement 1-2% des neurones à GnRH ont été retrouvés dans la région de l'ARC (Lehman et al., 1986) (Figure 8).

Ces neurones se projettent vers le système porte hypothalamo-hypophysaire où ils libèrent la GnRH (Merchenthaler et al., 1989). Les axones de ces neurones se terminent principalement dans la zone externe de l'éminence médiane (EM) où la GnRH est libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire pour aller stimuler les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure qui synthétisent et libèrent les hormones gonadotropes (Schally et al., 1971b). En dehors de l'EM et de la fonction de reproduction, des terminaisons sont retrouvées au niveau de l'organe voméronasal, de l'OVLN et à proximité de neurones à GnRH (Caldani et al., 1987).

La sécrétion de GnRH peut être mise en évidence par des prélèvements effectués dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, dans le Liquide Céphalo Rachidien (LCR) du troisième ventricule ou lors de la perfusion et du drainage du tissu de l'EM. Au niveau sanguin, sa sécrétion est pulsatile. Ces pulses de GnRH sont très brefs, sous forme de « vagues » dont la fréquence est en association étroite avec ceux de la LH hypophysaire (Figure 9) (Clarke and Cummins, 1982, Caraty and Locatelli, 1988, O'Byrne and Knobil, 1993). Chaque neurone possède une activité pulsatile endogène et la synchronisation de l'activité sécrétrice d'une partie ou de tous les neurones donne un pulse. Des études *in vitro* suggèrent que ces neurones acquièrent très tôt au cours du développement une pulsatilité endogène et une capacité à se synchroniser (Duittoz and Batailler, 2000) cependant le moment de l'apparition du caractère pulsatile de la libération de GnRH reste indéterminé.

2) Les hormones gonadotropes : LH et FSH

La synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes, LH et FSH, sont sous le contrôle de la libération, sous forme pulsatile, de la GnRH dans le système porte

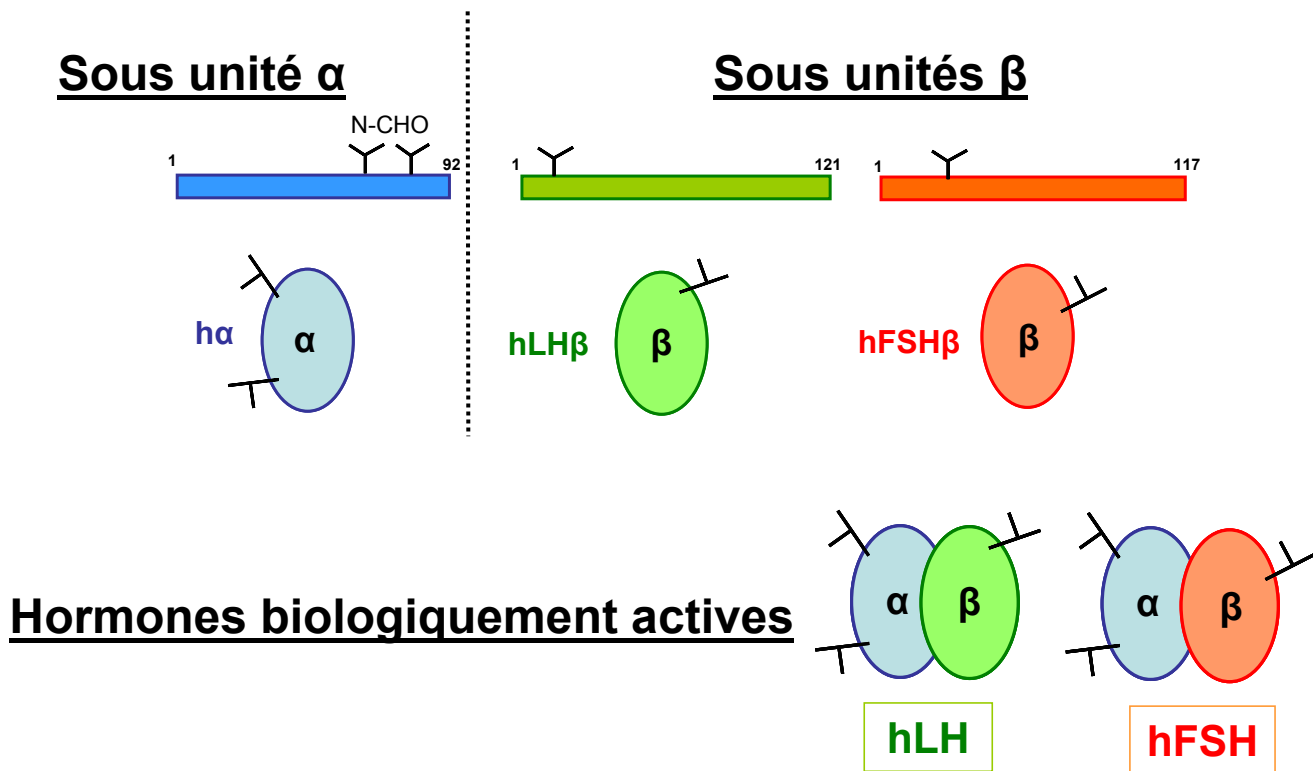


Figure 10: Structure des sous unités α et β des hormones gonadotropes humaines, hLH et hFSH. Seuls les hétérodimères $\alpha\beta$ associés de manière non covalente, présentent une activité biologique dont la spécificité dépend de la sous unité β . N-CHO: chaîne N-saccharidique portée par une asparagine (N) d'un site potentiel de glycosylation Asn-X-Ser/Thr. D'après (Combarrous, 2001).

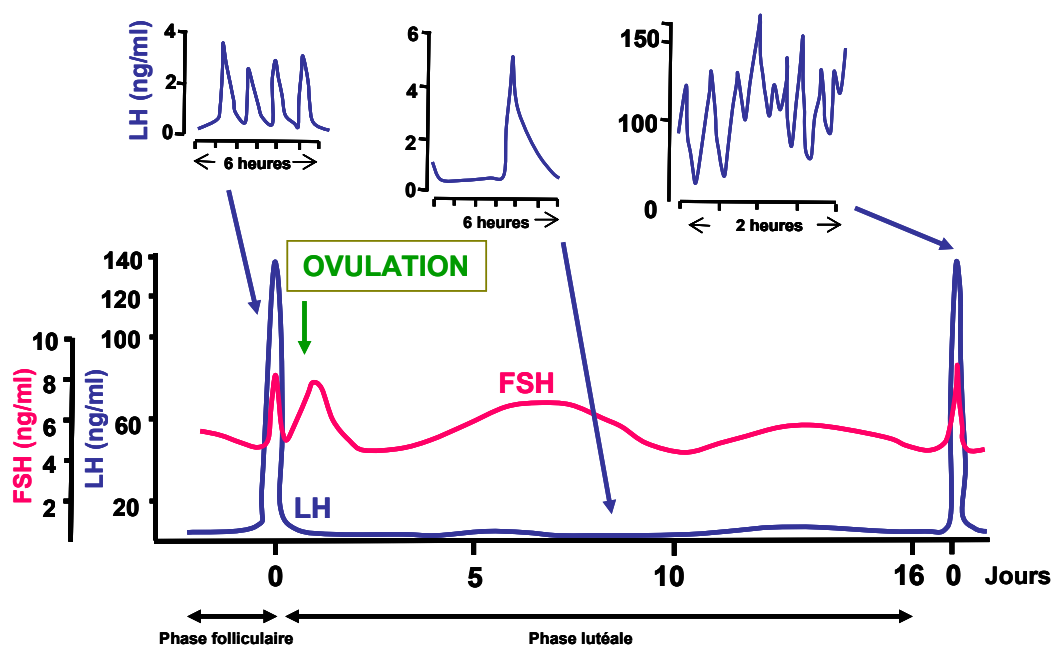


Figure 11: Evolution de la sécrétion des gonadotropines (LH et FSH) au cours du cycle sexuel de la brebis. D'après (Martin et Thiéry, 1987).

hypothalamo-hypophysaire. Ces deux hormones ont une action directe au niveau des gonades où elles modulent la stéroïdogénèse et la gamétogénèse. La LH et la FSH sont des glycoprotéines composées de deux sous unités, α et β (Figure 10). Dans une espèce donnée, la sous-unité α est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques et elle est le produit d'un même gène. A l'inverse, les sous unités β sont spécifiques de chaque hormone et sont codées par des gènes différents (Combarous, 2001) ce qui leur confèrent des propriétés biologiques et immunologiques spécifiques (Pierce and Parsons, 1981).

Les variations de sécrétion des hormones gonadotropes et notamment de la LH sont à l'origine des changements saisonniers de l'activité sexuelle (Karsch et al., 1984). En effet, la LH a la particularité d'être libérées sous forme pulsatile et la fréquence des pulses est variable entre la saison de repos sexuel et la saison de reproduction et entre les différentes étapes du cycle oestrien. D'autre part, les variations de la sécrétion de la LH au cours du cycle sont le reflet exact de celles de GnRH (Goodman, 1994). Lors d'un cycle oestrien, la phase lutéale caractérisée par la formation du corps jaune, est une période au cours de laquelle la pulsativité du GnRH et celle de LH sont très faibles (un pulse toutes les 4h) (Baird and Scaramuzzi, 1976). A ce stade, la libération de la FSH est plus ou moins régulière mais chaque « vague » de libération est suivie d'une phase de croissance folliculaire. Après la régression du corps jaune, la phase de croissance folliculaire est caractérisée tout d'abord par une augmentation progressive de la pulsativité de la sécrétion de GnRH/LH jusqu'à 1 à 2 pulses/h. Entre ces deux phases se produit l'ovulation au cours de laquelle le taux de base de la sécrétion de GnRH augmente pour donner un pic préovulatoire de GnRH qui induit un pic de LH et de FSH (Figure 11) (Thiery and Martin, 1991). Après l'ovulation, un second pic de FSH est observé induisant l'entrée en croissance d'une nouvelle vague folliculaire.

Au cours de la période de repos sexuel, la fréquence des pulses de GnRH et de LH est très faible ce qui ne permet pas l'installation des cycles oestriens et bloque la croissance folliculaire et donc l'ovulation.

3) Les hormones stéroïdiennes gonadiques

La progestérone et l'oestradiol (E2) sont deux stéroïdes sexuels produits au niveau de l'ovaire qui participent par des rétrocontrôles hypothalamiques et hypophysaires à la régulation de la sécrétion de GnRH puis de LH et FSH lors de la saison d'anoestrus et du cycle oestrien. La capacité de l'oestradiol à induire l'ovulation a été décrite pour la première fois en 1942 chez des brebis en anoestrus (Hammond, 1942). De nombreuses études ont ensuite mis en évidence le rôle prépondérant des stéroïdes sexuels dans le contrôle de la sécrétion de GnRH/LH.

a) Structure

Les stéroïdes sexuels, l'oestradiol, la progestérone et la testostérone chez le mâle, sont tous synthétisés à partir du cholestérol qui provient soit d'une synthèse locale par les cellules stéroïdogènes, soit est véhiculé sous la forme d'esters de cholestérol dans les cellules de la thèque et de la granulosa de l'ovaire et dans les cellules de Leydig du testicule (Baulieu et al., 1975). Lors de la première réaction commune à tous les stéroïdes, le cholestérol est converti en prégnénolone par le complexe enzymatique cytochrome P-450_{sc} (side-chain cleavage). A partir de la prégnénolone, trois voies de synthèse sont alors possibles. L'une mène directement à la synthèse de la progestérone avec l'intervention de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) et l'isomérase. La seconde voie aboutit *in fine* à la synthèse du cortisol avec l'activité successive de la 3 β -HSD/isomérase et de deux cytochromes P-450_{C21} et P-450_{C11}. Dans la troisième et dernière voie, la testostérone est obtenue après l'intervention

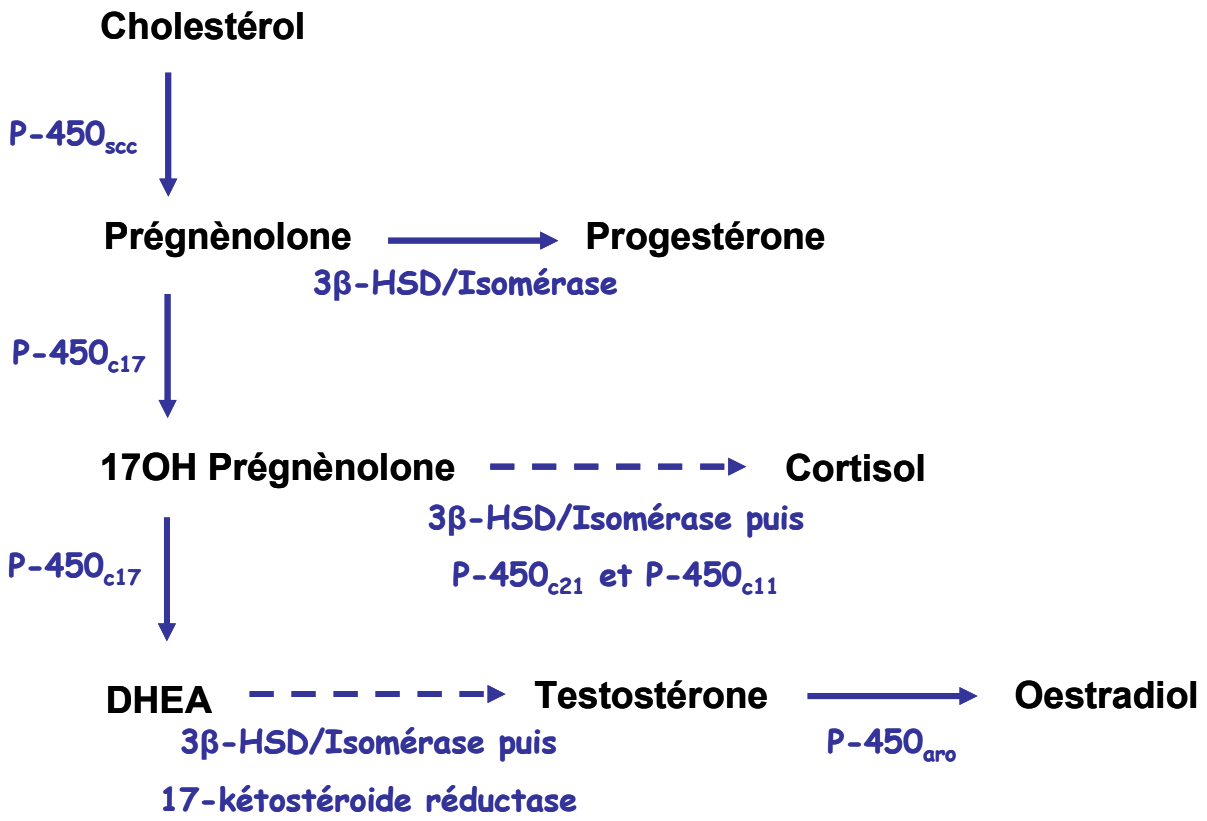


Figure 12: Principales voies de synthèse des hormones stéroïdiennes, en bleu les enzymes de synthèse. Adaptée de (Miller-WL, 1988).

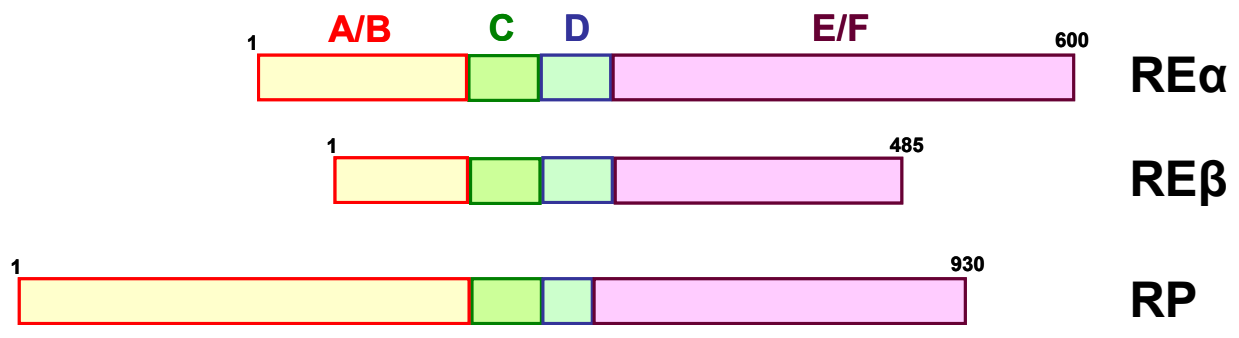


Figure 13: Schéma de la structure des récepteurs stéroïdiens nucléaires humains. D'après (Evans, 1988).

d'un second cytochrome, le P-450_{C17} (17 α -hydroxylase), de la 3 β -HSD accompagnée de l'isomérase puis de la 17-kétostéroïde réductase. Enfin, la conversion de la testostérone en oestradiol est assurée par le cytochrome P-450_{aro} (aromatase) (Figure 12) (Miller, 1988).

b) Localisation des récepteurs

Différents types de récepteurs aux hormones stéroïdes ont été identifiés. Jusqu'à peu, il était couramment admis que les récepteurs aux stéroïdes étaient des protéines solubles intracellulaires responsables de la reconnaissance et de la transduction du message hormonal (Figure 13). Au niveau structural, chaque récepteur de ce type est composé de différents domaines fonctionnels (A-F). Les régions A/B situées du côté N-terminal, variables selon le récepteur, permettent sa dimérisation. La région C, dont la composition est la plus constante parmi les récepteurs des stéroïdes gonadiques, assure la liaison du récepteur à l'ADN. Elle est suivie par la région D qui permet l'adressage des récepteurs. Les domaines E/F situés du côté C-terminal sont impliqués dans la liaison à l'hormone (Krust et al., 1986). Pour entrer dans la cellule cible, le stéroïde se lie au récepteur cytoplasmique et l'active. Puis le complexe Hormone-Récepteur est transféré dans le noyau pour activer la transcription de gènes spécifiques. Il a également été démontré que les récepteurs à l'oestradiol et à la progestérone peuvent être nucléaires en l'absence de l'hormone, résultat d'un équilibre dynamique entre le cytoplasme et le noyau (Guiochon-Mantel and Milgrom, 1993).

Deux types de récepteurs nucléaires aux oestrogènes (ER) ont été identifiés : ER α (Green et al., 1986, Greene et al., 1986) et ER β (Kuiper et al., 1996, Mosselman et al., 1996). Cependant les rôles de chacun des deux récepteurs par rapport à la régulation de la sécrétion de GnRH restent confus. Des études effectuées chez la brebis suggèrent que les ER α localisés dans l'HMB participent au rétrocontrôle positif de l'E2 au moment de la décharge préovulatoire de GnRH (Caraty et al., 1998). De plus, les ER α seraient nécessaires et

suffisants pour le rétrocontrôle positif de l'estradiol chez la souris puisque l'utilisation d'agonistes sélectifs des ER α génère un rétrocontrôle positif normal ce qui n'est pas le cas avec un agoniste des ER β (Hegele-Hartung et al., 2004, Wintermantel et al., 2006). Par contre, lors du rétrocontrôle négatif de l'E2 sur la sécrétion de GnRH, les rôles bien définis de chacun des récepteurs restent peu clairs chez l'ensemble des espèces. La présence de ER α serait un élément majeur puisque des souris invalidées pour ER α présentent des niveaux de LH similaires à des animaux ovariectomisés (Couse et al., 2003). A l'inverse, des souris invalidées pour ER β ne présentent pas de perturbations majeures de leur fonction de reproduction et ont des niveaux de LH normaux (Krege et al., 1998).

Des récepteurs transmembranaires de l'E2 ont aussi été mis en évidence récemment comme le GPR30, un récepteur couplé aux protéines G. Les effets du couple GPR30/E2 observés notamment dans les ovaires, l'endomètre et certaines modèles de cellules cancéreuses induisent une cascade de signalisation dite « non génomique » car ces effets de l'E2 ne font pas intervenir une cascade d'événements transcriptionnels (Filardo et al., 2000). L'ER-X, un autre récepteur membranaire fonctionnellement distinct de l'ER α , participerait à certaines cascades de signalisation cellulaire induite par l'E2 (Toran-Allerand, 2000).

Parmi les récepteurs à la progestérone (PR), il existe deux formes nucléaires majeures : l'isoforme B, le plus long (PRB) et la forme A, tronquée en N-terminal (PRA) (Conneely et al., 1987). S'ajoute à ces récepteurs nucléaires plusieurs formes membranaires initialement isolées et clonées chez les porcins puis chez de nombreuses espèces dont les ovins nommées mPR α , β et γ (Falkenstein et al., 1996, Ashley et al., 2006). Récemment, un autre isoforme a été identifié chez le poisson, le mPRcomponent1 (mPRc1) (Zhu et al., 2003).

Les distributions neuroanatomiques des ER et des PR ont été précisément décrites au moyen de techniques d'immunocytochimie dans l'encéphale ovin (Lehman et al., 1993, Skinner and Dufourny, 2005). Une accumulation dense de cellules immunoréactives pour

ER α a été mise en évidence au niveau de l'OVLT-APO. Puis de façon non exhaustive, la présence de récepteurs a été décrite dans de nombreuses régions de l'hypothalamus. Suivant un axe antéropostérieur, un nombre important de cellules a été retrouvé dans l'aire hypothalamique antérieure (AHA), quelques cellules sont présentes dans le noyau paraventriculaire (NPV), tandis qu'un nombre important de cellules localisées dans l'HVM et dans l'HDM entoure le fornix. Dans des régions plus postérieures, les ER α sont majoritairement présents en amas dans le noyau arqué (ARC) tandis que très peu de cellules marquées ont été retrouvées dans l'hypothalamus prémamillaire (HPM). Il faut noter que les ER α sont présents aussi dans des régions télencéphaliques telles que l'amygdale, l'hippocampe, le noyau du lit de la strie terminale et le septum latéral (Lehman et al., 1993). La distribution des ER β est également étendue dans la totalité du cerveau mais ils sont surtout nombreux dans des régions hypothalamiques. Au niveau rostral, les cellules portant des ER β sont observées au niveau de la bande diagonale de Broca, de l'OVLT et de l'APO médiane. Des noyaux fortement marqués sont également présents dans l'AHA, le NPV et l'ARC notamment dans la partie postérieure du noyau. Caudalement, les ER β sont trouvés dans des cellules de l'HDM et des aires latérales de l'hypothalamus (Skinner and Dufourny, 2005).

La distribution du GPR30 dans le cerveau des rongeurs est distincte de celle des ER classiques. Il a été mis en évidence dans le NPV et le noyau supraoptique de l'hypothalamus, dans le cortex, l'hippocampe, le locus coeruleus ainsi que dans les lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse (Hazell et al., 2009).

L'étude de la distribution des cellules immunoréactives pour les PR nucléaires a été réalisée récemment dans le cerveau ovin. La distribution s'étend de l'OVLT-POA à la région caudale de l'ARC. De nombreuses cellules marquées ont été observées dans la portion médiale et centrale de l'APO proche du troisième ventricule, au niveau de l'AHA et quelques cellules peu nombreuses sont localisées dans le NPV. Un continuum de cellules marquées

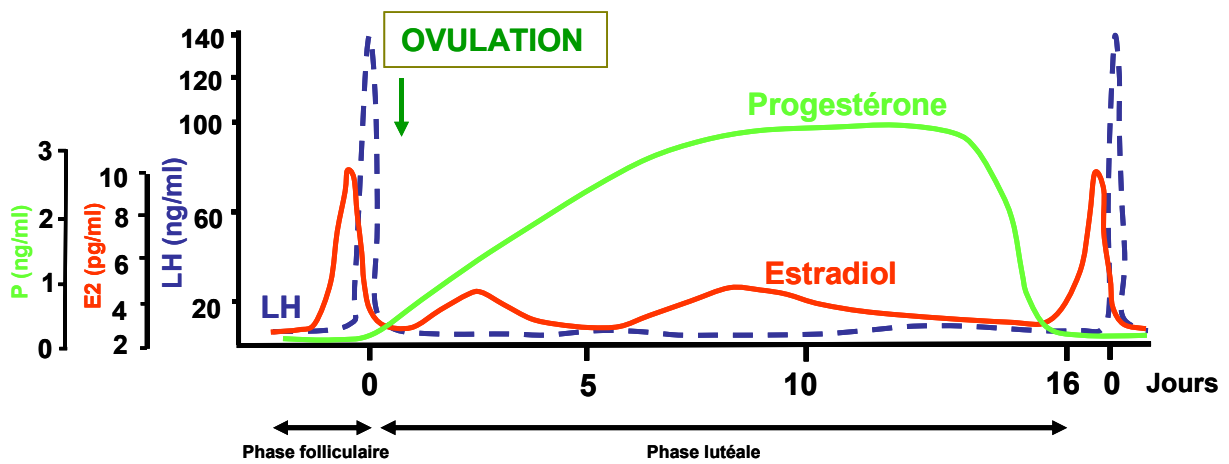


Figure 14: Evolution de la sécrétion des hormones stéroïdiennes (oestradiol et progestérone) au cours du cycle sexuel de la brebis. La courbe en pointillés représente la sécrétion de la LH. Adaptée de (Martin et Thiéry, 1987).

s'étend de la région médiale de l'HVM jusqu'au fornix. L'ARC présente également des cellules marquées à travers son étendue antéro-postérieure bien que très peu de récepteurs soient détectés dans la portion caudale de l'ARC et dans l'HPM (Skinner et al., 2001).

c) Contrôle de la sécrétion de GnRH/LH

Depuis plus de 30 ans, la réponse variable et saisonnière au rétrocontrôle négatif de l'E2 de l'axe hypothalamo-hypophysaire est bien connue (Legan et al., 1977).

Pendant la saison de reproduction, lorsque le rétrocontrôle négatif de l'E2 est faible, les niveaux de sécrétion du stéroïde ne sont pas suffisants pour inhiber la sécrétion de GnRH et de LH. En phase lutéale, la progestérone sécrétée par le corps jaune exerce une action inhibitrice sur la sécrétion de GnRH/LH (Hauger et al., 1977, Karsch et al., 1977). L'E2 potentialise ce rétrocontrôle négatif de la progestérone en permettant la synthèse des PR (Goodman et al., 1980, Caraty and Skinner, 1999) en particulier dans les neurones à opiacés qui sont impliqués dans le contrôle de la sécrétion de GnRH (Goodman et al., 2002). La chute de la concentration de progestérone avec la régression du corps jaune va permettre l'augmentation des niveaux de sécrétion de GnRH/LH ce qui conduit à une stimulation de la production d'E2 par les follicules : la phase folliculaire débute. L'E2 va alors exercer un rétrocontrôle positif qui se traduit par un pic massif de libération de GnRH. Cette augmentation de la sécrétion de GnRH induit une décharge préovulatoire des gonadotropines, LH et FSH (Karsch et al., 1984). Ce rétrocontrôle positif de l'oestradiol est facilité également par l'imprégnation à la progestérone lors de la phase lutéale (Caraty and Skinner, 1999) (Figure 14).

Le passage en saison d'anoestrus a lieu lorsque la sensibilité à l'E2 de l'axe hypothalamo-hypophysaire augmente. La quantité d'E2 produite par les follicules à chaque décharge préovulatoire devient alors suffisamment élevée pour inhiber la sécrétion de LH. A

ce stade, l'E2 exerce un rétrocontrôle négatif maximal sur la sécrétion de GnRH et donc de LH, les ovulations cessent, la saison d'anoestrus s'installe et se poursuit jusqu'à ce que l'axe hypothalamo-hypophysaire devienne de nouveau insensible à cette action inhibitrice de l'E2 lors de la saison de reproduction suivante (Legan et al., 1977).

4) Les neuromédiateurs clés de cette fonction

Les neurones à GnRH sont connus depuis longtemps comme ne possédant pas ou très peu de récepteurs ER α (Herbison et al., 1993), ni de PR (Skinner et al., 2001). Cependant, 50% de ces neurones sont porteurs de récepteurs ER β chez l'ovine (Skinner and Dufourny, 2005) ainsi que chez les rongeurs (Hrabovszky et al., 2000, Legan and Tsai, 2003). Par conséquent, l'action des hormones stéroïdiennes sur la sécrétion de GnRH s'exerce principalement de façon indirecte via l'intervention de neurones présentant différents phénotypes (Caraty and Skinner, 1999). Une grande quantité de neuromédiateurs ont été montrés comme étant impliqués dans le contrôle de la sécrétion et de la libération de GnRH. Ces populations neuromodulatrices ont toute la particularité de porter des ER α et d'avoir des afférences au niveau des neurones à GnRH.

Il ne faut pas écarter l'existence d'une régulation autocrine de l'activité des neurones à GnRH par des afférences à GnRH puisque 10% des synapses à la surface des neurones à GnRH proviennent de terminaisons à GnRH (Leranth et al., 1985, Pelletier, 1987) et des récepteurs à GnRH ont été retrouvés au niveau des membranes (Todman et al., 2005).

a) Les peptides amidés : kisspeptide et RFRP

(i) Les kisspeptines

Les kisspeptines (Kiss) ont été découvertes en 2001 et sont codées par le gène *Kiss-1* (Kotani et al., 2001). Leur importance pour l'activité de reproduction a été mise en évidence

de façon indirecte chez l'homme et la souris. Des patients montrant des troubles du développement pubertaire et un hypogonadisme prononcé possédaient en effet des mutations ou des délétions du gène codant pour le récepteur orphelin couplé aux protéines G, le GPR54. Ce récepteur a été identifié comme le récepteur pour le Kiss (Lee et al., 1999, de Roux et al., 2003, Seminara et al., 2003). Il a également été démontré, chez l'homme (Dhillon et al., 2005), la ratte (Matsui et al., 2004) et la brebis (Caraty et al., 2007), que l'administration exogène de Kiss par voie centrale ou périphérique entraîne une augmentation rapide des niveaux plasmatiques de LH et de FSH chez l'adulte. Ces effets du Kiss sur la LH sont transmis en partie par les neurones à GnRH qui expriment le GPR54 (Irwig et al., 2004). Les neurones Kiss expriment les ER α et les PR et l'expression du peptide est négativement régulée par ces stéroïdes ce qui suggère une forte implication du Kiss sur le rétrocontrôle négatif des stéroïdes sur la sécrétion de GnRH (Franceschini et al., 2006, Smith et al., 2007). Le couple Kiss-GPR54 semble aussi essentiel à la maturation pubertaire puisque le Kiss est capable d'initier la puberté chez des animaux prépubères en intervenant notamment sur la sécrétion de LH (Han et al., 2005, Shahab et al., 2005).

Deux populations majeures de neurones Kiss ont été décrites dans le diencephale des mammifères. Chez l'ovine, des cellules sont présentes dans l'APO et dans l'ARC principalement dans la portion caudale du noyau (Franceschini et al., 2006).

(ii) Les RFRP

A l'inverse du Kiss, un peptide hypothalamique inhibiteur de la libération des gonadotropines nommé Gonadotropin Inhibitory Hormone (GnIH) a été découvert pour la première fois chez la caille japonaise (Tsutsui et al., 2000). Chez les mammifères, les amphibiens et les poissons, des orthologues du gène codant pour le GnIH ont ensuite été mis en évidence. Chez les mammifères, deux peptides issus de ce gène sont appelés les RFamide-

related peptides (RFRP): RFRP-1 et RFRP-3 (Fukusumi et al., 2006). Les effets des RFRP sur la synthèse et la sécrétion des gonadotropines chez les rongeurs sont similaires à ceux observés chez les oiseaux. L'administration en périphérie de RFRP-3 induit une diminution des niveaux plasmatiques de LH (Johnson et al., 2007). De plus, l'administration intracérébroventriculaire de GnIH chez le hamster Syrien est également associée à une chute importante des niveaux plasmatiques de LH pouvant atteindre 80% (Kriegsfeld et al., 2006). Néanmoins, ces résultats doivent être nuancés puisqu'une autre étude a mis en évidence une inhibition de l'expression de RFRP chez le hamster Syrien et Sibérien mâle soumis à une photopériode courte chez lesquels ce traitement inhibite l'activité sexuelle (Revel et al., 2008). Une étude récente suggère que, chez le hamster, le RFRP-3 aurait une action stimulatrice sur la fonction de reproduction de ces animaux via une stimulation sur les neurones Kiss de l'ARC (Simonneaux et al., 2009a).

Quarante pourcents des neurones RFRP exprimerait des ER α et des variations de l'expression du gène RFRP existeraient au cours du cycle oestrien chez le hamster Syrien (Kriegsfeld et al., 2006, Gibson et al., 2008). Cependant, RFRP-3 ne semble pas capable d'influencer la puberté comme peut le faire le Kiss (Johnson et al., 2007). D'un point de vue neuroanatomique, les corps cellulaires des neurones à GnIH sont localisés dans le NPV chez les oiseaux (Ukena et al., 2003) tandis que chez les mammifères et notamment chez les rongeurs, les somas à RFRP-3 sont retrouvés principalement dans l'HDM (Kriegsfeld et al., 2006).

Des variations saisonnières des niveaux d'expression de ces peptides et des interactions entre les neurones à GnRH d'une part, et les terminaisons à Kiss ou à RFRP-3, d'autre part, ont été observées chez la brebis. Durant la saison de reproduction des niveaux élevés d'expression du Kiss ont été mesurés ainsi qu'un nombre plus grand de contacts entre les terminaisons à Kiss et les neurones GnRH. Durant la saison d'anoestrus, les brebis ont au

contraire montré une élévation de la synthèse de RFRP-3 et une augmentation des appositions synthétisant ce peptide sur les corps cellulaires à GnRH (Smith et al., 2008).

b) Les opiacés

Les peptides opiacés endogènes la β -endorphine (β -END), l'enképhaline et la dynorphine peuvent se lier à trois types de récepteurs : μ , δ et κ . Ces peptides sont impliqués dans la régulation de la pulsativité de la sécrétion de GnRH et des fibres immunoréactives pour la β -END et la dynorphine ont été détectées au contact des neurones à GnRH chez le rat (Chen et al., 1989), le singe (Thind and Goldsmith, 1988) et la brebis (Goodman et al., 2004). Jusqu'à peu, seules des analyses électrophysiologiques avaient pu détecter l'activité du récepteur μ sur les neurones à GnRH (Lagrange et al., 1995). La présence de récepteurs de type δ a été récemment observée dans un modèle de culture cellulaire de neurones à GnRH (Pimpinelli et al., 2006) et la présence du récepteur de type μ a également été détectée sur les neurones à GnRH de l'APO par immunocytochimie (Zheng et al., 2005).

D'un point de vue physiologique, la dynorphine serait un médiateur du rétrocontrôle négatif de la progestérone pendant le cycle oestrien (Horton et al., 1989, Goodman et al., 2004) tandis que la β -END serait plutôt impliquée dans les mécanismes d'action de l'E2 et de la progestérone au moment de la décharge préovulatoire de GnRH/LH (Goodman et al., 2004). L'injection d'un antagoniste non sélectif du type de récepteur aux opioïdes, le naloxone, active transitoirement la sécrétion de LH chez de nombreuses espèces telles que le mouton (Brooks et al., 1986, Lincoln et al., 1987), le cheval (Aurich et al., 1994a, Aurich et al., 1994b) et le hamster Syrien (Chen et al., 1984). Cette réponse est dépendante de la présence des stéroïdes gonadiques. La β -END aurait également un effet suppresseur sur l'expression du gène de la GnRH ainsi que sur celle de son récepteur ; son action sur l'expression du gène du

récepteur serait spécifique de la région hypothalamique concernée (Ciechanowska et al., 2008).

L'activité des opiacés sur la sécrétion de LH serait également influencée par les variations de la photopériode. En effet, dans l'espèce équine, l'activité inhibitrice des opiacés est plus importante en saison d'anestrus que pendant la saison de reproduction (Aurich et al., 1994b). Chez l'ovine, l'augmentation de l'expression de la pro-opiomélanocortine, le précurseur de la β -END, est observée lors des jours courts (Hileman et al., 1998). Ce phénomène peut s'expliquer, en partie, par l'existence d'une interaction entre deux systèmes inhibiteurs, le système dopaminergique et le système opiacé, au cours de la régulation photopériodique de la sécrétion des gonadotropines (Tortonese, 1999). En effet, dans ce modèle, la dopamine et les opiacés sont capables d'inhiber directement la libération de GnRH/LH mais le réseau à dopamine inhibe également le système aux opiacés et cette régulation est dépendante du type de photopériode.

c) La dopamine

La détection des neurones à dopamine dans le noyau A15 est réalisée par le marquage de la première enzyme dans la voie de la synthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase (TH). De nombreuses études démontrent que le noyau dopaminergique du noyau A15 est un des modulateurs de l'effet de la photopériode sur la reproduction ovine qui agit en inhibant la pulsativité de la LH en jours longs sous l'influence stimulatrice de l'E2 (Thiery et al., 1989, Havern et al., 1994). En effet, les neurones dopaminergiques du noyau A15 sont activés en réponse à l'E2 uniquement pendant la saison de repos sexuel (Thiery et al., 1995, Lehman et al., 1996). Cet effet de l'E2 est indirect puisque les cellules dopaminergiques du noyau A15 ne contiennent pas de ER α (Skinner and Herbison, 1997), ni de ER β (Lubbers et al., 1999).

L'utilisation de traceurs rétrogrades a permis de mettre en évidence des afférences au contact des neurones dopaminergiques du noyau A15 en provenance du l'APO ventromédiale (Coolen et al., 1999, Cutter et al., 2001). Ces neurones dopaminergiques du noyau A15 se projettent probablement au niveau de l'EM au contact des terminaisons à GnRH où la dopamine pourrait inhiber la libération de la GnRH mais la relation exacte n'est pas établie (Gayrard et al., 1995). De même, l'existence de projections directes ou indirectes des cellules à dopamine vers les corps cellulaires des neurones à GnRH reste controversée (Jansen et al., 1999). Il semble que les neurones à dopamine agiraient indirectement sur les neurones à GnRH via la population des neurones Kiss de l'ARC qui expriment des récepteurs à la dopamine de type D2 (Hileman et al., 2009).

Indépendamment de l'oestradiol, la photopériode module l'activité de la TH présente dans les terminaisons à dopamine de l'EM chez la brebis. Un traitement lumineux mimant les jours courts induit une diminution importante de l'activité TH et des niveaux de dopamine au niveau de l'EM (Thiery and Martin, 1991, Viguie et al., 1996). Cet effet de la photopériode sur le système dopaminergique de l'EM passerait par l'action de la mélatonine. La stimulation de la sécrétion de LH sous l'effet d'un implant sous-cutané de mélatonine est associée à une réduction de l'activité TH dans l'EM (Viguie et al., 1997). L'effet de la photopériode sur l'activité TH de l'EM est indépendante de l'oestradiol car il est similaire entre des brebis ovariectomisées (OVX) et des brebis OVX traitées avec de l'E2 (Viguie et al., 1996).

d) Les autres médiateurs impliqués

Le neuropeptide Y (NPY), un peptide de 36 acides aminés, est un régulateur cérébral majeur de différentes fonctions parmi lesquelles la reproduction et la prise alimentaire. Chez le rat, son action spécifique est sous la dépendance du statut endocrinien de l'animal. En effet,

le NPY stimule la libération de GnRH en présence d'oestradiol et à l'inverse a une action inhibitrice en l'absence de ce stéroïde (Kalra et al., 1992).

Chez la brebis, le rôle de ce neuropeptide sur la sécrétion de GnRH est beaucoup moins clair. Tout d'abord, les neurones sécrétant le NPY sont localisés dans la région de l'ARC. Une augmentation de l'expression du NPY a été mesurée lors de la phase préovulatoire du cycle oestrien ce qui suggère une participation de ce neuropeptide à la décharge préovulatoire de GnRH/LH (Polkowska et al., 2006). Des fibres terminales provenant de neurones à NPY ont également été observées sur les péricaryons de neurones à GnRH (Norgren and Lehman, 1989) et au niveau de l'EM. Le nombre de contacts avec la population caudale des neurones à GnRH est également supérieur pendant la saison de reproduction chez la brebis (Jansen et al., 2003). Le rôle du NPY sur la libération de GnRH dépendrait des phases du cycle oestrien. En effet, le NPY libéré au niveau de l'EM pourrait participer au contrôle de la libération de GnRH/LH durant la phase folliculaire (Advis et al., 2003) alors que les niveaux élevés de NPY, observés lors de la phase lutéale, bloqueraient la décharge préovulatoire de GnRH/LH (Estrada et al., 2006).

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux central (SNC) chez l'adulte. Les neurones GABA ont été mis en évidence dans plusieurs régions hypothalamiques (Vincent et al., 1982) et notamment au niveau de l'APO où ces neurones sont capables d'influencer l'activité des neurones à GnRH (Herbison et al., 1991, Herbison and Dyer, 1991). De plus, 40% de neurones GABAergiques de l'APO contiennent des ER α permettant ainsi le relais des informations hormonales aux neurones à GnRH (Herbison et al., 1993). Le GABA est capable de se lier à deux types de récepteurs, GABA_A et GABA_B. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de chaque type de récepteurs a permis de mettre en évidence un rôle important du récepteur de type A dans le rétrocontrôle négatif de l'E2 sur la sécrétion de GnRH/LH pendant la saison de reproduction

chez des brebis OVX (Scott and Clarke, 1993b), tandis que le récepteur de type B serait plutôt impliqué dans la régulation de la sécrétion de GnRH durant la saison d'anoestrus chez des brebis OVX et traitées avec de l'E2 (Scott and Clarke, 1993a). De plus, des afférences GABAergiques sont présentes au contact des neurones dopaminergiques du noyau A15 ce qui ferait du GABA un bon candidat pour relayer les effets inhibiteur de l'E2 sur la sécrétion de GnRH en saison d'anoestrus (Bogusz et al., 2008).

La somatostatine a été initialement décrite comme un facteur contrôlant la libération de l'hormone de croissance et existe sous deux formes actives produites par clivage alternatif d'une pré-protéine, une forme de 14 acides aminés et une seconde de 28 acides aminés. Le précurseur de la préprosomatostatine, a été localisé par hybridation *in-situ* dans le NPV et l'HVM (Bruneau and Tillet, 1998). Les neurones à somatostatine contiennent des ER α et se projettent vers l'APO (Goubillon et al., 1999). Cette population de neurones est un autre candidat potentiel pour relayer l'effet inhibiteur de l'E2 sur la sécrétion de GnRH. En effet, un traitement à l'E2 chez des brebis OVX a augmenté de 50% l'expression de la somatostatine dans l'HVM. De plus, l'injection intracérébroventriculaire (*icv*) de somatostatine a aboli la pulsativité de la LH et diminué le niveau de la sécrétion basale de LH (Pillon et al., 2004).

Le monoxyde d'azote est un neurotransmetteur gazeux qui diffuse localement après sa synthèse par la synthétase du monoxyde d'azote (NOS). Le monoxyde d'azote est donc un bon candidat pour relayer les effets des stéroïdes sur les neurones à GnRH. Chez le rat, ce neurotransmetteur serait impliqué dans le rétrocontrôle négatif de l'E2 sur la sécrétion de GnRH (Brann et al., 1997, Herbison, 1998) et le monoxyde d'azote produit par les cellules endothéliales de l'EM pourrait promouvoir la libération de GnRH (De Seranno et al., 2004). Chez la brebis, l'enzyme de synthèse est présente dans l'HPM (Sliwowska et al., 2004) et une partie des neurones répondant à l'E2 dans l'APO contiennent de la NOS (Dufourny and

Skinner, 2002). De plus, le monoxyde d'azote de l'APO ventromédial joue un rôle dans la diminution de la sécrétion de LH durant l'anoestrus saisonnier (McManus et al., 2007).

III) Le cycle saisonnier de la reproduction

1) La mélatonine

La mélatonine est une hormone qui a été découverte par Lerner et ses collaborateurs en 1958 à partir de glandes pinéales bovines (Lerner et al., 1958). Sa première fonction physiologique identifiée a consisté en un éclaircissement de la pigmentation de la peau de grenouilles, de crapauds et de certains poissons d'où son nom « mélatonine » (McCord and Allen, 1917). La glande pinéale est la source principale, au niveau cérébral, de mélatonine dont la particularité est d'être sécrétée uniquement pendant la nuit. La durée de sécrétion de cette hormone est le parfait reflet des variations de la photopériode et constitue un repère physiologique du moment de l'année pour l'organisme.

a) Voie de synthèse

La glande pinéale est constituée de pinéalocytes, unités cellulaires dont la fonction première est la sécrétion de la mélatonine (Reiter, 1981, Korf et al., 1998). Au niveau du pinéalocyte, la voie de biosynthèse de la mélatonine débute avec le tryptophane qui est transformé en sérotonine par deux activités enzymatiques successives. La tryptophane hydroxylase intervient en premier pour donner le 5-hydroxytryptophane. Puis la 5-hydroxytryptophane décarboxylase permet d'obtenir la sérotonine. Même si la synthèse de sérotonine est constitutive, les concentrations de sérotonine sont plus hautes pendant le jour que pendant la nuit. Ceci s'explique par le fait qu'au niveau de la glande pinéale, elle est transformée en mélatonine pendant la nuit suite à l'intervention de deux autres enzymes. En effet, ce neuropeptide est acétylé en N-acétylsérotonine par l'enzyme Arylalkylamine N-

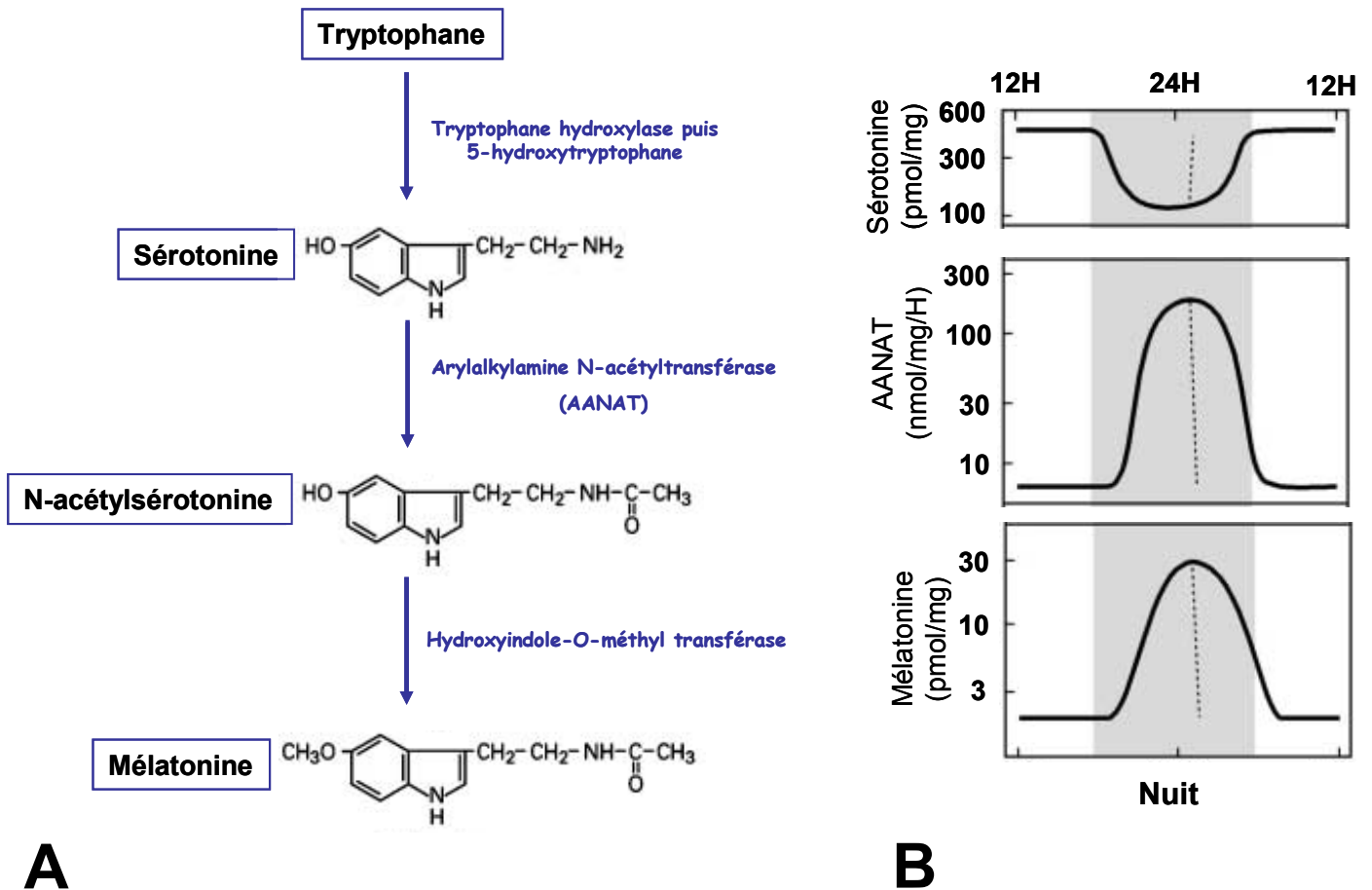


Figure 15: (A) Voie de synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale de rat, en bleu les enzymes de synthèse. (B) Variations circadiennes des taux de sérotonine, de mélatonine et rythme circadien d'activité de l'AANAT. Adaptée de (Klein, 1974).

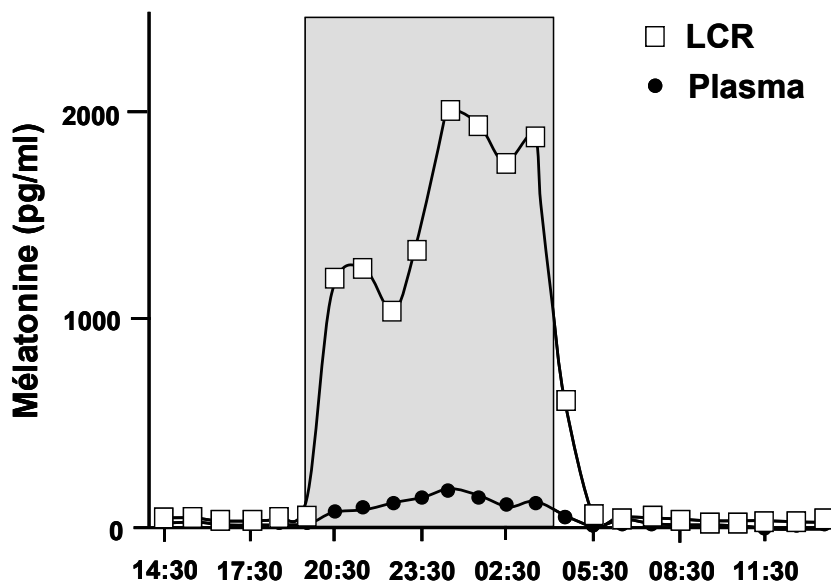


Figure 16: Concentrations moyennes de mélatonine détectable dans le LCR du troisième ventricule et dans le plasma jugulaire de la brebis. L'aire grise représente la période d'obscurité de 8 heures. D'après (Skinner et Malpaux, 1999).

acétyltransférase dont l'activité est maximale pendant la nuit. Cette étape est limitante pour la synthèse de mélatonine au niveau transcriptionnel chez les rongeurs et au niveau post-traductionnel chez les ongulés et les primates puis participe aux variations nyctémérales de la sécrétion de mélatonine. Puis l'hydroxyindole-O-méthyl transférase catalyse la formation de mélatonine en effectuant une O-méthylation (Figure 15) (Simonneaux and Ribelayga, 2003). Une fois synthétisée, la mélatonine, qui est une molécule lipophile, n'est pas stockée dans les pinéaloctes mais est libérée immédiatement dans l'espace interstitiel.

b) Mode de sécrétion et métabolisme

Quelque soit l'espèce animale considérée, le profil de sécrétion de la mélatonine est corrélé à la durée du jour et constitue un signal de nuit (Arendt, 1988) (Figure 16). Même si la durée de sécrétion de la mélatonine correspond à la durée de la nuit chez l'ensemble des espèces, le profil de sécrétion pendant la phase d'obscurité, et notamment le temps nécessaire pour atteindre une concentration plasmatique de mélatonine maximale, varie selon les espèces. En effet, le temps entre l'extinction de la lumière et l'augmentation de la sécrétion de la mélatonine peut aller de quelques minutes chez le mouton (Karsch et al., 1984) à plusieurs heures chez les rongeurs (Arendt, 1986, Arendt et al., 1995) (Figure 17).

La mélatonine est synthétisée et sécrétée par la glande pinéale lors de la phase d'obscurité puis elle est libérée dans la circulation sanguine et dans le LCR du troisième ventricule. Chez le mouton, (Reiter, 1991), les niveaux nocturnes plasmatiques de l'hormone atteignent 100 à 300 pg/ml (Skinner and Malpoux, 1999). Une concentration 20 fois plus grande de mélatonine a été mesurée dans le LCR du troisième ventricule où l'hormone atteint des niveaux de l'ordre de 2000 à 5000 pg/ml (Skinner and Malpoux, 1999). La libération de mélatonine de la glande pinéale directement dans le LCR ventriculaire se fait via le récessus pinéalien (Tricoire et al., 2002) (Figure 18).

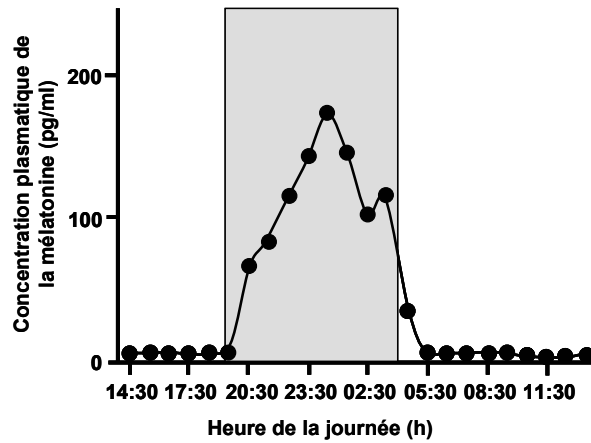
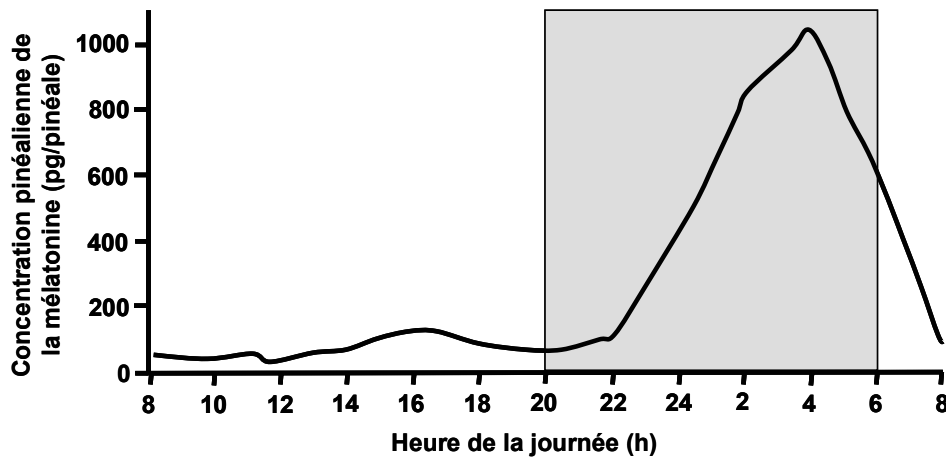
A**B**

Figure 17: (A) Concentration plasmatique moyenne de la mélatonine chez la brebis soumise à 16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité. Adapté de (Skinner & Malpoux, 1999). (B) Courbe individuelle de la concentration de la mélatonine dans la pinéale chez le hamster doré soumis à 14 heures de lumière, 10 heures d'obscurité. Adaptée de (Arendt, 1986).

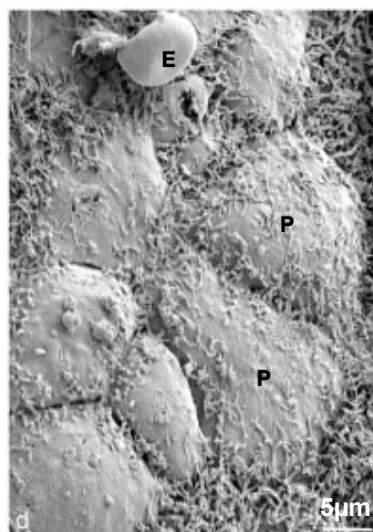


Figure 18: Photographie obtenue en microscopie électronique à balayage de pinéaloctes (P) bordant le récessus pinéalien. E, érythrocytes. D'après (Tricoire et al., 2003).

Une fois libérée dans la circulation sanguine et dans le LCR, la mélatonine est progressivement éliminée. Sa demi-vie plasmatique est par exemple de 10 à 60 minutes chez l'homme (Waldhauser et al., 1984) et de 10 à 30 minutes chez le mouton (Ravault and Chesneau, 1999). En périphérie, 90% de la mélatonine est métabolisée en 6-hydroxymélatonine par le foie et/ou le rein (Arendt et al., 1995). Au niveau central, elle est transformée en N-acétyl-N-2-formyl-5-méthoxykinurénamine puis en N-acétyl-5-méthoxykinurénamine (Hirata et al., 1974).

c) Les récepteurs à la mélatonine

Les récepteurs à la mélatonine sont au nombre de quatre. Il existe trois récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G appelés Mel1a ou MT1, Mel1b ou MT2 et Mel1c. Ce sont des sites de liaison à haute affinité pour la mélatonine (Nonno et al., 2000). MT1 et MT2 ont été identifiés, dans un premier temps, dans le cerveau du rat (Vanecek et al., 1987) puis ont été clonés chez les mammifères (Reppert et al., 1994, Reppert et al., 1995). MT1 et MT2 présentent 60% d'identité de leur séquence en acides aminés (Masana and Dubocovich, 2001). Le troisième sous type, Mel1c a été cloné uniquement chez les oiseaux (Liu et al., 1995), les poissons (Mazurais et al., 1999) et le xénope (Ebisawa et al., 1994) mais pas chez les mammifères. Cependant, une étude phylogénétique a montré que le récepteur orphelin GPR50, identifié chez les mammifères et apparenté à la famille des récepteurs à la mélatonine, serait le récepteur orthologue de Mel1c (Dufourny et al., 2008a), bien que le GPR50 ai perdu au cours de l'évolution sa capacité à lier la mélatonine. Un quatrième type de récepteur à la mélatonine, le MT3, a été purifié à partir de tissu rénal de hamster Syrien. Cette protéine présente 95% d'identité avec la quinone réductase de type 2, une enzyme impliquée dans la détoxification des cellules (Li et al., 1995, Nosjean et al., 2000).

Le MT3 n'appartient pas à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Mailliet et al., 2005) et la mélatonine présente une basse affinité pour ce dernier (Nosjean et al., 2000).

La technique de liaison avec la 2-¹²⁵I-mélatonine, un ligand non spécifique d'un sous-type de récepteur, et celle d'hybridation *in situ* ont permis de localiser MT1 et MT2 au niveau tissulaire et cellulaire (Vanecek et al., 1987, Gauer et al., 1998, Klosen et al., 2002). Il faut noter que la nature et le nombre des structures possédant l'un ou l'autre type de récepteurs varient considérablement d'une espèce à une autre. Chez l'ovine, le marquage le plus intense est obtenu dans la pars tuberalis (PT) (Morgan and Mercer, 1994). Un marquage d'intensité plus faible est également observé au niveau de l'HPM (Malpaux et al., 1998). Par l'insertion de microimplants de mélatonine chez des brebis en repos sexuel, il a été démontré que l'HPM est la région où la mélatonine agit pour synchroniser la reproduction (Malpaux et al., 1998). Cette localisation tissulaire de MT1 et MT2 a été confirmée par PCR quantitative en temps réel après leur clonage chez les ovins et leur expression semble varier entre différents temps du jour et de la nuit (Coge et al., 2009).

L'expression du GPR50 a été mise en évidence au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse notamment chez le mouton (Drew et al., 1998). Chez le hamster Sibérien, le *wwGPR50* est exprimé au niveau des tanocytes, épendymocytes spécialisés de la base du troisième ventricule. Leur synthèse est dépendante de la photopériode avec des taux de GPR50 plus faibles pendant les jours courts (Barrett et al., 2006).

2) Le rôle des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle clé dans le développement (traité dans le chapitre C), la croissance, le métabolisme ainsi que dans l'expression des événements neuroendocriniens qui participent à la rythmicité saisonnière de la fonction de reproduction.

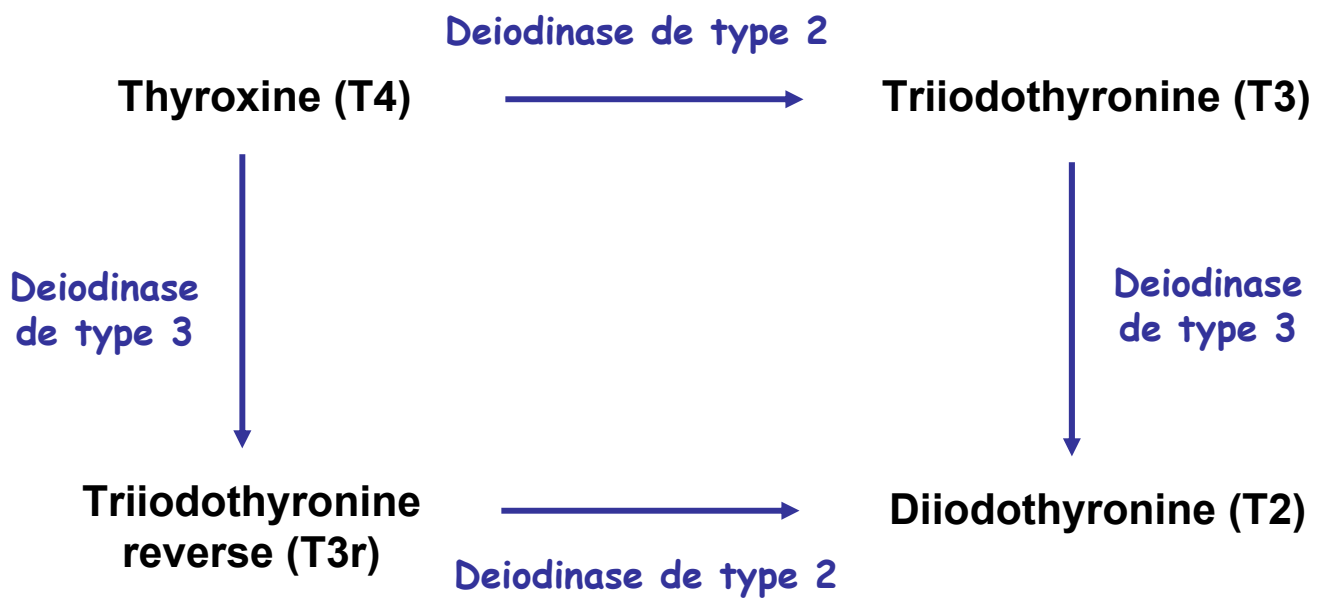


Figure 19: Métabolisme enzymatique des hormones thyroïdiennes, en bleu les enzymes de synthèse. D'après (Morgan et Hazlerigg, 2008).

a) Structure et mode de libération

Les hormones thyroïdiennes sont synthétisées par la glande thyroïde, puis libérées dans la circulation périphérique où elles sont transportées en étant liées à des protéines de transport telles que l'albumine et la transthyrétine. La Triiodothyronine (T3) est la forme biologiquement active mais l'essentiel (40 fois plus) des hormones thyroïdiennes est libéré sous la forme de thyroxine (T4) (Yen, 2001). Dans le cerveau, la T3 est issue de la conversion de la T4, forme biologiquement inactive de l'hormone, par l'enzyme déiodinase de type 2 (Dio2). La T3 peut également être catalysée en diiodothyronine (T2) par l'enzyme déiodinase de type 3 (Dio3). Puis, la Dio3 régule le passage de la T4 en T3 reverse et la Dio2 convertit la T3 reverse en T2 (figure 19) (voir les revues de (Bianco et al., 2002, Morgan and Hazlerigg, 2008)). Dio2 et Dio3 sont exprimées dans les cellules épendymaires du troisième ventricule, notamment au niveau des tanycytes, chez le hamster Sibérien (Tu et al., 1997). La Dio2 a également été observée au niveau des astrocytes, mais pas des neurones, dans certaines régions hypothalamiques telles que l'ARC (Fekete et al., 2000, Diano et al., 2003). La T3 formée se lie et active des récepteurs thyroïdiens localisés dans les noyaux de cellules gliales ou de neurones localisés dans différentes régions cérébrales (Bradley et al., 1992).

b) Action et transport cérébral

Pour atteindre le cerveau, la T4 synthétisée par la glande thyroïde doit traverser la barrière hémato-encéphalique (passage du sang vers le tissu cérébral) ou les plexus choroïdes (passage du sang vers le LCR). Cette dernière voie demeurerait majoritaire (Dratman et al., 1991, Chanoine et al., 1992). En dépit de leur nature lipophile, le transport des hormones thyroïdiennes requiert l'utilisation de transporteurs actifs pour traverser les membranes cellulaires (Pardridge and Mietus, 1980, Jansen et al., 2005). Les plexus choroïdes synthétisent et libèrent un transporteur, la transthyrétine, dans le LCR ce qui facilite la

distribution de l'hormone à tout le cerveau (Southwell et al., 1993, Chen et al., 2006). Plusieurs transporteurs peuvent intervenir mais il semble que les polypeptides transportant les anions organiques (OATP) et la famille des transporteurs de monocarboxylate (MCT) seraient parmi les plus importants (Jansen et al., 2005). Un membre de la famille des OATP, OATP1C1, est largement distribué dans le cerveau et présente une haute affinité pour la T3 et la T4 (Pizzagalli et al., 2002) cependant la fonction exacte de ce transporteur dans la régulation de la T3 reste peu connue. Le MCT8 aurait aussi un rôle important dans le transport central des hormones thyroïdes. Il est fortement exprimé dans le SNC et notamment dans les neurones et dans les tanocytes exprimant la Dio2 (Heuer et al., 2005, Herwig et al., 2009).

c) Variations saisonnières et photopériode

Les hormones thyroïdiennes sont connues, depuis les années 30, pour être impliquées dans la rythmicité saisonnière de la fonction de reproduction. Dès 1940, l'équipe de Woitkewitsch découvre, chez l'étourneau (*Sturnus vulgaris*), que la thyroïdectomie empêche la diminution de l'activité testiculaire et prolonge indéfiniment la saison de reproduction (Woitkewitsch, 1940). Par la suite, chez des espèces d'oiseaux telles que la caille japonaise ou chez des mammifères comme la brebis, de nombreuses études ont montré que ces hormones participent plus particulièrement à l'arrêt de la période de reproduction saisonnière (Peczely et al., 1980, Nicholls et al., 1988).

Chez la brebis, l'action inhibitrice des hormones thyroïdiennes sur l'axe reproducteur montre une rythmicité saisonnière (Thrun et al., 1996). Il existe une fenêtre temporelle critique située entre décembre et juin pendant laquelle un apport d'hormone thyroïdienne à des animaux thyroïdectomisés permet de restaurer un passage en anoestrus saisonnier (Billings et al., 2002). L'action des hormones thyroïdiennes pour promouvoir le passage en

anoestrus (Moenter et al., 1991, Webster et al., 1991) s'effectue principalement au niveau de la région ventromédiale de l'APO et dans la région de l'HPM (Anderson et al., 2003), qui contiennent des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Jansen et al., 1997).

L'implication directe de la photopériode dans l'activité saisonnière des hormones thyroïdiennes n'a pas été démontrée chez la brebis cependant des études effectuées chez d'autres espèces saisonnées ont amené quelques éléments. Le passage d'un traitement lumineux de jours courts à un traitement de jours longs, qui stimule l'activité reproductrice de la caille, a été associé à une augmentation de l'expression de la Dio2 dans l'HMB et à une augmentation locale de la T3 (Yoshimura et al., 2003, Yasuo et al., 2005). Des résultats similaires ont été observés chez le hamster Djungarian (*Phodopus sungorus*), chez lequel la reproduction a lieu pendant les jours longs, où l'expression de la Dio2 est inhibée par des jours courts (Watanabe et al., 2004). L'action de la photopériode sur la Dio2 serait régulée par la mélatonine chez les hamsters Djungarian et Syrien (Watanabe et al., 2004, Revel et al., 2006b). L'expression de la Dio2 dans l'HMB est inhibée pendant les jours longs chez le bouc (Yasuo et al., 2006), un animal de jours courts, alors que le phénomène inverse se produit chez le bélier (Hanon et al., 2008).

3) La voie de la pars tuberalis

Les mécanismes moléculaires permettant l'intégration du message photopériodique au niveau du SNC pour le contrôle de la reproduction saisonnée ne sont pas entièrement caractérisés. Des études récentes ont mis en évidence l'importance toute particulière de la PT en tant que site d'entrée de l'information lumineuse codée par la mélatonine au niveau cérébral pour induire une régulation de l'expression de la Dio2 dans l'HMB aussi bien chez les oiseaux que chez les mammifères.

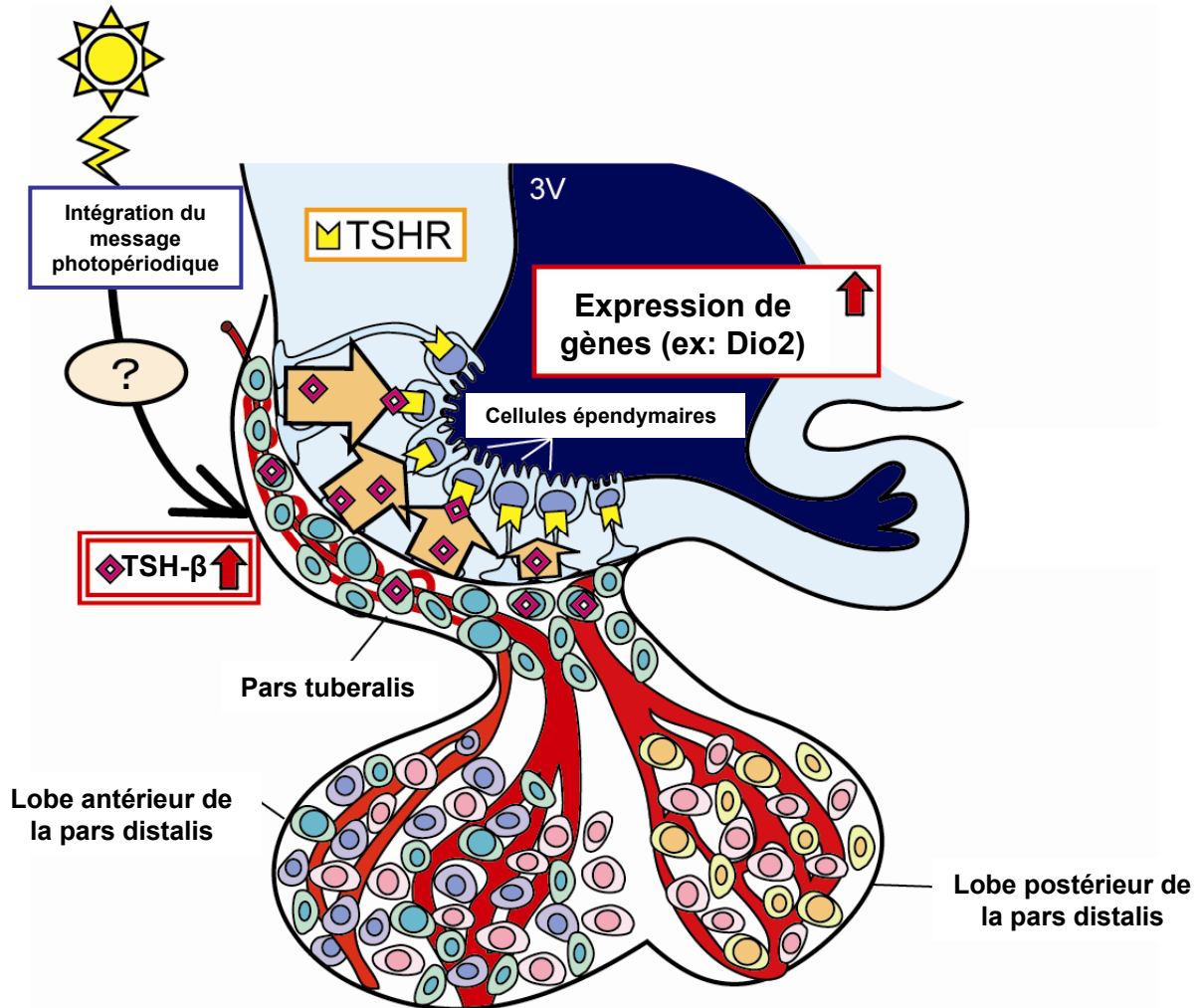


Figure 20: Modèle des mécanismes de lecture « du temps photopériodique » chez les oiseaux. L'information lumineuse de type jours longs, reçue au niveau du cerveau, induit une augmentation de l'expression de la TSH- β dans la pars tuberalis. La TSH- β va ensuite agir sur ses récepteurs (TSHR) localisés dans les cellules épendymaires de la paroi du troisième ventricule (3V) afin d'activer l'expression de gènes parmi lesquels celui de la déiodinase de type 2 (Dio2). D'après (Nakao et al., 2008).

a) Chez les oiseaux

En se basant sur leurs travaux réalisés chez la caille japonaise, Nakao et son équipe ont récemment proposé un mécanisme de lecture du « temps photopériodique » qui implique un facteur exprimé par la PT, la thyrotrophine ou thyroid stimulating hormone β (TSH- β) (Nakao et al., 2008). Cette hormone est libérée par les cellules de la PT après stimulation par la mélatonine. Elle agirait ensuite au niveau hypothalamique afin de stimuler la synthèse de la Dio2. Les mécanismes par lesquels la TSH- β passerait de la PT au contact des tanocytes exprimant le récepteur de cette TSH- β et la Dio 2 ne sont pas encore élucidés mais pourraient impliquer une captation de la TSH- β par les pieds de ces mêmes tanocytes (Figure 20).

b) Chez les mammifères

La PT est considérée, chez les mammifères, comme une région cible de la mélatonine pour une transmission du message photopériodique au réseau neuroendocrine (Morgan and Williams, 1996, Wittkowski et al., 1999). Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans cette fonction sont peu clairs et deux modèles coexistent jusqu'à maintenant.

Lincoln et ses collaborateurs ont proposé récemment que la PT chez le mouton pourrait être le « pacemaker » circannuel de la sécrétion saisonnière de la prolactine grâce à des mécanismes n'impliquant pas l'hypothalamus (Lincoln and Clarke, 1994, Lincoln and Clarke, 1995, Lincoln et al., 2006). Dans ce premier modèle, le signal mélatoninergique est intégré par la PT qui sécrète de la TSH- β laquelle stimule, comme chez les oiseaux, la synthèse de la Dio2.

Dans le second modèle, l'action hypothalamique de la mélatonine serait le moteur du contrôle saisonnier de la reproduction. Des expérimentations de lésions ou de pose d'implants effectuées chez le hamster ou le mouton suggèrent en effet que la mélatonine contrôle les

changements saisonniers notamment celles liées au rythme saisonnier de reproduction par l'intermédiaire de régions hypothalamiques telles que l'HDM, l'HVM, l'HPM et l'ARC (Lincoln and Maeda, 1992, Malpaux et al., 1995, Maywood et al., 1996, Malpaux et al., 1998). Dans ce second modèle, les régions cibles de l'hypothalamus relaient les effets de la mélatonine à l'hypophyse via la PT, tandis que la PT contrôle en parallèle les niveaux plasmatiques saisonniers de la prolactine.

B) La plasticité dans le système nerveux central

I) Définitions et fonctions

1) Le concept de « Plasticité structurale »

Le concept de plasticité a été suggéré, pour la première fois, par Cajal à la fin du 19ème siècle. En 1894, il suggère que l'intelligence se manifesterait par de la plasticité neuronale dans le cerveau et considère que la rétraction et la croissance des prolongements cellulaires est impliquée dans les activités intellectuelles, durant l'apprentissage et le sommeil (Cajal, 1913-14). Lors d'études beaucoup plus récentes, l'existence de remodelages morphologiques et fonctionnels des circuit neuronaux a été définie plus précisément comme la capacité du SNC à induire des modifications adaptées qui sont en relation avec la structure et la fonction de la région concernée (Bloom, 1985). La plasticité structurale est dite « spontanée » lorsqu'elle se produit dans des conditions physiologiques normales comme durant le développement ou dans certains états physiologiques à l'âge adulte, et, est dite « induite » sous l'effet d'une lésion, d'un stress ou d'un agent pharmacologique.

Deux types de plasticité structurale peuvent être décrites au cours de la vie. L'une se produit au cours du développement. Elle est fondamentale pour la construction du SNC et se caractérise par une augmentation importante du nombre de synapses (Missler et al., 1993) et des branches axonales (Portera-Cailliau et al., 2005) aboutissant *in fine* à la stabilisation des

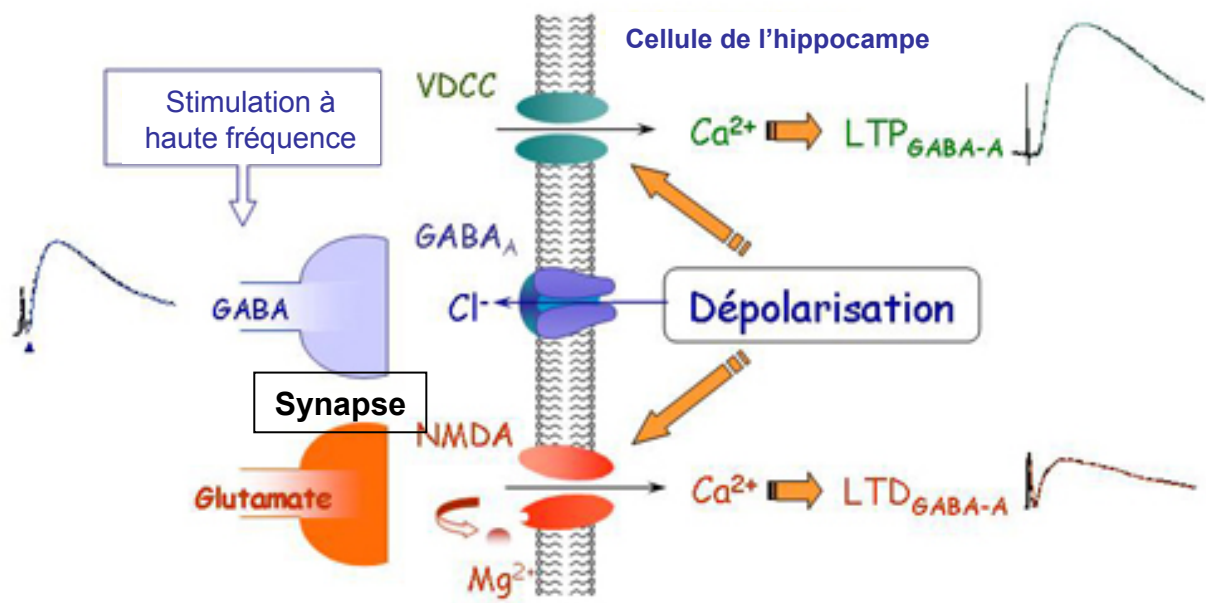


Figure 21: La potentialisation et la dépression à long terme (LTP et LTD) sont deux formes de plasticité qui nécessitent une dépolarisation, induite par l'activation des récepteurs GABA_A, et une entrée de Ca²⁺ au travers des canaux Ca²⁺ dépendants du voltage (VDCC) pour induire la LTP, et des récepteurs NMDA pour induire la LTD. D'après (Dr Gaiarsa, Equipe Neurotrophine et plasticité activité dépendante des synapses GABAergiques, INSERM Marseille; <http://www.inmed.univ-mrs.fr/index.php?page=15&id=9>).

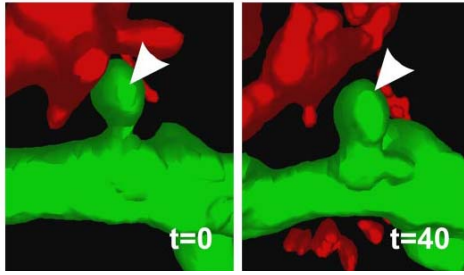
connexions chez l'adulte. La seconde se passe à l'âge adulte et est un phénomène qui se produit dans des régions bien spécifiques du cerveau selon la fonction physiologique concernée.

La plasticité cérébrale est un phénomène qui peut être contrôlé par des signaux externes sensoriels ou moteurs. Chez le singe à l'âge adulte, des lésions du nerf médian localisées sous la peau seraient à l'origine d'une réorganisation topographique de l'aire corticale du système sensoriel qui intègre les informations provenant de la perception tactile à la surface de la peau (Merzenich et al., 1983). Le cortex visuel peut également être plastique chez l'adulte lors de certaines phases d'apprentissage de la perception ou lors de privation visuelle ((Wiesel and Hubel, 1963), voir la revue de (Karmarkar and Dan, 2006)). Chez l'adulte, l'activité motrice intégrée au niveau des muscles et des tendons contribue aussi à réorganiser la structure et la fonction des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle moteur (Cotman and Berchtold, 2002), et l'exercice physique peut générer de nouveaux neurones dans l'hippocampe (Kempermann et al., 2000).

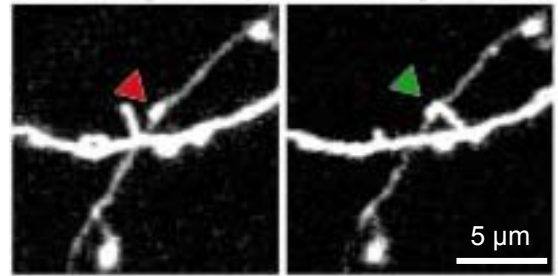
L'ensemble de ces phénomènes participe à l'adaptation du cerveau aux événements sociaux, biologiques ou physiques.

a) La plasticité synaptique

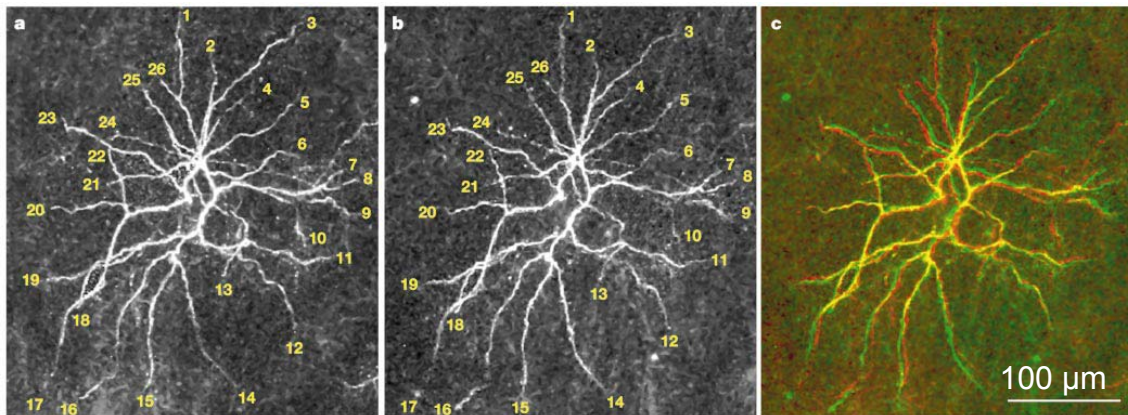
La plasticité synaptique a été mise en évidence pour la première fois par Hebb en 1949 lors de l'étude des effets de l'apprentissage et de la mémoire sur la « potentialisation et la dépression à long-terme » de la transmission synaptique respectivement nommées LTP et LTD (Hebb, 1949). Les mécanismes de la LTP ont été découverts, en 1973, par Bliss et ses collègues qui ont montré qu'une stimulation à haute fréquence entraînait une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté (Bliss and Gardner-Medwin, 1973) (Figure 21). Néanmoins, la plasticité structurale peut se manifester



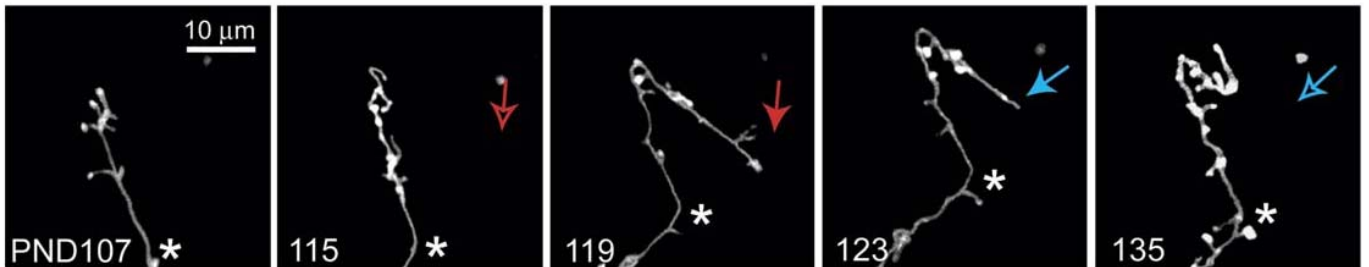
A Elimination d'une synapse



B Formation d'une synapse



C Rétraction ou formation de nouvelles épines dendritiques



D Changement de direction d'un axone

Figure 22: **(A)** Image d'un contact synaptique entre un axone (en rouge) et une épine (en vert) à $t=0$ et $t=40$ minutes après une dépression à long terme (LTD). D'après (Bastrikova et al., 2008). **(B)** Images d'une non apposition (flèche rouge) et d'une apposition (flèche verte), obtenues *in vivo*, entre un axone et une épine dendritique suggérant la formation d'un contact synaptique. D'après (Trachtenberg et al., 2002). **(C)** Images de 26 branches dendritiques prises à deux dates différentes (a et b). La superposition des deux images (c) montre les éléments stables (en jaune) et ceux qui ont bougé entre ces deux dates (en rouge (a), en vert (b)). D'après (Trachtenberg et al., 2002). **(D)** Images montrant l'évolution d'une terminaison axonale sur quatre jours. Les flèches rouges montrent l'élongation de l'axone et les bleues indiquent la rétraction de ce dernier. D'après (De Paola et al., 2006).

par une réorganisation des circuits neuronaux et des arborescences dendritiques induisant un remodelage synaptique qui peut prendre plusieurs aspects : la délétion (Wolff et al., 1989, Bastrokova et al., 2008) et/ou la formation de nouvelles synapses (Kalisman et al., 2005, Knott et al., 2006), la rétraction ou la formation de nouvelles épines dendritiques (Trachtenberg et al., 2002), et le changement de direction de l'arborisation axonales dans le néocortex (De Paola et al., 2006) (Figure 22).

De nouvelles connexions anatomiques peuvent s'établir suite à des expériences de lésions comme cela a été démontré chez le rat adulte (Raisman, 1969). Plus récemment, de nombreuses études ont démontré l'implication des neurotransmetteurs dans l'induction de certains phénomènes de plasticité. Certains neurotransmetteurs peuvent initier ou supprimer la croissance axonale et dendritique comme le GABA ((Wolff and Wagner, 1983) voir la revue de (Mattson, 1988)) ou induire tel le glutamate, la croissance d'épines dendritiques (spinogénèse) (Maletic-Savatic et al., 1999, Shi et al., 1999) ou de la synaptogénèse (Chang et al., 1991, Toni et al., 1999) par l'intermédiaire d'une action sur les récepteurs N-Methyl-D-Aspartate (NMDA).

b) La neurogénèse, une forme de plasticité

Une autre forme de plasticité structurale, la neurogénèse, a été découverte chez l'adulte et demeure une exception au dogme, datant du début du 20^{ème} siècle, selon lequel la production de nouveaux neurones est possible uniquement durant le développement et s'arrête avant la puberté (Cajal, 1913-14); voir la revue de (Jacobson, 1970). Les travaux pionniers de Altman et Das ont démontré la genèse de nouvelles cellules neuronales dans le cerveau de rongeurs adultes (Altman, 1962, Altman and Das, 1965). Puis en 1992, Reynolds et Weiss ont été les premiers à isoler et à caractériser des progéniteurs de cellules nerveuses ainsi que des cellules souches *in vitro* dans le cerveau de rongeurs adultes (Reynolds and Weiss, 1992). La

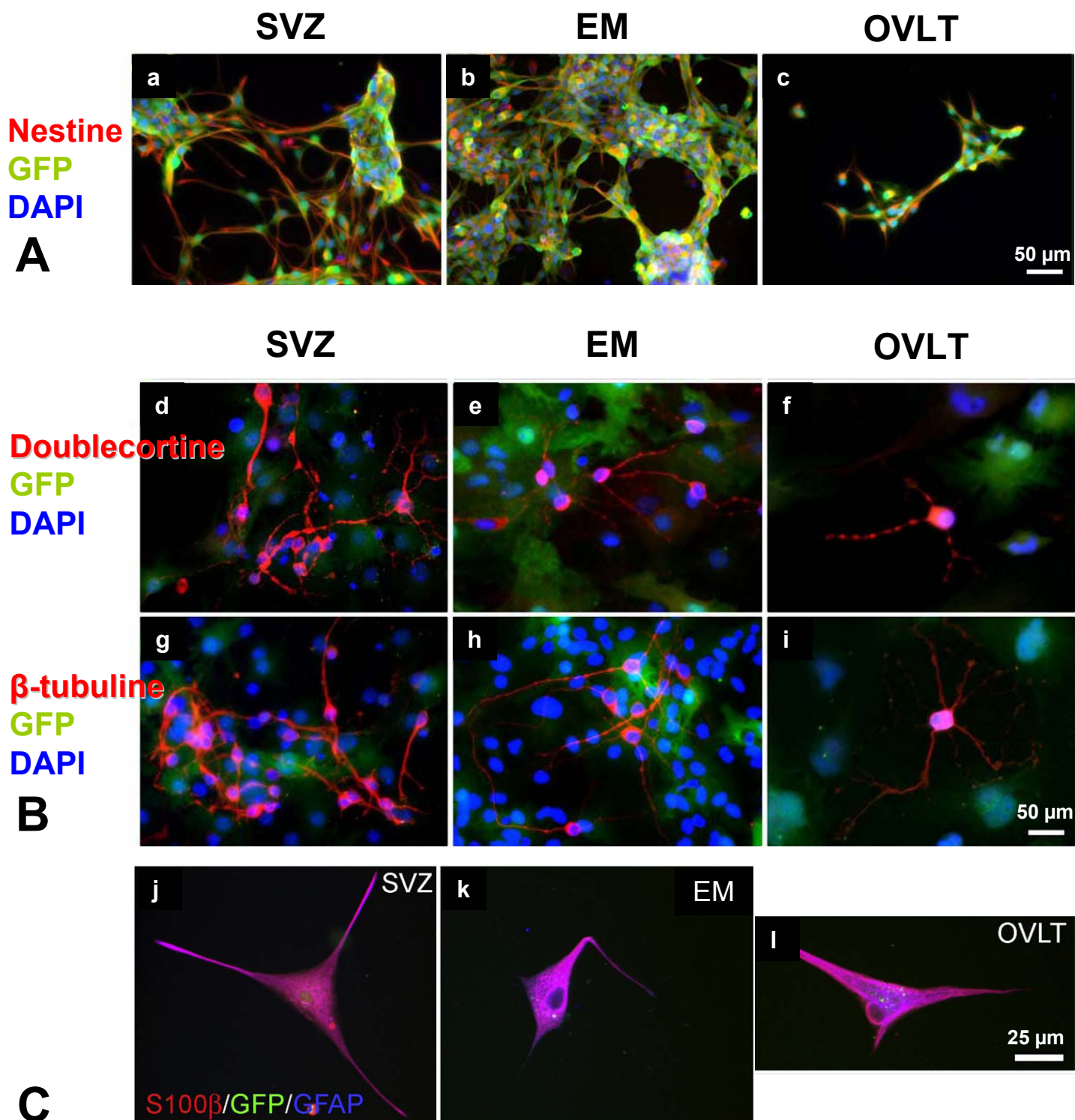


Figure 23: Photos montrant la présence de progéniteurs cellulaires dans la SVZ (a, d, g, j), l'EM (b, e, h, k) et l'OVLT (c, f, i, l). Cellules indifférenciées exprimant la nestine et le GFP (**A**). Après une différenciation de 14 jours, des cellules expriment des marqueurs neuronaux: la doublecortine (d-f) et la β -tubuline (g-i) (**B**) ou des marqueurs astrocytaires le S100 β et la GFAP (**C**). D'après (Bennett et al., 2009).

neurogénèse se caractérise en effet par la production de précurseurs des cellules nerveuses qui se différencient en neurones ou en cellules gliales dans le SNC.

Depuis une quarantaine d'années, de nombreux travaux ont confirmé l'existence de neurogénèse dans le cerveau adulte de plusieurs familles de vertébrés depuis les rongeurs (Altman, 1962), jusqu'aux oiseaux (Goldman and Nottebohm, 1983) et aux ovins (Hawken et al., 2009). A ce jour, la présence de progéniteurs cellulaires a été décrite dans de nombreuses régions délimitées du cerveau parmi lesquelles la zone subventriculaire (SVZ) (Lie et al., 2004) et les organes circumventriculaires qui incluent l'OVLT, l'organe subfornical, l'EM, l'organe subcommissural, l'aire postrema et les plexus choroïdes (Bennett et al., 2009) (Figure 23A-B). Cette dernière étude démontre également que les cellules en prolifération sont capables de se différencier en neurones ou en cellules gliales dans le cerveau de l'adulte (Figure 23C). De la neurogénèse a également été mise en évidence dans le cerveau de rat au niveau de la zone subépendymaire du troisième ventricule où sont localisés les tanocytes (Xu et al., 2005) Il existe quatre sous-populations de tanocytes, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$ qui appartiennent à la famille des cellules gliales et qui sont réparties dans des zones différentes le long de la paroi du troisième ventricule dans sa partie ventrale (Figure 24). L'utilisation de la nestine, une protéine du cytosquelette utilisée comme un marqueur des progéniteurs neuronaux (Wiese et al., 2004), a montré que les tanocytes $\alpha 2$ seraient des cellules souches hypothalamiques (McNay et al., 2009).

La fonction des cellules nerveuses nouvellement générées dans le SNC adulte et l'implication de la neurogénèse dans certaines fonctions physiologiques ou lors de pathologies du SNC font encore l'objet de nombreuses recherches aujourd'hui.

2) La plasticité associée à quelques fonctions physiologiques

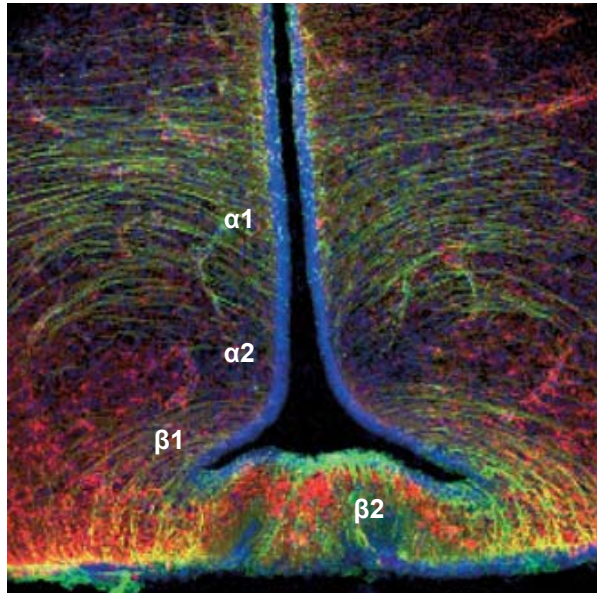


Figure 24: Montage montrant les quatre sous-populations de tanocytes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$) dans la région ventrale de l'éminence médiane, à la base du troisième ventricule sur une photo obtenue chez le rat en microscopie confocale à fluorescence. La vimentine est détectée par une fluorescence verte, le marqueur astrocytaire GFAP correspond à la fluorescence rouge et les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (fluorescence bleue). D'après (Ojeda et al., 2008).

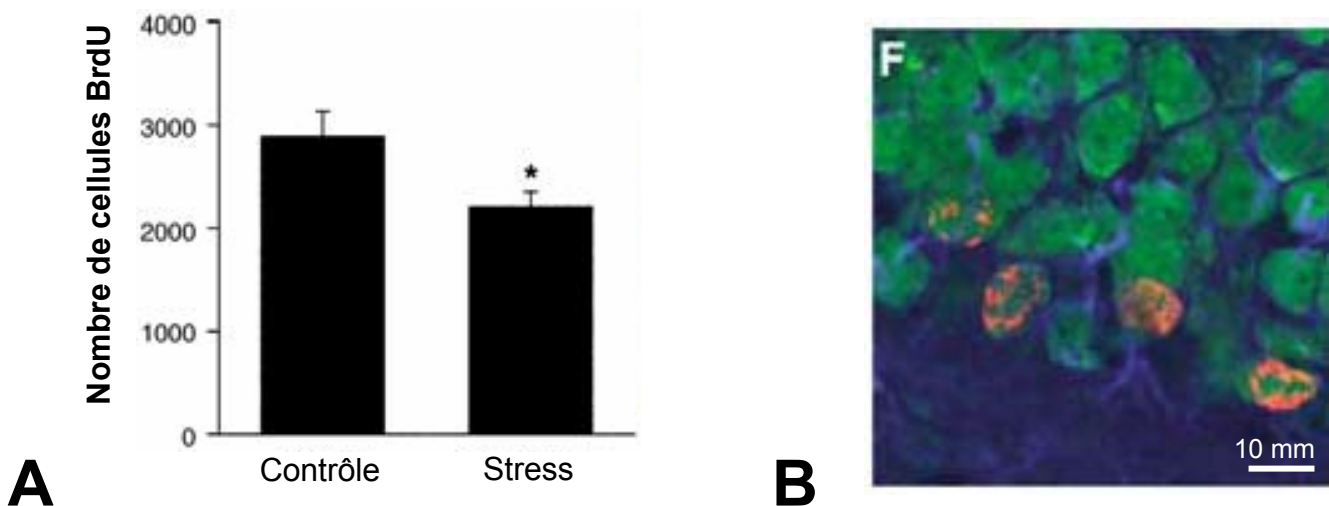


Figure 25: Effets de trois semaines d'un stress chronique sur la prolifération cellulaire dans l'hippocampe. **(A)** Histogramme montrant le nombre de cellules marquées au BrdU chez un groupe d'animaux contrôles et un groupe d'animaux soumis à un stress. **(B)** Superposition d'images obtenues en microscopie confocale indiquant la colocalisation des marquages BrdU (en rouge) et NeuN (en vert) dans les cellules de l'hippocampe. Le marquage GFAP (en bleu) n'est pas colocalisé avec les cellules BrdU. D'après (Pham et al., 2003).

La liste des événements physiologiques au cours desquels des remaniements morphologiques ont été mis en évidence à ce jour n'est pas exhaustive parmi laquelle le stress et la prise alimentaire ont couramment été décrits. La plasticité structurale se traduit aussi bien par des réorganisations morphologiques des différents prolongements cellulaires que par de la neurogénèse cérébrale.

a) Le stress

Le stress selon Rivier et Rivest induit une rupture de l'équilibre homéostatique de l'organisme (Rivier and Rivest, 1991). Les réponses de l'organisme au stress sont complexes et variées et peuvent se traduire par des réorganisations morphologiques dans certaines régions du cerveau. Le stress à l'âge adulte qui se traduit par une augmentation des glucocorticoïdes, en particulier de la corticostérone chez les rongeurs, induirait une diminution de la neurogénèse et la génération de nouveaux neurones dans la région de l'hippocampe chez le toupaille de Belanger, un animal utilisé pour les modèles de stress chronique, et le marmouset (Gould et al., 1992, Gould et al., 1997, Pham et al., 2003) (Figure 25). Cette neurogénèse hippocampale provoquée par un stress chronique ou bref peut s'avérer soit permanente si le stress est trop important, soit transitoire comme un mécanisme d'adaptation pour l'organisme (voir la revue de (Mirescu and Gould, 2006)).

L'administration de glucocorticoïdes provoque des réorganisations morphologiques des dendrites dans la région de l'amygdale coordonnant la réponse au stress chez le rat (Vyas et al., 2002). Un stress répété entraîne également une rétraction de l'arborescence dendritique de neurones pyramidaux du cortex préfrontal (Wellman, 2001, Liston et al., 2006) ainsi qu'une diminution de la longueur des dendrites et de la densité des épines dendritiques des neurones corticaux et hippocampiques (Watanabe et al., 1992, Radley et al., 2006).

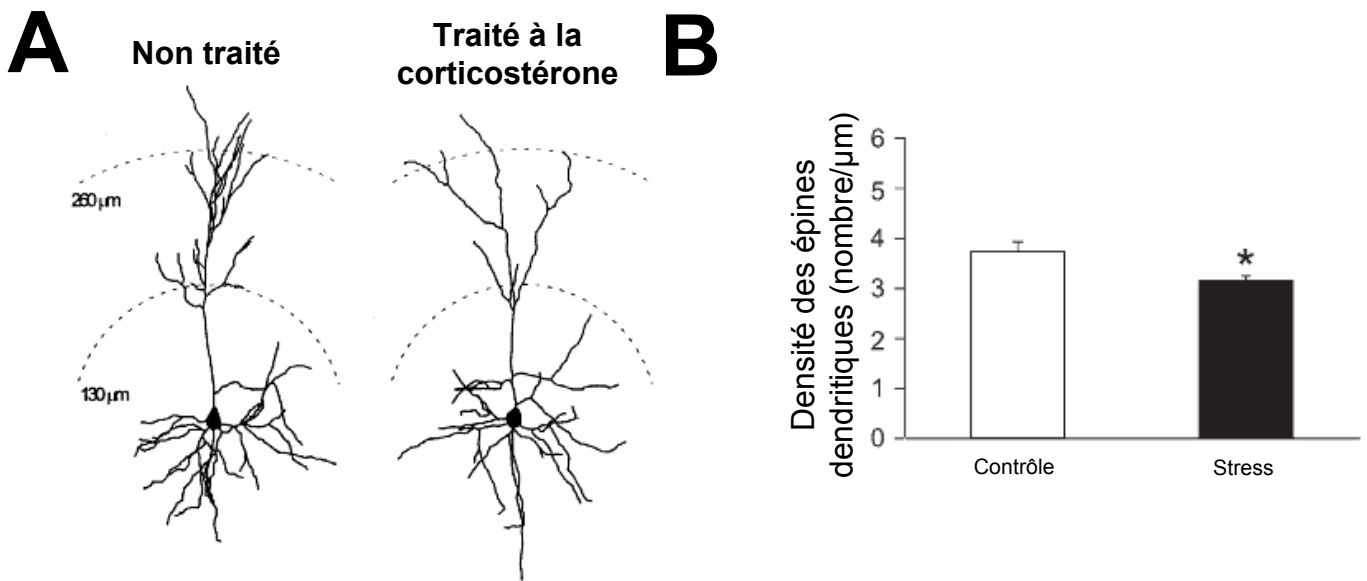


Figure 26: (A) Reconstruction assistée par ordinateur d'un neurone pyramidal du cortex préfrontal chez un rat non traité ou traité à la corticostérone. Les prolongements dendritiques se rétractent dans la zone la plus éloignée du soma (260 μm) chez les animaux traités. D'après (Wellman, 2001). (B) Diminution de la densité des épines dendritiques dans le cortex préfrontal du rat suite à un stress répété exercé pendant 31 jours. D'après (Radley et al., 2006).

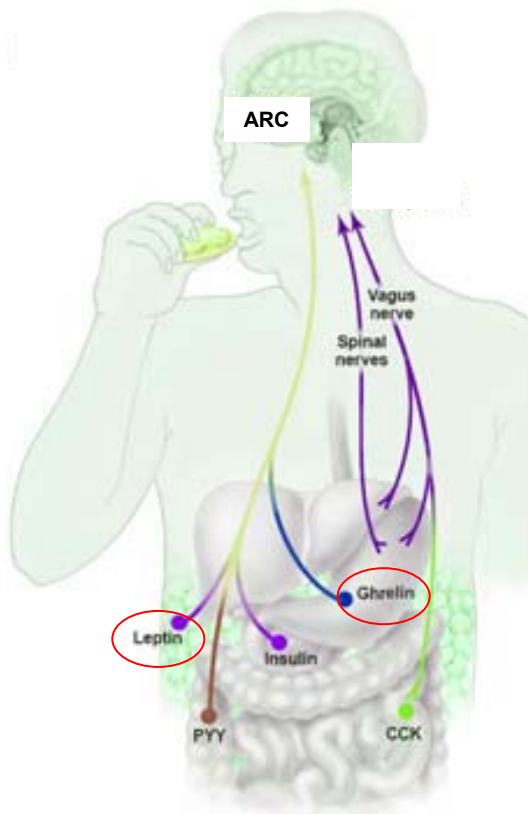


Figure 27: Schéma montrant la régulation homéostatique de la prise alimentaire. Les messagers du tractus digestif (ghréline, peptide tyrosine tyrosine (PYY), cholestokinine (CCK) et leptine), du pancréas (insuline) et du tissu adipeux (leptine) agissent au niveau de l'ARC ou transmettent des messages par l'intermédiaire des neurones afférents du nerf vague. Adaptée de (« Institut Européen de chimie et de biologie »); <http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>.

b) La prise alimentaire

La sous-nutrition chez l'adulte peut entraîner des phénomènes de plasticité cérébrale. La restriction alimentaire stimulerait chez l'adulte la neurogénèse dans l'hippocampe de la souris (Lee et al., 2002), tandis que la sur-alimentation supprimerait cette neurogénèse chez le rat adulte (Lindqvist et al., 2006). De plus, il a été suggéré par l'équipe de Kokoeva que les variations de neurogénèse dans certaines régions hypothalamiques régulant la prise alimentaire seraient une composante importante dans le contrôle de la prise alimentaire et de la balance énergétique (Kokoeva et al., 2005).

La leptine, l'hormone de la « satiété » sécrétée par le tissu adipeux qui inhibe au niveau central la prise alimentaire, semble influencer l'environnement synaptique au contact des neurones sécrétant le NPY et la proopiomélanocortine, populations connues pour réguler la prise alimentaire et la balance énergétique, dans la région de l'ARC (Pinto et al., 2004) (Figure 27). L'administration de ghréline, l'hormone de « l'appétit » stimulatrice de la prise alimentaire et produite principalement au niveau de l'estomac, induit chez le rat une augmentation de l'incorporation de bromodeoxyuridine dans des neurones du noyau du tractus solitaire et du noyau moteur dorsal (Zhang et al., 2004). Cette hormone régulerait également la plasticité synaptique dans l'hippocampe induisant la formation de synapses et la génération de LTP synaptique associée à une stimulation de l'apprentissage et de la mémorisation spatiale chez les animaux traités (Diano et al., 2006) (Figure 27).

II) Un marqueur de plasticité, la PSA-NCAM

1) Structure et mécanisme d'action

a) La molécule d'adhésion cellulaire neuronale : la NCAM

La molécule d'adhésion cellulaire neuronale (NCAM) est présente dans le système nerveux central et est exprimée à la surface des cellules (Hoffman et al., 1982). Elle appartient

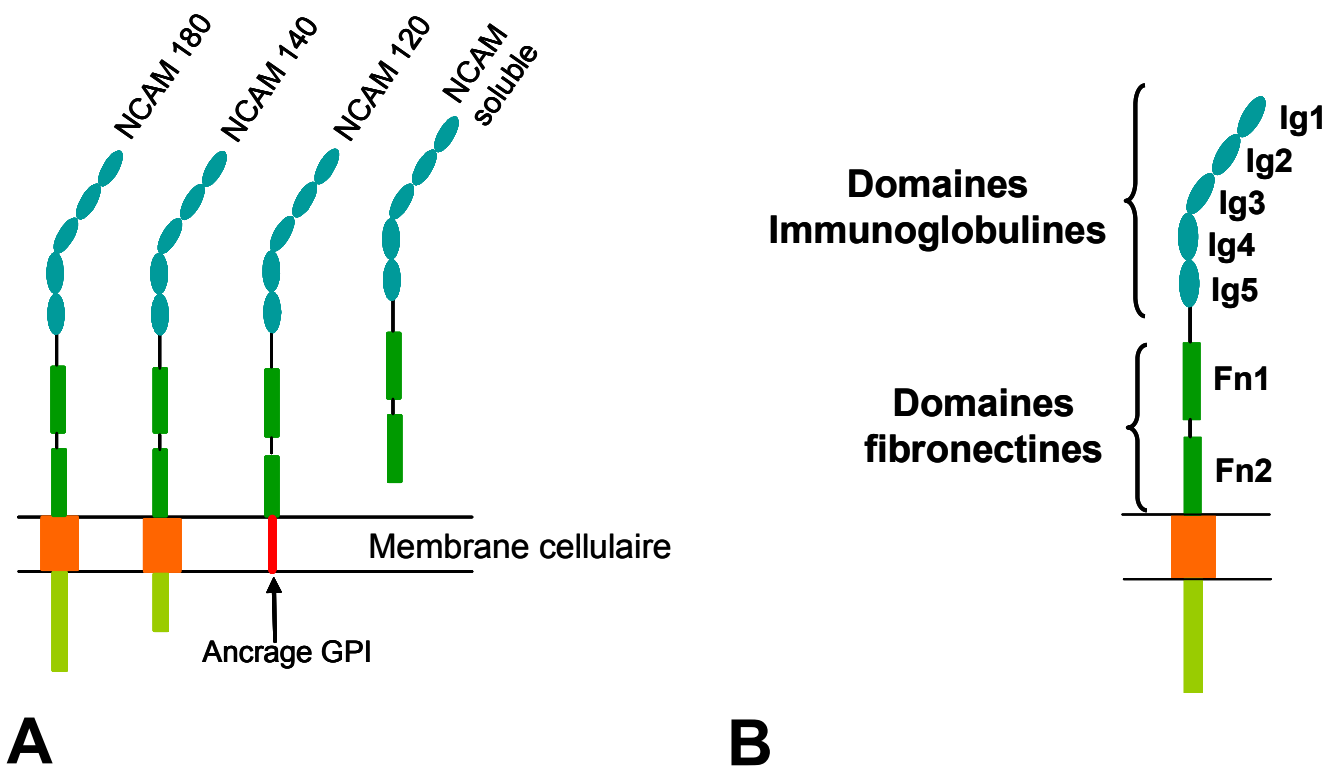
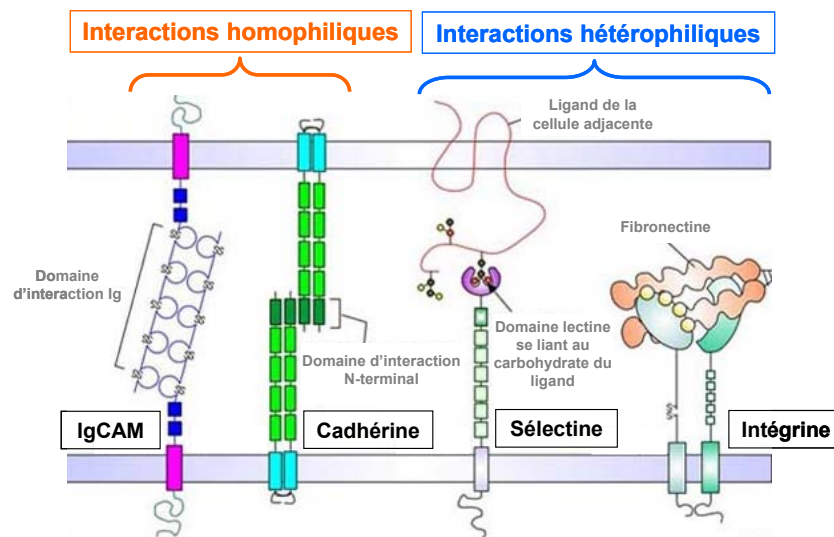


Figure 28: (A) Structure moléculaire des quatre isoformes de la NCAM. (B) Schéma illustrant les différents domaines d'un isoforme de la NCAM. GPI, Glycosylphosphatidylinositol. Adaptée de (Gascon et al., 2007).



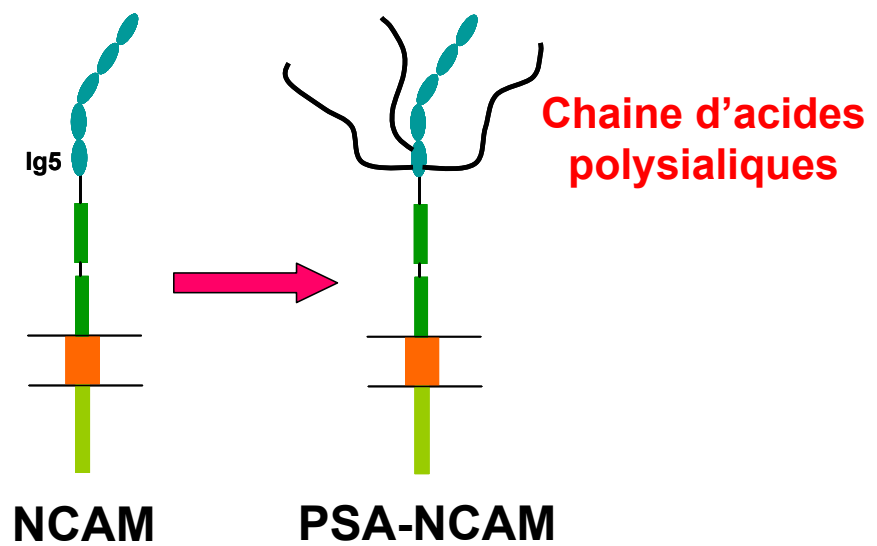
Figures 29: Représentation des interactions homophiliques et hétérophiliques entre les molécules d'adhésion cellulaire apparentées aux immunoglobulines (IgCAM), aux cadhérines, aux sélectines et aux intégrines.

Adaptée du Professeur O'Day-DH (Université de Toronto, <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/lecture5.htm>).

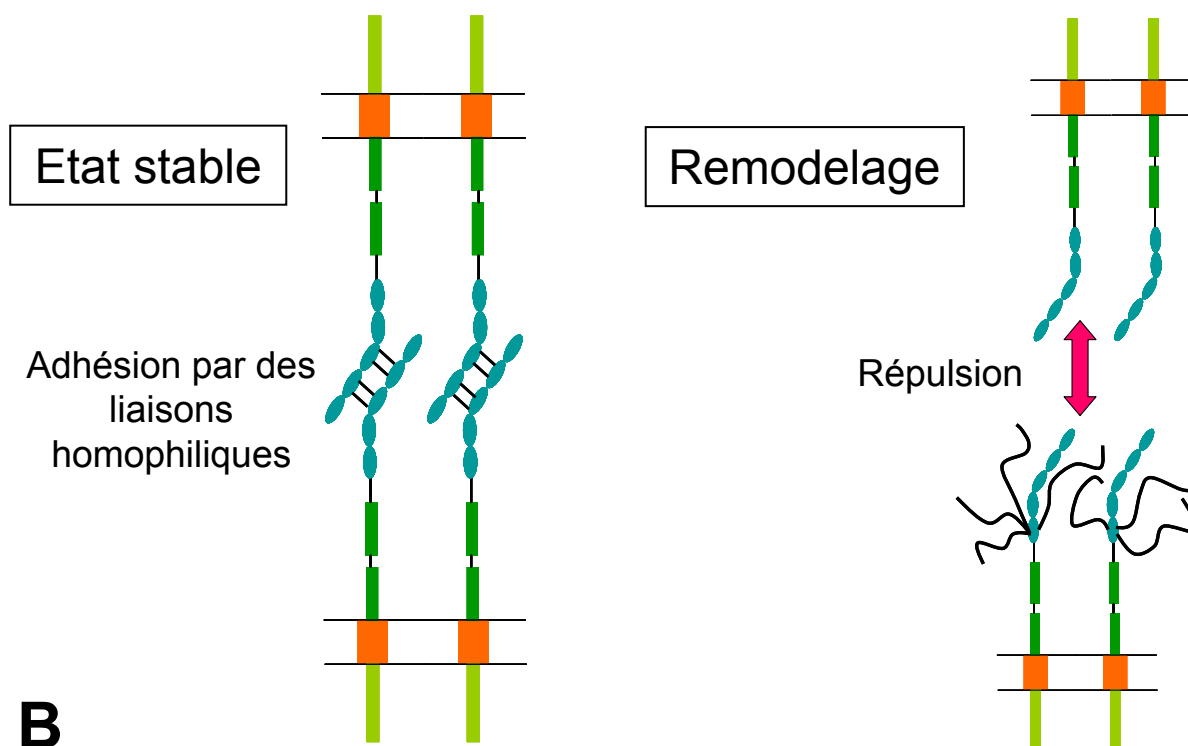
à la super famille des molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines, et est codée par un gène unique composé de 26 exons (voir la revue de (Goridis and Brunet, 1992)). Trois principales formes de NCAM sont générées par épissage alternatif de ce seul gène : les NCAM 180, 140 et 120 KDa. Les formes 180 et 140 diffèrent en N-terminal par leur domaine cytosolique tandis que la forme 120 est différente des deux autres NCAM par son type d'attachement à la membrane cellulaire qui se fait par l'intermédiaire d'un segment glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Edelman and Crossin, 1991). Des formes solubles de la NCAM peuvent aussi être générées par excision enzymatique de la NCAM 120 de son ancrage GPI (He et al., 1986) ou par clivage protéolytique de la partie extracellulaire de la molécule NCAM (Hinkle et al., 2006) (Figure 28A). La région extracellulaire des trois formes de NCAM est composée de deux domaines fibronectine de type III (Fn1 et 2) puis de cinq domaines immunoglobulines (Ig1 à 5). Les liaisons entre deux cellules établies par la NCAM se feraient par des interactions homophiliques entre leurs domaines extracellulaires (Cole et al., 1986) (Figure 28B). La NCAM est également capable d'interagir de manière hétérophilique avec d'autres membres de la famille des molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines tels que L1 ou TAG-1 (Brummendorf and Rathjen, 1995) ou des molécules de la matrice extracellulaire comme l'héparine (Cole and Glaser, 1986) (Figure 29).

b) La NCAM polysialylée : la PSA-NCAM

La forme PolySialylée de la NCAM (PSA-NCAM) est fréquemment utilisée comme marqueur de modifications morphologiques. Cette glycoprotéine est composée d'une protéine trans-membranaire la NCAM sur laquelle se greffent des polymères linéaires d'acides N-acétylneuraminique, en nombre plus ou moins important (8 à 100 résidus), par une liaison de type (α 2-8) aux deux asparagines du domaine extracellulaire Ig5 de la NCAM (Rougon, 1993) (Figure 30). Il a été montré que les acides polysialiques sont exclusivement attachés à la



A



B

Figure 30: (A) Schéma illustrant la NCAM et sa forme polysialylée, la PSA-NCAM suite à l'ajout de plusieurs chaînes d'acide polysialiques. (B) Modèle illustrant le passage d'un état stable caractérisé par des liaisons homophiliques entre les cellules et un état de remodelage induit par la présence de la PSA-NCAM qui limite les interactions cellulaires.

NCAM (Finne et al., 1983, Tomasiewicz et al., 1993). L'ajout des carbohydrates est une modification post-traductionnelle se produisant dans le compartiment cellulaire golgien en faisant intervenir deux polysialyltransférases : la ST8SiaIV (PST) et la ST8SiaII (STX) (Kitagawa and Paulson, 1994, Nakayama et al., 1995, Kojima et al., 1996). Expérimentalement, il est possible de cliver les chaînes polysialiques en utilisant une endosialidase, l'endoneuraminidase N (EndoN) produite par un bactériophage spécifique pour *Escherichia coli* K1 (Finne and Makela, 1985, Hallenbeck et al., 1987).

La présence de la PSA-NCAM permet de moduler l'adhésion entre deux membranes cellulaires qui est assurée par la NCAM. En effet, les acides polysialiques portent une grande quantité de charges négatives qui contribuent à réguler et modifier les interactions homophiliques ou hétérophiliques (Rougon, 1993). Ces phénomènes d'inhibition stérique ont pour effet de modifier les interactions impliquant des récepteurs d'adhésion cellulaire tels que les IgCAM, les cadhérines, les sélectines ou les intégrines (Fujimoto et al., 2001) (Figure 29). La présence de la PSA-NCAM influence le volume de l'espace intercellulaire ce qui participe aux modifications des interactions à la surface des cellules neurales ou gliales (Yang et al., 1992).

Les variations du niveau de PSA-NCAM à la surface des cellules dépendrait de deux mécanismes régulateurs majeurs : l'un consisterait en une modulation de l'expression de la NCAM ou de la synthèse et de l'activité des polysialyltransférases, l'autre serait dépendant du taux de renouvellement de la protéine sucrée à la surface des cellules (voir la revue de (Kiss and Rougon, 1997)).

2) Rôles de la NCAM

Le contrôle spatial et temporel des interactions cellulaires intimement liées à la NCAM est essentiel pour le développement du système nerveux et la plasticité (voir la revue de (Hinsby et al., 2004)).

a) Au cours du développement

La NCAM participerait au contrôle de la différenciation cellulaire par la stabilisation ou l'élimination sélective des synapses au cours de l'embryogenèse (Edelman, 1984). La croissance des neurites est associée avec l'état d'adhésivité ou de non adhésivité des cellules. Quand le prolongement atteint la région à innover, l'adhésivité est augmentée de façon à figer le système cellulaire dans la bonne position et cette variation de l'adhésion est contrôlée par des liaisons homophiliques entre cellules via notamment la NCAM (Edelman and Crossin, 1991).

b) Dans le comportement émotionnel

L'implication de la NCAM dans certains comportements émotionnels a été suggérée pour la première fois chez des souris invalidées pour la NCAM qui présentaient une amplification de l'anxiété lors d'un test consistant à explorer un environnement inconnu (Cremer et al., 1994). Ces souris montraient également une augmentation de leur comportement explorateur en réponse à un nouvel environnement ce qui indique une altération émotionnelle (Stork et al., 1999).

Une augmentation de la présence du fragment de 120 KDa de la NCAM a aussi été observée dans le LCR de patients atteints de troubles psychologiques (bipolarité de type I ou dépression unipolaire récurrente) (Poltorak et al., 1996, Vawter et al., 2000). Des souris invalidées pour la NCAM peuvent montrer des symptômes proches de ceux de la dépression

tels qu'une augmentation de la durée des périodes d'immobilisme (Bisaz et al., observations non publiés) ou une faible préférence pour une solution sucrée (Zharkovsky et al., 2006).

c) Au cours de l'apprentissage et dans la mémoire

L'apprentissage se définit comme un processus par lequel une nouvelle information est acquise tandis que la mémoire est le processus par lequel cette information est retenue. La transmission de l'information apprise à la mémoire est connue pour être étroitement liée au fonctionnement de l'hippocampe (voir la revue de (Alvarez and Squire, 1994)). Des tests cognitifs adaptés aux rongeurs ont été développés afin de caractériser les réponses comportementales dites normales en utilisant la peur, la faim et la curiosité innée pour motiver ou renforcer l'apprentissage des animaux. Certains de ces tests ont permis de mettre en évidence le rôle clef de la NCAM hippocampique dans l'apprentissage et la mémorisation. Lorsque les animaux sont mis dans un labyrinthe d'eau, ils sont forcés d'apprendre une nouvelle cartographie spatiale afin d'échapper à l'eau (Blozovski and Harris, 1986) tandis que dans les paradigmes conditionnant la peur et l'échappement induits par des chocs électriques sont utilisés pour initier la formation de la mémoire associative (Moser et al., 1993).

Les souris invalidées pour la NCAM présentent également un déficit de l'apprentissage spatial même si l'activité motrice semble normale (Cremer et al., 1994). La présence de la NCAM au stade postnatal est un élément essentiel au développement cérébral puisque son absence induit un déficit de la mémorisation spatiale à l'âge adulte (Bukalo et al., 2004).

d) Au cours de la neurogénèse chez l'embryon et l'adulte

La NCAM semblerait induire la différenciation de progéniteurs cellulaires en neurones cependant les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas très clairs. La NCAM serait impliquée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et dans l'induction de la différenciation des progéniteurs cellulaires en neurones dans l'hippocampe (Amoureux et al., 2000, Shin et al., 2002) alors que la NCAM 140 faciliterait la neurogénèse de l'hippocampe (Kim et al., 2005). La PSA-NCAM ne semble pas contribuer aux effets de la NCAM sur la neurogénèse dans l'hippocampe (Kim et al., 2005) alors qu'elle contrôle la différenciation neuronale induite par la NCAM dans la région du bulbe olfactif (Rockle et al., 2008). La NCAM, *in vivo*, serait au contraire stimulatrice de la neurogénèse dans les régions périventriculaire du bulbe l'olfactif indépendamment de la PSA-NCAM (Boutin et al., 2009).

3) Rôles de la PSA-NCAM

Les variations du niveau de polysialylation de la NCAM ont un rôle prépondérant dans les phénomènes de plasticité structurale au cours du développement ou dans le SNC de l'adulte. Il peut se produire des modifications morphologiques des terminaisons axonales et dendritiques, des synapses, des interactions entre deux neurones ou entre un neurone et une cellule gliale (voir la revue de (Rutishauser et al., 1988); (Bonfanti et al., 1992, Rougon, 1993, Kiss et al., 1994)). La PSA-NCAM jouerait également un rôle dans certaines étapes clefs de la neurogénèse telles que la migration cellulaire (Ono et al., 1994, Hu, 2000), et la survie et la croissance des prolongements des neurones nouvellement générés ((Daston et al., 1996) ; voir la revue de (Gascon et al., 2008)). L'ensemble de ces processus liés à la PSA-NCAM participe à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. L'importance de la PSA-NCAM dans la modulation de la fonction de reproduction sera abordée dans le chapitre C.

a) Au cours du développement

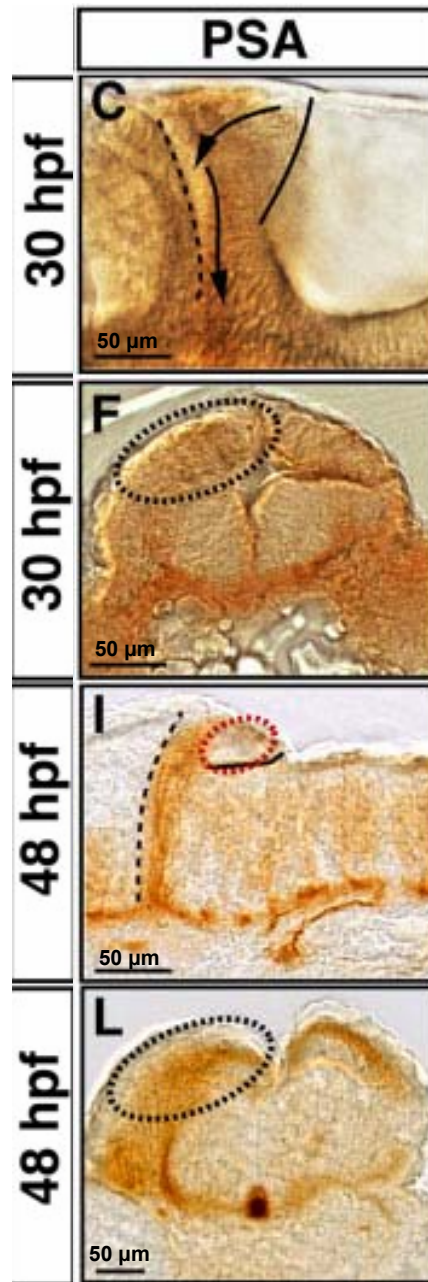


Figure 31: Coupes latérales (C, I) et transverses (F, L) montrant le marquage PSA-NCAM dans le rhombencéphale antérieur d'embryons de poisson zèbre de 30 et 48 heures post-fertilisation (hpf). L'expression de la PSA-NCAM dans le cervelet délimite la migration antéro-ventrale des progéniteurs neuronaux. D'après (Rieger et al., 2008).

L'une des premières fonctions attribuée à la PSA-NCAM au cours de l'embryogenèse a été son implication dans le contrôle des processus de fasciculation, de croissance ou de rétraction des axones et des dendrites. Dans l'embryon de poulet, l'inhibition de la PSA-NCAM par l'endoN induit une augmentation de la fasciculation des axones, une diminution des branchements axonaux pendant la mise en place de l'innervation musculaire (Landmesser et al., 1990) ainsi qu'une diminution de la croissance axonale dans le système visuel (Zhang et al., 1992). La PSA-NCAM exerce également une activité inhibitrice sur les processus de myélinisation chez la souris qui se produisent lors de la croissance des fibres pendant l'embryogenèse (Charles et al., 2000) et les premières semaines postnatales (Oumesmar et al., 1995).

La migration des cellules et notamment des neurones dans le SNC est un processus essentiel au cours du développement de nombreuses espèces qui requiert une régulation fine de la présence de la PSA-NCAM. Chez l'embryon de poulet par exemple, la PSA-NCAM contribuerait à la migration des neurones à GnRH en limitant leurs interactions avec l'environnement et en les guidant le long des nerfs vers le cerveau (Murakami et al., 1991). Cette glycoprotéine est également nécessaire à la mobilité des progéniteurs neuronaux cérébelleux chez le poisson zèbre en développement (Rieger et al., 2008) (Figure 31).

b) Dans la régulation des rythmes circadiens

Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) sont connus pour synchroniser de nombreuses fonctions biologiques selon un rythme jour/nuit de 24 heures (voir la revue de (Reppert and Weaver, 2002)). Ces noyaux font l'objet de réarrangements structuraux sur une période de 24 heures caractérisés par des modifications entre le jour et la nuit de la glie, des terminaisons axonales et/ou de l'entourage somato-dendritiques des neurones exprimant l'arginine-vasopressine et le peptide intestinal vasoactif, les deux principales sources de terminaisons

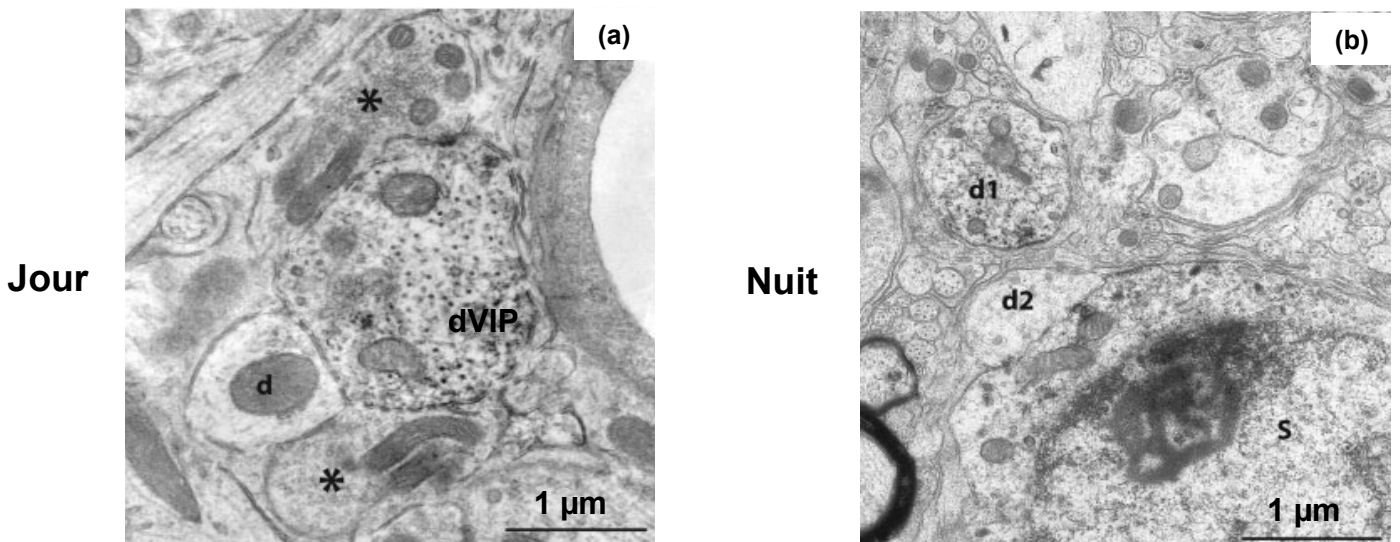


Figure 32: Photos montrant l'ultrastructure de neurones sécrétant le peptide intestinal vasoactif (VIP) chez des animaux abattus le jour (a) ou la nuit (b). (a) Une dendrite marquée au VIP (dVIP) est en contact avec une autre dendrite non marquée (d) ainsi qu'avec deux varicosités axonales (*). (b) Photos montrant l'augmentation de l'environnement glial d'une dendrite VIP (d1), d'un corps cellulaire VIP (s) ainsi qu'une autre dendrite non marquée au VIP (d2). D'après (Becquet et al., 2008).

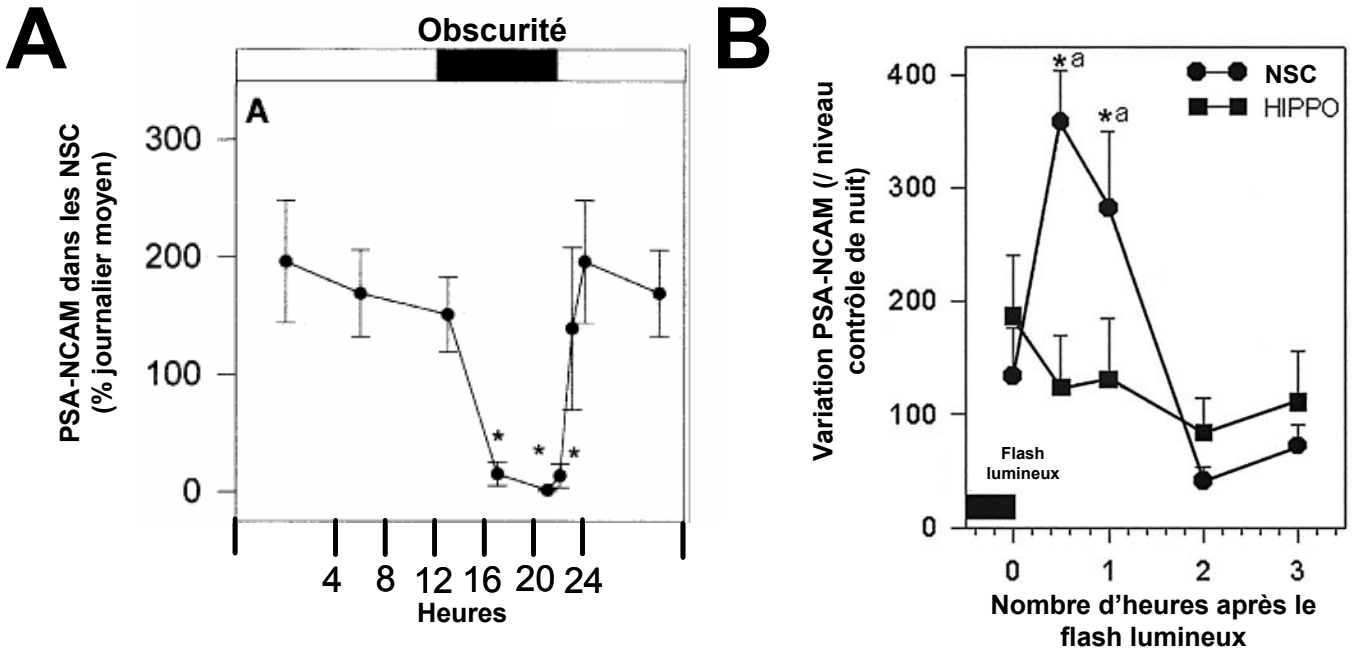


Figure 33: (A) Profil journalier des niveaux tissulaires de la PSA-NCAM mesurés par western blot dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC). (B) Effet d'un flash lumineux sur les niveaux de la PSA-NCAM dans les NSC et l'hippocampe obtenus par western blot. D'après (Glass et al., 2003).

neuronaux dans les NSC (Becquet et al., 2008) (Figure 32). La PSA-NCAM serait également impliquée dans la régulation de l'activité du NSC et pourrait participer à la plasticité structurale observée dans ces noyaux (Glass et al., 1994, Shen et al., 1997, Shen et al., 1999). Il existe un rythme circadien d'expression de la PSA-NCAM dans les NSC chez le hamster Syrien qui présente des niveaux élevés pendant le jour dès la première heure d'exposition à la lumière et des niveaux faibles la nuit (Glass et al., 2003). L'inhibition enzymatique de la PSA-NCAM dans les NSC bloque également l'expression de Fos, un marqueur précoce d'activation cellulaire, induite par la lumière ainsi que le rythme locomoteur circadien des animaux (Glass et al., 2000, Glass et al., 2003) (Figure 33A). Il est intéressant de remarquer que les niveaux de la PSA-NCAM s'adaptent rapidement à l'exposition à la lumière au cours du nyctémère : l'expression de la PSA-NCAM augmente moins d'une heure après un flash lumineux (Glass et al., 2003) (Figure 33B).

c) Au cours de l'apprentissage et la mémoire

Des études ont montré que certains apprentissages tels que la fuite face à un danger (Doyle et al., 1992), l'apprentissage spatial (Seymour et al., 2008) ou la consolidation de la mémoire (Fox et al., 1995) peuvent altérer l'expression de la PSA-NCAM. Des manipulations expérimentales affectant l'expression ou la fonction de cette molécule peuvent également entraîner un déficit de l'apprentissage spatial (Cremer et al., 1994, Becker et al., 1996, O'Connell et al., 1997). Les deux principales régions impliquées dans la fonction d'apprentissage dans lesquelles ces variations de la PSA-NCAM ont été observées sont le système olfactif et le lobe temporal médial comprenant l'hippocampe. Des souris déficientes en NCAM montrent une réduction de 40% de la taille du bulbe olfactif qui est due à une diminution de la migration de cellules en provenance de la SVZ cependant ces animaux conservent leur aptitude à discriminer les odeurs (Schellinck et al., 2004). Des variations

d'expression de la PSA-NCAM se produisent également dans la région de l'hippocampe lors de l'apprentissage de la discrimination des odeurs (Knafo et al., 2005) ainsi que dans le gyrus denté de l'hippocampe lors d'exercices de mémorisation (Foley et al., 2003).

d) Dans la régénération du tissu cérébral à la suite d'une lésion ou dans la cancérogenèse

Les niveaux et la distribution de la PSA-NCAM changent durablement ou transitoirement dans des modèles non physiologiques de lésion ou de réparation cérébrale. Par exemple, suite à une lésion du cortex enthorinal, une région importante pour la mémoire et proche de l'hippocampe, une expression rapide et spécifique de la PSA-NCAM associée à une croissance axonale et à de la synaptogénèse s'est produite dans le gyrus denté (Styren et al., 1994). Après une ischémie cérébrale, les cellules en prolifération de la SVZ ventrale expriment également fortement la PSA-NCAM indiquant un rôle potentiel de cette dernière pour guider la migration de ces cellules nouvellement formées (Sato et al., 2001, Parent et al., 2002).

Des modifications des niveaux de polysialylation existent également dans certaines circonstances pathologiques. La PSA-NCAM est fortement exprimée dans certains types de tumeurs d'origine humaine où elle aurait un impact direct sur la croissance tumorale en modulant les interactions cellulaires liées à la NCAM. Ceci pourrait participer à la genèse et la progression des tumeurs fortement agressive (Seidenfaden et al., 2003). La PSA-NCAM pourrait également être impliquée dans la formation de métastases puisque l'injection d'endoN chez un modèle de souris métastatique diminue l'expression de la PSA-NCAM à la surface des cellules tumorales et réduit ainsi que le nombre de métastases (Daniel et al., 2001).

e) Au cours de la neurogénèse chez l'adulte

La neurogénèse est un phénomène qui se produit chez l'adulte principalement dans deux régions, la SVZ et le gyrus denté de l'hippocampe. La PSA-NCAM est présente dans des niches neurogéniques et pourrait ainsi jouer un rôle dans la régulation de certaines étapes clés telles que la migration et la survie cellulaire ((Rousselot et al., 1995) ; voir la revue de (Garcia-Verdugo et al., 1998)).

L'aptitude de la PSA-NCAM à participer à la migration cellulaire a été mise en évidence particulièrement dans la région de la SVZ. Les cellules migrantes présentent des niveaux élevés de PSA-NCAM (Garcia-Verdugo et al., 1998, Barral-Moran et al., 2003) et le blocage fonctionnel de l'ajout de résidus sucrés sur la NCAM est suffisante pour interrompre leur migration (Ono et al., 1994, Murakami et al., 2000).

L'implication de la PSA-NCAM dans la survie des nouveaux neurones a aussi été montrée dans un modèle *in vitro* de neurogénèse (Vutskits et al., 2006). Le blocage de la PSA-NCAM par l'utilisation de l'endoN ou au moyen d'anticorps diminue fortement la survie des neurones. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez des souris invalidées pour les deux enzymes de synthèse des acides polysialiques. Chez ces animaux, la perte de la PSA-NCAM a induit un phénomène d'apoptose massif au cours du développement à l'origine de malformations sévères du cerveau à l'âge adulte notamment dans la région du bulbe olfactif et de la SVZ (Weinhold et al., 2005, Angata et al., 2007).

C) Plasticité structurale et reproduction

I) Au cours du développement

1) Migration des neurones à GnRH

Au cours du développement embryonnaire, les neurones à GnRH ont une origine extra-cérébrale. Les premiers neurones apparaissent précocement dans la placode olfactive au 35^{ème} jour chez le mouton (Caldani et al., 1995), au 12^{ème} jour chez le rat (Wray et al., 1989)

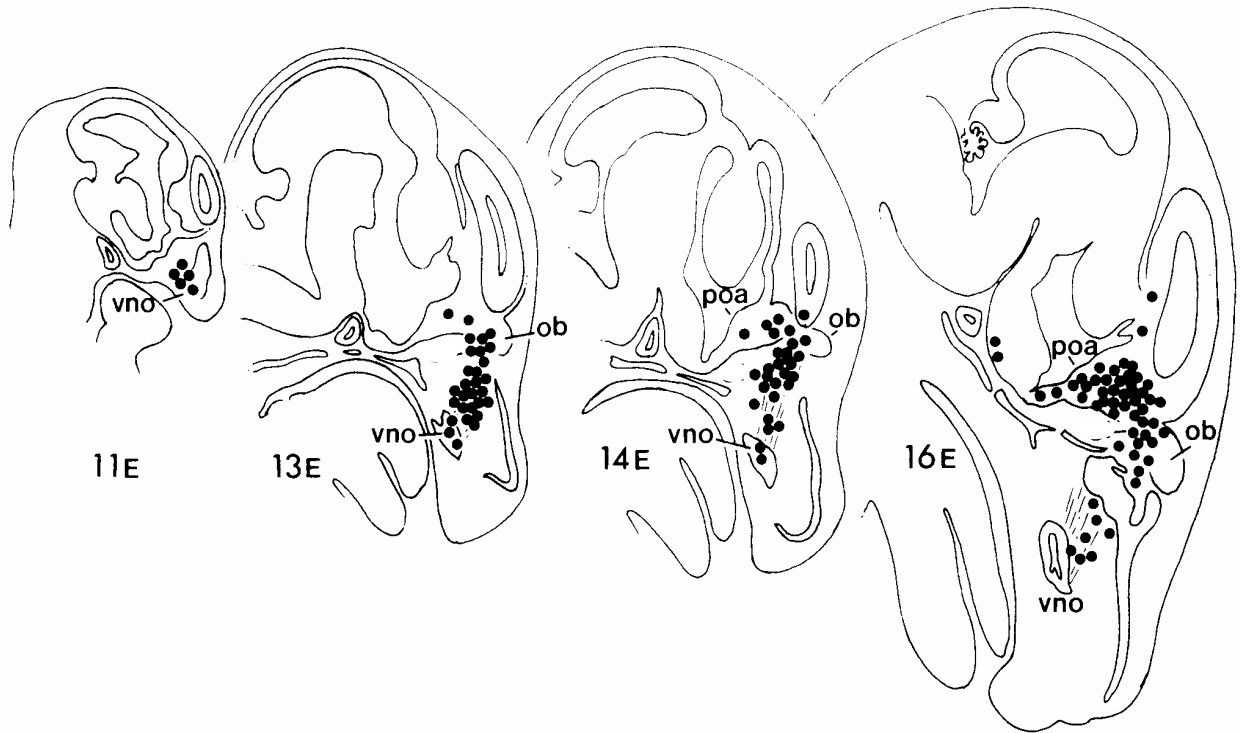


Figure 34: Dessins illustrant la migration des neurones à GnRH (point noir) au cours du développement embryonnaire de la souris entre le 11ème (11E) et le 16ème jour (16E). vno, organe voméronasal; ob, bulbe olfactif; poa, aire préoptique. D'après (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989).

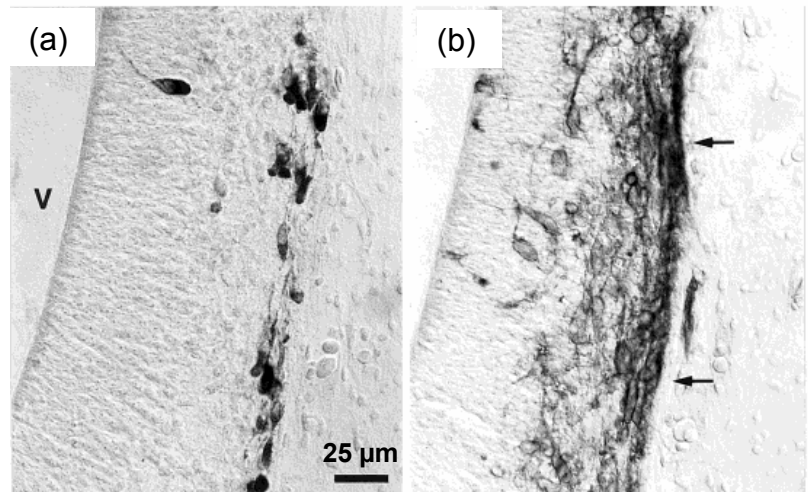


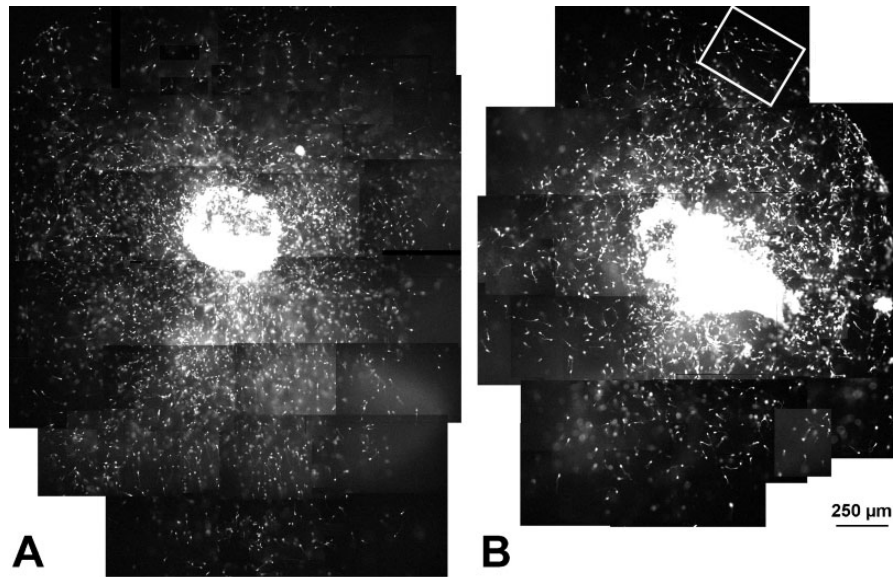
Figure 35: Marquage intense de la PSA-NCAM (b) le long du trajet de migration des neurones à GnRH (a). D'après (Murakami et al., 2000).

et avant la 10^{ème} semaine chez l'homme (Kim et al., 1999). Ils migrent ensuite vers le cerveau antérieur en suivant un trajet nerveux composé qui s'achève par le nerf terminal. Ils entrent dans le cerveau antérieur et poursuivent leur course dans la région du septum, de l'APO et enfin dans l'hypothalamus (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989) (Figure 34).

L'association spécifique des neurones à GnRH et ses guides nerveux nécessite l'intervention de molécules d'adhésion cellulaire parmi lesquelles la PSA-NCAM s'avère être un facteur essentiel dans le bon déroulement de la migration de ces neurones. La PSA-NCAM est fortement exprimée dans les nerfs olfactifs (Key and Akeson, 1991, Murakami et al., 1991, Norgren and Brackenbury, 1993) et voméronasaux (Dodd et al., 1988, Yoshida et al., 1999) et joue un rôle clef dans la migration des cellules (propriété décrite dans le chapitre B). L'absence de la PSA-NCAM due à l'injection d'endoN ou à l'invalidation du gène de la NCAM, inhibe la migration des neurones à GnRH depuis la placode olfactive jusqu'au cerveau (Ono et al., 1994, Murakami et al., 2000) (Figure 35).

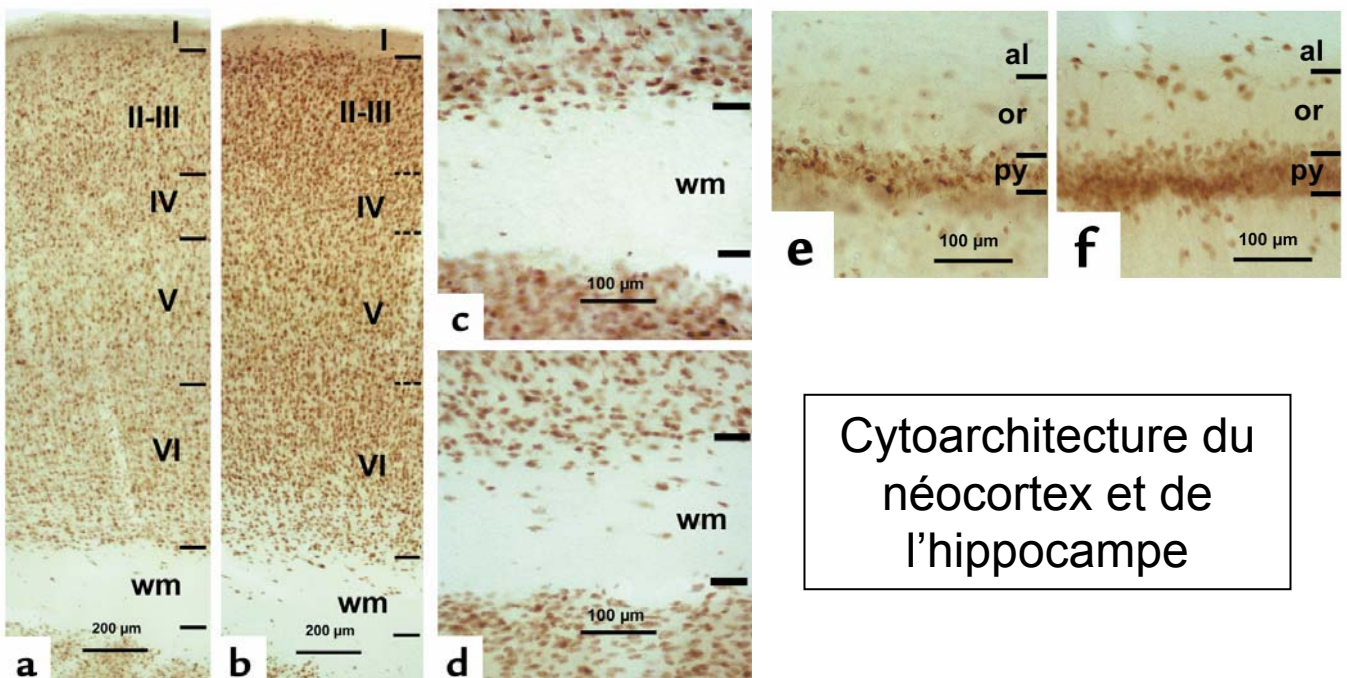
2) Importance des hormones thyroïdiennes

Au-delà de l'importance des hormones thyroïdes dans certains événements neuroendocriniens de la rythmicité saisonnière de la fonction de reproduction, elles ont également un rôle essentiel dans le développement du SNC des vertébrés connu depuis la fin du 19^{ème} siècle (Ord, 1888). Les hormones thyroïdiennes, en particulier celles de la mère, jouent un rôle majeur dès les premiers stades du développement fœtal. Elles s'avèrent indispensables tant que la fonction thyroïdienne fœtale n'est pas mature. Une déficience maternelle transitoire ou modérée de la T4 pendant le développement fœtal altère la migration radiale et tangentielle de certaines projections neuronales (Auso et al., 2004, Cuevas et al., 2005) (Figure 36), compromet la cytoarchitecture du néocortex et de l'hippocampe (Lavado-Autric et al., 2003) (Figure 37) et bloque la maturation des connexions entre les deux



Migration tangentielle de projections neuronales

Figure 36: Photos obtenues en microscopie à fluorescence à faible puissance illustrant l'effet de la thyroïdectomie maternelle sur la migration tangentielle des neurones dans le cortex des embryons (B) par rapport aux animaux contrôles (A). La migration des neurones chez les embryons contrôles est plus symétrique. D'après (Cuevas et al., 2005).



Cytoarchitecture du néocortex et de l'hippocampe

Figure 37: Marquage au NeuN des neurones matures du cortex (a-d) et de l'hippocampe (e-f) chez des rats soumis, au cours du développement, à un déficit maternel en hormones thyroïdiennes (b, d et f) montrant la désorganisation architecturale de ces deux régions par comparaison avec des rats contrôles (a, c et e). D'après (Lavado-Autric et al., 2003).

hémisphères cérébraux (Berbel et al., 1994). Les hormones thyroïdiennes produites par le fœtus ainsi que celles provenant de la mère sont nécessaires pour la maturation et la différenciation astrogliale puisqu'une hypothyroïdie fœtale altère le développement des cellules gliales radiaires dans l'hippocampe entraînant une désorganisation fonctionnelle et architecturale de cette région (Martinez-Galan et al., 1997).

Les hormones thyroïdiennes sont également un régulateur clef du développement postnatal du cerveau. Elles interviennent dans la maturation des dendrites, des épines dendritiques et des synapses de neurones localisés dans différentes régions telles que le cortex cérébral (Eayrs and Taylor, 1951), le noyau caudé (Lu and Brown, 1977) et l'hippocampe en particulier au niveau des cellules pyramidales et granulaires (Rami et al., 1986, Gould et al., 1990). Ces hormones sont impliquées dans la prolifération et la migration des cellules granulaires dans le cortex cérébelleux et activent, après la naissance, la génération de nouveaux neurones de l'olfaction chez le rat (Lauder, 1978, Paternostro and Meisami, 1989). Elles influencent également la maturation et la différenciation des cellules gliales (Aizenman and de Vellis, 1987, Martinez-Galan et al., 2004).

II) Au cours de la gestation et la lactation

Le nombre d'appositions directes sur les neurones des noyaux supraoptiques de la ratte augmente à la fin de la gestation et lors de la lactation (Theodosis and Poulain, 1984). Cette plasticité concerne à la fois les interactions entre les neurones et les cellules gliales mais aussi les configurations synaptiques des neurones (Theodosis and Poulain, 1984). De plus, pendant ces deux périodes, une diminution marquée de l'entourage glial des neurones à ocytocine des noyaux supraoptiques et du noyau paraventriculaire a été mise en évidence ce qui pourrait avoir des conséquences fonctionnelles sur la synchronisation de leur activité électrique qui, à terme, permet la contraction utérine lors de la parturition et l'éjection du lait lors de la

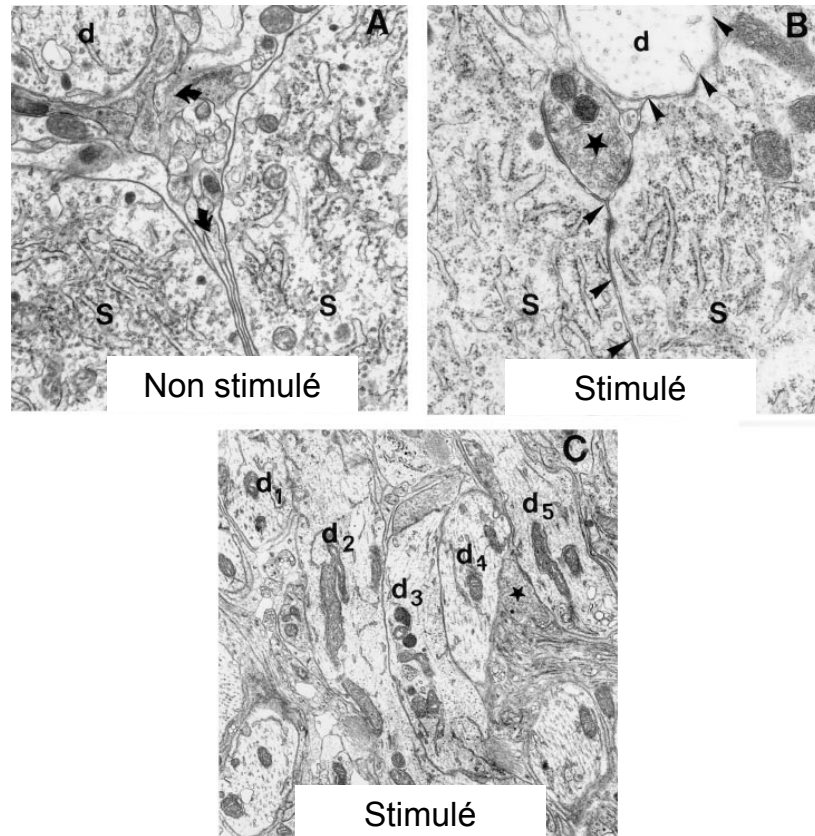


Figure 38: Réorganisation morphologique des neurones à ocytocine (OT) et des astrocytes dans les noyaux supraoptiques. **(A)** En condition basale (non stimulé), les somas (s) et les dendrites sont séparés par des prolongements astrocytaire (montré par les flèches). **(B et C)** Lors d'une intense sécrétion d'OT, les somas et les dendrites sont directement en contact: soma/soma, et soma/dendrite (au niveau des flèches) ou dendrite/dendrite (d1-d5). Adaptée de (Théodosis et MacVicar, 1996).

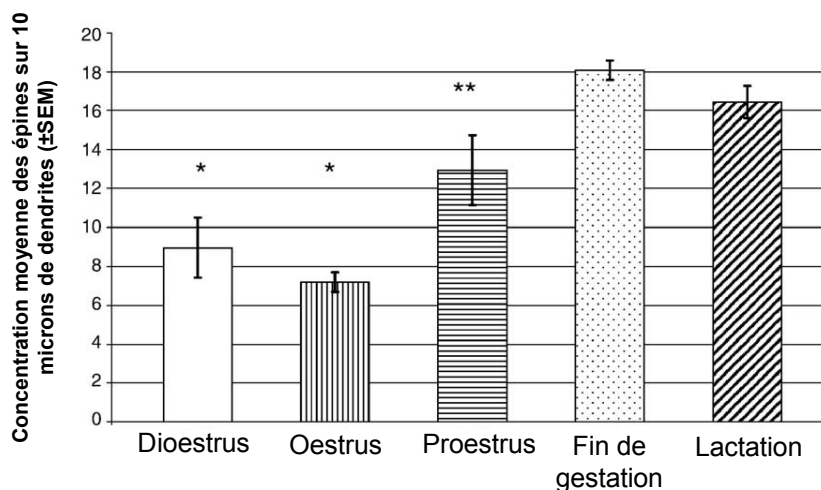


Figure 39: Augmentation de la concentration moyenne des épines sur 10 microns de dendrite dans les groupes d'animaux en gestation et en lactation par rapport aux groupes d'animaux tués lors de trois stades du cycle ovarien. D'après (Kinsley et al., 2006).

lactation ((Theodosios, 1987) ; voir la revue de (Theodosios, 2002)) (Figure 38). Le remodelage neuroglial sur les neurones à ocytocine ne semble cependant pas essentiel à la parturition et à la lactation puisqu'une étude impliquant l'endoN effectuée chez le rat n'a pas mis en évidence de perturbation de ces fonctions physiologiques (Catheline et al., 2006).

Des modifications neuroanatomiques dans des régions du cerveau contrôlant le comportement maternel ont également été mises en évidence chez des mères gestantes ou en période de lactation. Suite à la mise bas, des analyses morphologiques de neurones de l'APO médiane ont montré une augmentation du nombre de prolongements dendritiques ainsi qu'un accroissement de la taille de leur soma suggérant une augmentation de l'activité cellulaire de ces neurones et de leur capacité à transmettre l'information (Keyser-Marcus et al., 2001). De plus, chez des femelles en fin de gestation ou en lactation, une augmentation de la densité des prolongements dendritiques est également observée sur des neurones de l'hippocampe qui participent à la régulation de certains aspects du comportement maternel (Kinsley et al., 2006) (Figure 39).

III) Au cours du cycle ovarien

Des modifications des synapses neuronales et des contacts entre les neurones et les cellules gliales sont observées durant le cycle oestrien en association avec des fluctuations cycliques des niveaux circulants des hormones stéroïdes, notamment de l'E2. Nous avons choisi de détailler deux espèces parmi toutes celles décrites dans la littérature.

1) Chez le rat

a) Dans la région antérieure du diencephale

Le nombre de synapses augmente chez des femelles cycliques entre le proestrus et l'oestrus, deux stades équivalents à la phase folliculaire chez les mammifères, dans le noyau

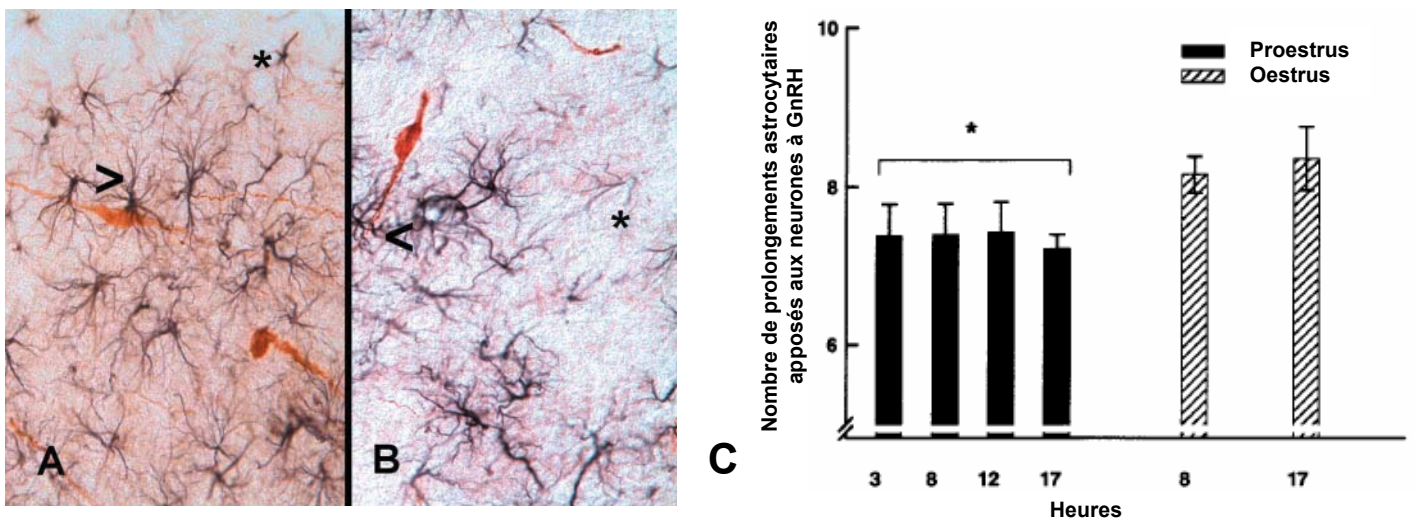


Figure 40: Morphométrie d'astrocytes apposés (tête de flèche) ou non apposés (étoile) à un neurone à GnRH à 3h00 (A) et 12h00 (B) le jour du proestrus. A partir de ces images, le nombre de prolongements astrocytaires au contact des neurones à GnRH a été déterminé au cours des différents stades du proestrus et de l'oestrus (C). D'après (Cashion et al., 2003).

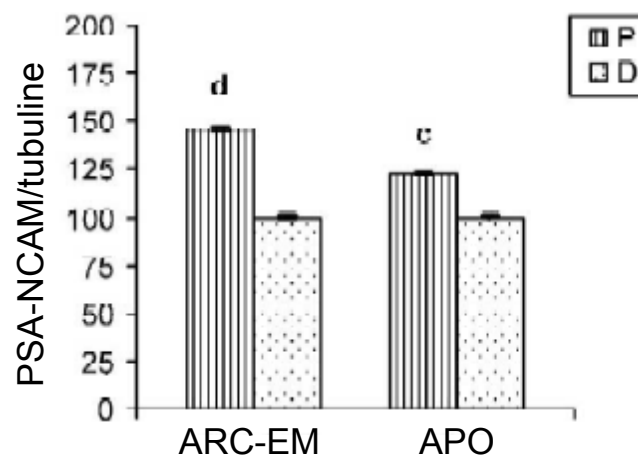


Figure 41: Niveaux protéiques de la PSA-NCAM par rapport à la tubuline dans la région du noyau arqué et de l'éminence médiane (ARC-EM) et dans l'aire préoptique (APO) lors du proestrus (P) et du dioestrus (D) du cycle ovarien chez la rat. D'après (Kaur et al., 2002).

périvertriculaire antéroventral (AVPV), tandis qu'il diminue pendant le metoestrus, période qui correspond au début de la phase lutéale des mammifères (Langub et al., 1994). De façon similaire, la surface de contact entre les neurones à GnRH et les astrocytes ainsi que le nombre de prolongements astrocytaires apposés aux corps cellulaires des neurones à GnRH diminuent le matin du proestrus, avant la décharge préovulatoire de GnRH/LH (Cashion et al., 2003) (Figure 40). Ces remodelages synaptiques et gliaux sont également sous le contrôle de l'E2 et il semblent impliquer les ER β (Kurunczi et al., 2009).

Dans l'APO, une chute des niveaux de la PSA-NCAM a également été observée au moment du dioestrus qui correspond à la fin de la phase lutéale. Elle est associée à une augmentation de l'expression de la protéine acide des fibres gliales (GFAP), un marqueur astro-glial, tandis que les marqueurs synaptiques ne varient pas (Kaur et al., 2002) (Figure 41). Une augmentation similaire de la PSA-NCAM a été mesurée au contact des neurones à GnRH et elle s'accompagne d'une expression plus élevée des polysialyltransférases entre le proestrus et le diestrus (Parkash and Kaur, 2007).

b) Dans le noyau arqué

Des études morphologiques effectuées chez la ratte adulte ont mis en évidence pour la première fois une diminution nette du nombre de synapses axo-somatiques dans la région de l'ARC entre le proestrus et l'oestrus. La quantité de synapses revient à son niveau de base entre l'oestrus et le dioestrus (Olmos et al., 1989). Les réorganisations synaptiques dans l'ARC seraient le résultat d'une modification du nombre de terminaisons au contact des corps cellulaires des neurones et coïncident avec des variations cycliques de l'E2 (Perez et al., 1993). Des analyses immunocytochimiques ont révélé que la majorité de ces terminaisons synaptiques sont de nature GABAergique et qu'elles exercent une activité inhibitrice sur les neurones de l'ARC (Parducz et al., 1993, Csakvari et al., 2006). En effet, la quantité de

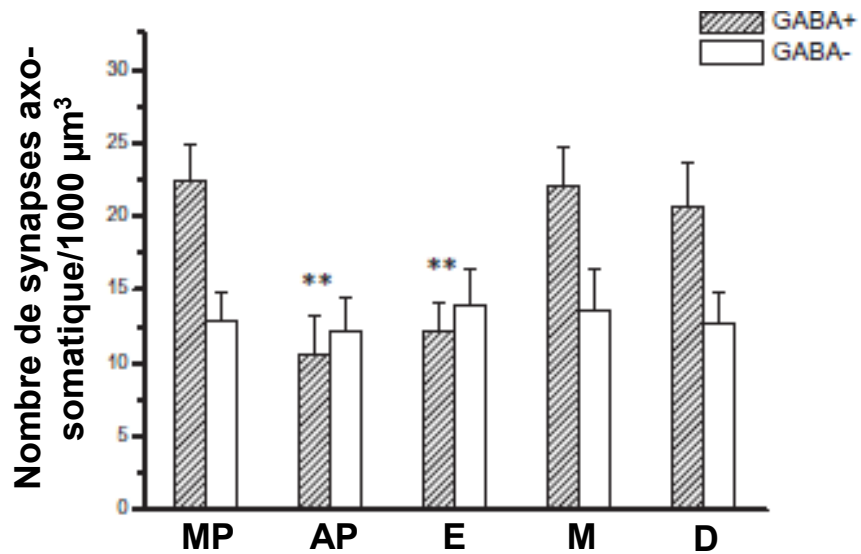


Figure 42: Variation de la densité des synapses axo-somatiques GABAergiques ou non GABAergiques chez des rattes lors du matin (MP) et de l'après midi du proestrus (AP), de l'oestrus (E), du metostrus (M) et du diestrus (D). D'après (Csakvari et al., 2006).

synapses axo-somatiques GABAergiques diminue significativement entre le matin et l'après midi du proestrus, reste à un niveau faible pendant l'oestrus, puis augmente de nouveau entre le metoestrus et le dioestrus (Figure 42). A l'inverse, la densité des synapses non GABAergiques ne varie pas au cours du cycle oestrien (Csakvari et al., 2006) (Figure 42). Ces variations du nombre de synapses GABAergiques pourraient être temporellement corrélées avec le niveau général d'activation cellulaire des neurones de l'ARC au cours du cycle oestrien.

Des modifications morphologiques au niveau des cellules gliales et de leurs prolongements ont également été observées dans l'ARC durant le cycle oestrien (Voir la revue de (Garcia-Segura et al., 2008)). Cette plasticité gliale se traduit par une augmentation de la surface membranaire neuronale recouverte par des prolongements gliaux (Garcia-Segura et al., 1994). L'expression de la GFAP, notamment un accroissement de la densité de cellules et de fibres immunoréactives pour la GFAP augmente l'après midi du proestrus ainsi que le matin de l'oestrus (Kohama et al., 1995). Cette augmentation de la couverture gliale des neurones s'accompagne d'un déplacement transitoire des contacts synaptiques pendant le proestrus et l'oestrus tandis que le phénomène inverse est observé lors de la rétraction des prolongements des cellules gliales (Garcia-Segura et al., 1994).

c) Au niveau de l'éminence médiane et des tanocytes

Parmi les propriétés fonctionnelles des tanocytes, on peut noter la capacité de ceux du type $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (voir la revue de (Rodriguez et al., 2005)) à participer à la barrière sang-cerveau. Ces cellules contribuent à réguler les échanges entre des neurones de l'EM et les vaisseaux sanguins du système porte hypothalamo-hypophysaire (Prevot et al., 1999). Les prolongements tanocytaires localisés dans l'EM se rétractent pendant l'après midi du proestrus facilitant ainsi le contact entre les terminaisons des neurones à GnRH et les

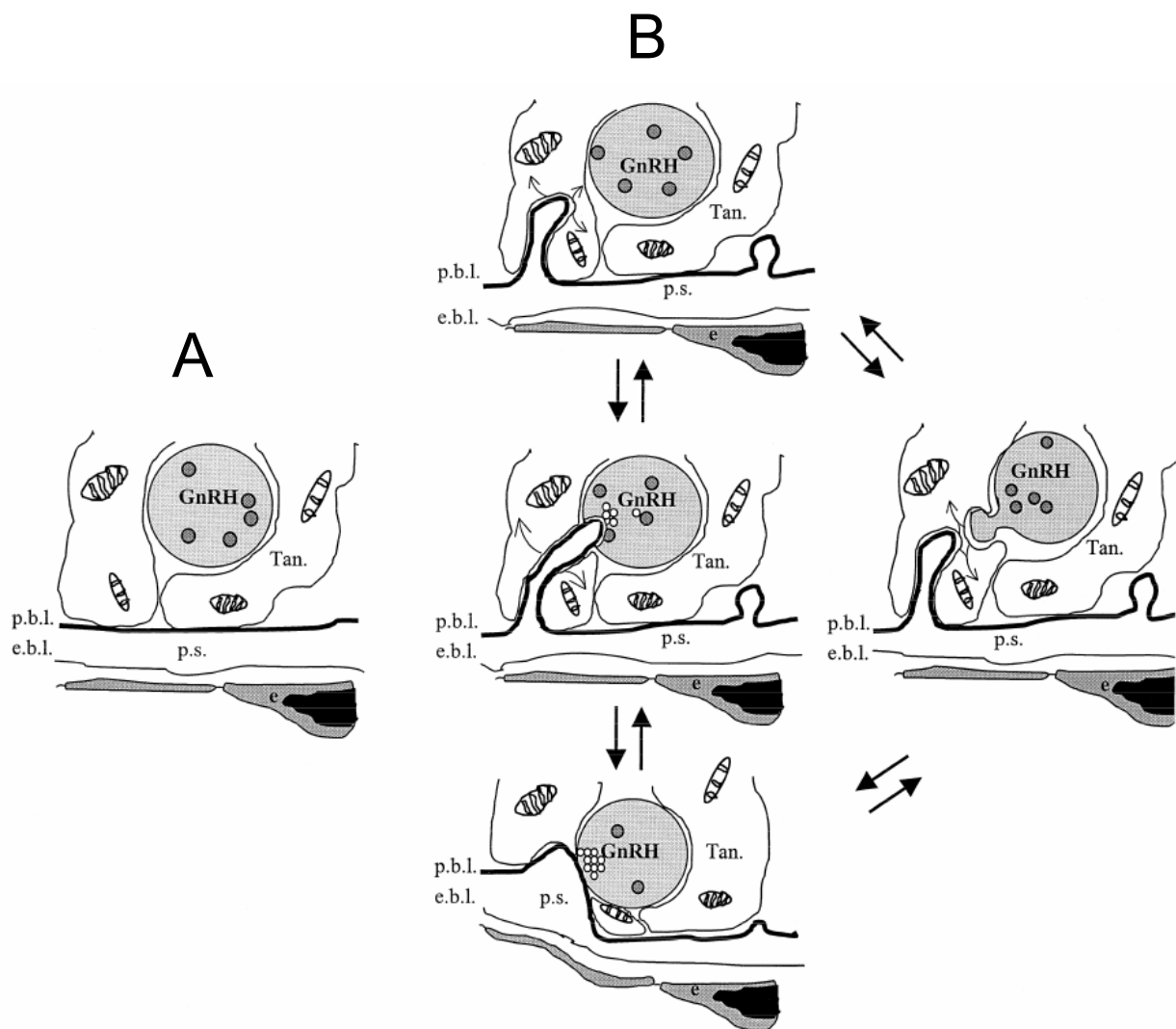


Figure 43: Schéma illustrant les relations anatomiques entre les neurones à GnRH, les tanycytes (Tan) et la lame basale du parenchyme (p.s.) les séparant de l'endothélium (e) lors du dioestrus (A) et du proestrus (B). Les doubles flèches indiquent les différentes étapes de la réorganisation structurale amenant les neurones à GnRH au contact avec la lame basale pendant le proestrus. e. b. l.: lame basale endothéliale; p. s.: espace péricapillaire. D'après (Prevot et al., 1999).

vaisseaux sanguin pour la libération de la GnRH (King and Letourneau, 1994, Prevot et al., 1999) (Figure 43). Les niveaux d'expression de la PSA-NCAM, du GAP-43 (Growth associated protein), un marqueur de la croissance axonale, et de la synaptophysine, un marqueur des boutons synaptiques, diminuent entre le proestrus et le dioestrus dans la région de l'ARC-EM (Kaur et al., 2002). L'association entre la PSA-NCAM et les terminaisons à GnRH de l'EM augmente pendant le proestrus. Ce phénomène est associé à une diminution de l'environnement glial des terminaisons à GnRH (Parkash and Kaur, 2005).

2) Chez la brebis

Au cours du cycle ovarien, le niveau d'association entre les corps cellulaires des neurones à GnRH et la PSA-NCAM est plus élevé en fin de phase folliculaire, au moment de la décharge préovulatoire de GnRH que pendant la phase lutéale. L'inhibition de la PSA-NCAM par l'injection *icv* d'endoN dans l'APO provoque également une diminution importante de l'amplitude de la décharge préovulatoire de GnRH (Franceschini et al., 2009).

IV) Au cours du cycle saisonnier de la reproduction

1) Neurogénèse

a) Chez les oiseaux et les amphibiens

La neurogénèse saisonnière chez l'adulte est bien documentée chez les oiseaux. Elle intervient dans des régions du cerveau contrôlant le chant, une fonction importante pour leur activité reproductrice (voir la revue de (Small and Moore, 2009)). La naissance de nouveaux neurones a été démontrée pour la première fois dans le cerveau du canari adulte par Goldman et Nottebohm où 1,5% de l'ensemble des neurones peuvent être nouvellement générés chaque jour dans l'« High Vocal Center » (HVC) (Goldman and Nottebohm, 1983). Plusieurs noyaux participent au contrôle du chant, l'HVC et le « Robust nucleus of the arcopallium » (RA). Ces

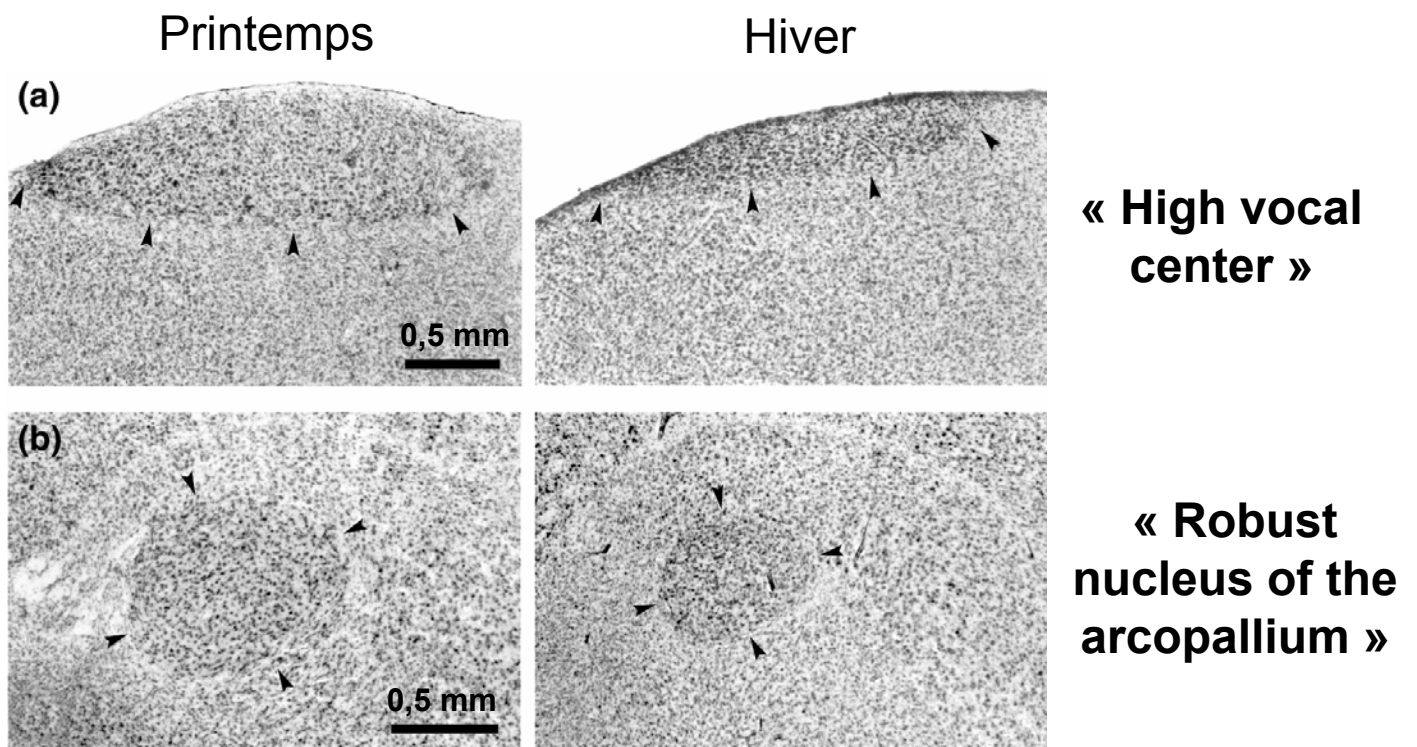


Figure 44: Modifications du volume (indiqué par les flèches) de l' « High vocal center » (a) et du « Robust nucleus of the arcopallium » (b) entre la saison de reproduction (Printemps) et la saison de repos sexuelle (Hiver) chez le Tohi à flancs roux mâle. D'après (Smith et al., 1996).

deux noyaux dans le cerveau des oiseaux sont connus pour montrer des variations saisonnières de leur volume et de leur architecture qui sont concomitantes aux changements de l'activité reproductrice (Nottebohm et al., 1976). Les variations saisonnières du volume de l'HVC seraient le reflet d'une augmentation de l'incorporation de nouveaux neurones mais également de l'augmentation de la taille des cellules, de leur arborescence dendritique et du volume des neuropiles ((Alvarez-Buylla et al., 1994), voir la revue de (Tramontin and Brenowitz, 2000)) (Figure 44). L'utilisation d'un inhibiteur de l'apoptose induit une diminution de la neurogénèse ce qui suggère que la mort cellulaire est un événement nécessaire au recrutement de nouveaux neurones dans l'HVC (Thompson and Brenowitz, 2009). La neurogénèse serait sous l'influence des stéroïdes, en particulier de la testostérone (Absil et al., 2003), et des récepteurs aux androgènes et à l'oestradiol sont présents dans l'HVC (Balthazart et al., 1992, Gahr et al., 1993). Les mécanismes par lesquels la testostérone régule cette plasticité ne sont pas tous connus néanmoins la doublecortine, une protéine associée aux microtubules participant à la migration post-mitotique et à la différenciation des neurones pendant le développement ou chez l'adulte (Francis et al., 1999), a été identifiée comme un des relais des effets de la testostérone sur l'incorporation de nouveaux neurones dans l'HVC du canari (Balthazart et al., 2008).

Chez les amphibiens, la naissance saisonnière de nouveaux neurones a été rapportée dans l'APO et le septum latéral de la grenouille taureau par l'incorporation de 5'-BromodeoxyUridine (BrdU) (Mumaw et al., 2009).

b) Chez les mammifères

L'existence d'un rythme saisonnier de la neurogénèse chez les mammifères adultes est moins bien documentée que chez les oiseaux. Cependant, chez le hamster Syrien, une transition les jours courts inhibiteurs de l'axe reproducteur induiraient une augmentation

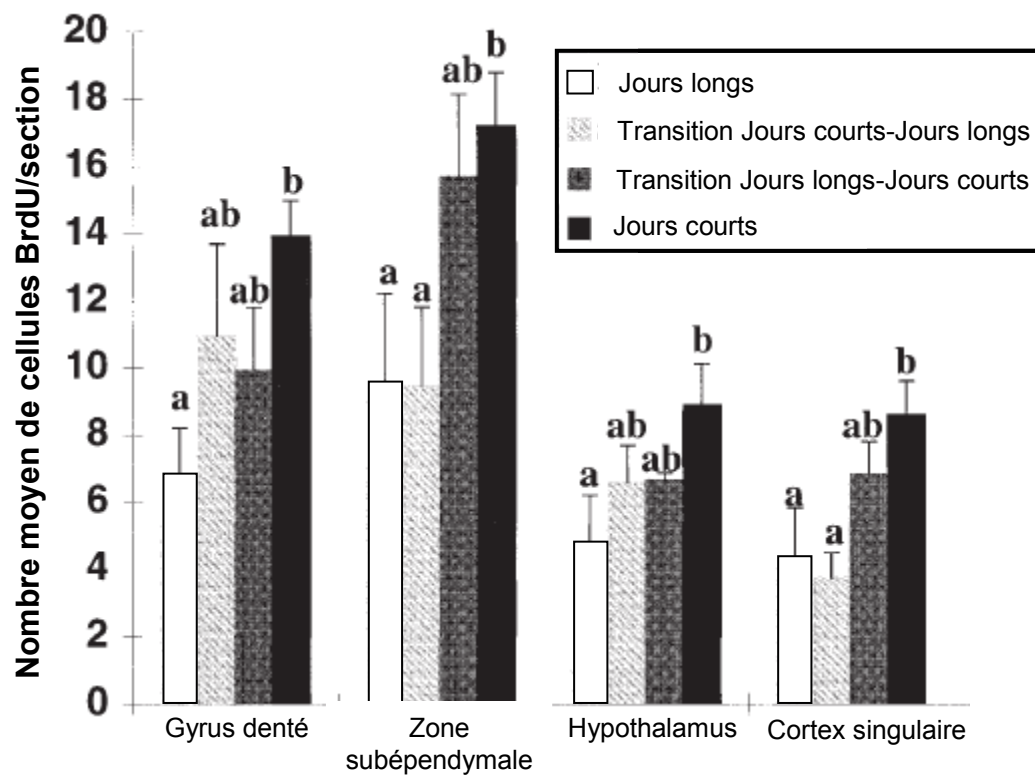


Figure 45: Effet de quatre types de traitements photopériodiques, chez le hamster doré, sur le nombre de cellules BrdU (\pm SEM) dans différentes régions du cerveau. D'après (Huang et al., 1998).

importante de l'incorporation de BrdU dans certaines régions du cerveau : le gyrus denté, l'hypothalamus, le cortex cingulaire et la zone subépendymaire (Figure 45). De plus, la majorité de ces cellules nouvellement générées seraient des neurones et non des cellules gliales (Huang et al., 1998).

Chez des brebis en saison de reproduction, une augmentation importante du nombre de cellules en prolifération ayant incorporées du BrdU par rapport à des brebis en saison d'anoestrus a été observée dans l'hypothalamus et dans le thalamus indépendamment de la présence ou non d'E2 circulant. Certaines de ces cellules BrdU sont immunoréactives pour un marqueur de neurones matures, le NeuN. Certains des noyaux marqués au BrdU sont également associés avec des fibres marquées au GFAP suggérant plutôt un destin astrocytaire pour ces nouvelles cellules (Migaud et al., 2009).

2) Plasticité neuronale

Le réseau cellulaire modulant la sécrétion et la libération de la GnRH est soumis à de multiples réorganisations morphologiques au cours des saisons.

a) Dans l'aire préoptique

En saison de reproduction, la quantité de synapses au contact des somas à GnRH augmente chez la brebis (Xiong et al., 1997) (Figure 46). Il est intéressant de noter que ce résultat est indépendant de la variation des concentrations circulantes en hormones gonadiques puisque les résultats sont similaires chez des brebis OVX traitées avec de l'E2 et chez des brebis intactes (Figure 46B). Une augmentation de la surface de contact entre le soma des neurones à GnRH et la PSA-NCAM a également été mise en évidence chez la brebis lors de la saison de reproduction (Viguie et al., 2001) (Figure 47). Ces modifications saisonnières de l'association entre la PSA-NCAM et les neurones à GnRH s'accompagnent

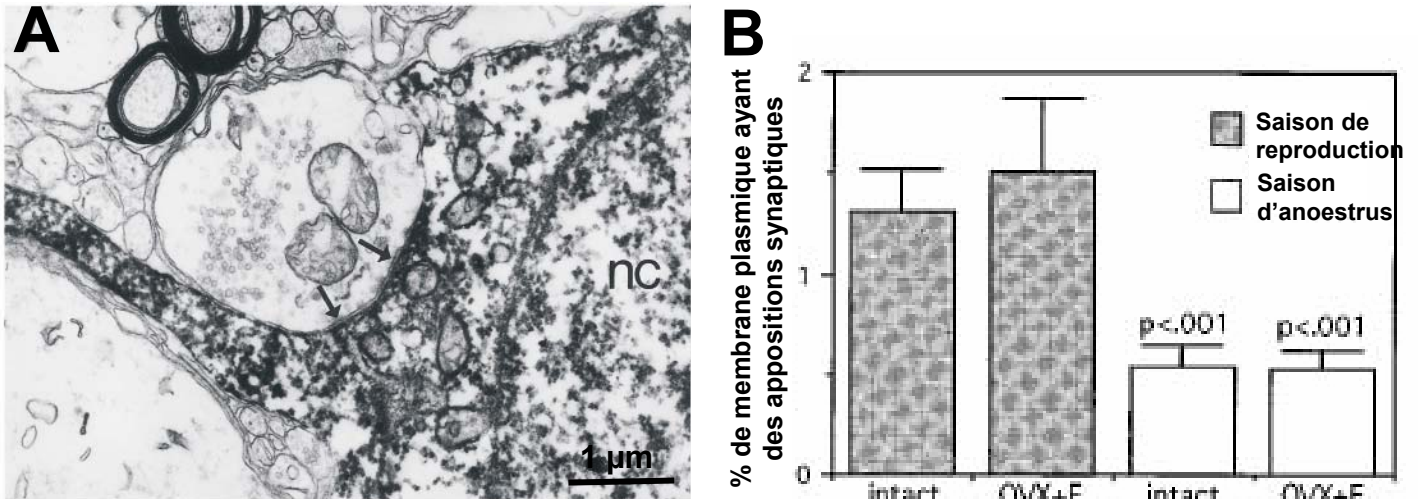


Figure 46: (A) Photographie prise au microscope électronique montrant des contacts synaptiques (flèches) sur un neurone à GnRH. nc, noyau. (B) Comparaison entre les saisons du pourcentage de membrane plasmique des neurones à GnRH ayant des appositions synaptiques chez des brebis intactes ou ovariectomisées avec un implant d'oestradiol (OVX+E2). D'après (Xiong et al., 1997).

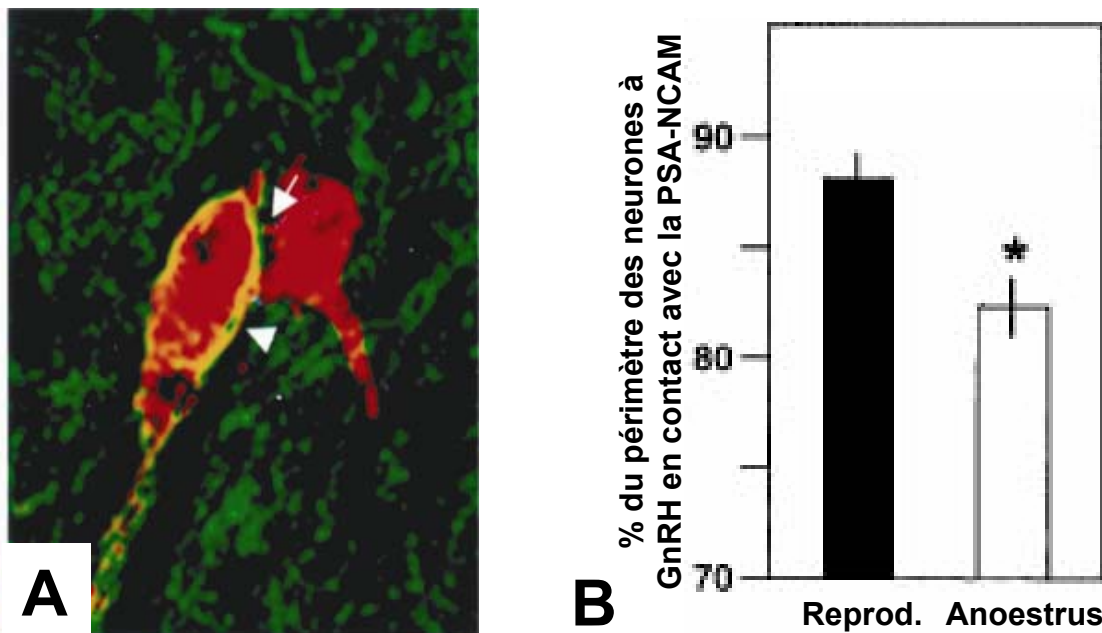


Figure 47: (A) Photographie prise au microscope confocal montrant deux neurones à GnRH (en rouge) et la PSA-NCAM (en vert). Le neurones à GnRH de gauche est entouré par un marquage PSA-NCAM (fluorescence jaune). Les flèches indiquent la colocalisation du marquage PSA-NCAM et GnRH. (B) Comparaison entre les saisons du pourcentage du périmètre des neurones à GnRH en contact avec de la PSA-NCAM chez des brebis ovariectomisées avec un implant d'oestradiol. D'après (Viguié et al., 2001).

également de variations de la nature des contacts neuropeptidergiques et monoaminergiques sur ces neurones entre les deux saisons. Le nombre de terminaisons à NPY au contact du soma à GnRH semble plus important en saison de reproduction (Jansen et al., 2003, Pompolo et al., 2003a). A l'inverse, les appositions à β -END sont plus nombreuses en saison d'anoestrus (Jansen et al., 2003). Chez des brebis en saison de reproduction, le nombre de terminaisons à Kiss sur les neurones à GnRH est plus important alors que les terminaisons RFRP sont moins nombreuses (Smith et al., 2008). Les résultats concernant le glutamate et le GABA sont contradictoires. Selon le type de transporteur du glutamate utilisé pour identifier les terminaisons de nature glutamatergique, les variations saisonnières sont différentes: le nombre d'appositions marquées avec VGlut-2 augmente en saison de reproduction (Sergeeva and Jansen, 2009) alors que le nombre de cellules marquées avec VGlut-1 ne semble pas varier entre les deux saisons (Pompolo et al., 2003a). Les variations saisonnières concernant les terminaisons GABAergiques chez la brebis ne sont pas évidentes puisqu'une étude montre une diminution du nombre de contacts GABA sur les dendrites à GnRH en saison d'anoestrus (Jansen et al., 2003) tandis que le phénomène inverse a été observé dans deux autres équipes (Pompolo et al., 2003a, Sergeeva and Jansen, 2009).

Cette plasticité saisonnière au contact des neurones à GnRH joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion de GnRH néanmoins ces modifications synaptiques ne sont pas suffisantes pour expliquer le passage des brebis en saison de repos sexuel qui nécessite la présence des hormones thyroïdes. Adams et collaborateurs ont récemment suggérés que les variations du nombre des contacts sur les neurones à GnRH ne sont pas suffisantes pour expliquer les variations saisonnières de la reproduction (Adams et al., 2006).

b) Dans la région rétrochiasmatique

La plasticité synaptique a également été mise en évidence dans le noyau A15 de la région rétrochiasmatic pour les neurones dopaminergiques. La présence de terminaisons synaptiques sensibles à l'E2 sur les neurones à la dopamine semble nécessaire puisque ces neurones sont capables de répondre à un traitement à l'E2 (Gayraud et al., 1994, Goodman et al., 2000) alors qu'ils ne contiennent pas de ER α (Skinner and Herbison, 1997), ni de ER β (Lubbers et al., 1999). Le nombre de contacts sur les dendrites des neurones du noyau A15 ainsi que la longueur de ces même dendrites augmentent en saison d'anoestrus (Adams et al., 2006). Cette plasticité sur les neurones à dopamine contribuerait au rétrocontrôle négatif exercé par l'E2 lors de la saison d'inactivité sexuelle (Adams et al., 2006). Les populations cellulaires sécrétant le GABA et le glutamate ont été identifiées comme pouvant relayer les effets de l'E2 sur les neurones du noyau A15. Les contacts synaptiques de nature GABAergique représentent 25-30% de l'ensemble des appositions sur les neurones à la dopamine (Adams et al., 2006, Bogusz et al., 2008) et leur nombre ne semble pas varier entre les saisons (Bogusz et al., 2008, Singh et al., 2009). Les terminaisons glutamatergiques porteuses de ER α sont moins nombreuses sur les neurones dopaminergiques en saison d'activité sexuelle (Pompolo et al., 2003b) ce qui pourrait contribuer à l'inaptitude de l'E2 à stimuler ces neurones en saison de reproduction (Singh et al., 2009).

c) Au niveau de l'éminence médiane et des tanocytes

Les fibres à GnRH de l'EM font l'objet de réorganisations morphologiques saisonnières pouvant participer à la régulation photopériodique de la sécrétion de GnRH. La présence de la PSA-NCAM au contact des terminaisons à GnRH a été observée dans la zone externe de l'EM chez la brebis indiquant l'existence possible de phénomènes plastiques dont le caractère saisonnier n'a pas été mis en évidence dans cette étude (Viguie et al., 2001). Chez un autre animal saisonnier, la caille japonaise, des modifications morphologiques des

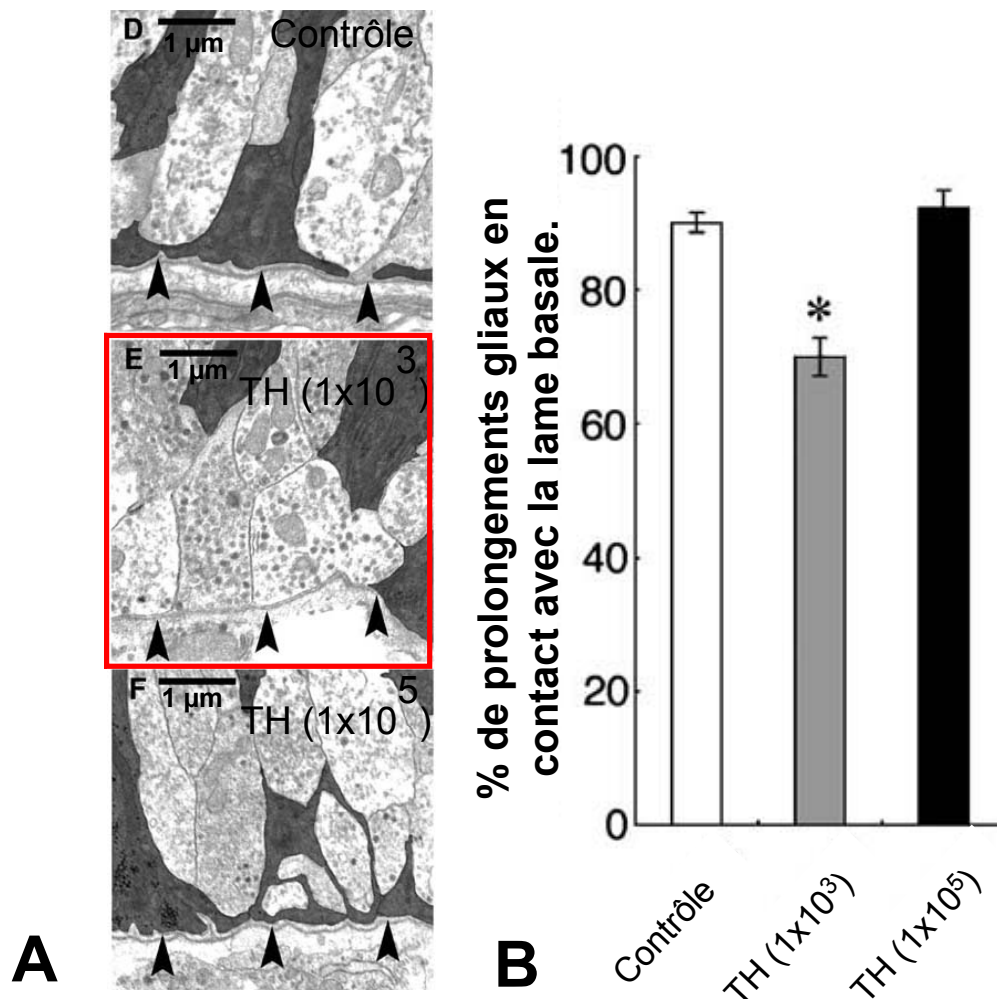


Figure 48: (A) Effet d'un implant d'hormones thyroïdiennes (TH) sur les changements morphologiques affectant les prolongements gliaux dans l'éminence médiane de la caïlle japonaise. Les flèches montrent la lame basale. (B) Quantification de la proportion de prolongements gliaux en contact avec la lame basale dans les trois groupes d'animaux. D'après (Yamamura et al., 2006).

interactions entre les terminaisons à GnRH et les cellules gliales de l'EM ont été observées, montrant notamment un rapprochement des fibres à GnRH vers l'espace péricapillaire limité par la lame basale et un environnement glial moins riche autour des terminaisons à GnRH pendant les jours longs (Yamamura et al., 2004). Cette plasticité gliale en faveur d'une régulation de la libération de la GnRH dans la région de l'EM serait aussi sous le contrôle des hormones thyroïdiennes (Yamamura et al., 2006) (Figure 48).

Le rôle des tanycytes dans la plasticité liée à la reproduction saisonnée est peu clair néanmoins plusieurs arguments sont en faveur d'une telle implication chez les ongulés. Chez le hamster Djungarian et Sibérien, un traitement photopériodique de jours courts, inhibiteur de l'activité sexuelle, induit des modifications morphologiques des tanycytes qui sont associées à une diminution de l'expression de la NCAM et de la PSA-NCAM dans l'AHA et l'HMB indépendamment de la présence de stéroïdes gonadiques (Lee et al., 1995, Bolborea et al., 2009). Un traitement photopériodique de jours longs stimule également l'expression de la nestine et du GPR50, qui appartient à la famille de récepteurs à la mélatonine, dans les tanycytes chez le hamster Sibérien (Barrett et al., 2006). Les tanycytes sont également sensibles aux variations de photopériodes puisque des modulations de l'expression de la Dio2, l'enzyme de synthèse de la T3 (Yoshimura et al., 2003, Watanabe et al., 2004, Revel et al., 2006b, Yasuo et al., 2006, Hanon et al., 2008), et d'un transporteur des hormones thyroïdiennes, le MCT8 (Herwig et al., 2009) ont été observées chez plusieurs espèces saisonnées suite à des changements de traitement lumineux. Les contacts axo-gliaux dans l'EM entre les terminaisons axonales qui libèrent la TRH (TSH-releasing hormone) dans l'espace extra-cellulaire et les tanycytes $\beta 2$ qui présentent une activité peptidase pyroglutamyl II, une enzyme qui dégrade la TRH, feraient l'objet de remaniements morphologiques qui participeraient à la régulation des niveaux circulants des hormones thyroïdiennes au niveau de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde (Sanchez et al., 2009).

OBJECTIFS

Les données bibliographiques ont bien établi que la variation de la durée nocturne de sécrétion de la mélatonine, illustrant les modifications saisonnières de la photopériode, est un des facteurs principaux contrôlant la saisonnalité de la fonction de reproduction ovine. Les mécanismes et les substrats cellulaires activés par la mélatonine pour contrôler le passage de la saison de reproduction en anoestrus et vice versa sont encore mal compris, aussi en nous basant sur des travaux antérieurs de l'équipe, nous avons décidé de tester l'hypothèse de remaniements morphologiques induit par un changement de photopériode. Notre équipe a montré que la mise en place dans l'hypothalamus prémamillaire de micro-implants de mélatonine chez des brebis soumises à des conditions d'éclairage reproduisant les jours longs provoque, 45 à 60 jours plus tard, une augmentation des niveaux de sécrétion de la LH similaire à celle provoquée par un traitement de jours courts (Malpaux et al., 1998). L'existence d'une plasticité neuronale induite sous l'effet d'une transition photopériodique est une hypothèse cohérente avec ce délai. En effet, une plasticité structurale a été montrée dans plusieurs régions cérébrales entre la saison de reproduction et celle de repos sexuel mais jusqu'ici aucune étude n'a montré de lien direct entre la variation de la photopériode et un remodelage des connexions cellulaires dans et entre différentes régions diencephaliques. L'objectif général de cette thèse a donc été de déterminer si une transition photopériodique était suffisante pour induire des remaniements morphologiques pouvant avoir des conséquences fonctionnelles sur la fonction saisonnière de reproduction.

Cet objectif a été découpé en trois objectifs spécifiques. Nous avons d'abord déterminé si une modification du traitement lumineux pouvait induire des variations des niveaux protéiques d'un marqueur de plasticité, la PSA-NCAM, ainsi que des niveaux d'expression de la NCAM dans différentes régions cérébrales participant au contrôle de la fonction de reproduction ou à l'intégration du message photopériodique. Nous avons ensuite cherché à comprendre l'importance fonctionnelle pour la reproduction saisonnière des

variations d'expression du marqueur de cette plasticité dans deux régions cérébrales : l'HPM, d'une part, et l'APO, d'autre part, qui représentent respectivement la « porte d'entrée » et la « porte de sortie » du signal mélatoninergique affectant la reproduction dans l'hypothalamus.

Dans un dernier chapitre de ce travail, nous avons souhaité identifier les populations de neurones impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction qui étaient spécifiquement affectées par les remaniements morphologiques. Pour cela, nous avons déterminé si une transition photopériodique activatrice de l'activité gonadotrope était suffisante pour moduler l'association entre les neurones à GnRH et la PSA-NCAM ou le nombre de contacts synaptiques sur les neurones à GnRH. De la même façon, nous avons également étudié l'interaction entre la PSA-NCAM et les neurones à β -END, connus pour relayer le rétrocontrôle négatif des stéroïdes gonadiques, en particulier la progestérone, aux neurones à GnRH lors de la saison d'anoestrus. Enfin, nous avons quantifié les effets d'une modification du traitement lumineux sur les populations neuronales exprimant le Kiss, un neuropeptide récemment découvert dont le rôle prééminent sur la mise en œuvre du pic de GnRH précédant l'ovulation n'est plus à démontrer.

1er CHAPITRE : Une transition photopériodique est-elle suffisante pour induire des remaniements morphologiques ?

I) Introduction

Plusieurs études ont démontré l'existence de remaniements morphologiques au contact des populations impliquées dans le contrôle de la reproduction entre la saison de reproduction et la saison d'anestrus chez la brebis. Afin de déterminer si la photopériode est le facteur clé permettant par sa variation d'induire des remaniements morphologiques, nous évaluerons dans ce chapitre les niveaux et l'importance fonctionnelle de la plasticité induite par une modification du traitement photopériodique dans des régions du cerveau participant à la modulation de l'activité saisonnière de la fonction de reproduction.

Nous avons déterminé, tout d'abord, si le passage d'un traitement photopériodique mimant les jours courts à un traitement de type jours longs, ou la transition photopériodique inverse, peut induire des variations des niveaux protéiques de la PSA-CAM et/ou des niveaux d'expression de la NCAM dans différentes régions du cerveau impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction (aire préoptique, aire hypothalamique antérieure, hypothalamus ventromédian, noyau arqué, éminence médiane) ou dans l'intégration du message mélatoninergique (noyau paraventriculaire, noyau dorsomédian, hypothalamus prémamillaire). Nous avons ensuite évalué l'importance fonctionnelle pour la reproduction saisonnée des variations de la PSA-NCAM mesurées dans l'aire préoptique puis dans l'hypothalamus prémamillaire. Pour cela, nous avons mimé une diminution de la PSA-NCAM par une injection intracérébrale d'endoneuraminidase N et mesuré les niveaux plasmatiques de LH chez les animaux traités et chez un groupe témoin afin d'évaluer les effets de cette injection sur l'activité de l'axe gonadotrope des brebis.

Cette étude fait l'objet d'un article qui sera soumis prochainement dans *Endocrinology*.

Photoperiod-driven modulation of PSA-NCAM levels within several hypothalamic regions of the ewe in regard with the reproductive function

S. Chalivoix^{a,b,c,d}, F. Chaudun^{a,b,c,d}, D. Guillaume^{a,b,c,d}, J. Cognié^{a,b,c,d}, J. C. Thiéry^{a,b,c,d}, B. Malpoux^{a,b,c,d}, L. Dufourny^{a,b,c,d,*}

^a INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

^b CNRS, UMR 6175, F-37380 Nouzilly, France

^c Université de Tours, F-37041 Tours, France

^d Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

Short title: Photoperiodic variations of hypothalamic PSA-NCAM related to reproductive status.

***Corresponding author:** Dr Laurence Dufourny

Centre INRA de Tours

F-37380 NOUZILLY, France

Phone: (+33) 2 47 42 79 03

Fax: (+33) 2 47 42 77 43

laurence.dufourny@tours.inra.fr

Keywords: Sheep, seasonal reproduction, plasticity, western blot, endoneuraminidase N.

Abstract

Cellular mechanisms induced by melatonin to synchronize seasonal reproduction in several species, including sheep, remain unclear. We sought to evaluate the scale and physiological significance of neural plasticity to explain the delay observed following a transition from long (LD, 16H light/24H) to short (SD, 8H light/24H) days and from SD to LD (30-35 days). Using Western blots in ovariectomized estradiol-replaced ewes, we found a decrease of the polysialylated form of neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), a plasticity marker, in most hypothalamic areas from D15 following a transition to SD. This decrease seemed linked to variations of the polysialylation degree since NCAM levels were not different between groups as shown by RT-PCR. Following a transition to LD, PSA-NCAM content increased at D15 in most regions except in the premammillary hypothalamic area (PMH).

Functional importance for seasonal reproduction of the variations was assessed for the PMH and the preoptic area (POA). PSA-NCAM synthesis was blocked by stereotaxic injections of endoneuroaminidase N and fluctuations of LH secretion were recorded in treated and control ewes. Inhibition of PSA-NCAM in the PMH in SD maintained ewes failed to produce a significant effect on LH secretion, whereas similar treatment in the POA before a transition to SD potently delayed activation of the gonadotrope axis in half of the ewes. Our results suggest that photoperiod alone can induce neuronal plasticity that may participate to the regulation of seasonal reproduction particularly in the POA.

Introduction

In sheep, a seasonal species that displays reproductive activity during autumn and winter shortening days hence named a short day breeder, an artificial light treatment reproducing summer long days (LD) will lead to an artificial anestrus period (Lincoln and Short, 1980). However, this physiological status can be reverted by insertion of a melatonin implant into the premammillary hypothalamus (PMH), that will promote an increase of luteinizing hormone (LH) secretion 45 to 60 days later (Malpoux et al., 1998). Melatonin signal is the key mechanism allowing the transduction of the duration of the day into a chemical signal to the central nervous system. Melatonin is indeed nightly secreted and its duration of secretion mimics exactly the length of the night and its variations through the year. Interpretation of this signal is a key point for numerous animal species to adapt to their environment and allow the birth of their offspring at the most appropriate time of the year *i.e* spring when food availability is maximal. However, to date mechanisms by which melatonin regulates neuronal networks driving reproduction remain puzzling, one of the less elucidated being the long period of latency between the increase of night duration, and hence melatonin secretion, and the increase of LH secretion. Several molecular and cellular events may occur during this period such as genesis of new cells, modulation of the existing cell connexions and/or alteration of cell content in the brain. Among these hypotheses, morphological plasticity appeared as the most convincing. Several studies have indeed demonstrated morphological rearrangements within different brain areas between breeding and anoestrus seasons in adult ewes. Xiong and colleagues first observed a twice larger apposition number on GnRH neurons of the preoptic area during the breeding season than during anestrus (Xiong et al., 1997). A potent increase of the association between GnRH somas and the PolySialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM), a marker for neuronal plasticity, has

later been reported during the breeding season (Viguie et al., 2001). Variations of PSA-NCAM content appear to be correlated with seasonal variations of the neuropeptidergic content of the inputs on GnRH neurons. For example, neuropeptide Y (NPY) terminals (Jansen et al., 2003) and glutamatergic afferents (Sergeeva and Jansen, 2009) increased during the breeding season whereas the β -endorphin (β -END) appositions on GnRH somas were more numerous during the anestrus season (Jansen et al., 2003). The situation is more contrasted for the gamma-amino butyric acid (GABA) inputs. The number GABA terminals on GnRH dendrites seems be lower during anestrus (Jansen et al., 2003) while the opposite has been found on GnRH somas (Pompolo et al., 2003a, Sergeeva and Jansen, 2009). Seasonal plasticity has also been reported for the A15 dopaminergic neurons (Adams et al., 2006), that transduce estradiol negative feedback to GnRH neurons during anestrus and represent therefore a critical component of the neural circuitry mediating the effect of the photoperiod on the seasonal reproduction in ovine species (Thiery et al., 1989). Synaptic contacts on A15 neurons and the dendrite length of A15 neurons were increased during the anestrus season. Phenotypes of these synapses also vary through seasons since more glutamatergic close contacts were present on A15 neurons during anoestrus (Singh et al., 2009) while there is no seasonal variations of the GABAergic terminals (Bogusz et al., 2008, Singh et al., 2009). This mechanism may depend on thyroid hormones necessary for the transition from breeding season to anestrus season (Adams et al., 2006).

Despite a clear demonstration of the existence of a structural plasticity between the breeding and the anestrus seasons in these studies, the direct implication of photoperiod variations in this phenomenon remains to be proved. In this study, we therefore sought to evaluate the scale and physiological significance of the morphological reorganizations induced by a change of photoperiodic treatment. Thus, this study had two major objectives. We first determined whether a transfer from LD to short days (SD) or the reverse one induced

variations of PSA-NCAM and/or NCAM contents within several brain regions involved either in the transduction of the photoperiodic message (paraventricular nucleus (PVN), dorsomedial nucleus (DMN), PMH), or in the control of reproduction (preoptic area (POA), anterior hypothalamic area (AHA), ventromedial hypothalamus (VMH), arcuate nucleus (ARC), median eminence (ME)). We then addressed the physiological significance of PSA-NCAM changes for seasonal reproduction in two areas, the PMH and the POA.

Materials and Methods

Animals and treatments

Experiments were performed on sexually mature adult Ile-de-France ewes (n=84) and all ewes have had free access to food, water and mineral licks at the INRA research station. Before the start of study, all ewes were ovariectomized and implanted subcutaneously with a 2-cm Silastic capsule containing 17β -estradiol (Sigma, St-Louis, MO, USA) to maintain low physiological serum concentrations of oestrogen (approx. 2 pg/ml (Evans et al., 1994)). For all experiments, ewes were synchronized with one artificial photoperiodic cycle of 75 SD (8 hours of light (L): 16 hours of darkness (D) per 24h) followed by 75 LD (16L: 8D) prior to the beginning of any protocol. Two sets of experiments were performed with these animals. The first one aimed at determining whether a switch of photoperiod from LD to SD or the reverse could induce morphological reorganizations assessed by modifications in PSA-NCAM and NCAM contents (Experiment 1). The second one aimed at measuring the functional significance on the seasonal reproductive function of some of the PSA-NCAM variations we found in the first set of experiments (Experiment 2).

All experimental procedures were performed in accordance with local animal usage regulation (authorizations no. A 37073, French Ministry of Agriculture). All procedures were approved by the Regional ethics committee (Saisine INRA37-CL2007-025).

Photoperiodic treatments

Exp.1, study of PSA-NCAM variations: PSA-NCAM levels were studied following a transition from LD to SD and following a transition from SD to LD. Ewes were grouped by age and weight, and 29 were then transferred from LD to SD on Day (D) 0. Ewes were killed at day D0 (n=5), D15 (n=6), D30 (n=7), D45 (n=6) and D80 (n=5). Eleven other ewes were transferred from SD to LD on D0 and killed on D0 (n=4), D15 (n=4) and D35 (n=3).

Exp.1, study of NCAM variations: For each photoperiodic treatment (from LD to SD or from SD to LD), NCAM contents were determined in ewes killed at D0 (n=5 for each photoperiodic treatment) and at D45 following a passage to SD (n=5) or at D15 following a passage to LD (n=5).

Exp.2, study of the importance of PSA-NCAM variations: Two sets of experiments were conducted on 4 groups of 6 ewes of similar ages and weights. These animals were synchronized with a photoperiodic treatment made of an alternation of 75 SD and 75 LD, as for experiment 1. These two experiments were carried out in the SD for the first one, and started in LD and finished in SD for the second one.

LH assays

Neuroendocrine reproductive activity was assessed from the concentration of LH in blood samples obtained twice weekly. LH secretion was assessed from the month preceding the final transition to the end of the experiment. In this model, periods of elevated LH are indicative of an active gonadotrope axis, and those of low LH are associated with a sexual

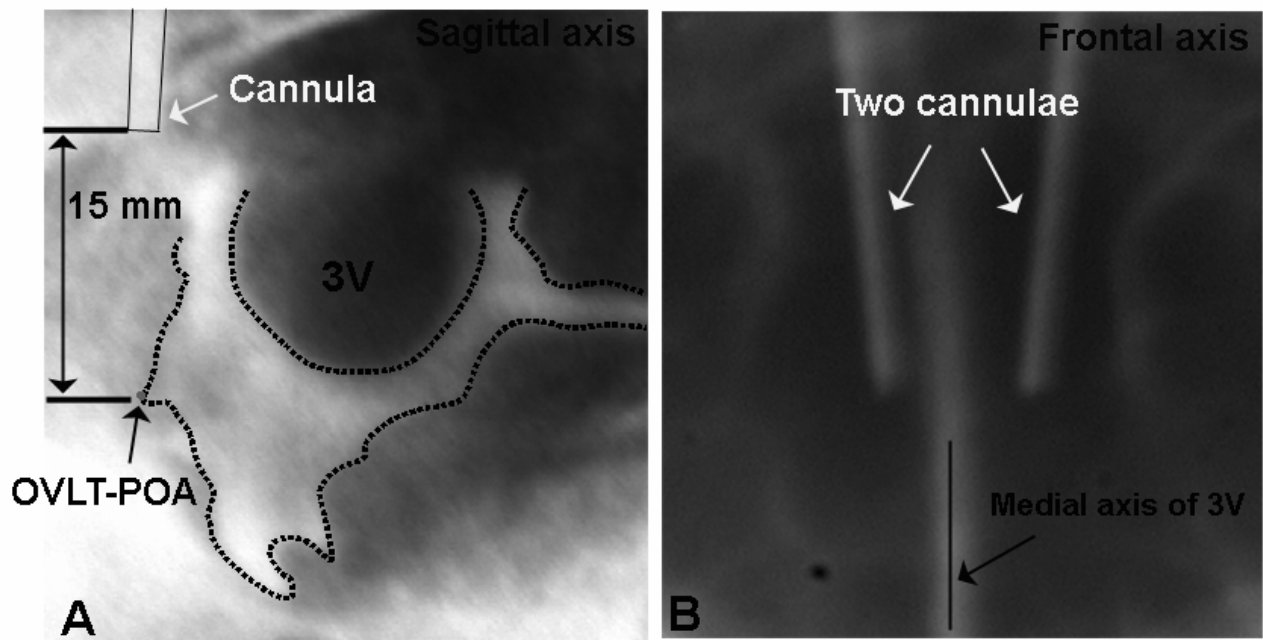


Figure 1. Example of stereotaxic placement to reach the OVLT-POA in one ewe. After injection of an X-Ray opaque solution in the lateral ventricle, a sagittal (A) and frontal (B). X-Ray are done in order to place 2 cannula guides 15 mm above the targeted injection sites. 3V, third ventricle.

inactivity (Legan et al., 1977, Legan and Karsch, 1980). Plasmatic LH concentrations were determined using the double antibody ELISA immunoassay technique published previously (Faure et al., 2005). The intra- and inter-assay coefficients of variation of the control averaged 12% and 8%, respectively.

Endoneuraminidase N injections

In Exp.2, animals were stereotaxically implanted with guide cannulae after deep isoflurane/oxygen anaesthesia. To determine the importance of PSA-NCAM variations in the PMH for reproductive function in the first set of experiments, cannulae were inserted bilaterally 15 mm above the PMH, using frontal and lateral X-rays of cerebral ventricles as anatomical guides, in 12 ewes 3 weeks after the last transition to SD. The distance between the tip of the cannula and the injection site allowed a good preservation of the cerebral tissue at the time of injection. When LH levels were indicative of an activation of the gonadotrope axis, bilateral injections of 0.7 unit of endoneuraminidase N (endoN, treated group; Abcys-QED Biosciences, Paris, France) or 1 μ l of boiled endoN (control group) were performed under isoflurane/oxygen anaesthesia. Biweekly blood collection was carried out until LH secretion falls below 0.1 ng/ml for 3 consecutive samples.

In the second set of experiments, cannulae were bilaterally implanted following the same procedure one month after the last transition to LD to target the preoptic area (POA) of 12 ewes (Fig. 1). Then, 63 days after the transition to LD, 1.4 unit of endoN (treated group) or 2 μ l of boiled endoN (control group) were bilaterally injected. Finally, two groups of ewes were transferred from LD to SD and blood collection was carried out until a rise in LH associated with an activation of the gonadotrope axis was detected in 3 consecutive samples.

Tissue collection

Exp. 1: For PSA-NCAM content measurement

To avoid any circadian modulation of PSA-NCAM content, all ewes were killed between 11.00 am and 11.30 am by decapitation. Brains were quickly removed, frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C until further processing. For positive control, one female Wistar (rat) brain was dissected out and frozen following the same procedure.

Exp. 1: For NCAM content estimation

Animals were decapitated, their brains were dissected out and left on a bed of crushed ice for 10 min. Thick sections (2 mm) were then performed on each brain and 4 regions of interest were carefully dissected out with a sterile scalpel: POA and ARC for the transition to SD, ARC and PMH for the transition to LD. Then, all samples were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing.

Exp. 2: For PSA-NCAM immunoreactivity assessment

When LH levels fall to the expected levels (see in “Endoneuraminase N injections” paragraph), all animals were decapitated in a registered slaughterhouse by a certified butcher and the brain was fixed by perfusion through both carotids with 1l of 1% sodium nitrite in 0.9% saline, followed by 3l of fixative containing 4% paraformaldehyde and 15% saturated picric acid in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4. After dissection, brains were left in 100 ml of 20% sucrose at 4°C until soaked. A block containing the whole diencephalon was dissected out, free-floating coronal sections (60 µm) were cut in a freezing microtome and were collected in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH=7.4).

Western blot to measure PSA-NCAM levels

At the time of the experiment, ME was dissected out. Thick coronal sections (1.5 mm) were performed at 4°C using a “ham” slicer (Magimix). Relevant brain regions (POA, AHA,

VMH, DMH, ARC, PMH, PVN) and cortex (negative control) were micropunched (Harris Uni-Core, Redding, USA) and pooled in order to obtain one tube per area per animal. Samples from each area were weighed and crushed in 10% (w/v) 50mM Tris-HCl (pH=7.4) containing 1mM EDTA (Quantum-Appligène S.A, Illkirch, France), 1 μ M leupeptin (Roche Diagnostic, Ville, France), 1 μ M pepstatin (Roche), 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Roche), and 1% igepal CA-630 (Sigma) and centrifuged for 10 min at 10.000 rpm. Protein content in the supernatant was determined by the Bradford method using a BC Assay reagent kit (Interchim, Montluçon, France). Each homogenate was then diluted in homogenization buffer to get a final concentration of 1 mg protein/ml and stored at -80°C until further processing. Using the same protocol, the rat brain tissue was crushed and prepared to obtain a final concentration of 5 mg/ml and stored at -80°C in aliquots.

Each sample was diluted 1:4 in 0.25M Tris-HCl (pH 6.8) buffer containing 20% glycerol, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% β -mercaptoethanol and 1mg bromophenol blue. Each well of the 8% acrylamide gel received 5 μ l of ovine sample, 4 μ l of the rat sample or 3 μ l of the of protein standard solution (161-0373 molecular weight, Bio-Rad, CA, USA). Each gel contains two lanes of the control rat sample and samples of a same area from up to 12 ewes distributed in a random way. Each ovine sample is deposited 3 times on different membranes. Migration of samples was performed at 100 V for 90 min in 0.25M Tris-glycine running buffer. Transfer of proteins onto a nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher & Schuell, Bioscience, Dassel, Germany) was performed at 120mA for 2 h using a semi dry apparatus (Owl Separation Systems, Portsmouth, UK). Membranes were then placed in 4% skimmed milk 0.25M Tris-buffered saline buffer pH7.4 containing 0.1% Tween-20 (TBS-T; Sigma) for 2 h at room temperature (RT). Membranes were then incubated overnight at 4°C in TBS-T containing 4% bovine serum albumin (Sigma) containing a mixture of primary antibodies: a monoclonal mouse anti PSA-NCAM IgM antibody (1:600; Abcys) and a

polyclonal rabbit anti-tubulin IgG antibody (1:100K; Chemicon, Temecula, CA, USA). The tubulin is used as a reference protein. After washes in TBS-T (3x10 min), membranes were incubated in a mixture of the adequate secondary antibodies, peroxidase-linked goat anti-IgM of mouse IgG (1:2.000; Sigma) and peroxidase-linked goat anti-rabbit IgG (1:5.000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD, USA), for 2 h at room temperature. Following incubation, membranes were washed in TBS-T buffer (3x10 min).

The blots were revealed using a western blot chemiluminescence detection kit (Super Signal West Dura, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and membranes were observed through a computerized image analyzer to detect the signal linked with each protein (VDS Pharmacia, Matsuyama, Japon).

qRT-PCR to detect NCAM

Total RNA was extracted from the dissected brain samples with the QIAzol solution (RNeasy®lipid tissus miniKit, Qiagen Sciences, Valencia, CA, USA) according to the protocol of the manufacturer. RNA (2 µg) was then reverse-transcribed using Superscript III reverse transcriptase (200U; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of oligo(dT) (50 µM; Invitrogen), dNTP (10 mM; Invitrogen), and RNasine (20U; Promega, Charbonnières, France) at 50°C for 50 min.

Each PCR reaction consisted of 20 µl containing 5 µl of diluted 1:5 cDNA, 3 µM of each primer, and 10 µl of 2X IQ SYBR green Supermix (Bio-Rad) in 96-wells plate. Beforehand, PCR reactions with total RNA (non-reverse transcribed) run to check for the absence of genomic DNA contamination, then, in each plate, PCR reactions run without cDNA (water blank) to check also the absence of genomic DNA and to serve as negative controls. The real-time quantitative PCR was run on iCycler iQ Multicolor Detection System (Bio-Rad). The cycling conditions were 1 cycle of denaturation at 95°C for 3 min, followed

by 40 three segment cycles of amplification (95°C/30 sec, 58°C/30 sec, and 72°C/30 sec). The baseline adjustment method of the iCycler software was used to determine the Ct (cycle threshold) in each reaction. A melting curve was constructed for each primer pair to verify the presence of one gene-specific peak and the absence of primer dimer, further controlled by agarose gel migration of the amplicon. The following specific primer sequences were used for the form 180KDa of the NCAM: forward 5'-CTGCGTGTCTATATGTGTATGTGC-3' and reverse 5'- GAAAGCCTGGGAGTCGGAAG-3' (197 bp fragment) designed with an ovine EST sequence (EE796128.1, *Ovis aries* cDNA) and glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene: forward 5'-GTGATGCTGGTGCTGAGTAC-3' and reverse 5'- GTAGAAGAGTGAGTGTCGC-3' (610 bp fragment). GAPDH is an enzyme which catalyses the conversion of glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3 diphosphoglycerate and is considered to be constitutively expressed in all cells (Revillion et al., 2000).

PSA-NCAM immunolabelling

All free-floating sections were washed (3x5 min, RT) in PBS. Sections were incubated overnight at RT under gentle shaking with the monoclonal mouse antibody directed against PSA-NCAM (1:4.000) diluted in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 5% normal goat serum. For PSA-NCAM visualization, sections were washed before and after each incubation step in PBS. Sections were first incubated for 90 min at RT in biotinylated goat anti-mouse IgG (1:300, Jackson), then transferred to Vector Elite kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). PSA-NCAM immunoreactivity was revealed using a 3,3'diaminobenzidine (DAB) reaction product (Herbison et al., 1993). Section were finally mounted on gelatine-coated slides, left to dry at RT, then dehydrated and mounted in DEPEX (VWR International, Poole, England).

The production and characterization of the PSA-NCAM antibody were described in details previously (Rougon et al., 1986). The specificity of this antibody has been also tested for the specific detection of polysialic acid residues on NCAM in the hypothalamo-neurohypophysial system of rat (Theodosis et al., 1991).

Analysis of results:

Quantification of PSA-NCAM

Images obtained from hybridized membranes were analyzed using Image Master 1D software (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). A window was drawn for each protein signal (PSA-NCAM or tubulin) to estimate non specific background. To obtain the specific value associated with PSA-NCAM or tubulin, background value was subtracted from each rough value calculated either for ovine or rat samples. We then calculated for each area and each animal the ratio between the ovine PSA-NCAM and the mean rat PSA-NCAM values. Same analyses were made in parallel for the tubulin. Finally, the ratio between PSA-NCAM and tubulin was calculated for each ewe. Mean values (\pm SEM) for each sample were calculated from data obtained from the 3 repeated western blots and expressed as the relative level of PSA-NCAM/tubulin (in arbitrary unit) per area and per ewe. Mean levels of PSA-NCAM/tubulin (\pm SEM) were finally calculated in each brain areas for each group of ewes.

Quantification of NCAM

For each primer pair, efficiency curves were generated using serial dilutions of cDNA of brain areas samples in the abscissa and the corresponding Ct in the ordinate. The slope of the log-linear phase reflects the amplification efficiency (E) derived from the formula $E=e^{(-1/\text{slope})}$. Amplification efficiency was found to be $E_{\text{NCAM}} = 1.94$ and $E_{\text{GAPDH}} = 1.84$. For quantitative analysis of each sample, the Ct of target gene NCAM was compared with the

Table 1. Time lapse between the endoN or the control injection and the end of the LH plateau in the two groups of ewes.

	Ewe number	Duration of the reproductive axis activity (days)
EndoN-treated ewes	32210	81
	30201	30
	32271	78
	32174	78
	32272	71
Control ewes	32056	57
	40007	72
	32195	92
	32250	72
	32246	79

Table 2 : Time lapse between the day of endoN injection and the beginning of the LH plateau.

Ewe number	Number of days before the LH plateau
60224	79
60244	89
50193	255
60251	217
60210	280

internal reference gene GAPDH according to the ratio $R = [E_{GAPDH}]^{Ct(GAPDH)} / [E_{NCAM}]^{Ct(NCAM)}$.

Mean expression levels of NCAM (\pm SEM) were finally calculated in each brain regions for each group of ewes.

Microscope observations

Observation of all sections was performed under Olympus BX51 brightfield microscope. Images of PSA-NCAM immunoreactivity were taken using a digital camera (Spot v4.0 Insight FireWire; Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) driven by the Spot Advanced software (Diagnostic Instruments). In the two groups of ewes (treated or control group), endoN or control injection sites and traces of cannulae have been search in all sections surrounding the targeted area (PMH or POA). Then, PSA-NCAM immunoreactivity has been compared between the treated and control groups.

Duration of LH plateau

For each ewe, the time lapse between endoN injection in the PMH and the acute decrease of LH secretion, assessed by 3 consecutive LH measures below 1 ng/ml, was determined in endoN treated and control groups. The mean duration of reproductive axis activity (\pm SEM) was then calculated and compared between the two groups of ewes (Table 1).

For the endoN injection in the POA, the time lapse between the injection data and the increase of LH secretion, assessed by 3 consecutive LH measures above 1 ng/ml, was calculated for each ewe of treated (Table 2) and control groups in order to compare the mean time (\pm SEM) necessary to observe the start of reproductive activity between the two groups of ewes.

Statistical analysis

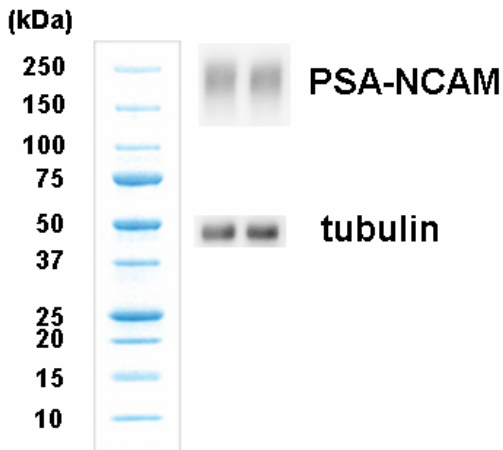


Figure 2. Representative Western blot hybridization signals for PSA-NCAM and tubulin having molecular weights at 200-250 KDa and 50 KDa respectively. Tubulin was used as a reference protein in all western blots.

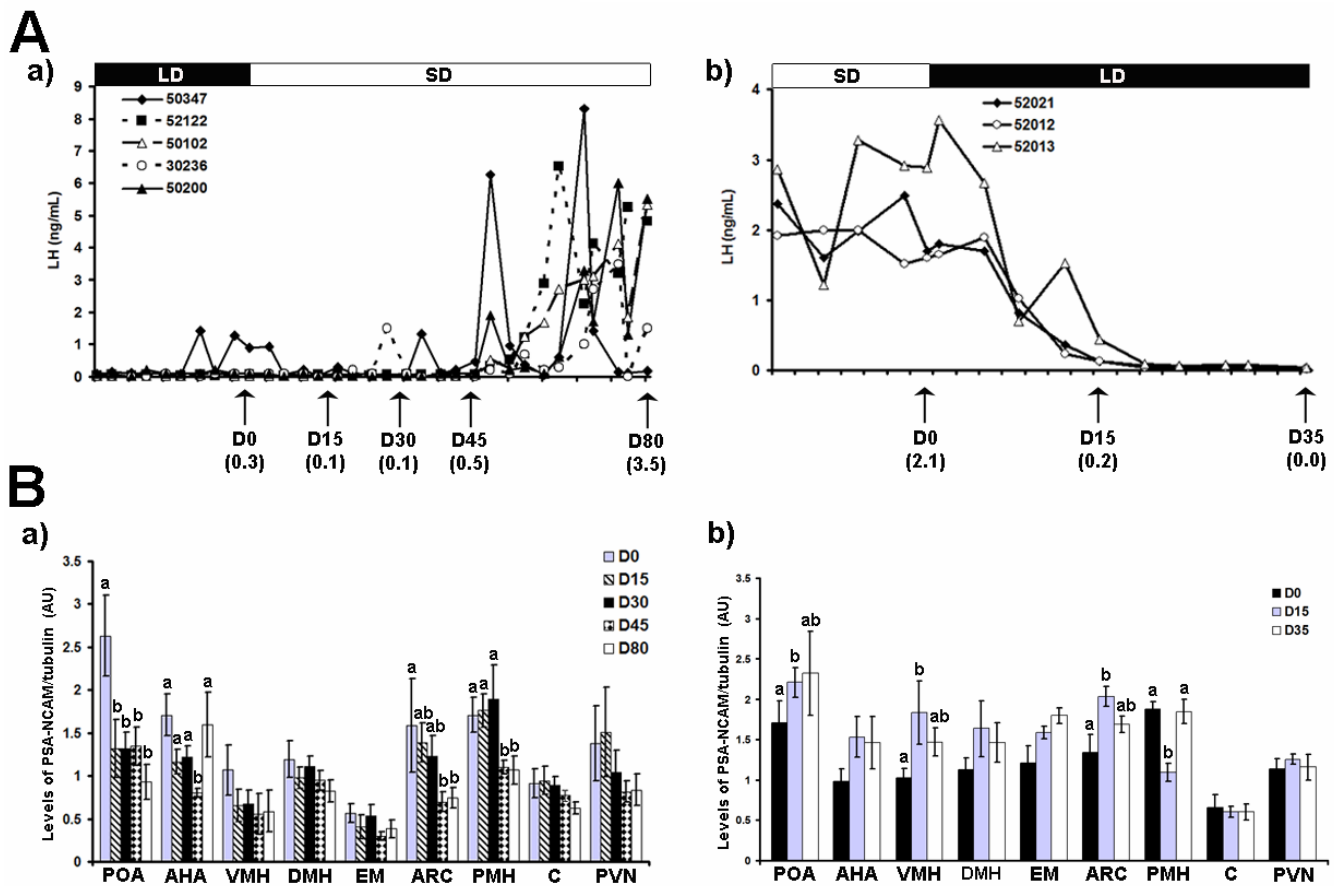


Figure 3. (A) Plasma LH concentrations (ng/ml) in 5 OVX+E2 ewes killed 80 days (D80) after a transition from LD to SD (a) and in 3 ewes killed D35 following a transition from SD to LD (b). Arrows indicate times at which the different groups of ewes were killed. Mean LH values (ng/ml) observed at these times for each group are indicated in brackets below each timepoint. (B) Means values (\pm SEM) of PSA-NCAM/tubulin levels in several brain regions measured between D0 and D80 after the transition to SD (a) and at D0, D15 and D35 following the transition to LD (b); a and b are significantly different ($p < 0.05$; ANOVA (“GLM” procedure; SAS software) followed by a mean comparison analysis (last square means)). AU, arbitrary unit.

The comparisons of means levels of PSA-NCAM/tubulin in each brain region between groups of ewes killed after a transition to SD or to LD were carried out using SAS software (SAS Institute Inc., Carry, NC, USA). PSA-NCAM contents were compared by an analysis of variance (ANOVA) using “GLM” procedure for nested model and the comparisons of means were done on least square means with PDIIF option. Only the difference with $p < 0.05$ were considered.

Other statistical analyses were performed using Graph-Pad InStat 3[®] software (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). A Student's *t* test was used to compare NCAM mRNA expression between the two groups of animals killed after a transition to SD (D0 vs. D45) in the POA and the ARC nucleus and following a passage to LD (D0 vs. D15) in the ARC nucleus and the PMH. The same statistical test was also performed to compare the time lapses between endoN or control animals.

Results

Does PSA-NCAM level vary in the hypothalamus following a change of light treatment?

PSA-NCAM signal appeared as broad band migrating in the 200-250 kDa range whereas tubulin appeared as a single band at 50 kDa in all examined Western Blots (Fig. 2). At D0, animals transferred from LD to SD had an inactive gonadotrope axis (lower LH levels, Fig. 3A-a) whereas ewes transferred from SD to LD showed high LH levels (Fig. 3A-b). Quantitative analysis revealed significant variations of PSA-NCAM content in several regions following a photoperiodic transition from LD to SD, as well as from SD to LD. Interestingly, regions showing variations were not exactly similar between the two transitions (Fig. 3B).

Fifteen days after a transition from LD to SD, PSA-NCAM content decreased in most regions (Fig. 3B-a). This decrease was particularly steep in the POA where the fall reached

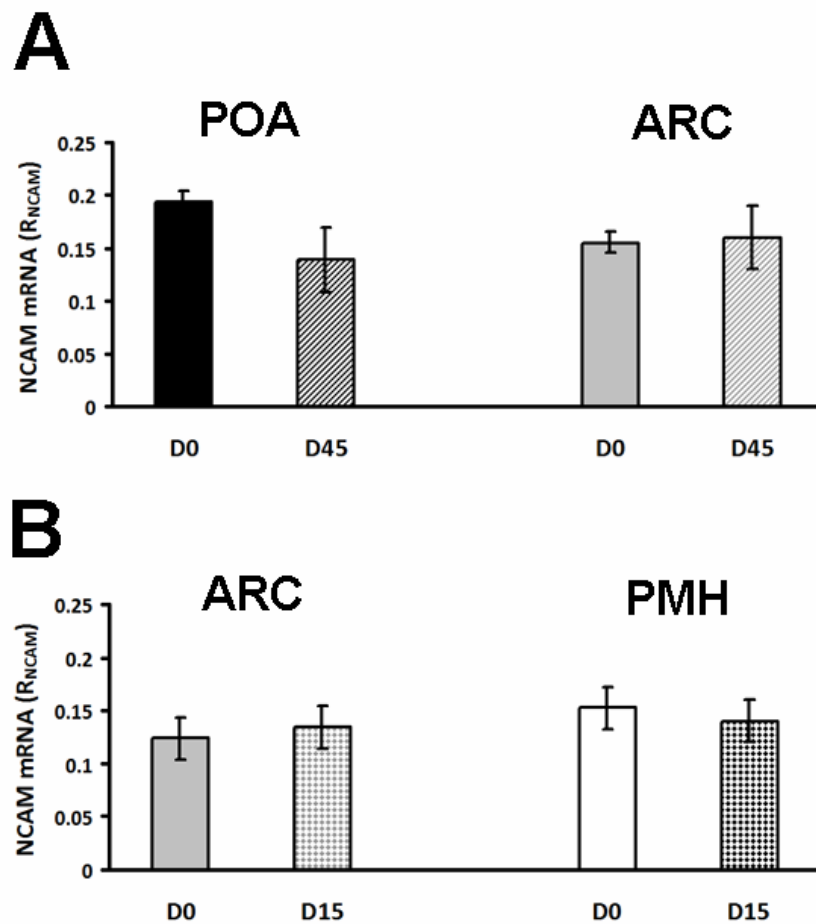


Figure 4. Histograms showing NCAM mRNA expression levels in the POA and ARC (A) and then in the ARC and PMH (B). Data represent the results of reverse transcription and quantitative PCR on brain tissue from ewes killed 0 (D0) and 45 days (D45) following the passage to SD and at D0 and D15 after a transition to LD. The ratio R_{NCAM} represents quantitative mRNA expression of the gene after normalization with the mRNA of the reference gene GAPDH.

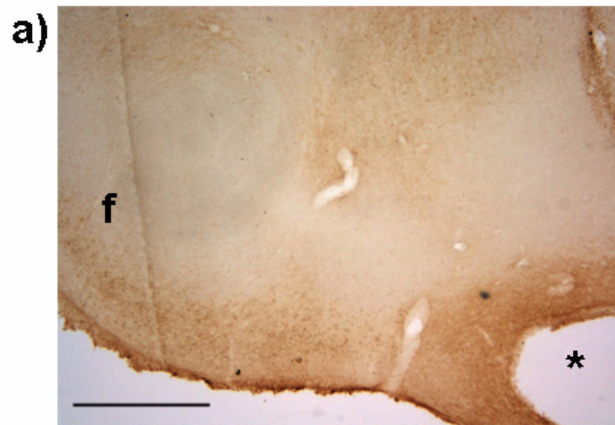
50% between D0 (2.6 ± 0.1 arbitrary unit (AU)) and D15 (1.3 ± 0.3 ; $P < 0.05$). The decrease was also important but slower in the AHA, ARC and PMH since the smallest amounts of PSA-NCAM were measured in animal killed at D45. The largest percentages of decrease were 50% in the AHA (D0: 1.7 ± 0.2 and D45: 0.8 ± 0.1 ; $P < 0.05$), 56% in the ARC (D0: 1.5 ± 0.5 and D45: 0.7 ± 0.1 ; $P < 0.05$) and 35% in the PMH (D0: 1.7 ± 0.2 and D45: 1.1 ± 0.1 ; $P < 0.05$). These PSA-NCAM variations appeared when LH levels were elevated in ewes killed at D80 (Fig. 3A-a). For VMH, DMH, ME and PVN, the transition to SD did not induce significant variations of PSA-NCAM levels despite lower amounts of PSA-NCAM at D80 compared to D0 in these regions. Moreover, in the cortex, considered as a control region, PSA-NCAM remained stable following the passage to SD (Fig. 3B-a).

Following a transition from SD to LD, PSA-NCAM levels increased between D0 and D15 in most areas (Fig. 3B-b). At this date, LH levels were still above 1 ng/ml in 5 out of 7 ewes (Fig. 3A-b). PSA-NCAM increase was above 29% in the POA (D0: 1.7 ± 0.3 , D15: 2.2 ± 0.2 ; $P < 0.05$), 53% in the ARC (D0: 1.3 ± 0.2 , D15: 2.0 ± 0.1 , $P < 0.05$) and 80% in the VMH (D0: 1.0 ± 0.1 , D15: 1.8 ± 0.4 , $P < 0.05$) between D0 and D15 (Fig. 3B-b). In contrast to the other examined areas, a 42% decrease of PSA-NCAM level was noted between D0 and D15 in the PMH (1.9 ± 0.1 vs. 1.1 ± 0.1 ; $P < 0.05$) then, at D30 the level went back to D0 levels at 1.8 ± 0.1 ($P < 0.05$) (Fig. 3B-b). A slight but not significant increase of the amount of PSA-NCAM was observed in the AHA, DMH and ME. PSA-NCAM did not vary in the C and PVN following the transition to LD.

Were variations of PSA-NCAM levels associated with changes of NCAM expression?

NCAM levels were analysed using RT-PCR in regions where the most important variations of PSA-NCAM were observed in the previous study. This quantitative method did not reveal significant differences in NCAM mRNA levels between groups of ewes following

A EndoN treated ewes



B Control ewes

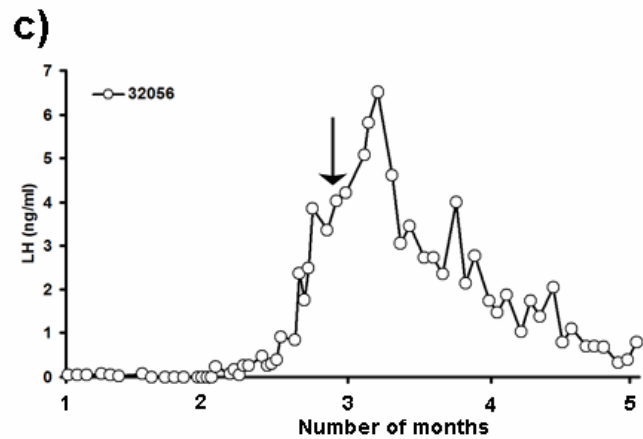
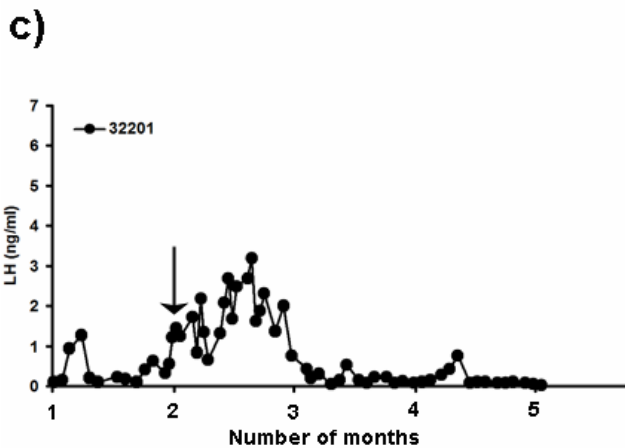
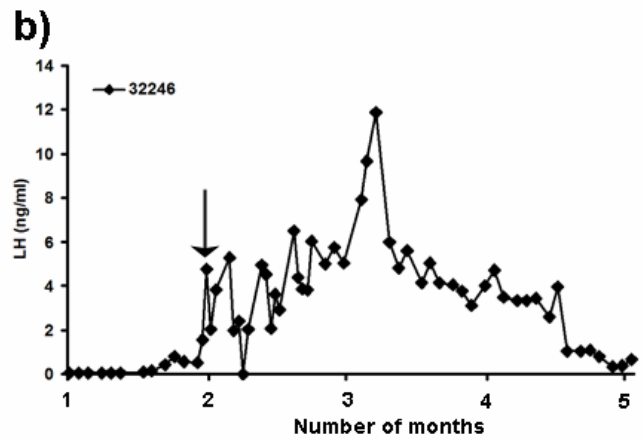
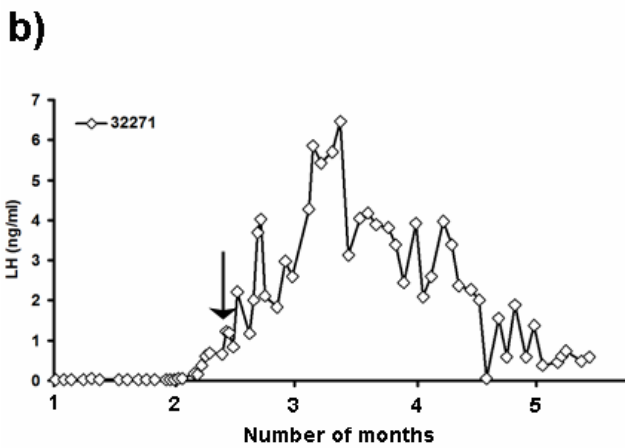


Figure 5. Photomicrographs of representative brain coronal sections after an immunocytochemical detection of PSA-NCAM, stained in brown from DAB (Aa and Ba), at the level of the PMH and LH levels in endoN treated ewes (A) and control animals (B). f, fornix; *, third ventricle. Scale bar = 1 mm. Abscise axis indicates the number of months following the transition to SD. Arrows indicate time of the injection of endoN (A-b and c) or boiled endoN (B-b and c).

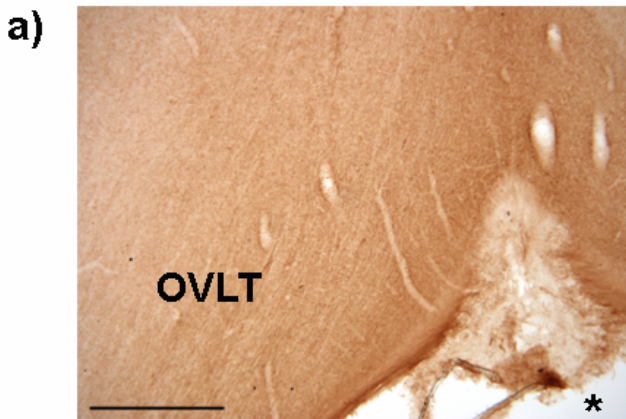
either the transition to SD or the transition to LD (Fig. 4). Levels of NCAM expression were 0.19 ± 0.01 and 0.14 ± 0.03 in the POA and 0.16 ± 0.01 and 0.16 ± 0.03 in the ARC at D0 and D45 following a passage to SD respectively (Fig. 4A). After a transition to LD, NCAM mRNA levels were stable in the ARC (D0: 0.12 ± 0.02 , D15: 0.13 ± 0.02) and in the PMH (D0: 0.15 ± 0.02 , D15: 0.14 ± 0.02) (Fig. 4B).

How significant are PSA-NCAM variations for seasonal reproduction?

The importance of PSA-NCAM variations for reproductive function was first studied in the PMH. EndoN was injected at the beginning of the LH rise following a passage to SD in order to mimic the decrease of PSA-NCAM observed in that area at D15 consecutively to a transition to LD. Our hypothesis was that alteration of PSA-NCAM in that area may produce cellular effects similar to those induced by a photoperiodic transition to LD. If this decrease is necessary to transduce this light information then treated animals should display a shorter LH plateau than controls.

An absence of the DAB brown reaction product associated with PSA-NCAM immunoreactivity was observed at the injection site in some endoN-treated animals, suggesting the enzyme was still active at the time of the ewe death *i.e.* more than 9 weeks following enzyme injection (Fig. 5A-a). In contrast, PSA-NCAM immunoreactivity was present in the whole PMH in the control group (Fig. 5B-a). Traces of needle passage were found on the sections near the targeted area (Fig. 5B-a). No significant difference was observed for the time lapse between endoN injection and LH fall between both groups of ewes (Table 1). The plateau of LH secretion lasted for 68 ± 10 days (Fig. 5A-b and c) in treated animals and for 74 ± 6 days in control animals (Fig. 5B-b and c).

A EndoN treated ewes



B Control ewes

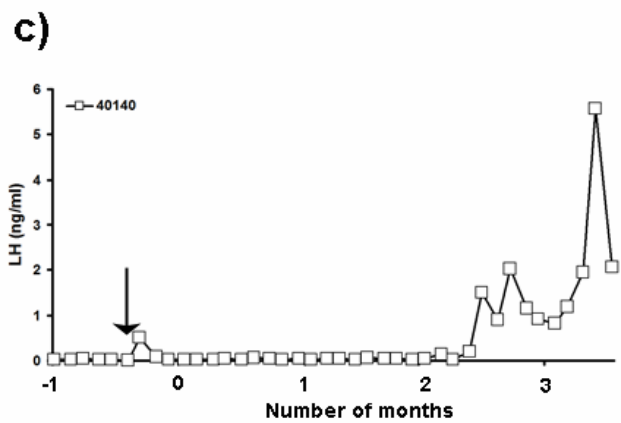
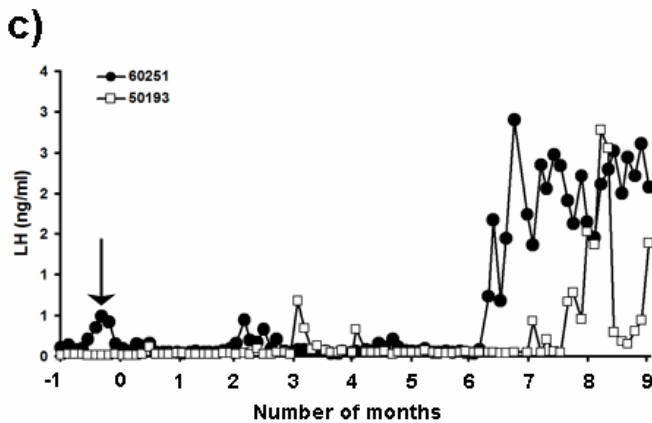
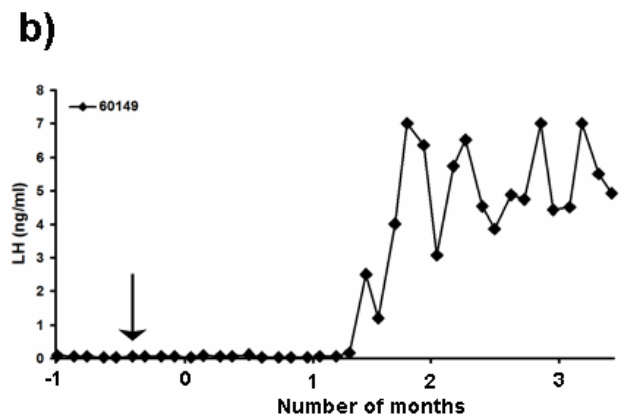
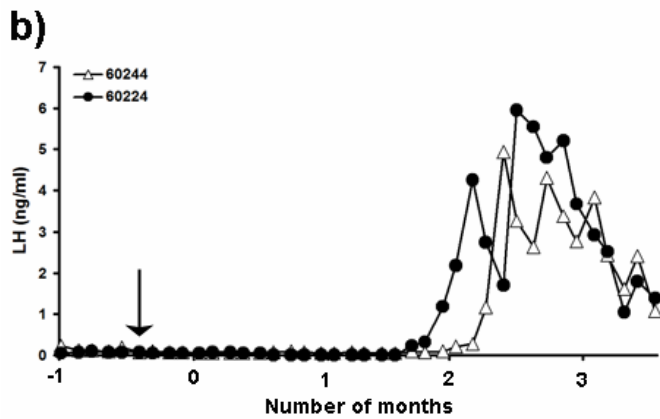
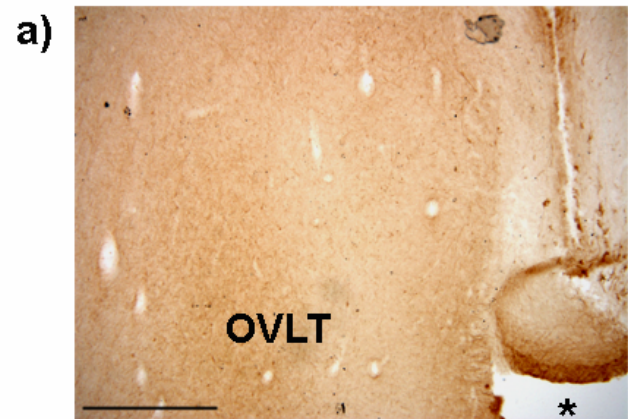


Fig. 6. Photomicrographs of representative brain coronal sections after an immunocytochemical detection of PSA-NCAM, stained in brown from DAB (Aa and Ba), at the level of the OVLT-POA and LH levels in representative endoN treated ewes (A) and control animals (B). *, third ventricle. Scale bar = 1 mm. Abscise axis indicates the number of months before (-1) and after the transition to SD at D0. Arrows indicate time of the injection of endoN (A-b and c) or boiled endoN (B-b and c).

The functional significance of PSA-NCAM variations for the control of seasonal reproduction was also studied in the POA. EndoN was injected 15 days before the transition from LD to SD to mimic the quick decrease of PSA-NCAM measured in that region at D15 in SD. We expected to see an effect on the start of the gonadotrope axis activation in treated ewes if this decrease is essential to reactivate LH secretion.

One of the control ewe was not considered in our results since it lost the estradiol implant and displayed high LH levels though a substantial period of the experiment. All other control ewes displayed similar time lapses of 86 ± 9 days between the endoN injection and the rise of LH secretion (Fig. 6B-b and c). PSA-NCAM immunoreactivity was uniform in the whole POA (Fig. 6B-a). Among the 6 endoN-treated animals, three types of responses were discernible (Table 2). Two ewes showed an increase of LH secretion after a delay of 84 ± 5 days following the endoN injection which is similar to control ewes (Table 2, Fig. 6A-b). For 4 animals out of 6, an important delay was needed after the transition to SD to obtain high LH levels (Fig. 6A-c): one treated ewe remained with low LH levels (LH concentration of 0.3 ng/ml in the last sample) for all the experiment after 265 days of SD treatment, while the 3 other treated ewes, displayed an increase of LH secretion but only after 251 ± 18 days (Table 2). PSA-NCAM immunoreactivity at the time of the animal death was not different between the 6 endoN-treated ewes and control animals that all presented uniform DAB brown staining (Fig. 6A-a). We did not see the injection site nor traces of cannula passage (Fig. 6A-a) except in one ewe.

Discussion

We demonstrated for the first time in this study that a variation of photoperiod alone is able to induce variations of PSA-NCAM levels not associated with variations of NCAM

expression in several brain regions. These variations of the degree of polysialylation of NCAM seem closely associated with a modification of the reproductive status of the ewe. From that, we tried to determine the functional significance for seasonal reproduction of PSA-NCAM variations in two areas, the PMH and the POA. Our results suggested a key role for PSA-NCAM variations in the POA for the reinstatement of an active gonadotrope axis.

Following the passage from LD to SD, a persistent and potent decrease of PSA-NCAM was detected in the POA, the AHA, the ARC and the PMH. This decrease appeared more precocious in the POA than in the other areas. In contrast, after the transition from SD to LD, a quick and transitory increase of PSA-NCAM levels was measured in the POA, the VMH and the ARC, the PMH being the only hypothalamic area examined where a transitory increase is detected at D15. Every photoperiodic transition was therefore followed by time- and region-specific modulations of PSA-NCAM content. As PSA-NCAM can be expressed rapidly at the cell surface, since a chemical alteration of its content is restored within one hour (Kiss et al., 1994), it is highly unlikely that the kinetics of PSA-NCAM variations obtained in this study are due to non-photoperiodic cues. However it is of note that circadian variations of this marker may exist in sheep as previously demonstrated for Syrian hamsters in the suprachiasmatic nucleus (Glass et al., 2003). To avoid a misinterpretation linked to the circadian fluctuations of PSA-NCAM, all groups of ewes were killed at the same hour (11:00 am) when PSA-NCAM levels were reported maximal in the hamster. The method used to estimate PSA-NCAM was previously developed by Kaur and colleagues and adapted to sheep material using a different primary antibody (Kaur et al., 2002). This technique is a semi-quantitative method but all precautions have been taken to obtain the most accurate results. All samples have been repeatedly measured (3 times each) using a random distribution in each gel. We also used an internal standard, tubulin known as a reference protein that does not

show variations of its synthesis in the mature brain (Wagner et al., 1992), and an external control, a rat brain sample that was present in all gels.

Our results on photoperiodic variations of PSA-NCAM highly suggest the occurrence of synaptic plasticity under variations of melatonin duration of secretion. They complement and strengthen previous published data demonstrating a seasonal plasticity on GnRH neurons in the ovine OVLT-POA between the breeding and anestrus seasons. The number of appositions on GnRH neurons was indeed twice as larger during the breeding season (Xiong et al., 1997) and the association between PSA-NCAM and GnRH neurons was higher in ewes killed in December (Viguie et al., 2001). Surprisingly the fluctuations of PSA-NCAM content between the present work and previous data do not follow the same patterns: we observed a potent and rapid fall of PSA-NCAM content in the whole OVLT-POA whereas it was reported an increase of the association of GnRH neurons with PSA-NCAM. This difference probably comes from the scale of the examined samples: our quantification is global for the region of the OVLT-POA while results from Xiong et al. and Viguie et al. focussed specifically on GnRH neurons. It is of note that the percentage of PSA-NCAM in contact with GnRH neurons studied 0, 60 and 112 days after a photoperiodic transition from LD to SD decreased slightly between D0 and D60 before showing a sharp increase at D112 in ewes having an active gonadotrope axis (Chalivoix et al., unpublished results; voir le 2ème article de la thèse).

The variations of PSA-NCAM observed in the POA and ARC after the passage to SD, and in the PMH and ARC nucleus following the transition to LD were not associated with a modulation of NCAM expression. Photoperiod affects therefore PSA-NCAM degree of polysialylation rather than the synthesis/presence of NCAM in cytoplasmic membranes. To ascertain this fact it remains necessary to investigate photoperiod effect on two polysialyltransferase enzymes (ST8siaII and ST8siaIV) responsible for the synthesis of PSA-

NCAM (Kojima et al., 1995, Phillips et al., 1997). Fluctuations of these enzymes have already been studied during the course of the estrus cycle in rodents where, the expression of polysialyltransferases in the periventricular area were higher in proestrus than in metestrus leading to increased PSA-NCAM contents. Concomitantly NCAM-180 and NCAM-140 KDa contents also decreased in proestrus (Tan et al., 2009). A similar up-regulation of PSA-NCAM on GnRH cell bodies accompanied by higher levels of polysialyltransferases mRNA was also observed in rat proestrus and diestrus (Parkash and Kaur, 2007).

We noticed that transitions to SD or to LD have symmetrically opposite effects on PSA-NCAM protein levels in several hypothalamic regions except in the PMH where a decrease of PSA-NCAM content is measured after both transitions. In sheep, melatonin acts in the PMH to synchronize seasonal reproduction as demonstrated using neurosurgical implantation of melatonin (Malpoux et al., 1998). PMH is also one the two brain sites, the second being the ventromedial POA, in which thyroid hormones act to permit the onset of seasonal anoestrus (Anderson et al., 2003). We therefore attempted in a second experiment to determine the importance of such a PSA-NCAM decrease on the photoperiod-driven modulations of activity of the reproductive axis. For that, we stereotaxically injected endoN in the PMH of ewes maintained in SD at the beginning of the LH plateau. As a decrease of PSA-NCAM in that area seems interpreted as a signal for a change of photoperiod leading to a change of activity of the gonadotrope axis we expected to detect a shorter duration of the LH plateau in endoN treated animals than in the control group. However we did not detect a significant difference between groups. This result may come from a technical weakness since the endoN approach we have developed has two main drawbacks. The first hurdle was to estimate the volume of enzyme to inject to get a maximal diffusion in the targeted area. The second difficulty was to determine the time of action of the enzyme activity after the injection since all reports performed before the start of this study did not last longer than 18 days after

endoN injection (Glass et al., 2000). We noted in endoN-treated ewes an absence of the DAB brown reaction product associated with PSA-NCAM immunoreactivity at the PMH injection site suggesting that the enzyme was still active at the time of ewes' death *i.e.* more than 9 weeks following enzyme injection. In the same time, a uniform DAB brown staining was observed in endoN-treated ewes in the POA more than 35 weeks after the endoN injection.

From a physiological point of view, the absence of effect on LH profiles of endoN injection in the PMH suggested that PSA-NCAM variations in this region are not essential for the transduction of neuronal information elicited following activation by melatonin. We cannot rule out that the decrease of PSA-NCAM levels induced by the endoN injection in the PMH has been misinterpreted by the hypothalamus as a signal of LD instead of a signal of SD since PSA-NCAM levels decreased following both transitions in that area. This mixed signal could explain the absence of effect on LH levels profiles. The absence of effect of endoN injection in the PMH also suggested that other brain areas may be involved in the transduction of the photoperiodic message encoded by melatonin for the synchronization of reproduction. Indeed other diencephalic areas displayed significant variations of their PSA-NCAM levels following a transition to SD such as the POA, the AHA and the ARC nucleus. Interestingly, we (Chalivoix et al., unpublished results; voir le 2ème article de la thèse) and other (Viguie et al., 2001) reported significant variations of the association between GnRH neurons of the OVLT/POA and PSA-NCAM between animals having inactive and active gonadotrope axis. Similarly, we also found a significant variation between animals having an inactive gonadotrope axis and animals showing high LH levels concerning the association between β -END neurons and PSA-NCAM in the caudal two-thirds of the ARC nucleus (Chalivoix et al., unpublished results, voir le 2ème article de la thèse). It was also reported that the number of synaptic contacts on dopaminergic dendrites and the length of these dendrites increased in the anoestrus season in the retrochiasmatic area (Adams et al., 2006). This plasticity phenomenon

was associated with a lower number of glutamatergic contacts on dopaminergic neurons in anoestrus season (Bogusz et al., 2008) suggesting an involvement of this plasticity in the inhibitory activity of this neuronal population on LH pulsatility in anoestrus season. We also found a large increase of the detectability of Kiss neuronal populations both in the caudal ARC nucleus, neighboring the PMH, and in the POA of animals having high LH levels compared to inactive animals (Chalivoix et al, voir le 3ème article de la thèse). Taken all together, these data suggest that the plasticity observed in the PMH could be necessary to read the variations of melatonin secretion rather than to synchronize directly the reproduction and could therefore represent a switch for the network allowing the transduction of melatonin signal rather than be the first link of this signal. In that regard, it is interesting to note that melatonin driven cytoskeletal reorganizations of actin exist in the suprachiasmatic nucleus and are necessary for melatonin to induce changes in clock gene expression involved in the circadian rhythm (Kandalepas and Gillette, 2009). It may therefore that variation of the duration of melatonin secretion is provoking a similar cytoskeletal rearrangement at the level of the PMH which may modify cell activity and allow for the transduction of environmental cues.

From a physiological point of view, these data can also suggest that photoperiod transition to SD may be read by more than one brain area. In that regard, the area of the ME-pars tuberalis could be a good candidate because it was now admitted in quail (Nakao et al., 2008) and sheep (Lincoln et al., 2006) that melatonin signal is also integrated by the pars tuberalis that responds by secreting thyroid stimulating hormone β which, by unknown cellular mechanisms, stimulates the deiodinase-2 synthesis in tanycytes located in the inferior half of the third ventricle. This enzyme converts the inactive thyroid hormone T4 to active T3 and its activity is dependent on photoperiod and melatonin in rams (Hanon et al., 2008) goats (Yasuo et al., 2006), Syrian (Revel et al., 2006b) and Siberian hamsters (Watanabe et al.,

2004). T3 produced in tanycytes may then act in the POA and the mediobasal hypothalamus to promote local peptide synthesis or synaptic plasticity. This pathway linked to the pars tuberalis could therefore be another site of action of melatonin to allow for the correct interpretation of a photoperiodic transition. This pathway would act in parallel with the pathway induced in the PMH by melatonin which could explain the absence of effect induced by our injection of endoN in the PMH.

Since specific modulations GnRH neuron association with PSA-NCAM were detected between seasons, we then decided to investigate what perturbations would come from the blockade of PSA-NCAM synthesis in the POA. For that we injected bilaterally endoN in the OVLT-POA of ewes in LD and transferred the animals in SD to record LH fluctuations. The important delay (between 217 and 280 days in treated animals compared to 86 days in average in control animals) for the onset of gonadotrope axis activation following endoN injection in the POA from 4 ewes out of 6 suggest that fluctuations of PSA-NCAM content in the OVLT-POA following a photoperiodic transition could play a key role for seasonal synchronization of the reproductive function. It may be that this PSA-NCAM degradation has affected the phenotypic reorganizations of synaptic contacts on GnRH neurons that were known to vary in relation with the season. For example, a blockade of Glutamatergic (VGlut-2) and NPY appositions on GnRH neurons that were more numerous during the breeding season (Jansen et al., 2003, Sergeeva and Jansen, 2009) could have led to a prolonged anestrus season. Similarly, it may be that our treatment has maintained for a longer time β -END and GABA terminals on GnRH neurons that were more numerous during anoestrus season (Jansen et al., 2003, Pompolo et al., 2003a, Sergeeva and Jansen, 2009). Blockade of synapse reorganizations on GnRH neurons cannot account solely for the long delay we observed before the reinstatement of high LH levels. Indeed, if enzyme activity lasted at least for 9 weeks as observed following endoN injection in the PMH, POA injection of endoN has

probably altered the high PSA-NCAM contents measured at D0 and D15 after the transition to SD but not the high association between the PSA-NCAM and GnRH neurons measured at D112 after the photoperiod change. It is therefore possible that PSA-NCAM presence is necessary for a precise window of time at the level of the OVLT-POA in order to provide a positive signal in the chain of events leading to the reactivation of the gonadotrope axis. According to that hypothesis its absence at that time has generated a further delay to have the PSA-NCAM signal being properly interpreted in the next window of time allowed for its interpretation.

In conclusion, photoperiodic transitions to SD or to LD have symmetrically opposite effects on PSA-NCAM content in several hypothalamic regions known to be involved in the seasonal regulation of the reproductive activity in the ewe. PSA-NCAM alteration in the POA lead to a long inactivity of the gonadotrope axis suggesting that morphological reorganizations in that area are of particular interest for the functional response to photoperiod leading to the onset of sexual activity. Future studies will be necessary to characterise the phenotypes of cell populations affected by these reorganizations in the different hypothalamic areas.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the assay platform laboratory and of the experimental unit of INRA Centre de Tours (UEPAO), as well as the staff of the Experimental Hospital (PRC) for their technical help. They also thank Mr. S. Formosa, A. Collet for their technical help and Drs J-L. Gatti, J-L. Dacheux and S. Fabre for their helpful comments regarding the PSA-NCAM Western Blot and the NCAM qPCR.

References

- Adams, V. L., Goodman, R. L., Salm, A. K., Coolen, L. M., Karsch, F. J. and Lehman, M. N., 2006. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology*. 147, 4843-4851.
- Anderson, G. M., Hardy, S. L., Valent, M., Billings, H. J., Connors, J. M. and Goodman, R. L., 2003. Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology*. 144, 2892-2901.
- Bogusz, A. L., Hardy, S. L., Lehman, M. N., Connors, J. M., Hileman, S. M., Sliwowska, J. H., Billings, H. J., McManus, C. J., Valent, M., Singh, S. R., Nestor, C. C., Coolen, L. M. and Goodman, R. L., 2008. Evidence that gamma-aminobutyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative feedback in anestrous ewes. *Endocrinology*. 149, 2762-2772.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Glover, B. H. and Karsch, F. J., 1994. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology*. 134, 1806-1811.
- Faure, M. O., Nicol, L., Fabre, S., Fontaine, J., Mohoric, N., McNeilly, A. and Taragnat, C., 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol*. 186, 109-121.
- Glass, J. D., Shen, H., Fedorkova, L., Chen, L., Tomaszewicz, H. and Watanabe, M., 2000. Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 280, 207-210.
- Glass, J. D., Watanabe, M., Fedorkova, L., Shen, H., Ungers, G. and Rutishauser, U., 2003. Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 117, 203-211.
- Hanon, E. A., Lincoln, G. A., Fustin, J. M., Dardente, H., Masson-Pevet, M., Morgan, P. J. and Hazlerigg, D. G., 2008. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol*. 18, 1147-1152.
- Herbison, A. E., Robinson, J. E. and Skinner, D. C., 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 57, 751-759.
- Jansen, H. T., Cutter, C., Hardy, S., Lehman, M. N. and Goodman, R. L., 2003. Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology*. 144, 3663-3676.
- Kandalepas, P. C. and Gillette, M. U., 2009. Filamentous (F)-actin reorganization is necessary for melatonin to induce a phase advance in the rat SCN at dusk . *Proceedings of the Neurosciences, Chicago*, pp. 574.524.
- Kaur, G., Heera, P. K. and 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.
- Kiss, J. Z., Wang, C., Olive, S., Rougon, G., Lang, J., Baetens, D., Harry, D. and 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.
- Kojima, N., Yoshida, Y., Kurosawa, N., Lee, Y. C. and Tsuji, S., 1995. Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for alpha 2,8-sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett*. 360, 1-4.

- Legan, S. J. and Karsch, F. J., 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod.* 23, 1061-1068.
- Legan, S. J., Karsch, F. J. and Foster, D. L., 1977. The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 101, 818-824.
- Lincoln, G. and Short, R. V., 1980. Seasonal breeding:nature's contraceptive. recent progress in hormone research. 36.
- Lincoln, G. A., Clarke, I. J., Hut, R. A. and Hazlerigg, D. G., 2006. Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science.* 314, 1941-1944.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G. and Chemineau, P., 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology.* 139, 1508-1516.
- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P. J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H. R. and Yoshimura, T., 2008. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature.* 452, 317-322.
- Parkash, J. and Kaur, G., 2007. Transcriptional regulation of PSA-NCAM mediated neuronal-glial plasticity in the adult hypothalamus. *Neuron Glia Biol.* 3, 299-307.
- Phillips, G. R., Krushel, L. A. and Crossin, K. L., 1997. Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res Dev Brain Res.* 102, 143-155.
- Pompolo, S., Pereira, A., Kaneko, T. and Clarke, I. J., 2003. Seasonal changes in the inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ewe brain: an assessment by conventional fluorescence and confocal microscopy. *J Neuroendocrinol.* 15, 538-545.
- Revel, F. G., Saboureaux, M., Pevet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V., 2006. Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology.* 147, 4680-4687.
- Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L. and Peyrat, J. P., 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 36, 1038-1042.
- Rougon, G., Dubois, C., Buckley, N., Magnani, J. L. and Zollinger, W., 1986. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol.* 103, 2429-2437.
- Sergeeva, A. and Jansen, H. T., 2009. Neuroanatomical plasticity in the gonadotropin-releasing hormone system of the ewe: seasonal variation in glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic afferents. *J Comp Neurol.* 515, 615-628.
- Singh, S. R., Hileman, S. M., Connors, J. M., McManus, C. J., Coolen, L. M., Lehman, M. N. and Goodman, R. L., 2009. Estradiol negative feedback regulation by glutamatergic afferents to A15 dopaminergic neurons: variation with season. *Endocrinology.*
- Tan, O., Fadiel, A., Chang, A., Demir, N., Jeffrey, R., Horvath, T., Garcia-Segura, L. M. and Naftolin, F., 2009. Estrogens regulate posttranslational modification of neural cell adhesion molecule during the estrogen-induced gonadotropin surge. *Endocrinology.* 150, 2783-2790.
- Theodosis, D. T., Rougon, G. and 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 U S A.* 88, 5494-5498.

- Thiery, J. C., Martin, G. B., Tillet, Y., Caldani, M., Quentin, M., Jamain, C. and Ravault, J. P., 1989. Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology*. 49, 80-87.
- Viguie, C., Jansen, H. T., Glass, J. D., Watanabe, M., Billings, H. J., Coolen, L., Lehman, M. N. and 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.
- Wagner, A. P., Reck, G. and Platt, D., 1992. Dynamics of gene expression for microtubule-associated protein MAP1B, embryonic alpha-tubulin and late neural beta-tubulin mRNAs in the hippocampus of aged rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 184, 292-299.
- Watanabe, M., Yasuo, S., Watanabe, T., Yamamura, T., Nakao, N., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2004. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology*. 145, 1546-1549.
- Xiong, J. J., Karsch, F. J. and 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.
- Yasuo, S., Nakao, N., Ohkura, S., Iigo, M., Hagiwara, S., Goto, A., Ando, H., Yamamura, T., Watanabe, M., Watanabe, T., Oda, S., Maeda, K., Lincoln, G. A., Okamura, H., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2006. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology*. 147, 432-440.

II) Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude démontre que les deux transitions photopériodiques semblent capables d'induire des variations symétriquement opposées de l'expression protéique d'un marqueur de la plasticité, la PSA-NCAM, dans des régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'activité saisonnière de reproduction chez l'ovine. Il faut noter que la région prémamillaire hypothalamique est la seule dans laquelle est observée une diminution des niveaux de PSA-NCAM quelque soit la transition photopériodique étudiée. Les variations des niveaux de la PSA-NCAM ne sont cependant pas associées avec une modulation des niveaux d'expression de la NCAM suggérant une régulation du degré de polysialylation de la NCAM plutôt que de la quantité de la NCAM présente dans les membranes cellulaires sous l'influence du changement de photopériode.

D'un point de vue physiologique, l'altération spécifique de la PSA-NCAM dans l'hypothalamus prémamillaire par l'endoneuraminidase N n'a eu aucun effet sur le profil de la sécrétion de LH des brebis traitées suggérant que les variations de la PSA-NCAM dans cette région permettraient une lecture des variations de la durée de sécrétion de la mélatonine plutôt qu'une synchronisation directe de l'activité reproductrice de la brebis. L'inhibition de la PSA-NCAM dans l'aire préoptique a eu des conséquences beaucoup plus drastiques puisqu'elle a retardé de façon importante l'activation de l'axe gonadotrope induite par un passage en jours courts chez 4 brebis traitées sur 6. Ce résultat suggère que la présence de PSA-NCAM est nécessaire dans cette région de l'organe vasculaire de la lame terminale-aire préoptique au cours d'une fenêtre de temps précise afin de permettre l'intégration des signaux environnementaux synchronisant la reproduction chez cette espèce.

2ème CHAPITRE : *Quelle est l'identité des populations neuronales pouvant être affectées par des réorganisations morphologiques ?*

Dans ce deuxième chapitre, nous tenterons d'identifier des populations de neurones susceptibles d'être touchées par des réarrangements morphologiques suite à un changement de traitement photopériodique. Dans une première partie, nous évaluerons les effets d'une transition photopériodique en jours courts sur l'association entre les neurones à GnRH ou à β -END et la PSA-NCAM. Nous déterminerons ensuite si les variations de la quantité de PSA-NCAM au contact des neurones à GnRH sont liées à un changement du nombre de synapses sur ces neurones à GnRH. Dans une seconde partie, nous déterminerons l'impact d'un changement de traitement photopériodique sur la population des neurones à kisspeptine de l'aire préoptique et du noyau arqué.

A) 1^{ère} PARTIE : Effet d'un passage en jours courts sur les réorganisations morphologiques au contact des neurones à GnRH et à β -END

I) Introduction

Nous avons estimé les niveaux d'association entre la PSA-NCAM et les neurones à GnRH de la région de l'organe vasculaire de la lame terminale. Nous avons aussi quantifié l'association entre la PSA-NCAM et les neurones à β -END du noyau arqué, population impliquée dans le rétrocontrôle négatif des stéroïdes gonadiques aux neurones à GnRH chez la brebis. Les animaux impliqués dans ces deux études ont été abattus à des intervalles de temps réguliers suivant un passage en jours courts. Dans un troisième temps, nous avons également déterminé le nombre de contacts synaptiques, identifiés par un marquage à la synaptophysine, sur les neurones à GnRH dans les deux groupes d'animaux ayant montré une plus grande variation de l'association entre la PSA-NCAM et les corps cellulaires à GnRH.

Ces données font l'objet d'un article soumis dans Journal of Comparative Neurology.

Photoperiod-generated fluctuations in the relationship between polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and neuronal populations associated with the hypothalamic control of ovulation in the ewe

S. Chalivoix^{a,b,c,d,e}, B. Malpoux^{a,b,c,d,e}, L. Dufourny^{a,b,c,d,e,*}

^a INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

^b CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France

^c Université de Tours, F-37041 Tours, France

^d Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

^e IFR135 Imagerie Fonctionnelle, F-37044 Tours, France

Short title: Light affects PSA-NCAM on GnRH and β -END neurons

***Corresponding author:** Dr Laurence Dufourny
Centre INRA de Tours
F-37380 NOUZILLY, France
Phone: (+33) 2 47 42 79 03
Fax: (+33) 2 47 42 77 43
Laurence.dufourny@tours.inra.fr

Keywords: Sheep, photoperiodic transition, seasonal reproduction, beta-endorphin neurons, GnRH.

Abstract

Morphological plasticity has been demonstrated between breeding and anestrus seasons in the ewe hypothalamus, particularly for the GnRH system. We sought to determine the impact of a photoperiodic transition, from long days (LD, 16H light/ 24H) to short days (SD; 8H light/24H), on the association between a marker of cerebral plasticity, the polysialylated form of neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), and two diencephalic populations: the GnRH and β -endorphin (β -END) neurons, the latter being potent inhibitors of GnRH neuronal activity during anestrus. We also estimated the number of contacts on GnRH neurons after the passage to SD, using synaptophysin as a marker for synaptic buttons. Those parameters were evaluated in ovariectomized estradiol-replaced ewes using double immunocytochemistry and confocal microscopy at different times after the transition to SD: D0, D30, D45, D60 and D112. LH secretion was recorded throughout the experiment. High LH levels were observed only at D112. Significantly more PSA-NCAM was found in the GnRH neuron perimeters in the D112 group than in the other groups. This increase was not associated with any change in the number of synaptophysin-immunoreactive contacts on GnRH neurons.

The β -END peri-neuronal space was affected negatively by the transition to SD: the percentage of PSA-NCAM on β -END neurons decreased between D45 and D112 in the posterior two thirds of the ARC. These results suggest that photoperiod alone can reorganize cell interactions in different hypothalamic areas, ultimately reactivating GnRH neurons.

Introduction

Sheep exhibit seasonal sexual activity, mostly synchronized by day length variations ((Karsch et al., 1984), for review (Thiery et al., 2002)). The two reproductive statuses can be elicited by an artificial photoperiodic treatment: short days (SD), corresponding to the breeding season, promote reproductive activity, whereas long days (LD) inhibit sexual activity, as observed during the anestrus season. This seasonal effect involves a finely-tuned regulation of complex neural and endocrine processes, the ultimate actor being the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) synthesizing neurons found mainly in the region of organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT)-preoptic area (POA) in sheep (Lehman et al., 1986).

Recent studies using electron, optical and/or confocal microscopy suggest that the ewe brain undergoes seasonal remodelling affecting both the nature and number of synapses contacting GnRH neurons. A sharp increase of synaptic inputs to GnRH neurons in animals killed during the breeding season was first described by Xiong and coworkers (Xiong et al., 1997). Seasonal variations in the association between GnRH somas and the polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), a marker for neuronal plasticity, were subsequently reported (Viguie et al., 2001). This increased association between PSA-NCAM and GnRH cell bodies during the breeding season correlates with seasonal variations of neuropeptidergic inputs to GnRH neurons. More neuropeptide Y (NPY) terminals appeared on GnRH somas during the breeding season (Jansen et al., 2003, Pompolo et al., 2003a). In contrast, β -endorphin (β -END) appositions were more numerous on GnRH neurons during anestrus (Jansen et al., 2003). Results concerning glutamatergic and gamma-amino butyric acid (GABA) synaptic buttons were less consistent. Depending on whether VGlut-2 (Sergeeva and Jansen, 2009) or VGlut-1 (Pompolo et al., 2003a) was used to stain the

glutamatergic afferents, there were more (VGlut-2) or not more (V-Glut-1) appositions on GnRH neurons during the breeding season. Previous studies have reported either a decrease (Jansen et al., 2003) or an increase (Pompolo et al., 2003a, Sergeeva and Jansen, 2009) in the concentration of GABA inputs to GnRH dendrites during anestrus.

A seasonal change in the number of synapses has also been reported for the dopaminergic neurons in the A15 nucleus, which mediate estradiol negative feedback during anestrus (Adams et al., 2006). The concentration and phenotypes of these synapses vary with seasons: there were more glutamatergic close contacts on A15 neurons during anestrus (Singh et al., 2009), while no seasonal variations in the GABAergic terminals on dopaminergic neurons were detected (Bogusz et al., 2008).

All these studies demonstrate morphological plasticity in several hypothalamic regions between the breeding and anestrus seasons, but no direct effect of photoperiod on the interactions between cell populations has been demonstrated. The aim of the present study was therefore to determine the impact of a change of photoperiod on the morphologies of two key neuronal populations in the control of seasonal reproduction in the ewe: GnRH and β -END neurons. Several studies led us to select β -END neurons for this study. This opioid peptide, mainly found in neurons in the arcuate nucleus (ARC), is involved in gonadal steroid feedback during the GnRH surge (Whisnant and Goodman, 1988, Horton et al., 1989). Neurons immunoreactive (IR) for β -END contain estradiol (Lehman and Karsch, 1993) and progesterone (Dufourny et al., 2005) receptors and project towards GnRH neurons in the ewe (Dufourny et al., 2005). Testosterone decreases proopiomelanocortin mRNA levels during LD but not SD in the ram (Hileman et al., 1998), suggesting an influence of photoperiod on steroid feedback. Beta-END terminals have also been reported on GnRH neurons in several species such as human (Dudas and Merchenthaler, 2004), rat (Chen et al., 1989) and sheep, in which seasonal plasticity has been reported (Jansen et al., 2003). Mu opioid receptors were

found on GnRH neurons in the guinea pig (Zheng et al., 2005). Naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, stimulates LH secretion in the ewe (Goodman et al., 1995) but also in non-seasonal species such as rat (Cicero et al., 1979) and monkey (Orstead et al., 1987). Finally, β -END suppresses the expression of both GnRH and GnRH receptors in the anterior pituitary (Ciechanowska et al., 2008). All these observations demonstrate the importance of β -END inhibiting effect on GnRH neurons during anestrus and suggest a deep involvement of photoperiod on this effect through modulation of the cellular activation and/or environment of β -END neurons.

The objectives of this study were therefore to determine whether a transition from LD to SD is sufficient to alter the association between GnRH or β -END neurons and PSA-NCAM, and whether variation in the GnRH/PSA-NCAM association is linked to a change in the number of synapses on GnRH neurons. Ovariectomized estradiol-replaced ewes were transferred from an artificial light treatment mimicking LD to an SD regimen. Animals were killed at different times following this photoperiodic transition to elucidate the kinetics of the cellular phenomenon induced by light. Brain sections were then dual-labelled either for PSA-NCAM and GnRH or β -END, or for GnRH and synaptophysin (a marker for synaptic buttons), and were observed by confocal microscopy.

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed at the INRA research station (48°N latitude) on sexually mature adult Ile-de-France ewes (2-4 years old; n=25) that had free access to food, water and mineral licks. All experimental procedures were performed in accordance with local animal regulations (authorization no. A 37073, French Ministry of Agriculture).

Treatments

Before the study, all ewes were ovariectomized and implanted subcutaneously with a 2-cm Silastic capsule containing 17β -estradiol (Sigma, St-Louis, MO, USA) to maintain a low physiological serum concentrations of estrogen (approx. 2 pg/ml (Evans et al., 1994)). They were synchronized with one artificial light cycle of 75 short days (SD, 8 h light (L): 16 h darkness (D) per 24 h) followed by 75 long days (LD, 16L: 8D) prior to starting the protocol. The ewes were distributed in four groups of similar age and weight and then transferred from LD to SD on Day 0 (D0). They were killed at D0 (n=5), D30 (n=5), D45 (n=5), D60 (n=5) or D112 (n=5).

Blood sampling

Neuroendocrine reproductive activity was assessed from the LH concentration in blood samples obtained twice weekly from the month preceding the final photoperiodic transition until the end of the experiment. In this model, periods of elevated LH indicate an active gonadotrope axis, and periods of low LH indicate inactivity of this axis (Legan et al., 1977, Legan and Karsch, 1980). Plasma LH concentrations were determined using the double antibody ELISA immunoassay technique published previously (Faure et al., 2005). The intra- and inter-assay coefficients of variation of the control averaged 12% and 8%, respectively.

Tissue collection

Animals were killed in a registered slaughterhouse by a certified butcher and the brain was fixed by perfusion through both carotids with 1l of 1% sodium nitrite in 0.9% saline, followed by 3l of fixative containing 4% paraformaldehyde and 15% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. After dissection, the brains were soaked in 100 ml of 20%

Table 1. Primary Antibodies Used In the Double Immunocytochemistry Protocols.

Primary antibody	Host species	Vendor	Dilution
Anti-GnRH	Rabbit polyclonal IgG	Dr Y.Tillet (Nouzilly, France)	1:20.000
Anti-PSA NCAM	Mouse monoclonal IgM	Abcys-QED biosciences (Paris, France)	1:4.000
Anti-synaptophysin	Mouse monoclonal IgG	Sigma	1:1.500
Anti- β -END	Rabbit polyclonal IgG	Prof. G.Tramu (Talence, France)	1:1.500

Table 2. Secondary Antibodies and Amplification System Used In the Double Immunocytochemistry Protocols.

Secondary antibodies and amplification system	Host species	Vendor	Dilution
FITC anti-rabbit IgG	Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc (Baltimore, MD, USA)	1:300
Texas red anti-rabbit IgG	Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc	1:300
Rhodamine anti-mouse IgM	Goat	Sigma	1:300
Biotin anti-mouse IgG	Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc	1:300
Fluorescein streptavidin	/	Vector Laboratories	1:300

sucrose in PB at 4°C. A block containing the whole diencephalon was dissected out, embedded in Tissue-Tek (O.C.TTM Compound, Zoeterwoude, Netherlands) and quickly frozen using either dry ice or a fast-freezing device in the cryostat chamber. Frontal sections (20 µm) were cut in a cryostat and directly collected on (3-aminopropyl)triethoxy-silane (Sigma)-coated slides (Warembourg and Leroy, 2000), which were stored at -20°C pending further processing.

Double immunocytochemistry

Sections were cut at the OVLT-POA level to detect GnRH-IR cell bodies and at three levels in the rostro-caudal extent of the ARC (anterior, medial and posterior) to visualize the β-END neurons. On our coronal sections, the rostral ARC ends where the median eminence (ME) appears. The medial ARC was considered for sections where the ME is clearly delineated and still anchored to the bottom of the hypothalamus. The caudal part of the ARC began on sections where the third ventricle is completely surrounded by hypothalamus and the median eminence is detached from the brain, and ended where the mammillary recess disappears.

Origins, host species and dilutions of the different primary and secondary antisera and detection systems are detailed in Tables 1 and 2. Sections were washed 3 x 5 min at room temperature (RT) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH=7.4), then incubated overnight at RT with a mixture of two primary antibodies directed against PSA-NCAM and GnRH or β END, or against GnRH and synaptophysin, diluted in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 5% normal goat serum. On the following day, the sections were washed (3 x 5 min at RT) before and after each incubation with the appropriate secondary antibodies and/or fluorescein streptavidin diluted in PBS (60 min at RT each incubation). Finally, they were

washed in PBS and coverslipped using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) as a mounting medium.

Specificity of antibodies

The specificity of the rabbit anti-GnRH has been checked in sheep (Tillet et al., 1989). The anti-synaptophysin antibody has been validated in the rat (Jahn et al., 1985) and a BLAST analysis revealed that the percentage of identically aligned amino acids is conserved to 95% between the sequences of rat and ungulates. The production and characterization of the PSA-NCAM antibody have previously been described in detail (Rougon et al., 1986) and the specificity of this antibody has been tested for the specific detection of polysialic acid residues on NCAM in the rat hypothalamo-neurohypophysial system (Theodosis et al., 1991). The characteristics and specificity of the anti- β -END antibody have also been reported previously (Covenas et al., 1999, Dufourny et al., 2005).

When primary antibodies were omitted or replaced with normal serum from the same species, and when secondary antibodies raised against inappropriate species were used, there was complete loss of immunostaining.

Confocal imaging

Images of double-immunolabelled neurons were obtained using a laser scanning confocal microscope (Olympus confocal FV 500) driven by Fluoview Tiempo time course software 4.2 (Olympus Optical CO (Europa), Hamburg, Germany) at x60 magnification. For each GnRH or β -END neuron, a series of optical sections (z-stacks, 0.25 μ m thickness) was generated with identical confocal settings, then analyzed using Visilog 6.6 software (NOESIS, Saint Aubin, France). Rhodamine and Texas-red were excited with the 633 nm HeNe laser line. and Fluorescein with the 488-514 nm argon laser line. All images were captured in

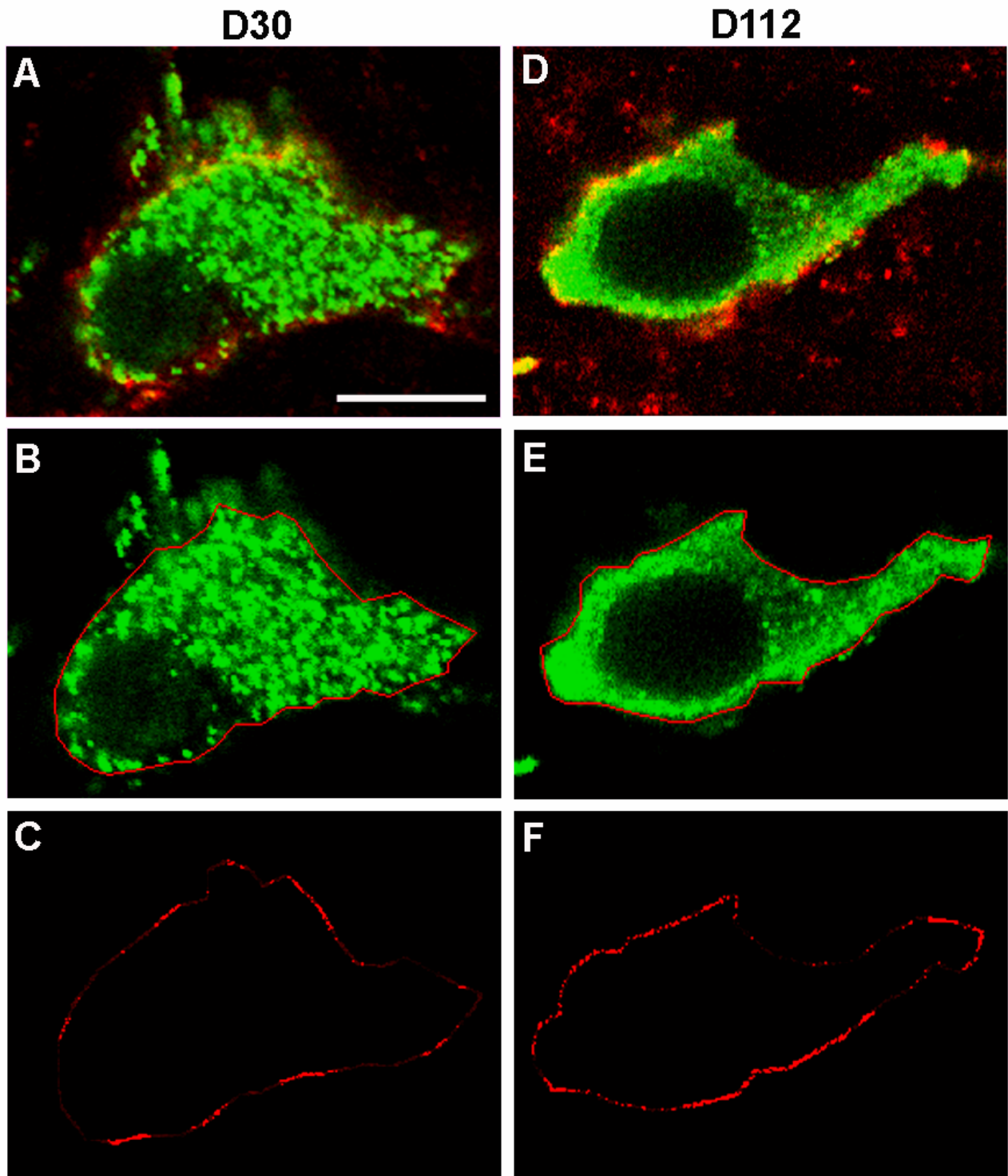


Figure 1. Single confocal z sections (0.25 μ m thick; **A, D**) showing PSA-NCAM immunoreactivity (red) associated with one GnRH-IR neuron (green) from a ewe killed 30 (D30; **A-C**) or 112 (D-F) days after transition from LD to SD. **B, E:** The perimeter of each GnRH neuron (green) was manually delimited (red line). **C, F:** The number of pixels stained with PSA-NCAM (intense red label) was determined in a 2-pixel ring within the perimeter of the GnRH neuron. Brightness and contrast were adjusted on images A and C. Scale bar = 10 μ m.

sequential mode to avoid altering the fluorescence intensity. Detector gain, amplitude offset and amplifier gain were normalized for each channel on each z-stack to a relative fluorescence intensity range of 0-4.095 with a low percentage of darkness and brightest pixels (1-2%). Pinhole diameters were automatically adjusted to match the thickness of the optical sections for all channels. Twenty four-bit confocal images were acquired with a frame size of 1.024 x 1.024 pixels, scan fast-speed, and x2 zoom mode.

Image analysis

Double immunoreactivity was detected by simultaneous visualization of both image channels (Fig. 1). The density of PSA-NCAM immunoreactivity associated with GnRH or β -END neurons was quantified within the cell body perimeters on four sections taken 1.25 μ m apart in the z-stack of images of each neuron. The perimeter of each randomly selected neuron was first manually delimited for each image (Fig. 1B, E). The software, set to a sensitivity threshold, then determined the number of pixels positive for PSA-NCAM in a 2-pixel ring surrounding the perimeter of each GnRH or β -END neuron (Fig. 1C, F).

The number of synaptic contacts on the perimeters of GnRH neurons was also counted on four sections taken 1.25 μ m apart in the z-stack of images of each neuron. A synaptophysin apposition was considered when no space was seen between synaptophysin immunoreactivity and the GnRH neuron.

For each ewe, means values (\pm SEM) were obtained from analysis of seven neurons per area for the three sets of experiments: GnRH/PSA-NCAM, GnRH/Synaptophysin and β -END/PSA-NCAM.

Statistical analysis

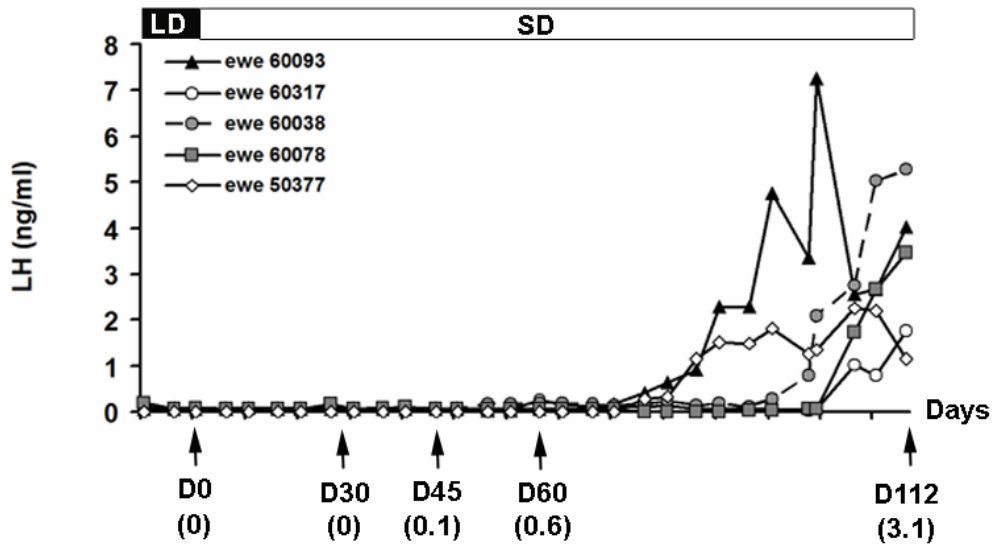


Figure 2. Plasma LH concentration (ng/ml) in the five ovariectomized estradiol-treated ewes killed 112 days after transition from LD to SD. Arrows indicate times when the other four experimental groups of ewes were killed. Mean LH values (ng/ml) observed at these times for the five animals are indicated in brackets below each time point.

Statistical comparisons of means (\pm SEM) were performed using Graph-Pad InStat 3® software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A one-way ANOVA statistical analysis followed by a Tukey-Kramer test was run for the GnRH/PSA-NCAM double immunolabelling (comparison of D0, D30, D45, D60 and D112 groups) and a Student's t test was used for GnRH/Synaptophysin (D112 vs. D60) and β -END/PSA-NCAM (D112 vs. D45) double immunolabellings.

Results

Endocrine status

Individual profiles of plasma LH levels after the transition from LD to SD showed an increase around day 70 at the earliest. LH was undetectable ($<0.1\text{ng/ml}$) in ewes killed between D0 to D60 after the transition to SD. Depending on the ewe, stable high LH levels, higher than 1ng/ml and up to 7.5ng/ml , were only detected approximately 70-110 days after the passage to SD (Fig. 2).

GnRH neurons

Association with PSA-NCAM. As previously reported (Lehman et al., 1986), most GnRH-IR neurons were found within the OVLT-POA. PSA-NCAM immunolabelling was widely distributed throughout the OVLT-POA and was diffuse in the cerebral tissue, in accordance with its location in the cellular membranes of neurons and glia, as reported in the female rat (Parkash and Kaur, 2007). Almost all GnRH neurons displaying green fluorescence were associated with Texas red-stained PSA-NCAM (Fig. 3). The association between GnRH and PSA-NCAM varied greatly between experimental groups and was maximal at D112 (Fig. 3A). This was confirmed by quantitative analysis, which revealed significantly ($P<0.05$) more

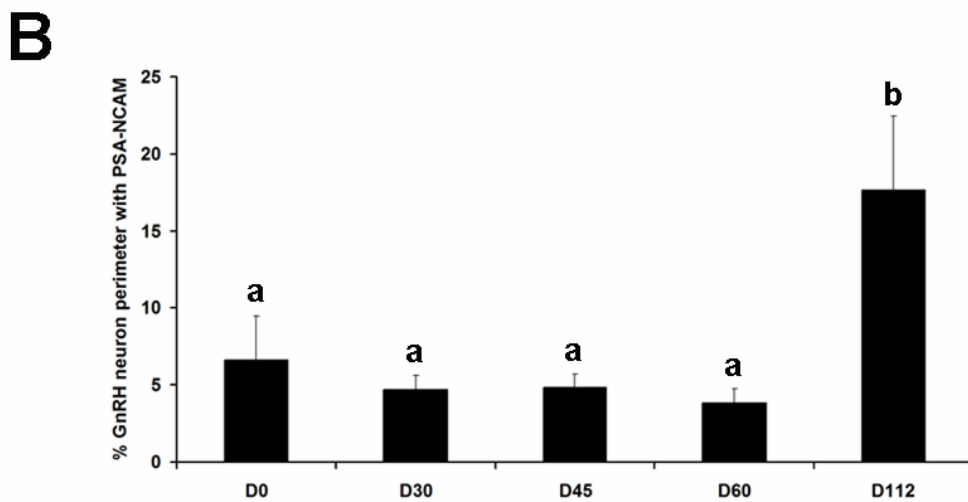
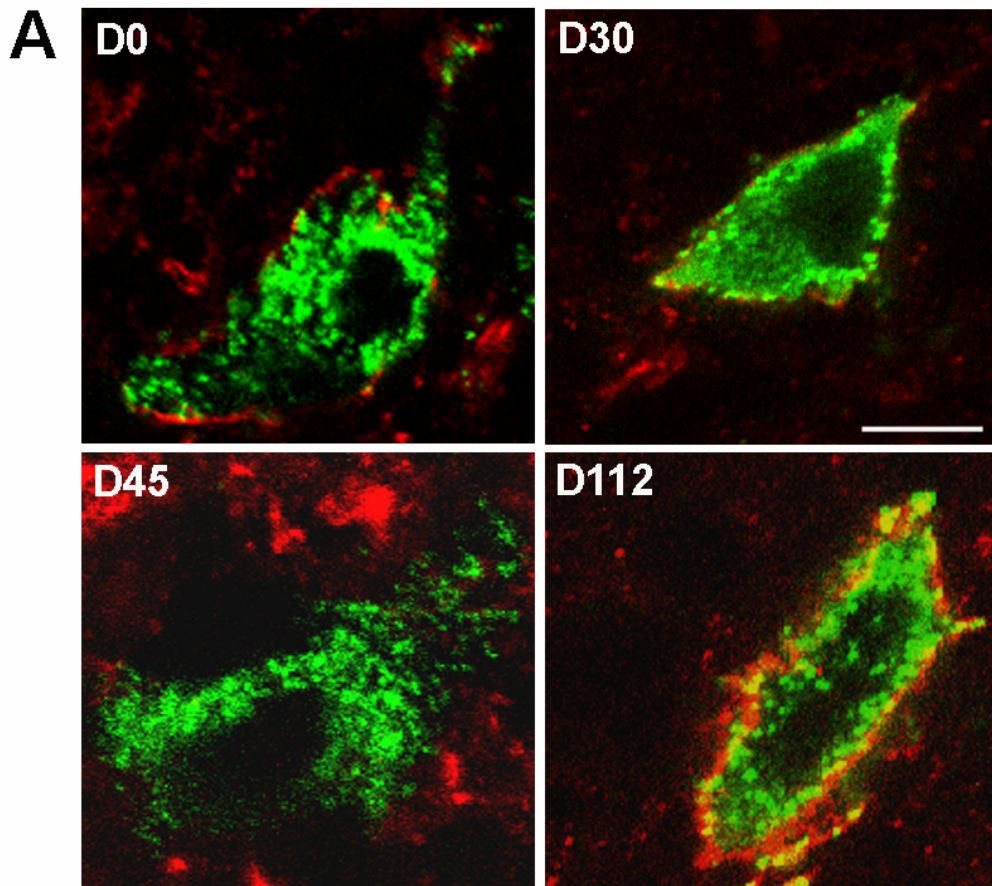


Figure 3. A: Single confocal sections from the OVLT-POA showing PSA-NCAM immunoreactivity (red) juxtaposed with GnRH-IR soma (green) in ewes killed 0, 30, 45 or 112 days after passage to SD. Scale bar = 10 μ m. **B:** Percentage (\pm SEM) of GnRH neuron perimeters in contact with PSA-NCAM at different time points following transition to SD; a and b are significantly different ($P < 0.05$; one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test post-hoc analysis).

GnRH neuron perimeters in contact with PSA-NCAM (Fig. 3B) in the D112 group than in the other four groups. The percentage was $17.7\pm 4.8\%$ in the D112 group while in the D0, D30, D45 and D60 groups it ranged between $3.9\pm 0.9\%$ (D60) and $6.6\pm 2.8\%$ (D0) (Fig. 3B). No statistical differences were noted among the latter four groups. It was notable that the average size of GnRH neurons did not vary among the groups of ewes (data not illustrated).

Synaptophysin contacts. To determine whether the sharp difference in GnRH/PSA-NCAM association between the D60 and D112 groups of ewes may be related to changes in the number of synaptic contacts on GnRH neurons, double immunolabelling against GnRH and synaptophysin was performed and the appositions on GnRH cell bodies were counted. Numerous synaptophysin-IR vesicles were spread throughout the OVLT-POA, and some among them were apposed on GnRH neurons (Fig. 4A). The number of synaptophysin punctuations surrounding each GnRH neuron was similar in the D60 (20.7 ± 4.1) and D112 (24 ± 4.0) groups (Fig. 4B).

β -END neurons

The location of β -END-IR cell bodies throughout the ARC was similar to that described by Whisnant et al. (Whisnant et al., 1992) with a rostro-caudal gradient of cell density through the nucleus, the highest density of β -END-IR neurons being found in the caudal half. All β -END neurons exhibiting green fluorescence were associated with rhodamine-stained PSA-NCAM. However, the juxtaposition differed greatly between the two experimental groups (D45 and D112) except at the level of the rostral ARC (Fig. 5A). Quantitative analysis was performed in the same way as for the GnRH cell population. The percentage of β -END soma perimeters associated with PSA-NCAM immunoreactivity was determined for the three ARC subdivisions in ewes killed 45 or 112 days after the transition from LD to SD (Fig. 5B). In the rostral ARC, this percentage was not significantly different

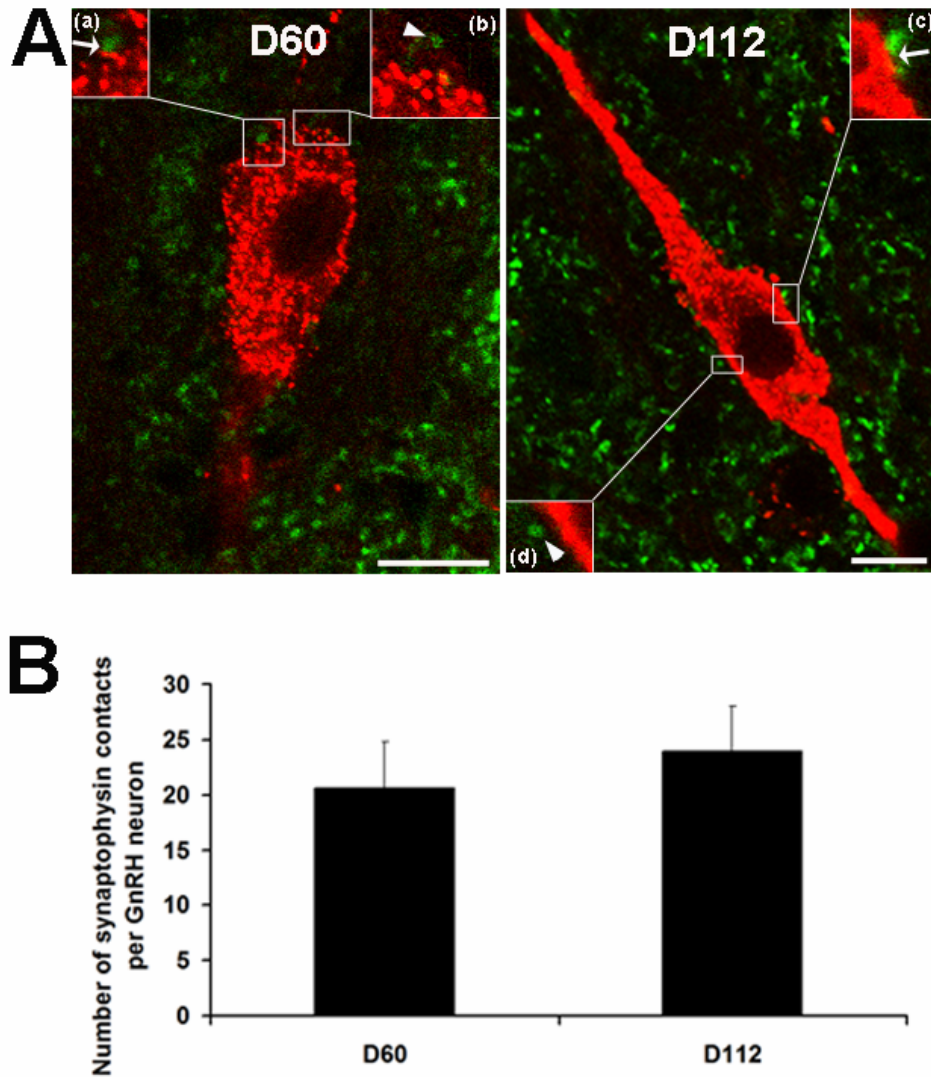


Figure 4. A: Single confocal 0.25 μm thick acquisitions showing synaptophysin immunoreactivity (green) around the GnRH neuron (red) at 60 or 112 days after passage to SD. Inserts show enlargements (x2) of close appositions (**a**, **c**; arrows) and “non” appositions (**b**, **d**; arrowheads). Scale bar = 10 μm . **B:** Number (\pm SEM) of synaptophysin contacts found on the perimeter of one GnRH neuron in the D60 and D112 groups of ewes.

between the two groups (31.9 ± 4.0 vs. $19.2\pm 4.6\%$). However, in the medial and caudal parts of the ARC, significantly less PSA-NCAM was found in close proximity to the perimeters of β -END neurons in the D112 than in the D45 group. The percentage fell from $34.5\pm 4.7\%$ to $14.4\pm 2.2\%$ in the median ARC ($P<0.01$) and from $24.2\pm 1.9\%$ to $9.7\pm 1.4\%$ in the caudal ARC ($P<0.001$) (Fig. 5B). As reported for GnRH neurons, the average size of β -END neurons did not differ among the groups of ewes (data not illustrated).

Discussion

Environment of GnRH neuron and photoperiod

We demonstrated in this study that a variation of photoperiod alone is sufficient to reorganize the peri-neural space of GnRH neurons in the ovine brain. This reorganization seems closely associated with the reproductive status of the animal.

Our results confirm and complement previous data on the ewe brain showing seasonal variations in PSA-NCAM appositions on GnRH neurons: there is more association during the breeding season (Viguie et al., 2001). This association may also be important for the central control of reproduction in non-seasonal mammals, where an up-regulation of PSA-NCAM on GnRH cell bodies was reported in the proestrous phase of rats (Parkash and Kaur, 2007). Taken together, these results suggest that PSA-NCAM has a permissive role in the structural remodelling of GnRH neurons. However, the functional significance of variations in PSA-NCAM remains to be evaluated. It is noteworthy that morphological plasticity seems to occur late, between 60 and 112 days after the transition to SD, although PSA-NCAM can be expressed rapidly at the cell surface, since a chemical modification in it is restored within one hour (Kiss et al., 1994). This plasticity seems to be concomitant with the restoration of high LH levels in our model.

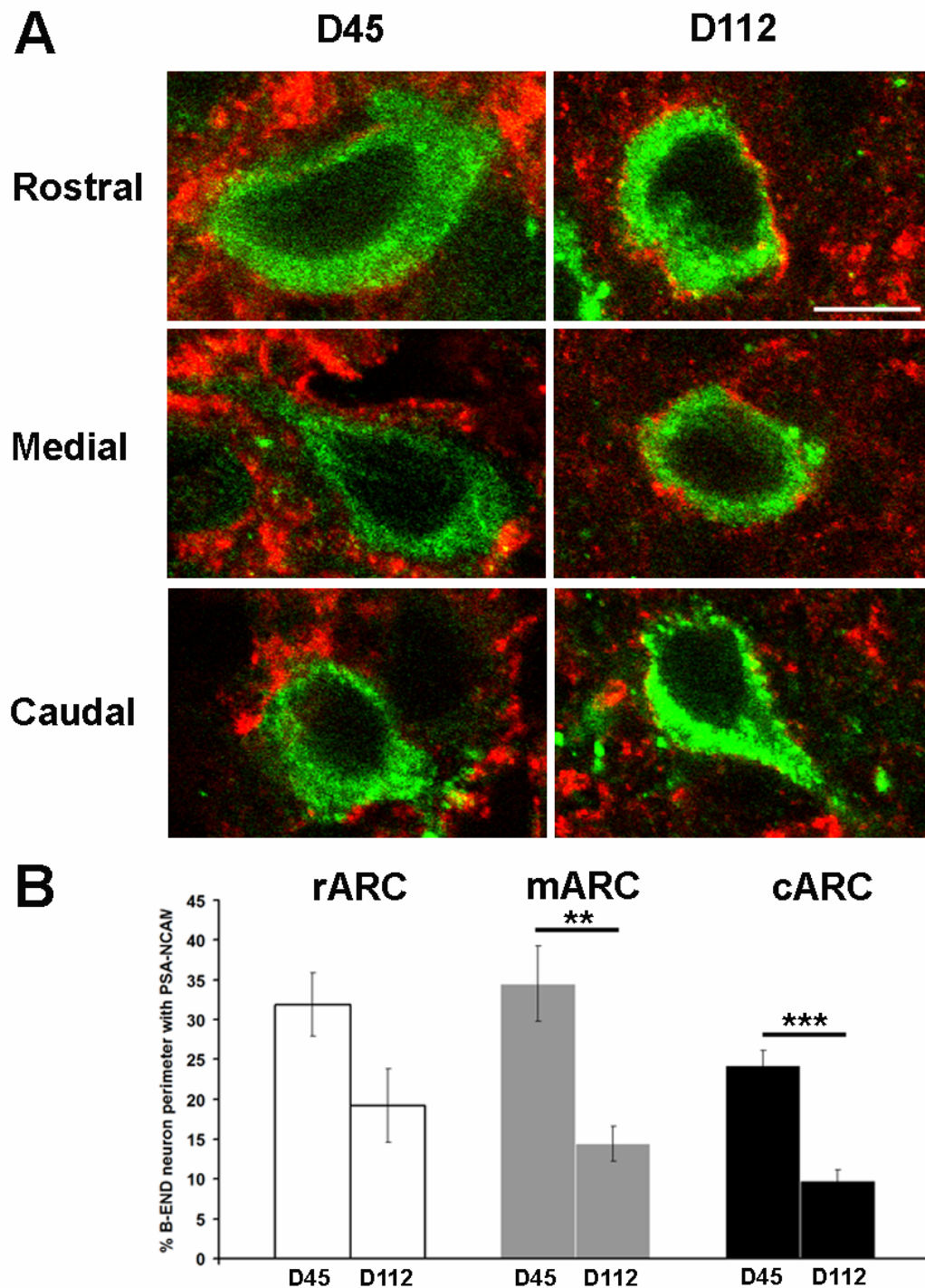


Figure 5. A: Single confocal z section (0.25 μm thick) showing β -END neurons (green fluorescence) surrounded by PSA-NCAM immunoreactivity (red fluorescence) at the rostral (rARC), medial (mARC) or caudal (cARC) levels of the ARC in ewes killed 45 (D45) or 112 days (D112) after passage from LD to SD. Scale bar = 10 μm . **B:** Percentage (\pm SEM) of β -END neuron perimeters in contact with PSA-NCAM in the three subdivisions of the ARC at D45 and D112. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (Student's *t* test).

We also observed that the sharp change in association between GnRH neurons and PSA-NCAM between D60 and D112 (inactive and active gonadotrope axis respectively) is not concomitant with any significant change in the number of synapses on the GnRH neurons. This result contrasts with the data obtained from both intact and ovariectomized estradiol-treated ewes killed during the breeding and anoestrus seasons (Xiong et al., 1997). In that ultrastructural study, there were more synapses on GnRH neurons during the breeding season than in anestrus. The discrepancies between those results and ours may stem from the different techniques used to estimate the number of synaptic contacts (electronic microscopy at both dendritic and somatic levels of the neurons vs. confocal microscopy to estimate the association of synaptophysin with the perimeter of the GnRH somas). Different ovine breeds and photoperiodic settings (natural season vs. controlled photoperiodic treatment) may also account for the difference.

Our results suggest that a change of photoperiod promotes the phenotypic plasticity of the synapses rather than changing their number. This confirms and strengthens previous reports showing seasonal variations in neuropeptidergic afferents controlling GnRH secretion. For example, glutamatergic (VGlut-2) and NPY appositions on GnRH neurons were more numerous during the breeding season (Jansen et al., 2003, Sergeeva and Jansen, 2009), suggesting that these two neuromodulators stimulate GnRH release. For β -END and GABA, two well-documented inhibitors of GnRH secretion (Horton et al., 1989, Scott and Clarke, 1993b), the number of terminals on GnRH neurons seems to increase during the anestrus season (Jansen et al., 2003, Pompolo et al., 2003a, Sergeeva and Jansen, 2009). It has also been demonstrated that double-phenotype (glutamate and GABA) contacts on GnRH dendrites increased during anestrus (Sergeeva and Jansen, 2009). This variation in the peptidergic content of synapses on GnRH neurons may be closely associated with seasonal regulation of the specific receptors for these modulators. The number of galanin receptors

(GAL-R1) on GnRH neurons indeed changed significantly between anestrus and the follicular and luteal phases of the oestrus cycle in the ewe (Dufourny and Skinner, 2005). Whether other receptor subtypes are susceptible to a similarly fine seasonal regulation remains to be determined.

Environment of β -END neuron and photoperiod

We reported for the first time that, following the transition to SD, there was significantly less association between PSA-NCAM and β -END neurons in the posterior two-thirds of the ARC in ewes with active than in those with inactive . This pure effect of our photoperiodic transition reinforces previously published data showing more β -END appositions on GnRH neurons during the anestrus season (Jansen et al., 2003). These data are consistent with the retrieval of the braking effect of this opioid peptide on GnRH release during anestrus, allowing LH release to increase. Since β -END neurons lie mainly in the ARC, it might be interesting to analyze the cellular processes occurring at this level following a change in the duration of melatonin secretion. Negative steroid feedback on GnRH neurons during anestrus can be partly exerted through β -END neurons that contain estradiol and progesterone receptors (Lehman and Karsch, 1993, Dufourny et al., 2005) and project directly toward GnRH neurons (Dufourny et al., 2005). Plasticity at the β -END neuron peripheries is probably necessary for seasonal inhibition of GnRH neuron activity. Tanycytes, specialized ependymal cells located in the inferior half of the third ventricle wall and therefore in close proximity to the β -END neurons of the ARC, have recently been found to have a role in the seasonal transmission of melatonin effects. This is important in relation to our results. It was shown in quail (Nakao et al., 2008) and also in sheep (Lincoln et al., 2006) that melatonin acting at the level of the pars tuberalis can activate the synthesis of deiodinase-2 in tanycytes. This enzyme is necessary for converting the inactive thyroid hormone T4 to active T3 and

shows photoperiod-associated variations in seasonal species such as hamsters (Watanabe et al., 2004) and goats (Yasuo et al., 2006), but also in the mouse (Ono et al., 2008). The role of thyroid hormones in central nervous system development and morphological plasticity is well known (Eayrs, 1966, Calza et al., 1997). In sheep, it was demonstrated that T3 must be present in two brains areas, the ventromedial POA and the PMH, to allow the passage to seasonal anestrus (Anderson et al., 2003). Taken together with our results, this suggests that high T3 levels produced and released during LD from tanycytes, spreading laterally into the ARC toward the PMH, enhance the synthesis of PSA-NCAM in close association with β -END neurons. It is notable that photoperiod affects the association between tanycyte processes and PSA-NCAM in Siberian (Lee et al., 1995) and Djungarian (Bolborea et al., 2009) hamsters. The decrease in deiodinase-2 activity resulting from a transition to SD may therefore diminish the production of T3 and lessen the association between PSA-NCAM and β -END neurons. To test this hypothesis, it would be necessary to check for a close morphological association between β -END neurons and tanycytes. It would be also interesting to assess the effect of thyroid hormones on PSA-NCAM synthesis.

A neuronal network to transduce photoperiod changes

From a physiological point of view, the late change in association between GnRH neurons and PSA-NCAM, appearing only from 60 days after passage to SD, may stem from a cascade reaction. Melatonin implanted surgically in the premammillary hypothalamic (PMH) area of anestrus ewes proved sufficient to reinstate an activated gonadotrope axis but only after 45-60 days (Malpoux et al., 1998). These data suggest that an increased duration of melatonin secretion is first perceived in the posterior hypothalamus and then transmitted to the rostral diencephalon, where most GnRH neurons are found (Lehman et al., 1986). No direct connection between the PMH and the OVLT-POA has been established so far and the

exact network of neurons relaying the photoperiodic information from the posterior hypothalamus to the OVLT-POA remains to be elucidated. However, among areas that might relay this signal, the retrochiasmatic area, where the A15 dopaminergic nucleus is found, is a serious candidate. It has indeed been demonstrated that dopaminergic neurons in the A15 nucleus relay the estradiol negative feedback to GnRH neurons (Thiery et al., 1989, Lehman et al., 1996), and that these neurons not only receive inputs from the caudal hypothalamus, in particular from the ARC (Gayrard et al., 1995), but also display seasonal morphological plasticity (Adams et al., 2006) as well as seasonal reorganization of their afferences (Singh et al., 2009). From those results and ours, we may propose that the long delay observed after an increased duration of melatonin secretion has been induced by a passage to SD first activates neurons located in the caudal regions of the hypothalamus (ARC, PMH...), which project directly or indirectly to the A15 nucleus. The A15 nucleus neurons would then project indirectly, as previously shown (Tillet et al., 1993), toward the OVLT-POA and reactivate the GnRH neurons. The different plastic events, reorganization of the connections within and/or between the different diencephalic areas, that occur during the delay between the increased duration of melatonin secretion and the increase in LH and hence of GnRH, may be partly linked to activation of PSA-NCAM synthesis by glutamate. Activation of the N-Methyl-DL-Aspartate (NMDA) receptor *in vitro* activates PSA-NCAM transcription (Singh and Kaur, 2007). Several *in vivo* studies on various seasonal breeders (starling (Dawson et al., 2001), horse (Fitzgerald and Davison, 1997), sheep (Jansen et al., 1991) and Syrian hamster (Urbanski, 1992)) have also shown that NMDA receptor activation increases LH release.

Functional significance of PSA-NCAM modulation

PSA-NCAM is a regulator of neuronal interactions but also of interactions between neurons and glia (Bonfanti et al., 1992, Kiss et al., 1993, Rougon, 1993) and may therefore be

essential for morphological plasticity. For example, an increased PSA-NCAM level associated with a decrease in the glial environment has been demonstrated in the supraoptic nucleus at the end of the gestation and during the lactation period (Theodosis et al., 1999, Pierre et al., 2001). The changes in association between PSA-NCAM and GnRH cell bodies that we found may then affect the neuroanatomical relationships between these neurons and glia, previously documented in primates (Witkin et al., 1991) including man (Baroncini et al., 2007) and in rodents (Romero et al., 1994).

Our results showed that PSA-NCAM contacts on GnRH and β -END neurons changed significantly after transition to SD. It is noteworthy that there is more association on each neuronal population when the neuropeptide secreted by that population is physiologically required. There was a stronger association with β -END neurons inhibiting GnRH neuron activity when the gonadotrope axis was inactivated by LD, while there was a surge in the juxtaposition of PSA-NCAM with GnRH cell bodies when high LH levels indicating activation of the gonadotrope axis after the passage to SD were measured. From this, it is tempting to conclude that in addition to reflecting neuronal plasticity, the association of PSA-NCAM with a cell population indicates the functional activation of that population. The presence of PSA-NCAM suggests dynamic morphological reorganizations affecting GnRH and β -END neurons, which could prove important for the timing of seasonal breeding activity. Further investigations are necessary to assess the exact significance of changes in PSA-NCAM in a delimited area for the seasonal control of reproduction.

Acknowledgements

The authors thank Pr. G. Tramu (Talence, France) and Dr Y. Tillet (Nouzilly, France) for their generous gifts of the anti- β -END and anti-GnRH antibodies respectively. They also thank the staff of the experimental unit of INRA (UEPAO) Centre de Tours and of the CHIRE

Platform, for breeding and taking good care of the animals, and the staff of the assay platform laboratory for performing the LH assays. They also thank Mr. S. Formosa and Mr P.Y. Sizaret for their valuable technical help. During this study, S.C. was supported by a Région Centre PhD Grant.

References

- Adams VL, Goodman RL, Salm AK, Coolen LM, Karsch FJ, Lehman MN. 2006. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 147(10):4843-4851.
- Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL. 2003. Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology* 144(7):2892-2901.
- Baroncini M, Allet C, Leroy D, Beauvillain JC, Francke JP, Prevot V. 2007. Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 19(9):691-702.
- Bogusz AL, Hardy SL, Lehman MN, Connors JM, Hileman SM, Sliwowska JH, Billings HJ, McManus CJ, Valent M, Singh SR, Nestor CC, Coolen LM, Goodman RL. 2008. Evidence that gamma-aminobutyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology* 149(6):2762-2772.
- Bolborea M, Steinlechner S, Pevet P, Klosen P. Photoperiodic regulation of tanycyte morphology and cell adhesion molecule expression. In: *Neuroscience So, editor*; 2009 Oct. 21; Chicago. 771.15.
- Bonfanti L, Olive S, Poulain DA, Theodosis DT. 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(2):419-436.
- Calza L, Aloe L, Giardino L. 1997. Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Res Bull* 44(4):549-557.
- Chen WP, Witkin JW, Silverman AJ. 1989. beta-Endorphin and gonadotropin-releasing hormone synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the male rat. *J Comp Neurol* 286(1):85-95.
- Cicero TJ, Schainker BA, Meyer ER. 1979. Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamus-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology* 104(5):1286-1291.
- Ciechanowska MO, Lapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. 2008. The central effect of beta-endorphin and naloxone on the expression of GnRH Gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus, and on GnRH-R gene in the anterior pituitary gland in follicular phase ewes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116(1):40-46.
- Covenas R, de Leon M, Narvaez JA, Aguirre JA, Tramu G, Gonzalez-Baron S. 1999. Anatomical distribution of beta-endorphin (1-27) in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 199(2):161-167.

- Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF. 2001. Photoperiodic control of seasonality in birds. *J Biol Rhythms* 16(4):365-380.
- Dudas B, Merchenthaler I. 2004. Close anatomical associations between beta-endorphin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon. *Neuroscience* 124(1):221-229.
- Dufourny L, Caraty A, Clarke IJ, Robinson JE, Skinner DC. 2005. Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology* 81(3):139-149.
- Dufourny L, Skinner DC. 2005. Distribution of galanin receptor 1-immunoreactive neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with GnRH. *Brain Res* 1054(1):73-81.
- Eayrs JT. 1966. Thyroid and central nervous development. *Sci Basis Med Annu Rev*:317-339.
- Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ. 1994. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 134(4):1806-1811.
- Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C. 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* 186(1):109-121.
- Fitzgerald BP, Davison LA. 1997. Comparison of the effects of N-methyl-DL-aspartic acid on gonadotropin and prolactin secretion in anestrus mares and mares exhibiting estrous cycles during anestrus. *Biol Reprod* 57(1):36-42.
- Gayrard V, Thiery JC, Thibault J, Tillet Y. 1995. Efferent projections from the retrochiasmatic area to the median eminence and to the pars nervosa of the hypophysis with special reference to the A15 dopaminergic cell group in the sheep. *Cell Tissue Res* 281(3):561-567.
- Goodman RL, Parfitt DB, Evans NP, Dahl GE, Karsch FJ. 1995. Endogenous opioid peptides control the amplitude and shape of gonadotropin-releasing hormone pulses in the ewe. *Endocrinology* 136(6):2412-2420.
- Hileman SM, Kuehl DE, Jackson GL. 1998. Photoperiod affects the ability of testosterone to alter proopiomelanocortin mRNA, but not luteinizing hormone-releasing hormone mRNA, levels in male sheep. *J Neuroendocrinol* 10(8):587-592.
- Horton RJ, Francis H, Clarke IJ. 1989. Seasonal and steroid-dependent effects on the modulation of LH secretion in the ewe by intracerebroventricularly administered beta-endorphin or naloxone. *J Endocrinol* 122(2):509-517.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. 1985. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12):4137-4141.
- Jansen HT, Cutter C, Hardy S, Lehman MN, Goodman RL. 2003. Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology* 144(8):3663-3676.
- Jansen HT, Khalid M, Jackson GL. 1991. N-methyl-D, L-aspartate induces a transient increase in LH secretion in the seasonally anestrus ewe. *Domest Anim Endocrinol* 8(1):55-62.
- Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 40:185-232.
- Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon G, Lang J, Baetens D, Harry D, Pralong WF. 1994. Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *Embo J* 13(22):5284-5292.

- Kiss JZ, Wang C, Rougon G. 1993. Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neuroscience* 53(1):213-221.
- Lee W, Watanabe M, Glass JD. 1995. Photoperiod affects the expression of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in the hypothalamus of the Siberian hamster. *Brain Res* 690(1):64-72.
- Legan SJ, Karsch FJ. 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 23(5):1061-1068.
- Legan SJ, Karsch FJ, Foster DL. 1977. The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 101(3):818-824.
- Lehman MN, Durham DM, Jansen HT, Adrian B, Goodman RL. 1996. Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrus, but not breeding season, ewes. *Endocrinology* 137(10):4443-4450.
- Lehman MN, Karsch FJ. 1993. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133(2):887-895.
- Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ, Silverman AJ. 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol* 244(1):19-35.
- Lincoln GA, Clarke IJ, Hut RA, Hazlerigg DG. 2006. Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science* 314(5807):1941-1944.
- Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P. 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139(4):1508-1516.
- Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Iigo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y, Sugano S, Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T. 2008. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452(7185):317-322.
- Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, Watanabe M, Nakane Y, Murai A, Ebihara S, Korf HW, Yoshimura T. 2008. Involvement of thyrotrophin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18238-18242.
- Orstead KM, Hess DL, Spies HG. 1987. Opiatergic inhibition of pulsatile luteinizing hormone release during the menstrual cycle of rhesus macaques. *Proc Soc Exp Biol Med* 184(3):312-319.
- Parkash J, Kaur G. 2007. Transcriptional regulation of PSA-NCAM mediated neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus. *Neuron Glia Biol* 3(4):299-307.
- Pierre K, Bonhomme R, Dupouy B, Poulain DA, Theodosis DT. 2001. The polysialylated neural cell adhesion molecule reaches cell surfaces of hypothalamic neurons and astrocytes via the constitutive pathway. *Neuroscience* 103(1):133-142.
- Pompolo S, Pereira A, Kaneko T, Clarke IJ. 2003. Seasonal changes in the inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ewe brain: an assessment by conventional fluorescence and confocal microscopy. *J Neuroendocrinol* 15(5):538-545.
- Romero MT, Silverman AJ, Wise PM, Witkin JW. 1994. Ultrastructural changes in gonadotropin-releasing hormone neurons as a function of age and ovariectomy in rats. *Neuroscience* 58(1):217-225.

- Rougon G. 1993. Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol* 61(2):197-207.
- Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W. 1986. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol* 103(6 Pt 1):2429-2437.
- Scott CJ, Clarke IJ. 1993. Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors. *Endocrinology* 132(4):1789-1796.
- Sergeeva A, Jansen HT. 2009. Neuroanatomical plasticity in the gonadotropin-releasing hormone system of the ewe: seasonal variation in glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic afferents. *J Comp Neurol* 515(6):615-628.
- Singh J, Kaur G. 2007. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res* 1154:8-21.
- Singh SR, Hileman SM, Connors JM, McManus CJ, Coolen LM, Lehman MN, Goodman RL. 2009. Estradiol negative feedback regulation by glutamatergic afferents to A15 dopaminergic neurons: variation with season. *Endocrinology*.
- Theodosis DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, Poulain DA. 1999. Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J Neurosci* 19(23):10228-10236.
- Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA. 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 U S A* 88(13):5494-5498.
- Thiery JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpoux B. 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol* 23(1-2):87-100.
- Thiery JC, Martin GB, Tillet Y, Caldani M, Quentin M, Jamain C, Ravault JP. 1989. Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 49(1):80-87.
- Tillet Y, Batailler M, Thibault J. 1993. Neuronal projections to the medial preoptic area of the sheep, with special reference to monoaminergic afferents: immunohistochemical and retrograde tract tracing studies. *J Comp Neurol* 330(2):195-220.
- Tillet Y, Caldani M, Batailler M. 1989. Anatomical relationships of monoaminergic and neuropeptide Y-containing fibres with luteinizing hormone-releasing hormone systems in the preoptic area of the sheep brain: immunohistochemical studies. *J Chem Neuroanat* 2(6):319-326.
- Urbanski HF. 1992. Photoperiodic modulation of luteinizing hormone secretion in orchidectomized Syrian hamsters and the influence of excitatory amino acids. *Endocrinology* 131(4):1665-1669.
- Viguie C, Jansen HT, Glass JD, Watanabe M, Billings HJ, Coolen L, Lehman MN, Karsch FJ. 2001. Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinology* 142(3):1317-1324.
- Warembourg M, Leroy D. 2000. Microwave pretreatment of sections to improve the immunocytochemical detection of progesterone receptors in the guinea pig hypothalamus. *J Neurosci Methods* 104(1):27-34.
- Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S, Yoshimura T. 2004. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145(4):1546-1549.

- Whisnant CS, Curto K, Goodman RL. 1992. Immunocytochemical localization of beta endorphin and gonadal steroid regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the ewe. *Neuroendocrinology* 56(6):812-821.
- Whisnant CS, Goodman RL. 1988. Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol Reprod* 39(5):1032-1038.
- Witkin JW, Ferin M, Popilskis SJ, Silverman AJ. 1991. Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129(2):1083-1092.
- Xiong JJ, Karsch FJ, Lehman MN. 1997. Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology* 138(3):1240-1250.
- Yasuo S, Nakao N, Ohkura S, Iigo M, Hagiwara S, Goto A, Ando H, Yamamura T, Watanabe M, Watanabe T, Oda S, Maeda K, Lincoln GA, Okamura H, Ebihara S, Yoshimura T. 2006. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147(1):432-440.
- Zheng SX, Bosch MA, Ronnekleiv OK. 2005. mu-opioid receptor mRNA expression in identified hypothalamic neurons. *J Comp Neurol* 487(3):332-344.

II) Conclusion

Les données présentées dans cet article démontrent qu'un changement de photopériode seul semble suffisant pour réorganiser l'espace péri-neuronal des neurones à GnRH et à β -END dans le cerveau ovin. L'association entre la PSA-NCAM et le périmètre des neurones à GnRH est maximale dans le groupe d'animaux abattus 112 jours après le passage en jours courts, chez lesquels les niveaux de LH sont élevés. Cette réorganisation morphologique semble être corrélée avec l'activation de l'axe gonadotrope. Cette plasticité n'est cependant pas associée avec une variation du nombre des synapses sur les neurones à GnRH suggérant que le changement de photopériode pourrait être à l'origine d'une plasticité phénotypique des contacts synaptiques sur ces neurones. A l'inverse des neurones à GnRH, l'association entre les neurones à β -END et la PSA-NCAM est plus faible dans le groupe d'animaux abattus au 112^{ème} jour de traitement de jours courts. Ce résultat peut être corrélé avec l'arrêt de l'inhibition de la sécrétion de GnRH lorsque la brebis entre en saison de reproduction.

La présence d'une quantité importante de PSA-NCAM au moment le plus opportun pour l'activité du neurone qu'elle entoure suggère une réorganisation morphologique dynamique affectant les neurones à GnRH et ceux à β -END qui pourrait être essentielle au déroulement de l'activité de reproduction saisonnière de la brebis. Nos résultats suggèrent aussi que la PSA-NCAM peut représenter un marqueur de l'activité du neurone.

B) 2^{ème} PARTIE : Effet de la photopériode sur la population des neurones à kisspeptine

I) Introduction

Afin de déterminer l'impact d'un changement de traitement lumineux sur les neurones Kiss, nous avons estimé la proportion des neurones sécrétant le Kiss par rapport au nombre total de neurones à des intervalles de temps réguliers suivant un passage en jours courts. Nous avons ensuite déterminé si le faible nombre de neurones mesuré chez des animaux sexuellement inactifs en jours longs est dû à une disparition des neurones par apoptose ou si le contenu en Kiss de ces neurones est trop faible pour être détecté par une immunocytochimie classique. Pour cela, nous avons comparé le nombre de neurones Kiss chez des animaux maintenus en jours longs, traité ou non traité avec de la colchicine, une substance qui bloque la libération des neuropeptides et permet donc leur accumulation dans le soma.

Ces données font l'objet d'un article soumis dans *Journal of Neuroendocrinology*.

Effects of photoperiod on Kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function

S. Chalivoix^{a,b,c,d}, A. Bagnolini^{a,b,c,d}, A. Caraty^{a,b,c,d}, J. Cognié^{a,b,c,d}, B. Malpoux^{a,b,c,d}, L. Dufourny^{a,b,c,d,*}

^a INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

^b CNRS, UMR 6175, F-37380 Nouzilly, France

^c Université de Tours, F-37041 Tours, France

^d Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

Short title: Photoperiod controls Kiss expression in the ewe brain.

***Corresponding author:** Dr Laurence Dufourny

Centre INRA de Tours

F-37380 NOUZILLY, France

Phone: (+33) 2 47 42 79 03

Fax: (+33) 2 47 42 77 43

laurence.dufourny@tours.inra.fr

Keywords: Sheep, photoperiodic transition, seasonal reproduction, kisspeptin.

Abstract

Kisspeptin (Kiss) is a key regulator of reproductive function in both prepubertal and adult mammals. Its expression seems to vary throughout the year in seasonal species. We sought to determine the impact of a change of photoperiod on the size of Kiss neuronal populations found in the preoptic area (POA) and arcuate nucleus (ARC) of the ewe brain. Using immunocytochemistry, we first examined the proportion of neurones expressing Kiss, using HuC/D as a neuronal marker, at different time-points following transition from long days (LD; 16L: 8D) to short days (SD; 8L: 16D). LH secretion was measured in ovariectomised oestradiol replaced ewes from the month preceding the transition to SD until the sacrifice of the animals at D0, D45 and D112 from this photoperiodic transition. High LH levels were only observed in animals killed at D112. The number of Kiss neurones/mm² doubled in the caudal ARC at D112. The percentage of neurones showing Kiss immunoreactivity increased significantly in both the POA and ARC in the D112 group. In a second experiment, ewes kept in LD received an intracerebroventricular injection of colchicine 20H before sacrifice. Colchicine treatment increased the number and the percentage of neurones with Kiss in both the POA and caudal ARC. Our data suggest that the increase in Kiss neurones detected in the POA and caudal ARC following transition to SD stemmed from an increase in Kiss synthesis. This up-regulation of Kiss content under the shorter day condition appears to be a late event within the cascade activated by a longer secretion of melatonin which is a critical factor in switching GnRH secretion to a breeding season profile.

Introduction

The discovery of kisspeptins (Kiss) encoded by the *Kiss-1* gene and their effects on reproduction constituted a landmark in understanding gonadotropic axis regulation in mammals. Evidence of their importance came indirectly from humans and mice with impaired sexual development and showing hypogonadotropic hypogonadism [1,2]. All presented a spontaneous mutation or deletion of the GPR54 gene, an orphan receptor, which was known as the receptor for Kiss [3,4]. These results suggested that the Kiss/GPR54 signalling pathway is essential for pubertal maturation. It has subsequently been demonstrated that central or peripheral administration of Kiss stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by raising LH and FSH levels in adults [5-7]. Kiss also initiates precocious puberty, assessed by age at vaginal opening or by LH secretion, in prepubertal rodents and monkeys [8,9]. The Kiss effect mainly appears to be mediated by GnRH neurones that express GPR54 receptors [8,10].

Two major subpopulations of Kiss neurones have been identified in the diencephalon of mammals, one distributed throughout the preoptic area (POA) and the other found in the arcuate nucleus (ARC). The function of Kiss neurones from the POA is better understood in rodents than in sheep; the physiological function of this population remains elusive in the latter [11,12], while Kiss neurones in the rodent anteroventral periventricular nucleus (AVPV), which all express oestrogen receptor (ER) α [13], relay the oestrogen positive feedback to GnRH neurones [14]. Despite the unknown physiological function of Kiss neurones in the ovine POA, it is noteworthy that half of them contain ER α [11].

All Kiss neurones located in the ARC express ER α [11,13]; most of them also contain progesterone [15] and androgen [14] receptors and therefore appear able to relay steroid feedback in both rodents and sheep.

Expression of Kiss in neurones of the ARC is upregulated following gonadectomy in the male and female mouse [13,14] and in the ewe [15,16], whereas it is reduced by oestrogen or testosterone replacement. This suggests that steroids mainly exert a negative feedback on this Kiss population. However, the situation seems more complex in the ewe, where Kiss neurones from the caudal ARC relay the positive feedback of oestradiol during the pre-ovulatory period [17].

Recent studies show that Kiss expression may be regulated by photoperiod in seasonal species. In the Syrian hamster, a species with ovarian cycles during spring and summer and is thus a long-day (LD) breeding species, LD photoperiod treatment increases Kiss in the ARC [18]. The same treatment decreases Kiss in the Siberian hamster AVPV [19]. Moreover, pinealectomised hamsters maintained in short days (SD) show elevated Kiss expression in the ARC [18], which can be reversed by melatonin injections [20]. Kiss regulation by melatonin has not yet been thoroughly examined in the ewe, a short-day breeder. However, Kiss-1 mRNA levels in the middle and caudal ARC are lower during seasonal anoestrus than during the breeding season. In contrast, no seasonal variation has been observed in the ovine POA [16]. It has also been reported that the maximal expression of Kiss mRNA in the caudal ARC of Soay sheep, a strongly seasonal species, was obtained during a photoperiod mimicking SD (8 hours of light), and the minimal expression during LD treatment (16 hours of light) [21].

The aim of this study was therefore to determine the impact of a change in photoperiod on the kinetics of Kiss neuronal populations found in both the POA and ARC of the ewe brain. Using immunocytochemistry, we estimated the percentage of neurones secreting Kiss at different time-points following transition from LD to SD. In a second experiment, we attempted to assess whether the “missing” neurones in LD animals disappeared by apoptosis or if their Kiss content was too low to be detected using conventional immunocytochemistry. For that, we compared the number of neurones stained

for Kiss in animals maintained in LD which had or had not been treated with colchicine, a drug that blocks peptide release.

Materials and Methods

Animals and treatments

Experiments were performed on 27 sexually mature adult Ile-de-France ewes. All ewes had free access to food, water and mineral licks at the INRA animal facility. All experimental procedures were performed in accordance with local regulations (authorization no. A 37073, French Ministry of Agriculture). Before the study, all ewes were ovariectomised (OVX) and implanted subcutaneously with a 2-cm Silastic capsule containing 17β -oestradiol to maintain low physiological serum concentrations of oestrogen (approx. 2 pg/ml [22]).

In the first experiment aimed at measuring the influence of a transition to SD on Kiss populations, 17 ewes were synchronised from the summer preceding the start of the experiment with an artificial photoperiod treatment composed of 75 short days (SD; 8 hours of light (L) and 16 hours of darkness (D) per 24h/ 8L:16D) followed by 75 long days (LD; 16L: 8D) prior to this protocol. The ewes were allocated to 4 groups matched for age and body weight and then transferred from LD to SD on Day 0 (end of September). Based on previous results from our laboratory showing that an increase of the duration of melatonin secretion results 45 to 60 days later in an increase of LH secretion [23], ewes were killed at Day 0 (n=5), D45 (n=5), D60 (n=2) and D112 (n=5).

The aim of the second experiment was to determine the size of Kiss populations during LD; it was carried out on 10 ewes which were transferred from natural photoperiod in January to an artificial LD photoperiod (16L: 8D). One month later, 5 ewes were anesthetized by inhalation of a isoflurane/oxygen mixture, placed in a stereotaxic frame and injected in the

lateral ventricle (coordinates: A 30 ± 2 mm, L $\pm 5 \pm 2$ mm, H 16 ± 2 mm according to the atlas of Richard [24]) with 1 mg colchicine (Sigma, Saint Louis, MO, USA) diluted in sterile saline 20h before killing. Five control animals were not injected. All animals were killed the following day. This colchicine treatment of ewes was approved by the Regional Ethics Committee (b-2009-LD-01).

In both experiments, neuroendocrine reproductive activity was assessed from the concentration of LH in blood samples obtained twice weekly from the month preceding the final transition to the end of the experiment. In this model, periods of high LH are indicative of an active gonadotrope axis, and periods of low LH are associated with inactivity of this axis [25,26]. Plasma LH concentrations were determined using the double antibody ELISA immunoassay technique published previously [27]. The intra- and inter-assay coefficients of variation of the control averaged 12% and 8%, respectively.

Tissue fixation

Animals were killed in a registered slaughterhouse by a certified butcher and the brain was fixed by perfusion through both carotids with 1l of 1% sodium nitrite in 0.9% saline, followed by 3l of fixative containing 4% paraformaldehyde and 15% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. After dissection, brains were soaked in 100 ml of 20% sucrose in PB at 4°C. A block containing the whole diencephalon was dissected out, embedded in Tissue-Tek (O.C.TTM Compound, Zoeterwoude, Netherlands) and quickly frozen using either dry ice or a fast freezing device in the cryostat chamber. Frontal sections (20 μ m) were cut in a cryostat and directly collected on silane-coated slides [28]. Slides were stored at -20°C until further processing.

Kiss immunolabelling

Sections were washed (3x5 min; room temperature) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH=7.4). Kiss immunolabelling was performed in the rostral preoptic area (POA) and throughout the arcuate nucleus (ARC) using a polyclonal rabbit antibody directed against mouse kisspeptin-10 (1:12.500). The sections were incubated with the primary antibody diluted in PBS 0.3% Triton X-100 containing 5% normal goat serum for 7 days at 4°C in a humid atmosphere. For visualization, sections were washed in PBS and incubated for 60 min at room temperature (RT) in biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD, USA), followed by fluorescein-linked streptavidin (1:300, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 60 min at room temperature. The sections were thoroughly washed in PBS and coverslipped using Vectashield (Vector) as a mounting medium. The specificity of the rabbit anti-Kiss antibody for the detection of Kiss neurones in the ewe has previously been published [11].

Kiss and HuC/D double immunolabelling

Human neuronal protein HuC and HuD (HuC/D), members of the Elav family, are used as markers of neuronal cell bodies [29]. It should be noted that the HuC/D marker we used is recognised as being a very efficient marker of mature neurones [29] and is found exclusively in neurones [30,31]. Double immunocytochemistry involving an anti-HuC/D antibody was used to estimate the percentage of neurones synthesising Kiss in the POA and caudal ARC. Kiss and HuC/D were detected on the same sections using double immunocytochemical labelling. After 3 washes in PBS at RT, sections were incubated for 7 days at 4°C with a mixture of the primary antibodies diluted in PBS 0.3% Triton X-100 containing 5% normal goat serum. The Kiss antibody was used at the same dilution as for single immunolabelling and the monoclonal mouse antibody directed against HuC/D protein (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was diluted 0.6 µg/ml. Sections were washed before and

after each incubation step at RT. All secondary antibodies were diluted in PBS and incubated at RT. For visualization of each immunoreactivity, slides were first incubated for 60 min in Texas-red goat anti-rabbit IgG (1:300, Jackson), then in biotinylated goat anti-mouse IgG (1:300, Jackson) and finally in fluorescein streptavidin (1:300, Vector). The sections were coverslipped using Vectashield (Vector).

Specificity of the mouse anti-HuC/D antibody has previously been checked in rats [32] and sheep [33]: when primary antibodies were omitted or replaced by normal serum from the same species, and when secondary antibodies raised against inappropriate species were used, there was a complete loss of immunostaining.

Analysis of results

Kiss and HuC/D neurones were observed with an Olympus BX51 fluorescence microscope equipped with a U-MNIBA2 filter allowing detection of fluorescein-labelled neurones (excitation wavelength: 470-490 nm), and with a U-MWIG2 filter (excitation wavelength: 520-550 nm) for visualization of Texas-Red-stained cells. Switching from one filter to the other allowed double-labelled neurones to be visualised. These were also discernible on the merged image obtained from pictures taken under each filter illumination using a digital camera (Spot v4.0 Insight FireWire; Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) driven by the Spot Advanced software (Diagnostic Instruments).

Observation of the Kiss single immunolabelling has been performed on 4 sections of the POA taken 100µm apart and on 4 sections (taken every 100µm) of each subdivision of the ARC. Microphotograph (20x magnifications) of Kiss-immunoreactive (IR) neurones has been taken in only one section of the POA and 3 other pictures were taken in each rostrocaudal subdivision of the ARC on 3 different sections. Photographs were taken in 2 ewes from the D0, D45 and D60 groups and in all ewes in the D112 group.

For the Kiss and HuC/D double immunolabelling, 3 sections at the level of the POA and 3 sections at the level of the caudal ARC were taken from all animals in the D0 (n=5), D45 (n=5) and D112 (n=5) groups and examined. The same procedure was performed for all ewes involved in the second experiment (colchicine-treated vs. untreated ewes). For each area of each animal, 5 microphotographs were taken, and labelled cells were then counted by an examiner who was unaware of the experimental treatment.

As each randomly selected microscopic field size was 263 x 351 μm , analyses were performed on a total surface of 0.45 mm^2 per area (POA or ARC) for each ewe. Total numbers of Kiss-IR and HuC/D-IR neurones were then expressed as total number of cells/ mm^2 ($\pm\text{SEM}$). Percentages of neurones expressing Kiss ($\pm\text{SEM}$) were calculated for each group. Statistical analysis was performed using Graph-Pad InStat 3[®] software (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, USA). A one-way ANOVA statistical analysis followed by a Tukey-Kramer-test was performed for the first experiment (comparison of D0, D45 and D112 groups), and a Student's *t*-test was used for the second experiment (colchicine-treated vs. untreated ewes).

Results

Distribution and intensity of neurones labelled for Kiss

The distribution of Kiss-IR neurones was similar to that reported previously [11,15] with two subpopulations found in the POA and in the ARC. The number and intensity of Kiss-labelled cells were compared in the different groups of ewes killed between D0 and D112 following transition to SD. Individual profiles of plasma LH showed an increase of LH levels (Fig. 1), which occurred approximately at day 90 at the earliest following a transition to SD (Table. 1). Kiss immunoreactivity was present in both cell bodies and fibres.

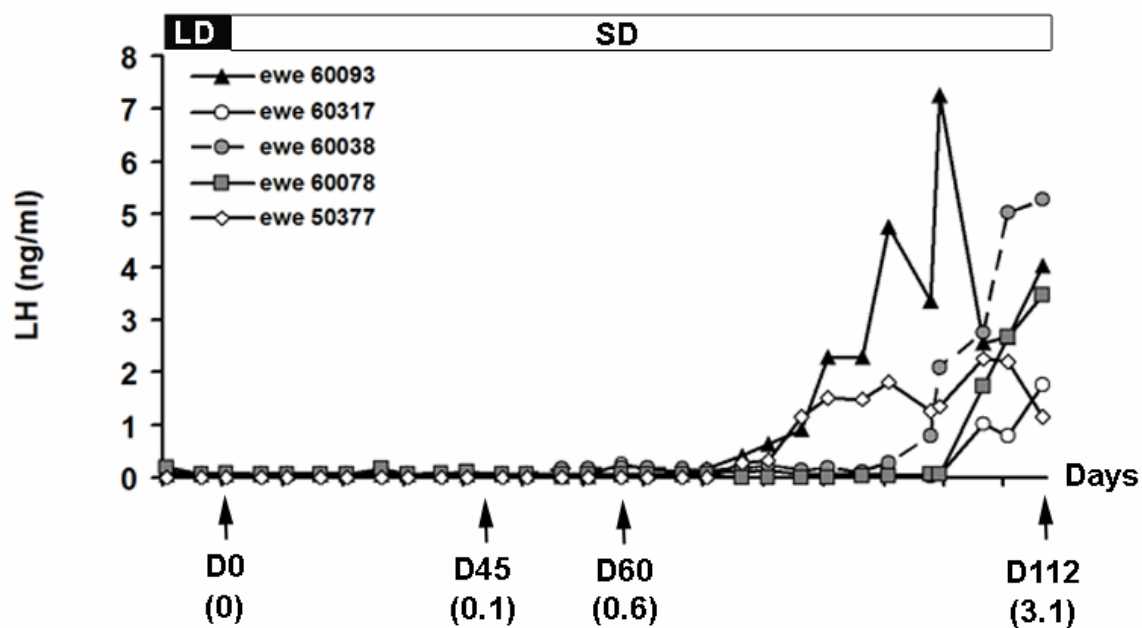


Fig. 1. Plasma LH concentration (ng/ml) in 5 ewes (OVX+E2) killed 112 days (D112) after a transition from LD to SD. Arrows indicate times when groups of ewes were killed. Mean LH values (ng/ml) observed at these times for the 5 animals are indicated in brackets below each timepoint.

Table 1. Approximate day of LH increase following a transition to SD (D0) in the D112 group.

Ewe number	Approximate day of LH increase
60038	97
60078	102
60093	84
60317	102
60377	84

In the POA (Fig. 2A), a similar distribution of cells was observed for ewes killed on D0, D45 and D60, with low LH levels (Fig. 1). In these groups, sparse cells located on both sides of the preoptic recess displayed a low intensity of fluorescence. In contrast, strongly labelled Kiss-IR cells were abundant in the D112 group which displayed high LH levels (Fig. 2B). These neurones, with intense fluorescence, were distributed laterally and were found throughout the rostro-caudal extent of the POA.

In the ARC (Fig. 2A), a few mildly fluorescent neurones were observed in the periventricular area of ewes killed on D0, D45 and D60, and most of these neurones were faintly labelled. In contrast, Kiss cell bodies of D112 ewes were very densely packed and strongly fluorescent in the ARC, particularly in the caudal part of the nucleus (Fig. 2B).

It is noteworthy that no differences were discernible among the different groups of ewes in the intensity of the labelling of Kiss fibres found in the POA, ARC and median eminence.

Kiss neuronal populations following transition to SD

The Kiss and HuC/D double immunolabelling was performed to estimate the percentage of neurones secreting Kiss in the POA and caudal ARC in ewes killed 0, 45 or 112 days after transition to SD (Fig. 3). HuC/D immunoreactivity was present in both the nucleus and the cytoplasm of all neurones, and cell bodies were strongly labelled. No fibres were labelled for HuC/D (Fig. 3).

Quantitative analysis of the POA failed to reveal a significant difference in the number of Kiss cells/mm² of ewes killed at D0, D45 and D112 following transition to SD (Fig. 4), although a slight increase was noticeable between D0 (157 neurones) and D112 (240 neurones). However, the percentage of neurones expressing Kiss rose ($p < 0.05$) from 3.6% at

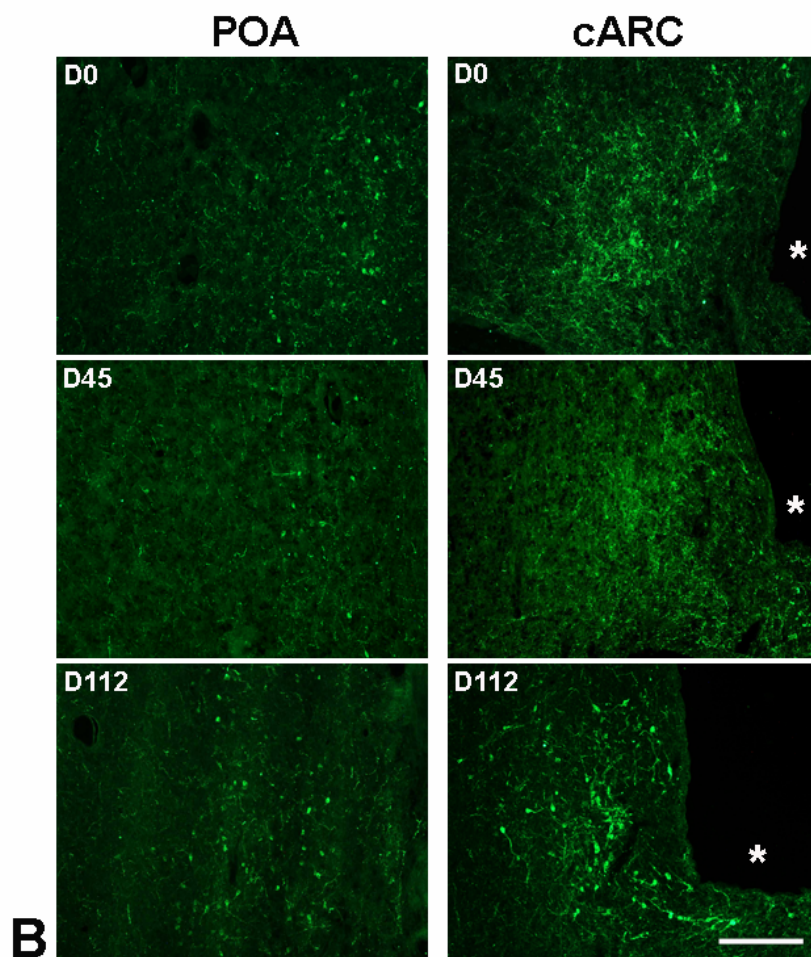
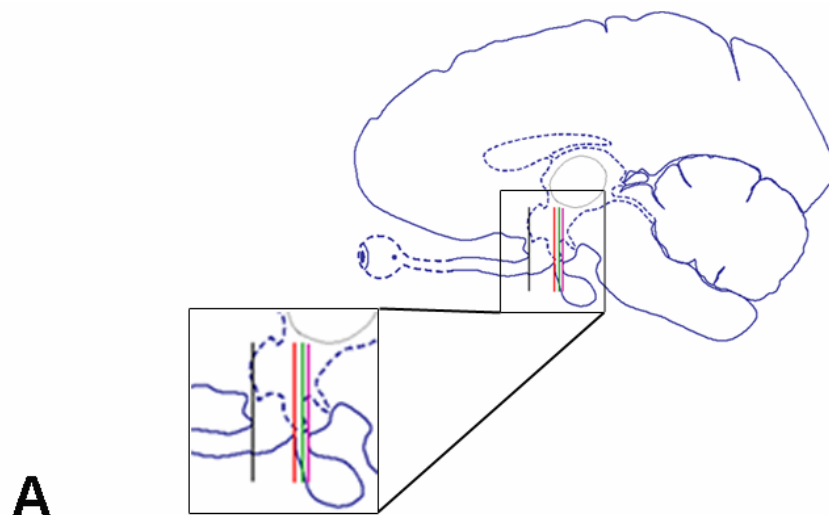


Fig. 2. Sagittal view of a sheep brain showing the localization of the POA (black bar) and the rostral (red bar), medial (green bar) and caudal (purple bar) regions of the ARC (A). Photographs of brain coronal sections from ewes killed 0, 45 or 112 days after a passage from LD to SD (B) showing Kiss immunolabelling at the level of the POA (left row) and of the caudal ARC (cARC; right row) (B). Asterisk indicates the 3rd ventricle. Scale bar = 105 μm.

D0 to 6.3% at D112 (Fig. 4). It is noteworthy that the total number of neurones did not vary significantly among the groups and averaged 4000 neurones/mm² (Fig. 4).

In the caudal ARC, quantitative analysis revealed a significant 51% increase ($P < 0.001$) in the total number of Kiss neurones between D0 (256 neurones) and D112 (517 cells) (Fig. 4). A very significant ($P < 0.001$) difference was also found between D45 and D112 (166 vs. 517 cells). Kiss-IR neurones accounted for 5% of all neurones at D0 but this percentage increased sharply at D112 to nearly 10% ($P < 0.001$; Fig. 4). As reported for the POA, the total number of neurones in the ARC did not change following the transition to SD photoperiod (Fig. 4).

Influence of colchicine on Kiss populations in animals maintained under LD

Using the same immunocytochemical approach, we then attempted to determine whether this increase in Kiss at D112 reflected an increase in the synthesis rate between sexually active and inactive animals or a modulation in the size of the Kiss neuronal population. We compared the number of neurones expressing Kiss in animals maintained under LD, having LH levels comprised between 0.0 and 0.2 ng/ml, which had and had not been treated with colchicine. Colchicine treatment significantly increased the number of Kiss neurones both in the POA (449 vs. 232 cells; $P < 0.01$) and in the caudal ARC (359 vs. 187; $P < 0.05$; Fig. 5 and 6). This increase was related to the percentage of neurones containing Kiss, which was also higher in the POA (9.1 vs. 5.1%; $P < 0.01$) and in the caudal ARC (6.7 vs. 4.0%; $P < 0.05$) of treated animals (Fig. 6). It is noteworthy that the total number of neurones in the caudal ARC differed significantly ($P < 0.05$) between the group of colchicine-treated ewes (5365 neurones) and the control animals (4671 neurones) (Fig. 6).

Overall comparison of the group of ewes killed at D0 in the previous experiment and the control group of this experiment, which had similar LH levels, revealed a difference in the

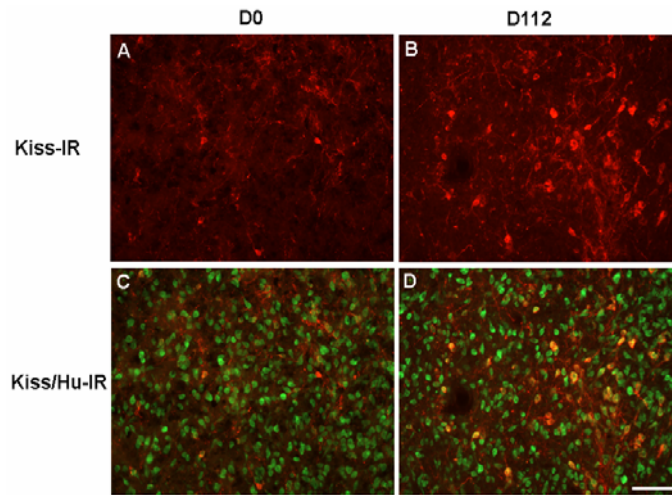


Fig. 3. Photomicrographs of brain coronal sections at the level of the caudal ARC of ewes killed at D0 (A, C) or D112 (B, D) following a passage to SD after a double immunocytochemical labelling to detect Kiss (red fluorescence) and HuC/D (yellow green fluorescence). Double-labelled Kiss and HuC/D immunoreactive neurones (C, D) were discernable by switching from one filter to the other or by merging images (C, D) taken with each filter. Double-labelled neurones appear orange on merged images (C, D). Scale bar = 75 μ m.

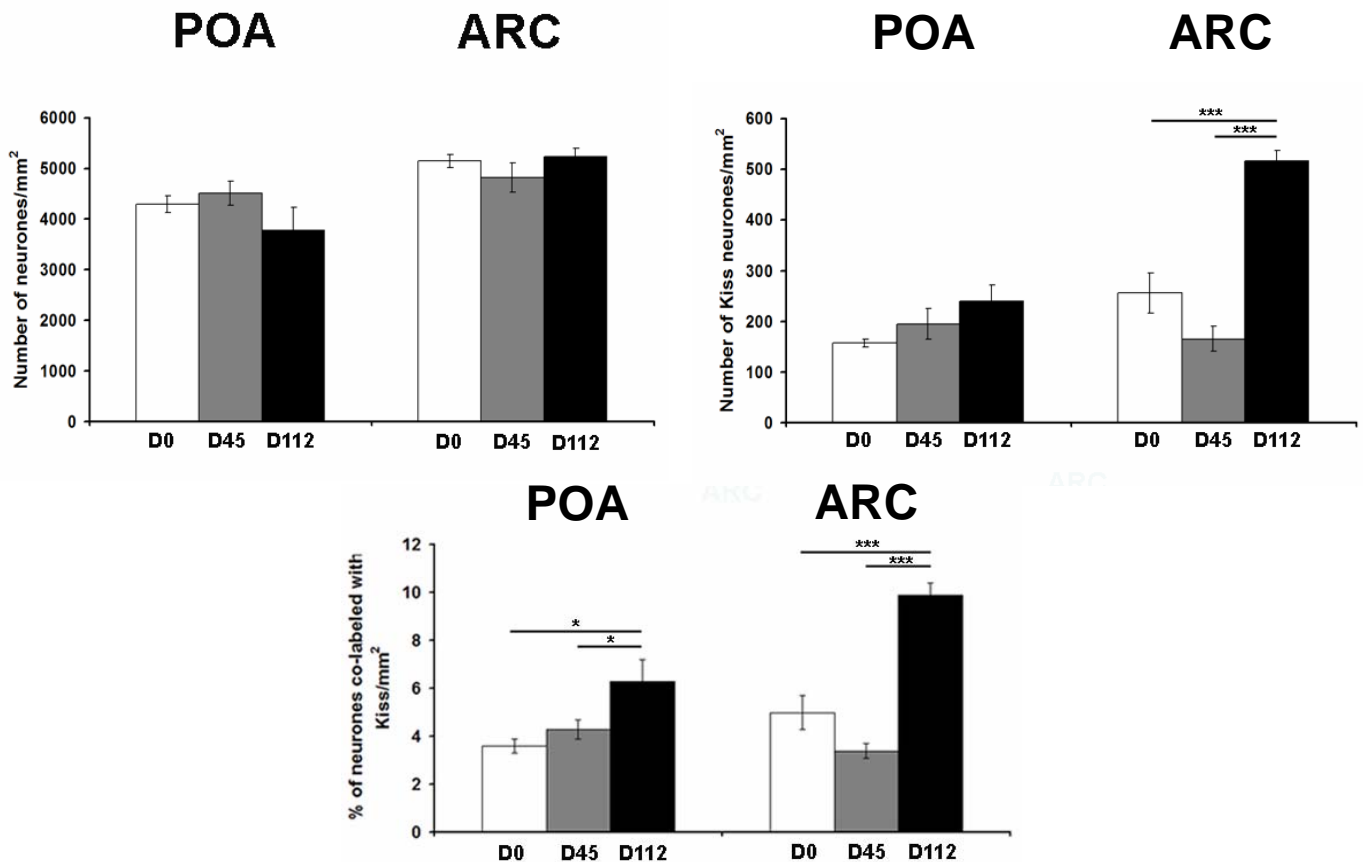


Fig. 4. Numbers (\pm SEM) of neurones, Kiss neurones and percentage (\pm SEM) of neurones co-labeled with Kiss per mm² of POA and caudal ARC in ewes killed 0, 45, or 112 days after a transition to SD. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

number of Kiss neurones in the POA (157 vs. 232; $P < 0.05$) but not in the ARC (256 vs. 187). It is important to note that there was no significant difference in the total number of neurones, and particularly in the proportion of Kiss neurones, between these two similarly treated groups of animals.

Discussion

We demonstrated for the first time in this study that modulating the photoperiod is sufficient to influence the percentage of neurones expressing Kiss in the ovine POA. We also showed that photoperiod can modulate Kiss content in the ovine ARC, in accordance with previous *in situ* hybridization results obtained in Soay sheep [21], but the time needed to obtain this increase following transition to SD is more than 60 days and is probably concomitant with the reinstatement of high LH levels in our model.

Our results for the rostral diencephalon are in line with previous data obtained in the Syrian hamster, another seasonal breeder. In this LD breeding species, a higher Kiss-1 mRNA expression was measured during LD in the AVPV [34], a region functionally similar to the ovine POA. Our results in the POA also strengthens and complements those previously obtained in both intact and ovariectomised oestradiol-treated (OVX+E2) ewes killed during the breeding or anoestrus seasons [15,16]. In those studies, no seasonal differences were noted in the expression of Kiss mRNA or in the global number of Kiss immunoreactive cells. We did not observe a significant difference in the number of Kiss neurones in the POA as well, but the percentage of neurones with Kiss was statistically higher in D112 animals. This suggests a slightly higher synthesis of Kiss in neurones at D112. However, we cannot rule out the hypothesis of a photoperiod-induced neurogenesis in the POA, associated with apoptosis of other neuronal populations, which would explain the overall similar number of neurones

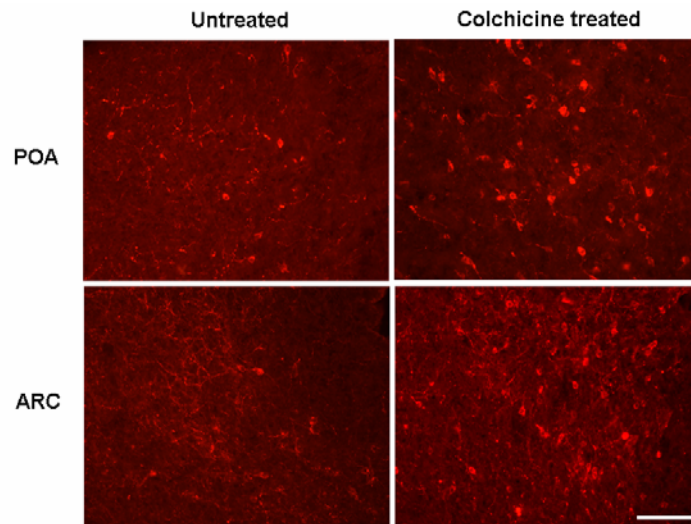


Fig. 5. Photomicrographs of coronal sections from the POA and caudal ARC of untreated and colchicine-treated ewes maintained in LD (killed at 9.00 am) stained for Kiss immunoreactivity. Scale bar = 75 μ m.

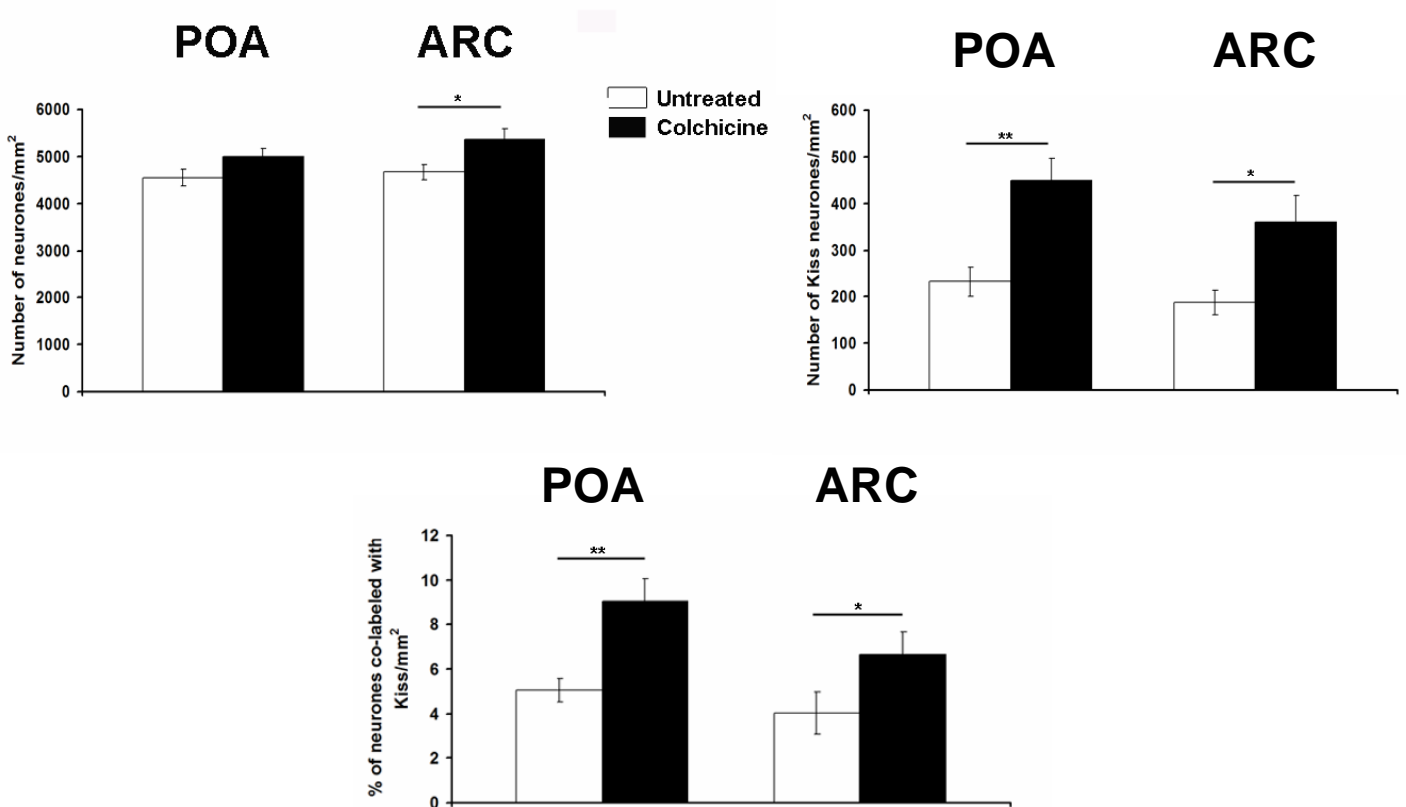


Fig. 6. Numbers (\pm SEM) of neurones, Kiss neurones and percentage (\pm SEM) of neurones co-labeled with Kiss per mm² of POA and caudal ARC in untreated and colchicine treated ewes maintained in LD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

and the increased percentage of neurones with Kiss. Photoperiod does appear to influence neurogenesis in the brain of various species of birds and mammals. Some bird species, such as Gambel's white-crowned sparrows, have larger song nuclei during spring [35,36], associated with a larger number of neurones, which could partly be attributed to increased survival of neurones [37]. In the adult Syrian hamster, an LD breeder, SD treatment significantly increases bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in newly generated cells, neuronal differentiation and/or survival in several brain regions including the hypothalamus [38]. Finally, this hypothesis is reinforced by a recent demonstration that circumventricular organs, such as the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) or the median eminence, are prolific sites of neural stem cells able to differentiate into both neurones and glial cells in the adult rodent brain [39].

We found a potent effect of SD treatment on the number of Kiss immunoreactive neurones in the caudal ARC. This result is in line with previous data showing an increase in Kiss-IR neurones or Kiss mRNA content during the breeding season in intact and OVX+E2 ewes [15,16] and under SD treatment in intact Soay ewes [21]. An effect of light regimen on the Kiss population has also been observed in Syrian and Siberian hamsters. A photoperiodic treatment mimicking SD induced a decrease in the number of neurones with Kiss mRNA in the adult male Syrian hamster [18], which is consistent with the inactivation of the gonadotrope axis induced by SD in this species. Surprisingly, the same treatment caused an increase in Kiss immunoreactive cell numbers in the adult male Siberian hamster ARC [19]. However, Greives and co-workers suggest that "increased kisspeptin-ir (immunoreactivity) in the ARC may be the result of inhibited peptide release in this brain region, allowing greater immunodetection" [19].

It would be interesting to investigate melatonin receptor expression on Kiss neurones to determine whether the photoperiod effect on Kiss populations is indirect or direct. However,

the time lag between transition to SD and the increase in the number of neurones with Kiss (between 60 and 112 days in our experiment) suggests an indirect effect of melatonin on these populations.

As previously demonstrated by Wagner and co-workers [21], our results suggest that the larger number of Kiss neurones in sexually active ewes is due to increased Kiss synthesis rather than modulation of the size of the Kiss neuronal population. It would be interesting to perform a colchicine treatment of SD-treated animals having an activated gonadotrope axis in order to determine if a reservoir of Kiss neurons is still available when the reproductive function is activated.

Overall, our results suggest that Kiss may be a key component of the photoperiodic seasonal regulation of GnRH secretion in the ewe which depends mostly on the change of gonadal steroid feedback. Half of the Kiss neurones in the POA and all of them in the ARC do in fact contain ER α [11] in the ewe. A substantial amount of this population also contains progesterone receptors in the ewe [15] and androgen receptors in the mouse [14]. Moreover, it has been demonstrated that sex steroids regulate Kiss expression in the rostral and caudal diencephalon of the ewe [15] and the mouse [13,14]. It remains to be determined whether Kiss neurones relay the gonadal steroid feedback directly to GnRH neurones or whether Kiss boutons found on GnRH cell bodies originate from neurones that do not express gonadal hormone receptors. It has been reported that Kiss innervation on GnRH neurones in immature rodents originates mostly from the rostral periventricular area of the third ventricle [40]. Whether or not this remains true in the adult mammalian brain has not yet been verified. It has also not been assessed whether Kiss steroid-responsive neurones from the ARC project towards GnRH cell bodies. This seems highly plausible since previous studies report that Kiss neurones from the ovine ARC express both dynorphin A and neurokinin B [41] and that a

substantial amount of steroid receptive dynorphin neurones from the ovine ARC project toward GnRH neurones [42].

In any event, photoperiod has been reported to exert a considerable influence on the number of Kiss appositions on GnRH neurones, with a larger number of contacts per GnRH neurone and of GnRH neurones with Kiss boutons during the breeding season [16]. This strengthens the more global hypothesis of widely distributed morphological rearrangements within different brain areas between breeding and anoestrus seasons in adult ewes, as previously shown for the OVLT/POA [43,44] and A15 dopaminergic nucleus [45]. However, the long time lag needed to observe a significant increase in Kiss labelling in the present study suggests that the morphological reorganizations that affect Kiss neuronal populations are a late event within the cascade of events following exposure to a longer daily secretion of melatonin elicited by transition to SD.

It is interesting to draw a parallel between the results of this study and previous ones regarding the initiation of puberty, as it has been suggested that Kiss activation of GnRH neurones in mice and primates could be the “neuroendocrine switch for the onset of puberty” [8]. For example, Kiss mRNA expression increased significantly in the AVPV of male mice [8] and in the MBH of female and male monkeys [9] across pubertal development in a pattern similar to the one we observed in the ovine POA following a photoperiodic transition from LD to SD. A significant increase in the number of Kiss appositions on GnRH cells bodies has also been demonstrated during pubertal transition [40]. Kiss can readily activate GnRH release at the early stages of postnatal development, and a change in sensitivity to Kiss has also been reported during the transition to puberty [8,46]. GPR54 expression increases between the juvenile and pubertal periods in female monkeys [9] and rats [47] suggesting that Kiss/GPR54 signalling settles progressively during the pubertal transition and may contribute to the pubertal resurgence of pulsatile GnRH release. These data, together with our results and

the findings of other teams [16,21], suggest that Kiss might also be the “neuroendocrine switch” required to reactivate the ovine GnRH neuronal system at the transition between anoestrus and the breeding season. In this connection, it would be interesting to study GPR54 expression on GnRH neurones during the photoperiodic transition.

In conclusion, we have shown that a sudden photoperiod change induces a sharp modulation of Kiss content in two key hypothalamic areas for the neuroendocrine control of seasonal reproduction in the ewe. Further investigations are needed to assess whether Kiss neurones express melatonin receptors and to clarify the physiological function of ovine POA Kiss population.

Acknowledgements

The authors thank Dr V. Prévot for his helpful comments regarding the use of HuC/D as a neuronal marker. They also thank the staff of the assay platform laboratory and of the experimental unit of INRA Centre de Tours (UEPAO) as well as the staff of the Experimental Hospital (PRC), and, Mr S. Formosa, for their technical help.

References

1. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E: Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10972-10976.
2. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH: The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349:1614-1627.
3. 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.
4. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde 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.

5. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T: Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:383-388.
6. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR: Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6609-6615.
7. Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton 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.
8. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE: Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005;25:11349-11356.
9. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM: Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2129-2134.
10. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA: Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004;80:264-272.
11. 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.
12. Smith JT, Clarke IJ: Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:1-9.
13. 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.
14. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA: Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005;146:2976-2984.
15. Smith JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ: KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 2007;148:1150-1157.
16. 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 gonadotropin-inhibitory hormone expression and terminal connections to GnRH neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 2008.
17. Estrada KM, Clay CM, Pompolo S, Smith JT, Clarke IJ: Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J Neuroendocrinol* 2006;18:806-809.
18. 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.
19. Greives TJ, Mason AO, Scotti MA, Levine J, Ketterson ED, Kriegsfeld LJ, Demas GE: Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology* 2007;148:1158-1166.

20. Simonneaux V, Ansel L, Revel FG, Klosen P, Pevet P, Mikkelsen JD: Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides* 2009;30:146-153.
21. Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG: Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology* 2008;149:32-39.
22. Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ: Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 1994;134:1806-1811.
23. Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P: Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 1998;139:1508-1516.
24. Richard P: Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis préAlpes du sud. INRA, Paris 1967.
25. Legan SJ, Karsch FJ, Foster DL: The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1977;101:818-824.
26. Legan SJ, Karsch FJ: Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 1980;23:1061-1068.
27. Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C: BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* 2005;186:109-121.
28. Warembourg M, Leroy D: Microwave pretreatment of sections to improve the immunocytochemical detection of progesterone receptors in the guinea pig hypothalamus. *J Neurosci Methods* 2000;104:27-34.
29. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD: Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:197-204.
30. Graus F, Elkon KB, Cordon-Cardo C, Posner JB: Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. Antineuronal antibody that also reacts with the tumor. *Am J Med* 1986;80:45-52.
31. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB: The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am J Pathol* 1992;141:881-886.
32. Phillips RJ, Hargrave SL, Rhodes BS, Zopf DA, Powley TL: Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. *J Neurosci Methods* 2004;133:99-107.
33. Munnich J, Gabel G, Pfannkuche H: Intrinsic ruminal innervation in ruminants of different feeding types. *J Anat* 2008;213:442-451.
34. Revel FG, Ansel L, Klosen P, Saboureau M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V: Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:57-65.
35. Smith GT, Brenowitz EA, Wingfield JC, Baptista LF: Seasonal changes in song nuclei and song behavior in Gambel's white-crowned sparrows. *J Neurobiol* 1995;28:114-125.
36. Smith GT, Brenowitz EA, Beecher MD, Wingfield JC: Seasonal changes in testosterone, neural attributes of song control nuclei, and song structure in wild songbirds. *J Neurosci* 1997;17:6001-6010.
37. Tramontin AD, Brenowitz EA: Seasonal plasticity in the adult brain. *Trends Neurosci* 2000;23:251-258.

38. Huang L, DeVries GJ, Bittman EL: Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol* 1998;36:410-420.
39. Bennett L, Yang M, Enikolopov G, Iacovitti L: Circumventricular organs: A novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci* 2009.
40. 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.
41. 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.
42. Dufourny L, Caraty A, Clarke IJ, Robinson JE, Skinner DC: Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology* 2005;81:139-149.
43. Xiong JJ, Karsch FJ, Lehman MN: Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology* 1997;138:1240-1250.
44. Viguie C, Jansen HT, Glass JD, Watanabe M, Billings HJ, Coolen L, Lehman MN, Karsch FJ: Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinology* 2001;142:1317-1324.
45. Adams VL, Goodman RL, Salm AK, Coolen LM, Karsch FJ, Lehman MN: Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 2006;147:4843-4851.
46. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castano JP, Malagon MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M: Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2006;257-258:75-83.
47. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M: Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004;145:4565-4574.

II) Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent qu'une modulation de la photopériode est suffisante pour influencer le pourcentage de neurones à Kiss dans l'aire préoptique et dans la région postérieure du noyau arqué. La proportion de neurones Kiss dans les deux régions est plus importante dans le groupe d'animaux abattus 112 jours après le passage en jours courts que dans les autres groupes d'animaux. Cette augmentation serait concomitante de celle de la LH et donc associée à l'activation de l'axe gonadotrope. Nos données montrent également que les animaux traités à la colchicine montrent une augmentation du nombre de neurones Kiss à la fois dans l'aire préoptique et dans le noyau arqué postérieur. Ces résultats suggèrent que ce nombre important de neurones Kiss chez des brebis sexuellement actives serait dû à une augmentation de la synthèse du Kiss plutôt qu'à une variation de la taille de la population cellulaire.

Ces observations suggèrent que le Kiss serait un élément clé de la modulation photopériodique saisonnière de la sécrétion de GnRH chez la brebis. L'observation tardive d'une augmentation du nombre de neurones Kiss suggère que les réorganisations morphologiques affectant ces neurones seraient un événement tardif de la cascade cellulaire induite par le changement de photopériode et amenant à une modulation de l'activité reproductrice.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse devrait faire l'objet de trois publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture. Ils concourent à suggérer qu'un changement de photopériode se traduisant par des variations de la durée de sécrétion de la mélatonine est suffisant pour induire des remaniements morphologiques dans des régions hypothalamiques participant à la synchronisation saisonnière de la reproduction chez les ovins. La nature des populations concernées par ces remaniements varie également suite aux différentes transitions photopériodiques.

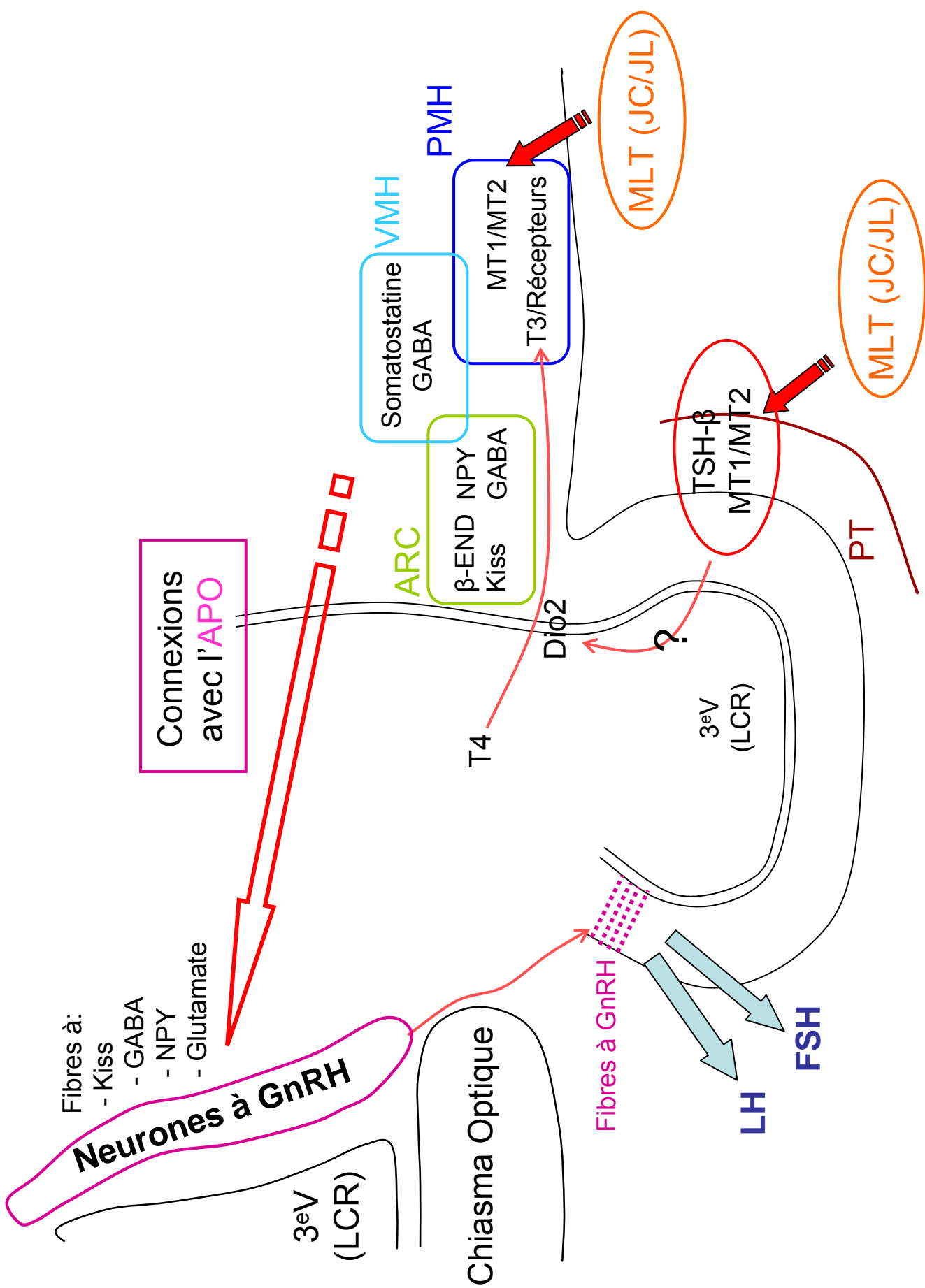
I) La mélatonine synchronise la reproduction saisonnée grâce à un réseau hypothalamique

1) Plasticité au sein de l'hypothalamus prémamillaire et de l'aire préoptique

La région de l'hypothalamus prémamillaire (HPM) représente la « porte d'entrée » du signal mélatoninergique qui peut être perçu par l'intermédiaire de récepteurs à la mélatonine de type MT1 et de type MT2 chez les ovins. Ces récepteurs exprimés par des neurones de l'HPM vont par l'activation d'un réseau neuronal complexe synchroniser la réponse de neurones à GnRH situés majoritairement dans l'organe vasculaire de la lame terminale-aire préoptique (OVLT-APO), « porte de sortie » du système. Ce réseau assuré par des neurones relais permet l'intégration du message lumineux synchronisant la reproduction saisonnée par codification chimique (Figure).

a) L'hypothalamus prémamillaire

Parmi les phénomènes de plasticité mis en évidence dans cette thèse, nous avons observé dans l'HPM une diminution de la quantité de la PSA-NCAM consécutivement à une transition photopériodique en jours courts ET en jours longs. Cependant l'absence d'effet



Fibres à:
 - Kiss
 - GABA
 - NPY
 - Glutamate

Neurones à GnRH

3^eV (LCR)

Chiasma Optique

Fibres à GnRH

LH

FSH

PT

TSH-β
 MT1/MT2

Dio2

T4

?

ARC

β-END NPY
 Kiss GABA

Somatostatine
 GABA

VMH

PMH

MT1/MT2
 T3/Récepteurs

MLT (JC/JL)

MLT (JC/JL)

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse devrait faire l'objet de trois publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture. Ils concourent à suggérer qu'un changement de photopériode se traduisant par des variations de la durée de sécrétion de la mélatonine est suffisant pour induire des remaniements morphologiques dans des régions hypothalamiques participant à la synchronisation saisonnière de la reproduction chez les ovins. La nature des populations concernées par ces remaniements varie également suite aux différentes transitions photopériodiques.

I) La mélatonine synchronise la reproduction saisonnée grâce à un réseau hypothalamique

1) Plasticité au sein de l'hypothalamus prémamillaire et de l'aire préoptique

La région de l'hypothalamus prémamillaire (HPM) représente la « porte d'entrée » du signal mélatoninergique qui peut être perçu par l'intermédiaire de récepteurs à la mélatonine de type MT1 et de type MT2 chez les ovins. Ces récepteurs exprimés par des neurones de l'HPM vont par l'activation d'un réseau neuronal complexe synchroniser la réponse de neurones à GnRH situés majoritairement dans l'organe vasculaire de la lame terminale-aire préoptique (OVLT-APO), « porte de sortie » du système. Ce réseau assuré par des neurones relais permet l'intégration du message lumineux synchronisant la reproduction saisonnée par codification chimique (Figure).

a) L'hypothalamus prémamillaire

Parmi les phénomènes de plasticité mis en évidence dans cette thèse, nous avons observé dans l'HPM une diminution de la quantité de la PSA-NCAM consécutivement à une transition photopériodique en jours courts ET en jours longs. Cependant l'absence d'effet

direct du blocage des variations d'expression de la PSA-NCAM dans cette région suggère que les neurones cibles de la mélatonine interviendraient plutôt dans la lecture des variations de sécrétion de la mélatonine que dans la synchronisation directe de l'activité saisonnière de reproduction. A ce jour, les mécanismes d'intégration et de transmission du signal mélatonergique au niveau de l'HPM ne sont pas connus mais il est possible d'envisager des mécanismes similaires à ceux observés dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) chez le rat. La mélatonine peut induire dans cette structure une réorganisation de l'actine, une protéine du cytosquelette, au sein des neurones. Cette réorganisation est nécessaire à l'expression circadienne de certains gènes de l'horloge (Kandalepas and Gillette, 2009). Dans notre modèle, on peut envisager que les variations de la durée de sécrétion de la mélatonine provoquent de la même façon des réarrangements du cytosquelette dans les cellules de l'HPM pouvant moduler la structure globale et donc l'activité de ces cellules, en changeant les interactions qu'elles développent avec les cellules environnantes. Ceci permettrait l'intégration du signal photopériodique acquis par les cellules de l'HPM possédant des récepteurs à la mélatonine. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'adapter la technique développée pour les NSC de rat (Hatcher et al., 2008) à l'HPM de la brebis afin d'identifier par spectrométrie de masse les peptides libérés suite à un traitement à la mélatonine par les cellules de l'HPM. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de MT1 et de MT2 permettrait également de déterminer le type de récepteur le plus important à la libération de peptides clés pour la synchronisation de la reproduction saisonnière. En effet, les récepteurs à la mélatonine sont le plus souvent retrouvés sous la forme d'hétérodimères et il a récemment été suggéré que le MT2 serait régulateur des récepteurs MT1 chez la brebis (Coge et al., 2009).

D'un point de vue physiologique, nos résultats suggèrent également que la perte de certains phénomènes de plasticité dans l'HPM pourrait être compensée par d'autres régions

qui transmettraient l'information mélatoninergique aux neurones à GnRH de l'OVLT-APO. Ce point sera discuté dans le second paragraphe de cette discussion.

b) L'aire préoptique

De façon intéressante, l'APO est une des régions hypothalamiques dans lesquelles nous avons observé des variations inverses de la quantité de PSA-NCAM entre un passage en jours courts et un passage en jours longs. Ces réorganisations morphologiques semblent essentielles à la régulation de la reproduction saisonnée puisque l'inhibition de la PSA-NCAM dans l'APO a provoqué un important retard dans la mise en place de l'activité de l'axe gonadotrope des brebis traitées à l'endoneuraminidase N, suggérant une désorganisation de l'environnement synaptiques des neurones à GnRH, mais peut être également des contacts synaptiques qui existent sur et entre les longs prolongements dendritiques des neurones à GnRH (Campbell et al., 2009). Il a été suggéré récemment que ces prolongements transversaux pourraient être impliqués dans la synchronisation de l'activité des neurones et donc dans la sécrétion de GnRH.

2) Populations affectées par cette plasticité

L'étude de la plasticité au contact des neurones à GnRH de l'OVLT-APO, qui représentent la « porte de sortie », de l'intégration du signal lumineux, montre une association importante de la PSA-NCAM et des neurones à GnRH chez des animaux ayant des niveaux de LH élevés bien que cette variation ne soit pas associée à une variation du nombre de contacts synaptiques. Ces résultats suggèrent l'existence d'une plasticité phénotypique des synapses présentes à la surface des neurones à GnRH qui pourrait affecter des appositions de type GABA, neuropeptide Y, Glutamate, et β -endorphine (β -END) comme suggéré précédemment dans les travaux comparant des animaux tués en saison de reproduction ou en

anestrus. Les boutons synaptiques pourraient aussi contenir de la kisspeptine (Kiss) puisque nous avons montré une variation importante suite à un passage en jours courts de la population des neurones Kiss du noyau arqué (ARC) qui se projettent vers les neurones à GnRH. La variation des synapses présentes à la surface des neurones à GnRH privilégierait la voie stimulant l'activité des neurones à GnRH au dépend de la voie inhibitrice lors de l'entrée en saison de reproduction et inversement. Par une approche similaire à celle développée dans notre laboratoire pour inhiber la tyrosine hydroxylase (Dufourny et al., 2008b), il serait possible pour vérifier cette hypothèse d'inhiber spécifiquement l'activité d'une population de neurones dont les appositions sur les neurones à GnRH sont connues pour varier entre les deux saisons. Par exemple, pour déterminer si l'augmentation du nombre de terminaisons à β -END sur les neurones à GnRH est essentielle à l'entrée en saison d'anoestrus, il faudrait injecter un virus exprimant des ARN interférents codants pour le gène de la POMC, le précurseur de la β -END dans l'ARC chez des brebis en saison de reproduction et voir si l'inactivation de la sécrétion de la β -END empêche le passage en saison d'anoestrus en suivant les profils de sécrétion de la LH.

Nous avons aussi observé des variations inverses de la quantité de PSA-NCAM entre un passage en jours courts et un passage en jours longs dans l'aire hypothalamique antérieure (AHA), l'ARC et l'hypothalamus ventromédian (HVM). Ces régions sont impliquées dans la régulation de la fonction de reproduction et contiennent des populations neuronales susceptibles d'être soumises à des réarrangements morphologiques comme suggéré précédemment par des comparaisons entre des animaux en saison de reproduction et des animaux en anoestrus. Parmi ces populations contrôlant directement l'activité des neurones à GnRH, nous avons privilégié au cours de cette thèse les neurones à β -END et les neurones à Kiss. Les neurones à β -END des deux tiers postérieurs de l'ARC, proche anatomiquement de l'HPM, participent au rétrocontrôle négatif des stéroïdes gonadiques sur la sécrétion de GnRH.

Nous avons montré que les neurones présentent une plus faible quantité de PSA-NCAM à leur surface chez des animaux ayant un axe gonadotrope actif que chez les animaux ayant des niveaux très faibles de LH. Ce résultat suggère que la présence de PSA-NCAM à la surface des neurones à β -END en plus d'être associée à une plasticité serait aussi indicatrice de l'activation des neurones puisque sa disparition semble associée à l'arrêt de l'inhibition de la sécrétion de GnRH lorsque la brebis entre en saison de reproduction. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en comparant, chez des brebis abattues à J0 et J112, le nombre de neurones doublement marqués pour la β -END et un marqueur d'activation cellulaire comme c-Fos.

Nous avons aussi démontré une augmentation importante de la proportion des neurones Kiss, un neuropeptide amidé stimulateur de la sécrétion de GnRH/LH, dans la région postérieure de l'ARC mais seulement chez des animaux ayant des niveaux de LH élevés. Ceci suggère que le Kiss serait bien un élément clé de la régulation photopériodique saisonnière de la sécrétion de GnRH mais que son activation serait un des derniers maillons de la chaîne d'événements cellulaires permettant la synchronisation de l'activité de reproduction par des facteurs environnementaux. Le nombre de jours entre le passage en jours courts et l'augmentation du nombre de neurones Kiss est compris entre 60 et 112 jours et suggère un effet indirect de la mélatonine. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer si les récepteurs à la mélatonine de type MT1 et MT2 sont exprimés à la surface des neurones à Kiss. Par une immunocytochimie classique, il serait possible de marquer les neurones Kiss puis de les microdisséquer avec un microscope à capture laser afin de rechercher par RT-PCR quantitative en temps réel la présence de transcrits codants pour les récepteurs MT1 et MT2 dans les neurones Kiss.

II) Une seconde voix pour l'intégration du signal mélatonnergique : la pars tuberalis

L'HPM n'est pas la seule région cible de la mélatonine ce qui pourrait expliquer en partie l'absence d'effet de l'inhibition de la PSA-NCAM sur les profils de sécrétion de la LH. La mélatonine agit également au niveau de la pars tuberalis qui exprime les récepteurs de type MT1 et MT2 (Coge et al., 2009). La pars tuberalis est connue depuis plus de 10 ans pour son implication dans le contrôle saisonnier de la sécrétion de la prolactine chez la brebis tandis que le contrôle saisonnier de l'axe gonadotrope serait régulé par l'hypothalamus (voir la revue de (Lincoln, 1999)). L'expression de plusieurs gènes de l'horloge a été mise en évidence dans la pars tuberalis de la brebis. Le profil d'expression circadien de ces gènes est modulé par les variations de la photopériode (Lincoln et al., 2002, Hazlerigg et al., 2004). Ces résultats suggèrent que les variations de la durée de sécrétion de la mélatonine affecteraient le niveau transcriptionnel des gènes de l'horloge au niveau de la pars tuberalis, ce qui modulerait la réponse neuroendocrine notamment les niveaux de sécrétion de la prolactine selon les saisons (Lincoln et al., 2003). Récemment, il a été démontré chez la caille (Nakao et al., 2008) et chez plusieurs espèces de mammifères saisonnés, tel les ovins (Hanon et al., 2008) et les hamsters (Watanabe et al., 2004, Revel et al., 2006b), ou non saisonnés comme la souris (Ono et al., 2008, Unfried et al., 2009) que les gènes de l'horloge exprimés au niveau de la PT et sous le contrôle de la mélatonine permettent l'expression de la TSH- β , laquelle par des voies cellulaires restant à caractériser agirait au niveau des tanocytes bordant le troisième ventricule afin de moduler l'expression de la déiodinase de type 2 (Dio2), l'enzyme permettant la synthèse locale de T3, hormone thyroïdienne nécessaire au passage en anoestrus chez l'ovin. Afin de déterminer si la mélatonine peut agir au niveau de la pars tuberalis pour compenser l'inhibition de la PSA-NCAM dans l'HPM que nous avons réalisée au cours de ce travail, il serait intéressant d'inactiver la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes d'une part,

d'altérer la PSA-NCAM dans l'HPM d'autre part et de regarder les effets de cette double inhibition sur les profils de sécrétion de la LH. Pour inactiver la voix des hormones thyroïdiennes, il serait possible d'injecter dans le troisième ventricule des brebis, un inhibiteur spécifique de la Dio2, l'acide iopanoïque (Coppola et al., 2005).

Il est intéressant de remarquer que même si la mélatonine se lie à ses récepteurs présents dans la pars tuberalis, un passage en jours courts ou en jours longs n'induit pas de variations de la PSA-NCAM dans la région de l'éminence médiane-pars tuberalis. Cette absence de variation suggère qu'un changement de photopériode seul n'induirait pas de remaniements morphologiques à travers la PSA-NCAM dans cette région. Il serait néanmoins possible d'envisager que la photopériode puisse affecter l'environnement glial autour des terminaisons à GnRH localisées dans l'éminence médiane pouvant favoriser la libération de la GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire comme cela a pu être démontré chez la caille (Yamamura et al., 2004). A l'aide de la microscopie électronique, il serait possible d'étudier l'environnement glial au contact des fibres à GnRH et de la lame basale qui est à l'interface entre l'éminence médiane et les vaisseaux sanguins du système porte et de comparer des animaux soumis à une transition photopériodique comme dans notre étude.

Les variations de la PSA-NCAM ainsi que les variations de l'environnement glial sont des phénomènes de plasticité dite structurale, il serait également possible qu'un changement de photopériode puisse aussi affecter la neurogénèse dans l'éminence médiane. Nous ne pouvons pas non plus écarter l'hypothèse de la naissance de nouvelles cellules dans les autres régions que nous avons étudiées. Plusieurs études sont en faveur d'une telle hypothèse et des expériences sont en cours dans notre laboratoire pour répondre à cette problématique. La mélatonine est capable d'induire directement de la neurogénèse dans plusieurs régions du cerveau telles que le gyrus denté chez les rongeurs (Rennie et al., 2009) et la photopériode régule la prolifération cellulaire dans l'hypothalamus chez le hamster (Huang et al., 1998).

Une augmentation importante du nombre de cellules en prolifération a également été mise en évidence dans l'hypothalamus et le thalamus chez des brebis en saison de reproduction (Migaud et al., 2009). Comme les tanocytes de type α de la paroi du 3^{ème} ventricule semblent être un réservoir de cellules souches hypothalamiques (McNay et al., 2009), un passage en jours courts ou en jours longs pourrait être à l'origine de la naissance de nouvelles cellules se différenciant en cellules gliales et/ou en neurones et qui seraient impliquées dans l'intégration et la transmission du message mélatoninergique. Pour vérifier si la photopériode est le facteur limitant qui influence la neurogénèse dans les régions présentant des variations de la quantité de PSA-NCAM suivant un passage en jours courts ou en jours longs, il serait nécessaire de réaliser des injections de BrdU afin d'estimer la naissance et la survie de cellules nouvellement créées.

III) Place de la génétique dans l'expression de la saisonnalité de la reproduction

La brebis Ile de France a été choisie comme modèle animal pour toutes les expériences réalisées dans ce travail. C'est une race dont la reproduction est très saisonnée, qui présente des saisons de reproduction et d'anoestrus bien marquées durant l'année et dont les caractéristiques physiologiques de réponse à la photopériode avaient été largement étudiées au sein du laboratoire. Tous les résultats obtenus au cours de ma thèse mettent en évidence des phénomènes de plasticité sous l'effet d'un changement de photopériode à l'origine de la synchronisation de la fonction de reproduction chez la brebis. Il est justifié de se demander si des variations de la PSA-NCAM aussi importantes et présentes dans les mêmes régions hypothalamiques auraient pu être observées chez une race de brebis moins saisonnée telles que les brebis Blackbelly, capables de se reproduire toute l'année en zone tropicale mais qui montrent une réponse à la photopériode, en terme de sécrétion de LH notamment, similaire à

celle de la race Ile de France lorsqu'elles sont exposées sous nos latitudes à des cycles de jours longs et de jours courts de 90 jours chacun (Hernandez et al., données non publiées). Pour cela, il faudrait étudier, chez des brebis Blackbelly, les effets d'un changement de photopériode sur les niveaux d'expression de la PSA-NCAM dans les régions du cerveau où les variations étaient les plus marquées chez les brebis Ile de France telles que l'APO, l'ARC et l'HPM.

Il est intéressant de noter que tout au long de cette thèse, nous avons observé une augmentation croissante du délai entre le passage en photopériode courte et la réactivation de l'activité de l'axe gonadotrope des brebis. En 1998, la durée théorique avait été estimée entre 45 et 60 jours (Malpaux et al., 1998), lors de la première expérience en 2006 le délai était de 80 jours, et en 2008, de 112 jours. Pour expliquer un tel phénomène, nous avons écarté, tout d'abord, les problèmes techniques qui pourraient se produire au bâtiment conditionné au niveau de l'intensité lumineuse qui doit être d'environ 300 lux ou des perturbations des programmes contrôlant la durée des cycles de lumière. Nous avons également vérifié que le régime alimentaire des animaux n'avait pas changé depuis une dizaine d'année car il est maintenant bien reconnu que l'alimentation peut perturber fortement l'activité de reproduction. Nous avons alors privilégié l'existence d'une dérive génétique suite à l'introduction de gènes par des techniques d'insémination artificielle dans le génome des brebis du troupeau de l'INRA de Nouzilly, restreint jusqu'en 1998, date d'un important incendie qui a conduit à reformer un troupeau. La semence utilisée pour inséminer les brebis du troupeau de l'unité expérimentale provient de béliers probablement sélectionnés en élevage pour leur haut niveau de fertilité. Il est possible d'envisager au cours des générations une sélection délétère des gènes contrôlant le caractère saisonnier de la reproduction au profit des gènes favorisant la fertilité ce qui pourrait entraîner une augmentation du temps de réponse à la transition photopériodique en jours courts. Nous avons observé ce phénomène seulement

suite à un passage en jours courts tandis que les expériences après une transition en jours longs ne mettent pas en évidence un tel retard suggérant que les mécanismes moléculaires et génétiques mis en œuvre seraient différents entre les deux transitions. Ces résultats suggèrent aussi que les phénomènes saisonniers pourraient être sous la dépendance d'un frein dont la levée serait de plus en plus difficile (lors de l'activation de l'axe gonadotrope des brebis) que son retour (lors de l'entrée en inactivité sexuelle). Il est difficile d'envisager un retour en arrière par rapport au mode de fonctionnement actuel mis en place pour le renouvellement du troupeau par l'insémination artificielle et pour des questions économiques, les sociétés d'élevage doivent continuer à favoriser l'utilisation des semences de béliers les plus fertiles. Par conséquent, l'une des solutions à envisager pour nos études serait de changer de race de brebis et d'orienter le choix vers des races très saisonnées qui n'ont pas fait l'objet de pression de sélection et ayant un patrimoine génétique ancestral comme par exemple la race Belle-Ile ou la race Ouessant. Le laboratoire porte également un intérêt tout particulier à ces races car les brebis sont plus petites (47 kg en moyenne contre 70 kg pour les brebis Ile de France). Il serait possible d'envisager des techniques d'imagerie telles que l'IRM puisque la taille des cerveaux de ces brebis se rapproche de celle des miniporcs ce qui permettrait de créer plus facilement un référentiel en se basant sur celui du miniporc pour l'analyse des images. Leur plus petite taille aurait également un grand intérêt économique pour les techniques d'étude de neurogénèse car l'injection de BrdU, dont la concentration à injecter est exprimée en mg/kg, se fait dans la circulation générale chez la brebis.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Absil, P., Pinxten, R., Balthazart, J. and Eens, M., 2003. Effect of age and testosterone on autumnal neurogenesis in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Behav Brain Res.* 143, 15-30.
- Adams, V. L., Goodman, R. L., Salm, A. K., Coolen, L. M., Karsch, F. J. and Lehman, M. N., 2006. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology.* 147, 4843-4851.
- Advis, J. P., Klein, J., Kuljis, R. O., Sarkar, D. K., McDonald, J. M. and Conover, C. A., 2003. Regulation of gonadotropin releasing hormone release by neuropeptide Y at the median eminence during the preovulatory period in ewes. *Neuroendocrinology.* 77, 246-257.
- Aizenman, Y. and de Vellis, J., 1987. Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res.* 406, 32-42.
- Altman, J., 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* 135, 1127-1128.
- Altman, J. and Das, G. D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124, 319-335.
- Alvarez-Buylla, A., Ling, C. Y. and Yu, W. S., 1994. Contribution of neurons born during embryonic, juvenile, and adult life to the brain of adult canaries: regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. *J Comp Neurol.* 347, 233-248.
- Alvarez, P. and Squire, L. R., 1994. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 7041-7045.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R. and Guillemin, R., 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 44, 205-210.
- Amoureux, M. C., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. and Crossin, K. L., 2000. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci.* 20, 3631-3640.
- Anderson, G. M., Hardy, S. L., Valent, M., Billings, H. J., Connors, J. M. and Goodman, R. L., 2003. Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology.* 144, 2892-2901.
- Angata, K., Huckaby, V., Ranscht, B., Terskikh, A., Marth, J. D. and Fukuda, M., 2007. Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol Cell Biol.* 27, 6659-6668.
- Arendt, J., 1986. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol.* 8, 266-320.
- Arendt, J., 1988. Melatonin. *Clin Endocrinol (Oxf).* 29, 205-229.
- Arendt, J., Deacon, S., English, J., Hampton, S. and Morgan, L., 1995. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res.* 4, 74-79.
- Ashley, R. L., Clay, C. M., Farmerie, T. A., Niswender, G. D. and Nett, T. M., 2006. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology.* 147, 4151-4159.
- Aurich, C., Schlote, S., Hoppen, H. O., Klug, E., Hoppe, H. and Aurich, J. E., 1994a. Effects of the opioid antagonist naloxone on release of luteinizing hormone in mares during the anovulatory season. *J Endocrinol.* 142, 139-144.
- Aurich, C., Sieme, H., Hoppe, H. and Schlote, S., 1994b. Involvement of endogenous opioids in the regulation of LH and testosterone release in the male horse. *J Reprod Fertil.* 102, 327-336.

- Auso, E., Lavado-Autric, R., Cuevas, E., Del Rey, F. E., Morreale De Escobar, G. and Berbel, P., 2004. A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. *Endocrinology*. 145, 4037-4047.
- Baba, Y., Matsuo, H. and Schally, A. V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun*. 44, 459-463.
- Baird, D. T. and Scaramuzzi, R. J., 1976. Changes in the secretion of ovarian steroid and pituitary luteinizing hormone in the peri-ovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *J Endocrinol*. 70, 237-245.
- Baker, J. R. and Ramsom, R. M., 1932. Factors affecting the breeding of the field mouse (*Microtus agrestis*). *Proc R Soc Lond*, 313-322.
- Balthazart, J., Boseret, G., Konkle, A. T., Hurley, L. L. and Ball, G. F., 2008. Doublecortin as a marker of adult neuroplasticity in the canary song control nucleus HVC. *Eur J Neurosci*. 27, 801-817.
- Balthazart, J., Foidart, A., Wilson, E. M. and Ball, G. F., 1992. Immunocytochemical localization of androgen receptors in the male songbird and quail brain. *J Comp Neurol*. 317, 407-420.
- Baroncini, M., Allet, C., Leroy, D., Beauvillain, J. C., Francke, J. P. and Prevot, V., 2007. Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 19, 691-702.
- Barral-Moran, M. J., Calaora, V., Vutskits, L., Wang, C., Zhang, H., Durbec, P., Rougon, G. and Kiss, J. Z., 2003. Oligodendrocyte progenitor migration in response to injury of glial monolayers requires the polysialic neural cell-adhesion molecule. *J Neurosci Res*. 72, 679-690.
- Barrett, P., Ivanova, E., Graham, E. S., Ross, A. W., Wilson, D., Ple, H., Mercer, J. G., Ebling, F. J., Schuhler, S., Dupre, S. M., Loudon, A. and Morgan, P. J., 2006. Photoperiodic regulation of cellular retinoic acid-binding protein 1, GPR50 and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol*. 191, 687-698.
- Bastrikova, N., Gardner, G. A., Reece, J. M., Jeromin, A. and Dudek, S. M., 2008. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 3123-3127.
- Baulieu, E. E., Atger, M., Best-Belpomme, M., Corvol, P., Courvalin, J. C., Mester, J., Milgrom, E., Robel, P., Rochefort, H. and De Catalogne, D., 1975. Steroid hormone receptors. *Vitam Horm*. 33, 649-736.
- Becker, C. G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H. and Schachner, M., 1996. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res*. 45, 143-152.
- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., Francois-Bellan, A. M. and Bosler, O., 2008. Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia*. 56, 294-305.
- Bennett, L., Yang, M., Enikolopov, G. and Iacovitti, L., 2009. Circumventricular organs: A novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci*.
- Berbel, P., Guadano-Ferraz, A., Angulo, A. and Ramon Cerezo, J., 1994. Role of thyroid hormones in the maturation of interhemispheric connections in rats. *Behav Brain Res*. 64, 9-14.

- Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J. and Larsen, P. R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 23, 38-89.
- Billings, H. J., Viguie, C., Karsch, F. J., Goodman, R. L., Connors, J. M. and Anderson, G. M., 2002. Temporal requirements of thyroid hormones for seasonal changes in LH secretion. *Endocrinology.* 143, 2618-2625.
- Bliss, T. V. and Gardner-Medwin, A. R., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232, 357-374.
- Bloom, F. E., 1985. CNS plasticity: a survey of opportunities. . Central nervous system plasticity and repair, Raven Press, New York, 3-11.
- Blozovski, D. and Harris, P., 1986. Passive avoidance deficits following lesions of the posteroventral hippocampo-subiculo-entorhinal area in the developing rat. *J Physiol (Paris).* 81, 374-378.
- Bogusz, A. L., Hardy, S. L., Lehman, M. N., Connors, J. M., Hileman, S. M., Sliwowska, J. H., Billings, H. J., McManus, C. J., Valent, M., Singh, S. R., Nestor, C. C., Coolen, L. M. and Goodman, R. L., 2008. Evidence that gamma-aminobutyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative feedback in anestrous ewes. *Endocrinology.* 149, 2762-2772.
- Bolborea, M., Steinlechner, S., Pevet, P. and Klosen, P., 2009. Photoperiodic regulation of tancyte morphology and cell adhesion molecule expression. *Proceedings of the Neuroscience, Chicago*, pp. 771.715.
- Bonfanti, L., Olive, S., Poulain, D. A. and 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.
- Boutin, C., Schmitz, B., Cremer, H. and Diestel, S., 2009. NCAM expression induces neurogenesis in vivo. *Eur J Neurosci.*
- Bradley, D. J., Towle, H. C. and Young, W. S., 3rd, 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 12, 2288-2302.
- Brann, D. W., Bhat, G. K., Lamar, C. A. and Mahesh, V. B., 1997. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* 65, 385-395.
- Bronson, F. H., 1988. Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reprod Nutr Dev.* 28, 335-347.
- Bronson, F. H. and Heideman, P. D., 1994. Seasonal regulation of reproduction in mammals. *The physiology of reproduction*, Eds Knobil and Neill, 541-583.
- Brooks, A. N., Lamming, G. E., Lees, P. D. and Haynes, N. B., 1986. Opioid modulation of LH secretion in the ewe. *J Reprod Fertil.* 76, 693-708.
- Brown, W. B., Forbes, J. M., Goodall, E. D., Kay, R. N. and Simpson, A. M., 1979. Effects of photoperiod on food intake, sexual condition and hormone concentrations in stags and rams [proceedings]. *J Physiol.* 296, 58P-59P.
- Brummendorf, T. and Rathjen, F. G., 1995. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile.* 2, 963-1108.
- Bruneau, G. and Tillet, Y., 1998. Localization of the preprosomatostatin-mRNA by in situ hybridization in the ewe hypothalamus. *Peptides.* 19, 1749-1758.
- Bukalo, O., Fentrop, N., Lee, A. Y., Salmen, B., Law, J. W., Wotjak, C. T., Schweizer, M., Dityatev, A. and Schachner, M., 2004. Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long-term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *J Neurosci.* 24, 1565-1577.

- Cajal, J. R., 1913-14. Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford University Press, London.
- Caldani, M., Antoine, M., Batailler, M. and Duittoz, A., 1995. Ontogeny of GnRH systems. *J Reprod Fertil Suppl.* 49, 147-162.
- Caldani, M., Batailler, M. and Jourdan, F., 1987. The sheep terminal nerve: coexistence of LHRH- and AChE-containing neurons. *Neurosci Lett.* 83, 221-226.
- Calza, L., Aloe, L. and Giardino, L., 1997. Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Res Bull.* 44, 549-557.
- Campbell, R. E., Gaidamaka, G., Han, S. K. and Herbison, A. E., 2009. Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 10835-10840.
- Caraty, A., Fabre-Nys, C., Delaleu, B., Locatelli, A., Bruneau, G., Karsch, F. J. and Herbison, A., 1998. Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 139, 1752-1760.
- Caraty, A. and Locatelli, A., 1988. Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. *J Reprod Fertil.* 82, 263-269.
- Caraty, A. and Skinner, D. C., 1999. Dynamics of steroid regulation of GnRH secretion during the oestrus cycle of the ewe. *Ann Endocrinol (Paris).* 60, 68-78.
- Caraty, A., Smith, J. T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C. and Clarke, I. J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology.* 148, 5258-5267.
- Cashion, A. B., Smith, M. J. and Wise, P. M., 2003. The morphometry of astrocytes in the rostral preoptic area exhibits a diurnal rhythm on proestrus: relationship to the luteinizing hormone surge and effects of age. *Endocrinology.* 144, 274-280.
- Castellano, J. M., Navarro, V. M., Fernandez-Fernandez, R., Castano, J. P., Malagon, M. M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M., 2006. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol.* 257-258, 75-83.
- Catheline, G., Touquet, B., Lombard, M. C., Poulain, D. A. and Theodosis, D. T., 2006. A study of the role of neuro-glial remodeling in the oxytocin system at lactation. *Neuroscience.* 137, 309-316.
- Chang, P. L., Isaacs, K. R. and Greenough, W. T., 1991. Synapse formation occurs in association with the induction of long-term potentiation in two-year-old rat hippocampus in vitro. *Neurobiol Aging.* 12, 517-522.
- Chanoine, J. P., Alex, S., Fang, S. L., Stone, S., Leonard, J. L., Korhle, J. and Braverman, L. E., 1992. Role of transthyretin in the transport of thyroxine from the blood to the choroid plexus, the cerebrospinal fluid, and the brain. *Endocrinology.* 130, 933-938.
- Charles, P., Hernandez, M. P., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B. and Lubetzki, C., 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 7585-7590.
- Chen, H. J., Targovnik, J., McMillan, L. and Randall, S., 1984. Age difference in endogenous opiate modulation of short photoperiod-induced testicular regression in golden hamsters. *J Endocrinol.* 101, 1-6.
- Chen, R. L., Kassem, N. A. and Preston, J. E., 2006. Dose-dependent transthyretin inhibition of T4 uptake from cerebrospinal fluid in sheep. *Neurosci Lett.* 396, 7-11.

- Chen, W. P., Witkin, J. W. and Silverman, A. J., 1989. beta-Endorphin and gonadotropin-releasing hormone synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the male rat. *J Comp Neurol.* 286, 85-95.
- Cicero, T. J., Schainker, B. A. and Meyer, E. R., 1979. Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamus-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology.* 104, 1286-1291.
- Ciechanowska, M. O., Lapot, M., Malewski, T., Mateusiak, K., Misztal, T. and Przekop, F., 2008. The central effect of beta-endorphin and naloxone on the expression of GnRH Gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus, and on GnRH-R gene in the anterior pituitary gland in follicular phase ewes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 116, 40-46.
- Clarke, I. J. and Cummins, J. T., 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 111, 1737-1739.
- Clarkson, J. and Herbison, A. E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 147, 5817-5825.
- Coge, F., Guenin, S., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., Nosjean, O., Malpoux, B., Delagrangé, P. and Boutin, J., 2009. The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT receptor. *Br J Pharmacol.*
- Cole, G. J. and Glaser, L., 1986. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol.* 102, 403-412.
- Cole, G. J., Loewy, A. and Glaser, L., 1986. Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature.* 320, 445-447.
- Combarrous, Y., Colette, G., Crépieux, P., Chopineau, M., Counis, R., 2001. Les gonadotropines: Structure, fonction, mécanismes d'action. M L CThibaut, (Ed), *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme* Ellipses INRA, Paris, 108-121.
- Conneely, O. M., Maxwell, B. L., Toft, D. O., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W., 1987. The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 149, 493-501.
- Coolen, L. M., Jansen, H. T., Goodman, R. L., Wood, R. I. and Lehman, M. N., 1999. A new method for simultaneous demonstration of anterograde and retrograde connections in the brain: co-injections of biotinylated dextran amine and the beta subunit of cholera toxin. *J Neurosci Methods.* 91, 1-8.
- Coppola, A., Hughes, J., Esposito, E., Schiavo, L., Meli, R. and Diano, S., 2005. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett.* 579, 4654-4658.
- Cotman, C. W. and Berchtold, N. C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
- Couse, J. F., Yates, M. M., Walker, V. R. and Korach, K. S., 2003. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol.* 17, 1039-1053.
- Covenas, R., de Leon, M., Narvaez, J. A., Aguirre, J. A., Tramu, G. and Gonzalez-Baron, S., 1999. Anatomical distribution of beta-endorphin (1-27) in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Anat Embryol (Berl).* 199, 161-167.
- Cox, G.-W., 1985. The evolution of avian migration systems between temperate and tropical regions of the new world. *The American Naturalist.* 126, 451-474.

- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S. and et al., 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.
- Csakvari, E., Hoyk, Z., Gyenes, A., Garcia-Ovejero, D., Garcia-Segura, L. M. and Parducz, A., 2006. Fluctuation of synapse density in the arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience*.
- Cuevas, E., Auso, E., Telefont, M., Morreale de Escobar, G., Sotelo, C. and Berbel, P., 2005. Transient maternal hypothyroxinemia at onset of corticogenesis alters tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *Eur J Neurosci*. 22, 541-551.
- Curlewis, J. D., 1992. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: a review. *Reprod Fertil Dev*. 4, 1-23.
- Cutter, C., Hardy, S., Anderson, G., Goodman, R. L. and Lehman, M. N., 2001. Preoptic area efferents contact A15 dopamine neurons in the sheep brain. *Society for neuroscience*. 27, No.631.612.
- Dalmau, J., Furneaux, H. M., Cordon-Cardo, C. and Posner, J. B., 1992. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am J Pathol*. 141, 881-886.
- Daniel, L., Durbec, P., Gautherot, E., Rouvier, E., Rougon, G. and Figarella-Branger, D., 2001. A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process. *Oncogene*. 20, 997-1004.
- Dark, J., 2005. Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr*. 25, 469-497.
- Daston, M. M., Bastmeyer, M., Rutishauser, U. and O'Leary, D. D., 1996. Spatially restricted increase in polysialic acid enhances corticospinal axon branching related to target recognition and innervation. *J Neurosci*. 16, 5488-5497.
- Dawson, A., King, V. M., Bentley, G. E. and Ball, G. F., 2001. Photoperiodic control of seasonality in birds. *J Biol Rhythms*. 16, 365-380.
- De Paola, V., Holtmaat, A., Knott, G., Song, S., Wilbrecht, L., Caroni, P. and Svoboda, K., 2006. Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron*. 49, 861-875.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J. C., Matsuda, F., Chaussain, J. L. and Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 10972-10976.
- De Seranno, S., Estrella, C., Loyens, A., Cornea, A., Ojeda, S. R., Beauvillain, J. C. and Prevot, V., 2004. Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci*. 24, 10353-10363.
- 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. and Bloom, S. R., 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*. 90, 6609-6615.
- Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., da Silva, I., Horvath, B., Gaskin, F. S., Nonaka, N., Jaeger, L. B., Banks, W. A., Morley, J. E., Pinto, S., Sherwin, R. S., Xu, L., Yamada, K. A., Sleeman, M. W., Tschop, M. H. and Horvath, T. L., 2006. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci*. 9, 381-388.

- Diano, S., Leonard, J. L., Meli, R., Esposito, E. and Schiavo, L., 2003. Hypothalamic type II iodothyronine deiodinase: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 976, 130-134.
- Dodd, J., Morton, S. B., Karagogeos, D., Yamamoto, M. and Jessell, T. M., 1988. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron.* 1, 105-116.
- Doyle, E., Nolan, P. M., Bell, R. and Regan, C. M., 1992. Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J Neurosci Res.* 31, 513-523.
- Dratman, M. B., Crutchfield, F. L. and Schoenhoff, M. B., 1991. Transport of iodothyronines from bloodstream to brain: contributions by blood:brain and choroid plexus:cerebrospinal fluid barriers. *Brain Res.* 554, 229-236.
- Drew, J. E., Barrett, P., Williams, L. M., Conway, S. and Morgan, P. J., 1998. The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol.* 10, 651-661.
- Dudas, B. and Merchenthaler, I., 2004. Close anatomical associations between beta-endorphin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon. *Neuroscience.* 124, 221-229.
- Dufourny, L., Caraty, A., Clarke, I. J., Robinson, J. E. and Skinner, D. C., 2005. Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology.* 81, 139-149.
- Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpaux, B. and Monget, P., 2008a. GPR50 is the mammalian ortholog of *Mel1c*: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol.* 8, 105.
- Dufourny, L., Migaud, M., Thiery, J. C. and Malpaux, B., 2008b. Development of an in vivo adeno-associated virus-mediated siRNA approach to knockdown tyrosine hydroxylase in the lateral retrochiasmatic area of the ovine brain. *J Neurosci Methods.* 170, 56-66.
- Dufourny, L. and Skinner, D. C., 2002. Influence of estradiol on NADPH diaphorase/neuronal nitric oxide synthase activity and colocalization with progesterone or type II glucocorticoid receptors in ovine hypothalamus. *Biol Reprod.* 67, 829-836.
- Dufourny, L. and Skinner, D. C., 2005. Distribution of galanin receptor 1-immunoreactive neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with GnRH. *Brain Res.* 1054, 73-81.
- Duittoz, A. H. and Batailler, M., 2000. Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *J Reprod Fertil.* 120, 391-396.
- Eayrs, J. T., 1966. Thyroid and central nervous development. *Sci Basis Med Annu Rev.* 317-339.
- Eayrs, J. T. and Taylor, S. H., 1951. The effect of thyroid deficiency induced by methyl thiouracil on the maturation of the central nervous system. *J Anat.* 85, 350-358.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M. R. and Reppert, S. M., 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 6133-6137.
- Edelman, G. M., 1984. Modulation of cell adhesion during induction, histogenesis, and perinatal development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 7, 339-377.
- Edelman, G. M. and Crossin, K. L., 1991. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem.* 60, 155-190.
- Estrada, K. M., Clay, C. M., Pompolo, S., Smith, J. T. and Clarke, I. J., 2006. Elevated *KiSS-1* expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-

- releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J Neuroendocrinol.* 18, 806-809.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Glover, B. H. and Karsch, F. J., 1994. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology.* 134, 1806-1811.
- Falkenstein, E., Meyer, C., Eisen, C., Scriba, P. C. and Wehling, M., 1996. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 229, 86-89.
- Faure, M. O., Nicol, L., Fabre, S., Fontaine, J., Mohoric, N., McNeilly, A. and Taragnat, C., 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol.* 186, 109-121.
- Fekete, C., Mihaly, E., Herscovici, S., Salas, J., Tu, H., Larsen, P. R. and Lechan, R. M., 2000. DARPP-32 and CREB are present in type 2 iodothyronine deiodinase-producing tanycytes: implications for the regulation of type 2 deiodinase activity. *Brain Res.* 862, 154-161.
- Fernald, R. D. and White, R. B., 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol.* 20, 224-240.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. and Frackelton, A. R., Jr., 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 14, 1649-1660.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H. and Goridis, C., 1983. Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 112, 482-487.
- Finne, J. and Makela, P. H., 1985. Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid. *J Biol Chem.* 260, 1265-1270.
- Fitzgerald, B. P. and Davison, L. A., 1997. Comparison of the effects of N-methyl-DL-aspartic acid on gonadotropin and prolactin secretion in anestrus mares and mares exhibiting estrous cycles during anestrus. *Biol Reprod.* 57, 36-42.
- Foley, A. G., Hedigan, K., Rouillet, P., Moricard, Y., Murphy, K. J., Sara, S. J. and Regan, C. M., 2003. Consolidation of memory for odour-reward association requires transient polysialylation of the neural cell adhesion molecule in the rat hippocampal dentate gyrus. *J Neurosci Res.* 74, 570-576.
- Fox, G. B., O'Connell, A. W., Murphy, K. J. and Regan, C. M., 1995. Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J Neurochem.* 65, 2796-2799.
- Franceschini, I., Desroziers, E., Lomet, D., Duittoz, A. and Caraty, A., 2009. A role for PSA-NCAM-dependant neuron-glia interactions in the control of GNRH neuron activity. *Proceedings of the Société de Neurosciences, Bordeaux*, pp. 025.013.
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y. and Caraty, A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett.* 401, 225-230.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S. K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P. and Chelly, J., 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron.* 23, 247-256.

- Fujimoto, I., Bruses, J. L. and Rutishauser, U., 2001. Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem.* 276, 31745-31751.
- Fukusumi, S., Fujii, R. and Hinuma, S., 2006. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides.* 27, 1073-1086.
- Gahr, M., Guttinger, H. R. and Kroodsma, D. E., 1993. Estrogen receptors in the avian brain: survey reveals general distribution and forebrain areas unique to songbirds. *J Comp Neurol.* 327, 112-122.
- Garcia-Segura, L. M., Lorenz, B. and DonCarlos, L. L., 2008. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction.* 135, 419-429.
- Garcia-Segura, L. M., Luquin, S., Parducz, A. and Naftolin, F., 1994. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia.* 10, 59-69.
- Garcia-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A., 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol.* 36, 234-248.
- Gascon, E., Vutskits, L. and Kiss, J. Z., 2008. The Role of PSA-NCAM in Adult Neurogenesis. *Neurochem Res.*
- Gauer, F., Schuster, C., Poirel, V. J., Pevet, P. and Masson-Pevet, M., 1998. Cloning experiments and developmental expression of both melatonin receptor Mel1A mRNA and melatonin binding sites in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res.* 60, 193-202.
- Gayrard, V., Malpoux, B., Tillet, Y. and Thiery, J. C., 1994. Estradiol increases tyrosine hydroxylase activity of the A15 nucleus dopaminergic neurons during long days in the ewe. *Biol Reprod.* 50, 1168-1177.
- Gayrard, V., Thiery, J. C., Thibault, J. and Tillet, Y., 1995. Efferent projections from the retrochiasmatic area to the median eminence and to the pars nervosa of the hypophysis with special reference to the A15 dopaminergic cell group in the sheep. *Cell Tissue Res.* 281, 561-567.
- Gibson, E. M., Humber, S. A., Jain, S., Williams, W. P., 3rd, Zhao, S., Bentley, G. E., Tsutsui, K. and Kriegsfeld, L. J., 2008. Alterations in RFamide-Related Peptide Expression Are Coordinated with the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology.*
- Glass, J. D., Lee, W., Shen, H. and Watanabe, M., 1994. Expression of immunoreactive polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology.* 60, 87-95.
- Glass, J. D., Shen, H., Fedorkova, L., Chen, L., Tomasiewicz, H. and Watanabe, M., 2000. Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 280, 207-210.
- Glass, J. D., Watanabe, M., Fedorkova, L., Shen, H., Ungers, G. and Rutishauser, U., 2003. Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 117, 203-211.
- Goldman, S. A. and Nottebohm, F., 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 2390-2394.
- Goodman, R. L., 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. The physiology of reproduction, Eds Kneib and Neill, 659-710.

- Goodman, R. L., Coolen, L. M., Anderson, G. M., Hardy, S. L., Valent, M., Connors, J. M., Fitzgerald, M. E. and Lehman, M. N., 2004. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology*. 145, 2959-2967.
- Goodman, R. L., Gibson, M., Skinner, D. C. and Lehman, M. N., 2002. Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reprod Suppl.* 59, 41-56.
- Goodman, R. L., Legan, S. J., Ryan, K. D., Foster, D. L. and Karsch, F. J., 1980. Two effects of estradiol that normally contribute to the control of tonic LH secretion in the ewe. *Biol Reprod.* 23, 415-422.
- 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. and Clarke, I. J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. 148, 5752-5760.
- Goodman, R. L., Parfitt, D. B., Evans, N. P., Dahl, G. E. and Karsch, F. J., 1995. Endogenous opioid peptides control the amplitude and shape of gonadotropin-releasing hormone pulses in the ewe. *Endocrinology*. 136, 2412-2420.
- Goodman, R. L., Thiery, J. C., Delaleu, B. and Malpoux, B., 2000. Estradiol increases multiunit electrical activity in the A15 area of ewes exposed to inhibitory photoperiods. *Biol Reprod.* 63, 1352-1357.
- Goridis, C. and Brunet, J. F., 1992. NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Semin Cell Biol.* 3, 189-197.
- Goubillon, M., Delaleu, B., Tillet, Y., Caraty, A. and Herbison, A. E., 1999. Localization of estrogen-receptive neurons projecting to the GnRH neuron-containing rostral preoptic area of the ewe. *Neuroendocrinology*. 70, 228-236.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S. and McEwen, B. S., 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci.* 12, 3642-3650.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. and Fuchs, E., 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 17, 2492-2498.
- Gould, E., Westlind-Danielsson, A., Frankfurt, M. and McEwen, B. S., 1990. Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci.* 10, 996-1003.
- Graus, F., Elkou, K. B., Cordon-Cardo, C. and Posner, J. B., 1986. Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. Antineuronal antibody that also reacts with the tumor. *Am J Med.* 80, 45-52.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. and Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 320, 134-139.
- Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. and Shine, J., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 231, 1150-1154.
- Greives, T. J., Mason, A. O., Scotti, M. A., Levine, J., Ketterson, E. D., Kriegsfeld, L. J. and Demas, G. E., 2007. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology*. 148, 1158-1166.
- Guiochon-Mantel, A. and Milgrom, E., 1993. Cytoplasmic-nuclear trafficking of steroid hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 4, 322-328.
- Gwinner, E., 1986. *Circannual rhythms.* Springer-Verlag, Berlin.

- Hallenbeck, P. C., Vimr, E. R., Yu, F., Bassler, B. and Troy, F. A., 1987. Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. *J Biol Chem.* 262, 3553-3561.
- Hammond, J., Jr, Hammond, J., and Parkes, A.S., 1942. Hormonal augmentation of fertility in sheep. I. Induction of ovulation, superovulation and heat in sheep. *J Agric Sci* 32, 308-323.
- Han, S. K., Gottsch, M. L., Lee, K. J., Popa, S. M., Smith, J. T., Jakawich, S. K., Clifton, D. K., Steiner, R. A. and 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.
- Hanon, E. A., Lincoln, G. A., Fustin, J. M., Dardente, H., Masson-Pevet, M., Morgan, P. J. and Hazlerigg, D. G., 2008. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol.* 18, 1147-1152.
- Hatcher, N. G., Atkins, N., Jr., Annangudi, S. P., Forbes, A. J., Kelleher, N. L., Gillette, M. U. and Sweedler, J. V., 2008. Mass spectrometry-based discovery of circadian peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 12527-12532.
- Hauger, R. L., Karsch, F. J. and Foster, D. L., 1977. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology.* 101, 807-817.
- Havern, R. L., Whisnant, C. S. and Goodman, R. L., 1994. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology.* 134, 1905-1914.
- Hawken, P. A., Jorre, T. J., Rodger, J., Esmaili, T., Blache, D. and Martin, G. B., 2009. Rapid induction of cell proliferation in the adult female ungulate brain (*Ovis aries*) associated with activation of the reproductive axis by exposure to unfamiliar males. *Biol Reprod.* 80, 1146-1151.
- Hazell, G. G., Yao, S. T., Roper, J. A., Prossnitz, E. R., O'Carroll, A. M. and Lolait, S. J., 2009. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol.* 202, 223-236.
- Hazlerigg, D. G., Andersson, H., Johnston, J. D. and Lincoln, G., 2004. Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Curr Biol.* 14, 334-339.
- He, H. T., Barbet, J., Chaix, J. C. and Golidis, C., 1986. Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *Embo J.* 5, 2489-2494.
- Hebb, D. O., 1949. *The organization of behaviour.* Wiley, New York.
- Hegele-Hartung, C., Siebel, P., Peters, O., Kosemund, D., Muller, G., Hillisch, A., Walter, A., Kraetzschmar, J. and Fritzemeier, K. H., 2004. Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 5129-5134.
- Herbison, A. E., 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev.* 19, 302-330.
- Herbison, A. E., Chapman, C. and Dyer, R. G., 1991. Role of medial preoptic GABA neurones in regulating luteinising hormone secretion in the ovariectomised rat. *Exp Brain Res.* 87, 345-352.
- Herbison, A. E. and Dyer, R. G., 1991. Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology.* 53, 317-320.
- Herbison, A. E., Robinson, J. E. and Skinner, D. C., 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic

- acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 57, 751-759.
- Herwig, A., Wilson, D., Logie, T. J., Boelen, A., Morgan, P. J., Mercer, J. G. and Barrett, P., 2009. Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296, R1307-1315.
- Heuer, H., Maier, M. K., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E. C., Visser, T. J. and Bauer, K., 2005. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*. 146, 1701-1706.
- Hileman, S. M., Bassin, A., Nestor, C. C., Billings, H. J., Connors, J. M., Holaskova, I., Lehman, M. N. and Goodman, R. L., 2009. Dopaminergic neurons act in the arcuate nucleus to hold LH pulse frequency in check in anestrus ewes. *Proceedings of the Neurosciences, Chicago*, pp. 868.869.
- Hileman, S. M., Kuehl, D. E. and Jackson, G. L., 1998. Photoperiod affects the ability of testosterone to alter proopiomelanocortin mRNA, but not luteinizing hormone-releasing hormone mRNA, levels in male sheep. *J Neuroendocrinol*. 10, 587-592.
- Hinkle, C. L., Diestel, S., Lieberman, J. and Maness, P. F., 2006. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Neurobiol*. 66, 1378-1395.
- Hinsby, A. M., Berezin, V. and Bock, E., 2004. Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci*. 9, 2227-2244.
- Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T. and Seno, S., 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*. 249, 1311-1313.
- Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M., 1982. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem*. 257, 7720-7729.
- Horton, R. J., Francis, H. and Clarke, I. J., 1989. Seasonal and steroid-dependent effects on the modulation of LH secretion in the ewe by intracerebroventricularly administered beta-endorphin or naloxone. *J Endocrinol*. 122, 509-517.
- Hrabovszky, E., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Hajszan, T., Carpenter, C. D., Liposits, Z. and Petersen, S. L., 2000. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 141, 3506-3509.
- Hu, H., 2000. Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J Neurosci Res*. 61, 480-492.
- Huang, L., DeVries, G. J. and Bittman, E. L., 1998. Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol*. 36, 410-420.
- Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., Gottsch, M. L., Clifton, D. K. and Steiner, R. A., 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 80, 264-272.
- Jacobson, M., 1970. *Developmental neurobiology*. Holt, Rinehart, and Winston, New York.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C. and Greengard, P., 1985. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82, 4137-4141.
- Jansen, H. T., Cutter, C., Hardy, S., Lehman, M. N. and Goodman, R. L., 2003. Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe:

- changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology*. 144, 3663-3676.
- Jansen, H. T., Cutter, C. T., Anderson, G. M., Hardy, S. L., Lehman, M. N. and Goodman, R. L., 1999. Restricted distribution of estradiol receptor (alpha) containing afferents to the hypothalamic A15 region of the ewe? *Society for neuroscience*. 5825, 1452.
- Jansen, H. T., Khalid, M. and Jackson, G. L., 1991. N-methyl-D, L-aspartate induces a transient increase in LH secretion in the seasonally anestrus ewe. *Domest Anim Endocrinol*. 8, 55-62.
- Jansen, H. T., Lubbers, L. S., Macchia, E., DeGroot, L. J. and Lehman, M. N., 1997. Thyroid hormone receptor (alpha) distribution in hamster and sheep brain: colocalization in gonadotropin-releasing hormone and other identified neurons. *Endocrinology*. 138, 5039-5047.
- Jansen, J., Friesema, E. C., Milici, C. and Visser, T. J., 2005. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid*. 15, 757-768.
- Jennes, L. and Stumpf, W. E., 1980. LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell Tissue Res*. 209, 239-256.
- Johnson, M. A., Tsutsui, K. and Fraley, G. S., 2007. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav*. 51, 171-180.
- Kalisman, N., Silberberg, G. and Markram, H., 2005. The neocortical microcircuit as a tabula rasa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 880-885.
- Kalra, S. P., Fuentes, M., Fournier, A., Parker, S. L. and Crowley, W. R., 1992. Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology*. 130, 3323-3330.
- Kandalepas, P. C. and Gillette, M. U., 2009. Filamentous (F)-actin reorganization is necessary for melatonin to induce a phase advance in the rat SCN at dusk . *Proceedings of the Neurosciences, Chicago*, pp. 574.524.
- Karmarkar, U. R. and Dan, Y., 2006. Experience-dependent plasticity in adult visual cortex. *Neuron*. 52, 577-585.
- Karsch, F. J., Bittman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J. and Robinson, J. E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res*. 40, 185-232.
- Karsch, F. J., Legan, S. J., Hauger, R. L. and Foster, D. L., 1977. Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: dependence on the ovaries. *Endocrinology*. 101, 800-806.
- Karsch, F. J., Robinson, J. E., Woodfill, C. J. and Brown, M. B., 1989. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod*. 41, 1034-1046.
- Kaur, G., Heera, P. K. and 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.
- Kempermann, G., van Praag, H. and Gage, F. H., 2000. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. *Prog Brain Res*. 127, 35-48.
- Key, B. and Akeson, R. A., 1991. Delineation of olfactory pathways in the frog nervous system by unique glycoconjugates and N-CAM glycoforms. *Neuron*. 6, 381-396.
- Keyser-Marcus, L., Stafisso-Sandoz, G., Gerecke, K., Jasnow, A., Nightingale, L., Lambert, K. G., Gatewood, J. and Kinsley, C. H., 2001. Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Res Bull*. 55, 737-745.

- Kim, J. H., Lee, J. H., Park, J. Y., Park, C. H., Yun, C. O., Lee, S. H., Lee, Y. S. and Son, H., 2005. Retrovirally transduced NCAM140 facilitates neuronal fate choice of hippocampal progenitor cells. *J Neurochem.* 94, 417-424.
- Kim, K. H., Patel, L., Tobet, S. A., King, J. C., Rubin, B. S. and Stopa, E. G., 1999. Gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the adult and fetal human olfactory system. *Brain Res.* 826, 220-229.
- King, J. A. and Millar, R. P., 1979. Heterogeneity of vertebrate luteinizing hormone-releasing hormone. *Science.* 206, 67-69.
- King, J. A. and Millar, R. P., 1982. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 257, 10729-10732.
- King, J. C., Anthony, E. L., Fitzgerald, D. M. and Stopa, E. G., 1985. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons in human preoptic/hypothalamus: differential intraneuronal localization of immunoreactive forms. *J Clin Endocrinol Metab.* 60, 88-97.
- King, J. C. and Letourneau, R. J., 1994. Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dramatic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology.* 134, 1340-1351.
- Kinsley, C. H., Trainer, R., Stafisso-Sandoz, G., Quadros, P., Marcus, L. K., Hearon, C., Meyer, E. A., Hester, N., Morgan, M., Kozub, F. J. and Lambert, K. G., 2006. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav.* 49, 131-142.
- Kiss, J. Z. and Rougon, G., 1997. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 640-646.
- Kiss, J. Z., Wang, C., Olive, S., Rougon, G., Lang, J., Baetens, D., Harry, D. and 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.
- Kiss, J. Z., Wang, C. and Rougon, G., 1993. Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neuroscience.* 53, 213-221.
- Kitagawa, H. and Paulson, J. C., 1994. Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J Biol Chem.* 269, 1394-1401.
- Klosen, P., Bienvenu, C., Demartean, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pevet, P. and Masson-Pevet, M., 2002. The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem.* 50, 1647-1657.
- Knafo, S., Barkai, E., Herrero, A. I., Libersat, F., Sandi, C. and Venero, C., 2005. Olfactory learning-related NCAM expression is state, time, and location specific and is correlated with individual learning capabilities. *Hippocampus.* 15, 316-325.
- Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E. and Svoboda, K., 2006. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci.* 9, 1117-1124.
- Kohama, S. G., Goss, J. R., McNeill, T. H. and Finch, C. E., 1995. Glial fibrillary acidic protein mRNA increases at proestrus in the arcuate nucleus of mice. *Neurosci Lett.* 183, 164-166.
- Kojima, N., Tachida, Y., Yoshida, Y. and Tsuji, S., 1996. Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. Requirement of core alpha1,6-linked fucose and a polypeptide chain for polysialylation. *J Biol Chem.* 271, 19457-19463.
- Kojima, N., Yoshida, Y., Kurosawa, N., Lee, Y. C. and Tsuji, S., 1995. Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence

- for alpha 2,8-sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett.* 360, 1-4.
- Kokoeva, M. V., Yin, H. and Flier, J. S., 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science.* 310, 679-683.
- Korf, H. W., Schomerus, C. and Stehle, J. H., 1998. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 146, 1-100.
- Kortner, G. and Geiser, F., 2000. The temporal organization of daily torpor and hibernation: circadian and circannual rhythms. *Chronobiol Int.* 17, 103-128.
- 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. and Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 276, 34631-34636.
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. A. and Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 15677-15682.
- Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K. and Silver, R., 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 2410-2415.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. M. and Chambon, P., 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *Embo J.* 5, 891-897.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 5925-5930.
- Kurunczi, A., Hoyk, Z., Csakvari, E., Gyenes, A. and Parducz, A., 2009. 17beta-Estradiol-induced remodeling of GABAergic axo-somatic synapses on estrogen receptor expressing neurons in the anteroventral periventricular nucleus of adult female rats. *Neuroscience.* 158, 553-557.
- Lagrange, A. H., Ronnekleiv, O. K. and Kelly, M. J., 1995. Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology.* 136, 2341-2344.
- Landmesser, L., Dahm, L., Tang, J. C. and Rutishauser, U., 1990. Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron.* 4, 655-667.
- Langub, M. C., Jr., Maley, B. E. and Watson, R. E., Jr., 1994. Estrous cycle-associated axosomatic synaptic plasticity upon estrogen receptive neurons in the rat preoptic area. *Brain Res.* 641, 303-310.
- Lauder, J. M., 1978. Effects of early hypo- and hyperthyroidism on development of rat cerebellar cortex. IV. The parallel fibers. *Brain Res.* 142, 25-39.
- Lavado-Autric, R., Auso, E., Garcia-Velasco, J. V., Arufe Mdel, C., Escobar del Rey, F., Berbel, P. and Morreale de Escobar, G., 2003. Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J Clin Invest.* 111, 1073-1082.
- 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. and O'Dowd, B. F., 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446, 103-107.

- Lee, J., Seroogy, K. B. and Mattson, M. P., 2002. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 80, 539-547.
- Lee, W., Watanabe, M. and 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.
- Legan, S. J. and Karsch, F. J., 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod.* 23, 1061-1068.
- Legan, S. J., Karsch, F. J. and Foster, D. L., 1977. The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 101, 818-824.
- Legan, S. J. and Tsai, H. W., 2003. Oestrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone neurones after ovariectomy and chronic exposure to oestradiol. *J Neuroendocrinol.* 15, 1164-1170.
- Lehman, M. N., Durham, D. M., Jansen, H. T., Adrian, B. and Goodman, R. L., 1996. Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrus, but not breeding season, ewes. *Endocrinology.* 137, 4443-4450.
- Lehman, M. N., Ebling, F. J., Moenter, S. M. and Karsch, F. J., 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinology.* 133, 876-886.
- Lehman, M. N. and Karsch, F. J., 1993. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology.* 133, 887-895.
- Lehman, M. N., Robinson, J. E., Karsch, F. J. and Silverman, A. J., 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol.* 244, 19-35.
- Leranth, C., Segura, L. M., Palkovits, M., MacLusky, N. J., Shanabrough, M. and Naftolin, F., 1985. The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing nerve terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. *Brain Res.* 345, 332-336.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H. and Mori, W., 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Adv Exp Med Biol.* 80, 2587-2592.
- Li, R., Bianchet, M. A., Talalay, P. and Amzel, L. M., 1995. The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 8846-8850.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L. and Gage, F. H., 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44, 399-421.
- Lin, Z., Gao, N., Hu, H. Z., Liu, S., Gao, C., Kim, G., Ren, J., Xia, Y., Peck, O. C. and Wood, J. D., 2002. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 14, 197-204.
- Lincoln, G., 1999. Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. Systems ancient and modern. *Adv Exp Med Biol.* 460, 137-153.
- Lincoln, G., Messenger, S., Andersson, H. and Hazlerigg, D., 2002. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep:

- evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 13890-13895.
- Lincoln, G. and Short, R. V., 1980. Seasonal breeding:nature's contraceptive. recent progress in hormone research. 36.
- Lincoln, G. A., 1998. Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in the mouflon ram (*Ovis musimon*). *Anim Reprod Sci.* 53, 87-105.
- Lincoln, G. A., Andersson, H. and Hazlerigg, D., 2003. Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol.* 15, 390-397.
- Lincoln, G. A. and Clarke, I. J., 1994. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol.* 6, 251-260.
- Lincoln, G. A. and Clarke, I. J., 1995. Evidence that melatonin acts in the pituitary gland through a dopamine-independent mechanism to mediate effects of daylength on the secretion of prolactin in the ram. *J Neuroendocrinol.* 7, 637-643.
- Lincoln, G. A., Clarke, I. J., Hut, R. A. and Hazlerigg, D. G., 2006. Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science.* 314, 1941-1944.
- Lincoln, G. A., Ebling, F. J. and Martin, G. B., 1987. Endogenous opioid control of pulsatile LH secretion in rams: modulation by photoperiod and gonadal steroids. *J Endocrinol.* 115, 425-438.
- Lincoln, G. A. and Maeda, K. I., 1992. Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J Endocrinol.* 132, 201-215.
- Lincoln, G. A. and Richardson, M., 1998. Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 119, 283-294.
- Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P. and Erlanson-Albertsson, C., 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol.* 13, 1385-1388.
- Liston, C., Miller, M. M., Goldwater, D. S., Radley, J. J., Rocher, A. B., Hof, P. R., Morrison, J. H. and McEwen, B. S., 2006. Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci.* 26, 7870-7874.
- Liu, F., Yuan, H., Sugamori, K. S., Hamadanizadeh, A., Lee, F. J., Pang, S. F., Brown, G. M., Pristupa, Z. B. and Niznik, H. B., 1995. Molecular and functional characterization of a partial cDNA encoding a novel chicken brain melatonin receptor. *FEBS Lett.* 374, 273-278.
- Loudon, A. S., Milne, J. A., Curlewis, J. D. and McNeilly, A. S., 1989. A comparison of the seasonal hormone changes and patterns of growth, voluntary food intake and reproduction in juvenile and adult red deer (*Cervus elaphus*) and Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*) hinds. *J Endocrinol.* 122, 733-745.
- Lu, E. J. and Brown, W. J., 1977. The developing caudate nucleus in the euthyroid and hypothyroid rat. *J Comp Neurol.* 171, 261-284.
- Lubbers, L. S., Greco, B., Hileman, S. M., Schwartz, P. E. and Blaustein, J. D., 1999. Localization of tyrosine hydroxylase (TH) and estrogen receptor (ER) beta in the retrochiasmatic region of the hypothalamus of the female sheep. In: *Neuroscience*, S. o. (Ed.). Proceedings of the, 25, pp. 1452.
- Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Coge, F., Chomarar, P., Mallet, C., Guenin, S. P., Guillaumet, G., Viaud-Massuard, M. C., Yous, S., Delagrang, P. and Boutin, J. A.,

2005. Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol.* 71, 74-88.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R. and Svoboda, K., 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science.* 283, 1923-1927.
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G. and Chemineau, P., 1998. Evidence that melatonin acts in the preammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology.* 139, 1508-1516.
- Malpaux, B., Skinner, D. C. and Maurice, F., 1995. The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J Neuroendocrinol.* 7, 199-206.
- Martinez-Galan, J. R., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., Santacana, M. and Ruiz-Marcos, A., 2004. Hypothyroidism alters the development of radial glial cells in the term fetal and postnatal neocortex of the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 153, 109-114.
- Martinez-Galan, J. R., Pedraza, P., Santacana, M., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G. and Ruiz-Marcos, A., 1997. Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J Clin Invest.* 99, 2701-2709.
- Masana, M. I. and Dubocovich, M. L., 2001. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE.* 2001, PE39.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. and Ohtaki, T., 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 320, 383-388.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M., Arimura, A. and Schally, A. V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 43, 1334-1339.
- Mattson, M. P., 1988. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res.* 472, 179-212.
- Maywood, E. S., Bittman, E. L. and Hastings, M. H., 1996. Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod.* 54, 470-477.
- Mazurais, D., Brierley, I., Anglade, I., Drew, J., Randall, C., Bromage, N., Michel, D., Kah, O. and Williams, L. M., 1999. Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J Comp Neurol.* 409, 313-324.
- McCord, C. P. and Allen, F. B., 1917. Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool.* 23, 207-224.
- McManus, C. J., Valent, M., Hardy, S. L. and Goodman, R. L., 2007. Does nitric oxide act in the ventromedial preoptic area to mediate oestrogen negative feedback in the seasonally anoestrous ewe? *Reproduction.* 134, 137-145.
- McNay, D. E., Robins, S., Kokoeva, M., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Placzek, M. and Flier, J. S., 2009. The location and characterisation of hypothalamic neural stem cells. *Proceedings of the Neuroscience, Chicago*, pp. 399.396.
- Merchenthaler, I., Setalo, G., Csontos, C., Petrusz, P., Flerko, B. and Negro-Vilar, A., 1989. Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinology.* 125, 2812-2821.

- Merzenich, M. M., Kaas, J. H., Wall, J., Nelson, R. J., Sur, M. and Felleman, D., 1983. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience*. 8, 33-55.
- Migaud, M., Batailler, M., Pilon, D., Franceschini, I. and Malpoux, B., 2009. Seasonal dependant variation of cell proliferation in the sheep hypothalamus and thalamus. *Proceedings of the Société des neurosciences, Bordeaux*, pp. 31.33.
- Miller, W. L., 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev.* 9, 295-318.
- Mirescu, C. and Gould, E., 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*. 16, 233-238.
- Misra, M., Rani, S., Singh, S. and Kumar, V., 2004. Regulation of seasonality in the migratory male blackheaded bunting (*Emberiza melanocephala*). *Reprod Nutr Dev.* 44, 341-352.
- Missler, M., Wolff, A., Merker, H. J. and Wolff, J. R., 1993. Pre- and postnatal development of the primary visual cortex of the common marmoset. II. Formation, remodelling, and elimination of synapses as overlapping processes. *J Comp Neurol.* 333, 53-67.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Minegishi, T., Nomura, M., Takahashi, Y., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H., 1982. Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 107, 820-827.
- Moenter, S. M., Woodfill, C. J. and Karsch, F. J., 1991. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology.* 128, 1337-1344.
- Morgan, P. J. and Hazlerigg, D. G., 2008. Photoperiodic signalling through the melatonin receptor turns full circle. *J Neuroendocrinol.* 20, 820-826.
- Morgan, P. J. and Mercer, J. G., 1994. Control of seasonality by melatonin. *Proc Nutr Soc.* 53, 483-493.
- Morgan, P. J. and Williams, L. M., 1996. The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod.* 1, 153-161.
- Moser, E., Moser, M. B. and Andersen, P., 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci.* 13, 3916-3925.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R., 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49-53.
- Mumaw, L., Lacagnina, A. and Orchinik, M., 2009. Seasonal differences in newborn cells in the adult amphibian brain: Implications for neuropeptide regulation. *Proceedings of the Neurosciences*, pp. 864.811.
- Munnich, J., Gabel, G. and Pfannkuche, H., 2008. Intrinsic ruminal innervation in ruminants of different feeding types. *J Anat.* 213, 442-451.
- Murakami, S., Seki, T., Rutishauser, U. and 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.
- Murakami, S., Seki, T., Wakabayashi, K. and 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.
- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P. J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H. R. and Yoshimura, T., 2008. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature.* 452, 317-322.

- Nakayama, J., Fukuda, M. N., Fredette, B., Ranscht, B. and Fukuda, M., 1995. Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 7031-7035.
- Navarro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M. L., Roa, J., Sanchez-Criado, J. E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M., 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 145, 4565-4574.
- Nicholls, T. J., Follett, B. K., Goldsmith, A. R. and Pearson, H., 1988. Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reprod Nutr Dev.* 28, 375-385.
- Nonno, R., Lucini, V., Spadoni, G., Pannacci, M., Croce, A., Esposti, D., Balsamini, C., Tarzia, G., Frascini, F. and Stankov, B. M., 2000. A new melatonin receptor ligand with mt1-agonist and MT2-antagonist properties. *J Pineal Res.* 29, 234-240.
- Norgren, R. B., Jr. and Brackenbury, R., 1993. Cell adhesion molecules and the migration of LHRH neurons during development. *Dev Biol.* 160, 377-387.
- Norgren, R. B., Jr. and Lehman, M. N., 1989. A double-label pre-embedding immunoperoxidase technique for electron microscopy using diaminobenzidine and tetramethylbenzidine as markers. *J Histochem Cytochem.* 37, 1283-1289.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauchere, J. L., Delagrangue, P., Canet, E. and Boutin, J. A., 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275, 31311-31317.
- Nottebohm, F., Stokes, T. M. and Leonard, C. M., 1976. Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *J Comp Neurol.* 165, 457-486.
- O'Byrne, K. T. and Knobil, E., 1993. Electrophysiological approaches to gonadotrophin releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Hum Reprod.* 8 Suppl 2, 37-40.
- O'Connell, A. W., Fox, G. B., Barry, T., Murphy, K. J., Fichera, G., Foley, A. G., Kelly, J. and Regan, C. M., 1997. Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem.* 68, 2538-2546.
- Olmos, G., Naftolin, F., Perez, J., Tranque, P. A. and Garcia-Segura, L. M., 1989. Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience.* 32, 663-667.
- Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., Ebihara, S., Korf, H. W. and Yoshimura, T., 2008. Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 18238-18242.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. and Rutishauser, U., 1994. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron.* 13, 595-609.
- Ord, W. M., 1888. Report of a committee of the Clinical Society of London: Myxoedema (ed. Lond, T. C. S.), pp. 1-215. Society of the Clinical of London, London.
- Orstead, K. M., Hess, D. L. and Spies, H. G., 1987. Opiatergic inhibition of pulsatile luteinizing hormone release during the menstrual cycle of rhesus macaques. *Proc Soc Exp Biol Med.* 184, 312-319.
- Ortavant, R., 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *J Biol Sci.* 41, 69-85.

- Oumesmar, B. N., Vignais, L., Duhamel-Clerin, E., Avellana-Adalid, V., Rougon, G. and Baron-Van Evercooren, A., 1995. Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *Eur J Neurosci.* 7, 480-491.
- Pardridge, W. M. and Mietus, L. J., 1980. Transport of thyroid and steroid hormones through the blood-brain barrier of the newborn rabbit: primary role of protein-bound hormone. *Endocrinology.* 107, 1705-1710.
- Parducz, A., Perez, J. and Garcia-Segura, L. M., 1993. Estradiol induces plasticity of gabaergic synapses in the hypothalamus. *Neuroscience.* 53, 395-401.
- Parent, J. M., Vexler, Z. S., Gong, C., Derugin, N. and Ferriero, D. M., 2002. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol.* 52, 802-813.
- Parkash, J. and 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. and Kaur, G., 2007. Transcriptional regulation of PSA-NCAM mediated neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus. *Neuron Glia Biol.* 3, 299-307.
- Paternostro, M. and Meisami, E., 1989. Selective effects of thyroid hormonal deprivation on growth and development of olfactory receptor sheet during the early postnatal period: a morphometric and cell count study in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 7, 243-255.
- Peczely, P., Pethes, G. and Rudas, P., 1980. Interrelationship between thyroid and gonadal function in female Japanese quail kept under short and long photoperiods. *J Endocrinol.* 87, 55-63.
- Pelletier, G., 1987. Demonstration of contacts between neurons staining for LHRH in the preoptic area of the rat brain. *Neuroendocrinology.* 46, 457-459.
- Pelletier, J., 1973. Evidence for photoperiodic control of prolactin release in rams. *J Reprod Fertil.* 35, 143-147.
- Pelletier, J. and Almeida, G., 1987. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *J Reprod Fertil Suppl.* 34, 215-226.
- Perez, J., Luquin, S., Naftolin, F. and Garcia-Segura, L. M., 1993. The role of estradiol and progesterone in phased synaptic remodelling of the rat arcuate nucleus. *Brain Res.* 608, 38-44.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R. and McEwen, B. S., 2003. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 17, 879-886.
- Phillips, G. R., Krushel, L. A. and Crossin, K. L., 1997. Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res Dev Brain Res.* 102, 143-155.
- Phillips, R. J., Hargrave, S. L., Rhodes, B. S., Zopf, D. A. and Powley, T. L., 2004. Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. *J Neurosci Methods.* 133, 99-107.
- Pierce, J. G. and Parsons, T. F., 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.
- Pierre, K., Bonhomme, R., Dupouy, B., Poulain, D. A. and 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.
- Pillon, D., Caraty, A., Fabre-Nys, C., Lomet, D., Cateau, M. and Bruneau, G., 2004. Regulation by estradiol of hypothalamic somatostatin gene expression: possible involvement of somatostatin in the control of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod.* 71, 38-44.

- Pimpinelli, F., Parenti, M., Guzzi, F., Piva, F., Hokfelt, T. and Maggi, R., 2006. Presence of delta opioid receptors on a subset of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons. *Brain Res.* 1070, 15-23.
- Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J. M. and Horvath, T. L., 2004. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 304, 110-115.
- Pizzagalli, F., Hagenbuch, B., Stieger, B., Klenk, U., Folkers, G. and Meier, P. J., 2002. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol.* 16, 2283-2296.
- Polkowska, J., Wankowska, M. and Wojcik-Gladysz, A., 2006. Expression of NPY-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the cycling ewe. *Folia Histochem Cytobiol.* 44, 13-16.
- Poltorak, M., Frye, M. A., Wright, R., Hemperly, J. J., George, M. S., Pazzaglia, P. J., Jerrels, S. A., Post, R. M. and Freed, W. J., 1996. Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder. *J Neurochem.* 66, 1532-1538.
- Pompolo, S., Pereira, A., Kaneko, T. and Clarke, I. J., 2003a. Seasonal changes in the inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ewe brain: an assessment by conventional fluorescence and confocal microscopy. *J Neuroendocrinol.* 15, 538-545.
- Pompolo, S., Pereira, A., Scott, C. J., Fujiyama, F. and Clarke, I. J., 2003b. Evidence for estrogenic regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glutamatergic neurons in the ewe brain: An immunohistochemical study using an antibody against vesicular glutamate transporter-2. *J Comp Neurol.* 465, 136-144.
- Portera-Cailliau, C., Weimer, R. M., De Paola, V., Caroni, P. and Svoboda, K., 2005. Diverse modes of axon elaboration in the developing neocortex. *PLoS Biol.* 3, e272.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G. B. and Beauvillain, J. C., 1999. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience.* 94, 809-819.
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Miller, M., Janssen, W. G., Liston, C., Hof, P. R., McEwen, B. S. and Morrison, J. H., 2006. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 16, 313-320.
- Raisman, G., 1969. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 14, 25-48.
- Rami, A., Patel, A. J. and Rabie, A., 1986. Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: morphological alterations in granule and pyramidal cells. *Neuroscience.* 19, 1217-1226.
- Ravault, J. P. and Chesneau, D., 1999. The onset of increased melatonin secretion after the onset of darkness in sheep depends on the photoperiod. *J Pineal Res.* 27, 1-8.
- Reiter, R. J., 1981. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat.* 162, 287-313.
- Reiter, R. J., 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 12, 151-180.
- Rennie, K., De Butte, M. and Pappas, B. A., 2009. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *J Pineal Res.* 47, 313-317.
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slangenaupt, S. A. and Gusella, J. F., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 8734-8738.

- Reppert, S. M. and Weaver, D. R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418, 935-941.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R. and Ebisawa, T., 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 13, 1177-1185.
- Revel, F. G., Ansel, L., Klosen, P., Saboureau, M., Pevet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V., 2007. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord*. 8, 57-65.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V., 2006a. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol*. 16, 1730-1735.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Pevet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V., 2006b. Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the Syrian hamster. *Endocrinology*. 147, 4680-4687.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Pevet, P., Simonneaux, V. and Mikkelsen, J. D., 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology*. 149, 902-912.
- Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L. and Peyrat, J. P., 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 36, 1038-1042.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255, 1707-1710.
- Richard, P., 1967. Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis préAlpes du sud. INRA, Paris
- Rieger, S., Volkman, K. and Koster, R. W., 2008. Polysialyltransferase expression is linked to neuronal migration in the developing and adult zebrafish. *Dev Dyn*. 237, 276-285.
- Rivier, C. and Rivest, S., 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod*. 45, 523-532.
- Rockle, I., Seidenfaden, R., Weinhold, B., Muhlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R. and Hildebrandt, H., 2008. Polysialic acid controls NCAM-induced differentiation of neuronal precursors into calretinin-positive olfactory bulb interneurons. *Dev Neurobiol*. 68, 1170-1184.
- Rodriguez, E. M., Blazquez, J. L., Pastor, F. E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B. and Amat, P., 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol*. 247, 89-164.
- Romero, M. T., Silverman, A. J., Wise, P. M. and Witkin, J. W., 1994. Ultrastructural changes in gonadotropin-releasing hormone neurons as a function of age and ovariectomy in rats. *Neuroscience*. 58, 217-225.
- Rougon, G., 1993. Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol*. 61, 197-207.
- Rougon, G., Dubois, C., Buckley, N., Magnani, J. L. and Zollinger, W., 1986. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol*. 103, 2429-2437.
- Rousselot, P., Lois, C. and Alvarez-Buylla, A., 1995. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol*. 351, 51-61.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A. K., Mann, D. M. and Sunshine, J., 1988. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science*. 240, 53-57.
- Sanchez, E., Vargas, M. A., Singru, P. S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J. L. and Lechan, R. M., 2009. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of

- the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 150, 2283-2291.
- Sato, K., Hayashi, T., Sasaki, C., Iwai, M., Li, F., Manabe, Y., Seki, T. and Abe, K., 2001. Temporal and spatial differences of PSA-NCAM expression between young-adult and aged rats in normal and ischemic brains. *Brain Res*. 922, 135-139.
- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., Nair, R. M., Debeljuk, L. and White, W. F., 1971a. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*. 173, 1036-1038.
- Schally, A. V., Kastin, A. J. and Arimura, A., 1971b. Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies. *Fertil Steril*. 22, 703-721.
- Schellinck, H. M., Arnold, A. and Rafuse, V. F., 2004. Neural cell adhesion molecule (NCAM) null mice do not show a deficit in odour discrimination learning. *Behav Brain Res*. 152, 327-334.
- Schwanzel-Fukuda, M. and Pfaff, D. W., 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. 338, 161-164.
- Scott, C. J. and Clarke, I. J., 1993a. Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for gamma-amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology*. 133, 2904-2912.
- Scott, C. J. and Clarke, I. J., 1993b. Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors. *Endocrinology*. 132, 1789-1796.
- Seidenfaden, R., Krauter, A., Schertzinger, F., Gerardy-Schahn, R. and Hildebrandt, H., 2003. Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol*. 23, 5908-5918.
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Jr., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwino, 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. and Colledge, W. H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 349, 1614-1627.
- Sergeeva, A. and Jansen, H. T., 2009. Neuroanatomical plasticity in the gonadotropin-releasing hormone system of the ewe: seasonal variation in glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic afferents. *J Comp Neurol*. 515, 615-628.
- Seymour, C. M., Foley, A. G., Murphy, K. J. and Regan, C. M., 2008. Intraventricular infusions of anti-NCAM PSA impair the process of consolidation of both avoidance conditioning and spatial learning paradigms in Wistar rats. *Neuroscience*. 157, 813-820.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S. B., Crowley, W. F., Ojeda, S. R. and Plant, T. M., 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 2129-2134.
- Shen, H., Glass, J. D., Seki, T. and Watanabe, M., 1999. Ultrastructural analysis of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nuclei of the adult mouse. *Anat Rec*. 256, 448-457.
- Shen, H., Watanabe, M., Tomasiewicz, H., Rutishauser, U., Magnuson, T. and Glass, J. D., 1997. Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J Neurosci*. 17, 5221-5229.

- Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K. and Malinow, R., 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science*. 284, 1811-1816.
- Shin, M. H., Lee, E. G., Lee, S. H., Lee, Y. S. and Son, H., 2002. Neural cell adhesion molecule (NCAM) promotes the differentiation of hippocampal precursor cells to a neuronal lineage, especially to a glutamatergic neural cell type. *Exp Mol Med*. 34, 401-410.
- Simonneaux, V., Ancel, C., Ansel, L. and Mikkelsen, J. D., 2009a. The role of RFRP peptide in the seasonal regulation of reproduction *Proceedings of the Neurosciences*, Chicago, pp. 665.661.
- Simonneaux, V., Ansel, L., Revel, F. G., Klosen, P., Pevet, P. and Mikkelsen, J. D., 2009b. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides*. 30, 146-153.
- Simonneaux, V. and Ribelayga, C., 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 55, 325-395.
- Singh, J. and Kaur, G., 2007. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res*. 1154, 8-21.
- Singh, S. R., Hileman, S. M., Connors, J. M., McManus, C. J., Coolen, L. M., Lehman, M. N. and Goodman, R. L., 2009. Estradiol negative feedback regulation by glutamatergic afferents to A15 dopaminergic neurons: variation with season. *Endocrinology*.
- Skinner, D. C., Caraty, A. and Allingham, R., 2001. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology*. 142, 573-579.
- Skinner, D. C. and Dufourny, L., 2005. Oestrogen receptor beta-immunoreactive neurones in the ovine hypothalamus: distribution and colocalisation with gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol*. 17, 29-39.
- Skinner, D. C. and Herbison, A. E., 1997. Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and beta-endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology*. 138, 2585-2595.
- Skinner, D. C. and Malpoux, B., 1999. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology*. 140, 4399-4405.
- Sliwowska, J. H., Billings, H. J., Goodman, R. L., Coolen, L. M. and Lehman, M. N., 2004. The premammillary hypothalamic area of the ewe: anatomical characterization of a melatonin target area mediating seasonal reproduction. *Biol Reprod*. 70, 1768-1775.
- Small, T. W. and Moore, I. T., 2009. Seasonal neuroplasticity of the song control system in tropical, flexibly, and opportunistically breeding birds. *Gen Comp Endocrinol*.
- Smith, G. T., Brenowitz, E. A., Beecher, M. D. and Wingfield, J. C., 1997. Seasonal changes in testosterone, neural attributes of song control nuclei, and song structure in wild songbirds. *J Neurosci*. 17, 6001-6010.
- Smith, G. T., Brenowitz, E. A., Wingfield, J. C. and Baptista, L. F., 1995. Seasonal changes in song nuclei and song behavior in Gambel's white-crowned sparrows. *J Neurobiol*. 28, 114-125.
- Smith, J. T. and Clarke, I. J., 2007. Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev Endocr Metab Disord*. 8, 1-9.
- Smith, J. T., Clay, C. M., Caraty, A. and Clarke, I. J., 2007. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*. 148, 1150-1157.

- Smith, J. T., Coolen, L. M., Kriegsfeld, L. J., Sari, I. P., Jaafarzadehshirazi, M. R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R. L., Tilbrook, A. J., Ubuka, T., Bentley, G. E., Clarke, I. J. and Lehman, M. N., 2008. Variation in kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone expression and terminal connections to GnRH neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*.
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. and 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. and Steiner, R. A., 2005b. Differential regulation of *KiSS-1* mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 146, 2976-2984.
- Southwell, B. R., Duan, W., Alcorn, D., Brack, C., Richardson, S. J., Kohrle, J. and Schreiber, G., 1993. Thyroxine transport to the brain: role of protein synthesis by the choroid plexus. *Endocrinology*. 133, 2116-2126.
- Stork, O., Welzl, H., Wotjak, C. T., Hoyer, D., Delling, M., Cremer, H. and Schachner, M., 1999. Anxiety and increased 5-HT_{1A} receptor response in NCAM null mutant mice. *J Neurobiol*. 40, 343-355.
- Styren, S. D., Lagenaur, C. F., Miller, P. D. and DeKosky, S. T., 1994. Rapid expression and transport of embryonic N-CAM in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: ultrastructural analysis. *J Comp Neurol*. 349, 486-492.
- Tan, O., Fadiel, A., Chang, A., Demir, N., Jeffrey, R., Horvath, T., Garcia-Segura, L. M. and Naftolin, F., 2009. Estrogens regulate posttranslational modification of neural cell adhesion molecule during the estrogen-induced gonadotropin surge. *Endocrinology*. 150, 2783-2790.
- Theodosis, D. T., 2002. Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*. 23, 101-135.
- Theodosis, D. T., Bonhomme, R., Vitiello, S., Rougon, G. and 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. and Poulain, D. A., 1984. Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation. *Neuroscience*. 11, 183-193.
- Theodosis, D. T., Rougon, G. and 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 U S A*. 88, 5494-5498.
- Theodosis, D. T. a. P., M.A., 1987. Oxytocin-secreting neurones: a physiological model for structural plasticity in the adult mammalian brain. *TINS, Elsevier cambridge*. 10, 426-430.
- Thiery, J. C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M. and Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol*. 23, 87-100.
- Thiery, J. C., Gayraud, V., Le Corre, S., Viguie, C., Martin, G. B., Chemineau, P. and Malpoux, B., 1995. Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl*. 49, 285-296.
- Thiery, J. C. and Martin, G. B., 1991. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep--a review. *Reprod Fertil Dev*. 3, 137-173.
- Thiery, J. C., Martin, G. B., Tillet, Y., Caldani, M., Quentin, M., Jamain, C. and Ravault, J. P., 1989. Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone

- and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology*. 49, 80-87.
- Thimonier, J., 1989. Contrôle photoperiodique de l'activité ovulatoire chez la brebis: Existence de rythmes endogènes. In: Doctorat Sciences de la Vie).
- Thimonier, J. and Mauléon, P., 1969. Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins.
- Thimonier, J., Ravault, J. P. and Ortavant, R., 1978. Plasma prolactin variations and cyclic ovarian activity in ewes submitted to different light regimens. *Anim Biochem Biophys* 18, 1229–1235.
- Thind, K. K. and Goldsmith, P. C., 1988. Infundibular gonadotropin-releasing hormone neurons are inhibited by direct opioid and autoregulatory synapses in juvenile monkeys. *Neuroendocrinology*. 47, 203-216.
- Thompson, C. K. and Brenowitz, E. A., 2009. Neurogenesis in an adult avian song nucleus is reduced by decreasing caspase-mediated apoptosis. *J Neurosci*. 29, 4586-4591.
- Thrun, L. A., Dahl, G. E., Evans, N. P. and Karsch, F. J., 1996. Time-course of thyroid hormone involvement in the development of anestrus in the ewe. *Biol Reprod*. 55, 833-837.
- Tillet, Y., Batailler, M. and Thibault, J., 1993. Neuronal projections to the medial preoptic area of the sheep, with special reference to monoaminergic afferents: immunohistochemical and retrograde tract tracing studies. *J Comp Neurol*. 330, 195-220.
- Tillet, Y., Caldani, M. and Batailler, M., 1989. Anatomical relationships of monoaminergic and neuropeptide Y-containing fibres with luteinizing hormone-releasing hormone systems in the preoptic area of the sheep brain: immunohistochemical studies. *J Chem Neuroanat*. 2, 319-326.
- Todman, M. G., Han, S. K. and Herbison, A. E., 2005. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience*. 132, 703-712.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U. and Magnuson, T., 1993. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron*. 11, 1163-1174.
- Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R. and Muller, D., 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*. 402, 421-425.
- Toran-Allerand, C. D., 2000. Novel sites and mechanisms of oestrogen action in the brain. *Novartis Found Symp*. 230, 56-69; discussion 69-73.
- Tortonese, D. J., 1999. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology*. 140, 750-757.
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E. and Svoboda, K., 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 420, 788-794.
- Tramontin, A. D. and Brenowitz, E. A., 2000. Seasonal plasticity in the adult brain. *Trends Neurosci*. 23, 251-258.
- Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P. and Malpoux, B., 2002. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*. 143, 84-90.
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S. and Sharp, P. J., 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun*. 275, 661-667.

- Tu, H. M., Kim, S. W., Salvatore, D., Bartha, T., Legradi, G., Larsen, P. R. and Lechan, R. M., 1997. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 138, 3359-3368.
- Ukena, K., Ubuka, T. and Tsutsui, K., 2003. Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res*. 312, 73-79.
- Unfried, C., Ansari, N., Yasuo, S., Korf, H. W. and von Gall, C., 2009. Impact of melatonin and molecular clockwork components on the expression of thyrotropin beta-chain (Tshb) and the Tsh receptor in the mouse pars tuberalis. *Endocrinology*. 150, 4653-4662.
- Urbanski, H. F., 1992. Photoperiodic modulation of luteinizing hormone secretion in orchidectomized Syrian hamsters and the influence of excitatory amino acids. *Endocrinology*. 131, 1665-1669.
- Vanecek, J., Pavlik, A. and Illnerova, H., 1987. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*. 435, 359-362.
- Vawter, M. P., Frye, M. A., Hemperly, J. J., VanderPutten, D. M., Usen, N., Doherty, P., Saffell, J. L., Issa, F., Post, R. M., Wyatt, R. J. and Freed, W. J., 2000. Elevated concentration of N-CAM VASE isoforms in schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 34, 25-34.
- Viguie, C., Jansen, H. T., Glass, J. D., Watanabe, M., Billings, H. J., Coolen, L., Lehman, M. N. and 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.
- Viguie, C., Thibault, J., Thiery, J. C., Tillet, Y. and Malpoux, B., 1996. Photoperiodic modulation of monoamines and amino-acids involved in the control of prolactin and LH secretion in the ewe: evidence for a regulation of tyrosine hydroxylase activity. *J Neuroendocrinol*. 8, 465-474.
- Viguie, C., Thibault, J., Thiery, J. C., Tillet, Y. and Malpoux, B., 1997. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology*. 138, 499-506.
- Vincent, S. R., Hokfelt, T. and Wu, J. Y., 1982. GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland. Immunohistochemical demonstration using antibodies against glutamate decarboxylase. *Neuroendocrinology*. 34, 117-125.
- Vutskits, L., Gascon, E., Zraggen, E. and Kiss, J. Z., 2006. The polysialylated neural cell adhesion molecule promotes neurogenesis in vitro. *Neurochem Res*. 31, 215-225.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S. and Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 22, 6810-6818.
- Wagner, A. P., Reck, G. and Platt, D., 1992. Dynamics of gene expression for microtubule-associated protein MAP1B, embryonic alpha-tubulin and late neural beta-tubulin mRNAs in the hippocampus of aged rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 184, 292-299.
- Wagner, G. C., Johnston, J. D., Clarke, I. J., Lincoln, G. A. and Hazlerigg, D. G., 2008. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology*. 149, 32-39.
- Waldhauser, F., Waldhauser, M., Lieberman, H. R., Deng, M. H., Lynch, H. J. and Wurtman, R. J., 1984. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology*. 39, 307-313.

- Warembourg, M. and Leroy, D., 2000. Microwave pretreatment of sections to improve the immunocytochemical detection of progesterone receptors in the guinea pig hypothalamus. *J Neurosci Methods*. 104, 27-34.
- Watanabe, M., Yasuo, S., Watanabe, T., Yamamura, T., Nakao, N., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2004. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology*. 145, 1546-1549.
- Watanabe, Y., Gould, E. and McEwen, B. S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*. 588, 341-345.
- Webster, J. R., Moenter, S. M., Barrell, G. K., Lehman, M. N. and Karsch, F. J., 1991. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology*. 129, 1635-1643.
- Weinhold, B., Seidenfaden, R., Rockle, I., Muhlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Marth, J. D., Gerardy-Schahn, R. and 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.
- Wellman, C. L., 2001. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*. 49, 245-253.
- Whisnant, C. S., Curto, K. and Goodman, R. L., 1992. Immunocytochemical localization of beta endorphin and gonadal steroid regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the ewe. *Neuroendocrinology*. 56, 812-821.
- Whisnant, C. S. and Goodman, R. L., 1988. Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol Reprod*. 39, 1032-1038.
- White, R. B. and Fernald, R. D., 1998. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. *Gen Comp Endocrinol*. 112, 322-329.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R. and Wobus, A. M., 2004. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*. 61, 2510-2522.
- Wiesel, T. N. and Hubel, D. H., 1963. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol*. 26, 1003-1017.
- Wintermantel, T. M., Campbell, R. E., Porteous, R., Bock, D., Grone, H. J., Todman, M. G., Korach, K. S., Greiner, E., Perez, C. A., Schutz, G. and Herbison, A. E., 2006. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*. 52, 271-280.
- Witkin, J. W., Ferin, M., Popilskis, S. J. and Silverman, A. J., 1991. Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology*. 129, 1083-1092.
- Witkin, J. W., Paden, C. M. and Silverman, A. J., 1982. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology*. 35, 429-438.
- Wittkowski, W., Bockmann, J., Kreutz, M. R. and Bockers, T. M., 1999. Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol*. 185, 157-194.
- Woitkewitsch, A. A., 1940. Dependence of seasonal periodicity in gonadal changes on the thyroid gland in *Sturnus vulgaris*. *L C R Acad Sci Moscow*. 28, 741-745.
- Wolff, J. R., Leutgeb, U., Holzgraefe, M. and Teuchert, G., 1989. Synaptic remodelling during primary and reactive synaptogenesis. Rahmann, H (ed), *Fundamentals of memory formation: Neuronal plasticity and brain function* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; New York, 68-82.

- Wolff, J. R. and Wagner, G. P., 1983. Selforganization in synaptogenesis: interaction between the formation of excitatory and inhibitory synapses. Synergetics of the brain Springer, Berlin.
- Worthy, K., Haresign, W., Dodson, S., McLeod, B. J., Foxcroft, G. R. and Haynes, N. B., 1985. Evidence that the onset of the breeding season in the ewe may be independent of decreasing plasma prolactin concentrations. *J Reprod Fertil.* 75, 237-246.
- Wray, S., Grant, P. and 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 U S A.* 86, 8132-8136.
- Xiong, J. J., Karsch, F. J. and 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.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M. and Ide, C., 2005. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol.* 192, 251-264.
- Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2004. Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology.* 145, 4264-4267.
- Yamamura, T., Yasuo, S., Hirunagi, K., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2006. T(3) implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res.* 324, 175-179.
- Yang, P., Yin, X. and Rutishauser, U., 1992. Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J Cell Biol.* 116, 1487-1496.
- Yasuo, S., Nakao, N., Ohkura, S., Iigo, M., Hagiwara, S., Goto, A., Ando, H., Yamamura, T., Watanabe, M., Watanabe, T., Oda, S., Maeda, K., Lincoln, G. A., Okamura, H., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2006. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology.* 147, 432-440.
- Yasuo, S., Watanabe, M., Nakao, N., Takagi, T., Follett, B. K., Ebihara, S. and Yoshimura, T., 2005. The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology.* 146, 2551-2554.
- Yen, P. M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81, 1097-1142.
- Yoshida, K., Rutishauser, U., Crandall, J. E. and Schwarting, G. A., 1999. Polysialic acid facilitates migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons on vomeronasal axons. *J Neurosci.* 19, 794-801.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K. and Ebihara, S., 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature.* 426, 178-181.
- Zhang, H., Miller, R. H. and Rutishauser, U., 1992. Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate. *J Neurosci.* 12, 3107-3114.
- Zhang, W., Lin, T. R., Hu, Y., Fan, Y., Zhao, L., Stuenkel, E. L. and Mulholland, M. W., 2004. Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol.* 559, 729-737.
- Zharkovsky, A., Aonurm, A., Soon, K. and Zharkovsky, M., 2006. Depression-like phenotype in NCAM-deficient mice. *Int J Devl Neuroscience.* 24, 496-603.
- Zheng, S. X., Bosch, M. A. and Ronnekleiv, O. K., 2005. mu-opioid receptor mRNA expression in identified hypothalamic neurons. *J Comp Neurol.* 487, 332-344.

Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M. and Thomas, P., 2003. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 2231-2236.



Stéphanie CHALIVOIX



Transition photopériodique et plasticité neuronale dans l'hypothalamus ovin : aspects neuroanatomiques et fonctionnels



Résumé

Les mécanismes cellulaires activés par la mélatonine pour synchroniser l'alternance entre la saison de reproduction et l'anoestrus sont encore mal compris. Les niveaux et l'importance fonctionnelle de la plasticité induite par une transition photopériodique ont été étudiés dans des régions du cerveau impliquées dans la synchronisation saisonnière de la reproduction chez les ovins. Nos résultats suggèrent qu'un changement de photopériode seule serait capable d'induire, dans plusieurs régions hypothalamiques, des variations d'un marqueur de la plasticité, la PSA-NCAM, qui participeraient à la régulation de la reproduction saisonnée en particulier dans l'aire préoptique. Des populations neuronales affectées par des réarrangements morphologiques ont également été identifiées. La PSA-NCAM est plus présente au contact des neurones à GnRH et à β -endorphine au moment le plus opportun pour l'activité du neurone suggérant que la plasticité affectant ces deux populations cellulaires serait essentielle au déroulement de la reproduction saisonnée. Les neurones à kisspeptine sont également plus nombreux chez des animaux ayant un axe gonadotrope actif suggérant que cette population serait un des derniers éléments activés par l'augmentation de la durée de sécrétion de la mélatonine.

Nos travaux montrent qu'un changement de photopériode est suffisant pour induire des remaniements morphologiques dans des régions hypothalamiques nécessaires à la synchronisation saisonnière de la reproduction chez les ovins. Ces remaniements affectent des populations neuronales spécifiques.

Mots clés : Brebis, reproduction saisonnée, photopériode, hypothalamus, PSA-NCAM, GnRH, neuromodulateurs.

Abstract

Cellular mechanisms induced by melatonin to synchronize seasonal reproduction are still unclear. The scale and functional significance of neuronal plasticity induced by a photoperiodic transition have been studied in brain regions involved in the seasonal synchronization of sheep reproduction. Our results suggested that a change of photoperiod alone seems able to induce variations of PSA-NCAM, a plasticity marker, in several hypothalamic areas that may participate to the regulation of seasonal reproduction particularly in the preoptic area. Neuronal populations affected by morphological rearrangements have been identified. PSA-NCAM was present in contact with GnRH and β -endorphin neurons when the neuropeptide secreted by that population is required for the timing of seasonal breeding activity. Kisspeptin neurons were more numerous in ewes having an active gonadotrope axis suggesting that kisspeptine is one of the last element activated by the increase of the duration of melatonin secretion.

All together, our results suggest that a change of photoperiod alone is essential to induce morphological reorganizations in hypothalamic regions necessary for the seasonal synchronization of sheep reproduction. Plasticity affects specific neuronal populations.

Key words: Ewes, seasonal reproduction, photoperiod, hypothalamus, PSA-NCAM, GnRH, neuromodulators.