UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR INRA-CNRS-Université de Tours Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Equipe : Microenvironnement et dynamique des réseaux neuroendocrines

THÈSE présentée par : Lyes DEROUICHE

soutenue le : **02 février 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

Exposition développementale à l'éthinylœstradiol et fonction de reproduction chez la souris : e*ffets neuroendocrines et comportementaux*

THÈSE dirigée par :

M^me^ DUITTOZ Anne	Professeur, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M^me^ MHAOUTY-KODJA Sakina	Directeur de recherche, CNRS-UPMC Paris
M^me^ PARENT Anne-Simone	Professeur, Université de Liège

JURY :

M^me^ DUITTOZ Anne	Professeur, université François – Rabelais de Tours
M^me^ MHAOUTY-KODJA Sakina	Directeur de recherche, CNRS-UPMC Paris
M^me^ PARENT Anne-Simone	Professeur, Université de Liège-Belgique
M^me^ PILLON Delphine	MCU, Université François-Rabelais de Tours
M. SPEZIA François	Responsable de département, CiToxLab Evreux
M. VOURC'H Patrick	PU-PH, Université François- Rabelais de Tours

A tous ceux qui m'ont soutenu dans cette aventure

« Savoir pour prévoir, afin de pouvoir »

Auguste Comte

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury de ma soutenance d'avoir accepté d'évaluer mon travail, Sakina MHAOUTY-KODJA et Anne-Simone PARENT d'avoir accepté d'en être rapporteurs et François SPEZIA et Patrick VOURC'H en tant qu'examinateurs.

J'adresse mes remerciements à Florian GUILLOU et Thierry MAGALLON pour m'avoir accueilli durant ces trois années de thèse au sein de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans des conditions favorables.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Déborah BOURC'HIS, Matthieu KELLER et Éric PAILLOUX pour leurs conseils avisés.

J'adresse mes sincères remerciements Anne DUITTOZ et Delphine PILLON qui m'ont accompagné et encadré durant cette aventure.

Delphine, merci de m'avoir fait confiance et cru en moi, de m'avoir initié à la recherche et de m'avoir accompagné dès mes premiers pas dans la recherche en tant que stagiaire de M1 puis de M2. Merci de m'avoir inculqué le sens de la rigueur et de m'avoir encouragé et poussé au meilleur de moi-même. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de faire de l'enseignement et de m'avoir conseillé et accompagné dans cette tâche si difficile qui est l'enseignement. Enfin merci d'avoir pris le temps pour me relire et pour vos consciencieux conseils et corrections. En tant que votre premier thésard, j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et de vos exigences.

Anne, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude en votre qualité de directeur de cette thèse et pour votre grande implication dans ce travail. Merci pour vos conseils, vos encouragements et vos relectures et corrections sur mes écrits. Merci de m'avoir fait profiter de votre expertise dans la culture des placodes olfactives et de m'avoir initié aux joies de la dissection ! Merci aussi de m'avoir fait confiance pour les enseignements de neuroendocrinologie et pour vos conseils pédagogiques. Enfin, merci pour votre enthousiasme, votre énergie positive et vos encouragements qui ont su me redonner du courage à aller toujours de l'avant.

Je tiens à remercier encore Matthieu KELLER pour son implication dans ma thèse, de m'avoir initié aux tests de comportement et pour ses conseils et son expertise qu'il a pu m'apporter dans l'étude du comportement chez la souris.

Merci également d'avoir pris le temps de répondre à chacune de mes sollicitations et d'avoir toujours apporté une réponse ou un conseil à mes questions. Enfin merci beaucoup pour ta précieuse relecture de mon introduction.

La thèse c'est aussi un travail d'équipe, je tiens à remercier les membres l'équipe MiDyNNet de m'avoir accueilli parmi eux et de m'avoir accompagné tout au long de ce parcours. Merci à Pascal VAUDIN, Martine MIGAUD et Isabelle FRANCESCHINI pour tous vos conseils, vos encouragements et vos attentions à mon égard. Merci aussi pour vos relectures et vos remarques pertinentes lors de réunions ou de discussions entre deux portes… Je remercie également Martine BATAILLER pour ses conseils nombreux en immunohistochimie et en culture cellulaire et pour sa bonne humeur, ses encouragements et sa générosité (en divers anticorps mais aussi pour ses délicieux Yaourts faits maison…!). Je remercie également Caroline CHARVET, Yves TILLET, Gilles BRUNEAU et Emmanuel MOYSE pour leurs conseils et leur gentillesse. Merci à Marie-Line CATEAU pour les coupes en paraffine et aussi pour ta bonne humeur, tes récits sur l'histoire de France, les Celtes, les Gaulois, Jeanne d'Arc…..

Merci à Mariangela MARTINI pour son aide dans les tests de comportement, à Camille TORCHY pour son aide lors de son stage de M1 et à Maryse MEURISSE pour tous ses conseils et pour la formation au logiciel Mercator.

A Lucile (je préfère Lulu) et Caro, votre arrivée dans l'équipe un an après la mienne a changé le rythme de mes journées ! Lulu, avec ta bonne humeur, Caro et ta joie de vivre, vous avez su égailler mes journées et bien me faire rire. Merci pour les sorties afterwork, restos, les soirées et aussi de m'avoir écouté et soutenu… et merci aussi pour vos relectures. Je vous souhaite de belles thèses, plein de résultats et plein de beaux articles. Caro, bon courage pour les enseignements (tu les as voulus à tout prix tu les as eus, bravo !).

Merci à Adrien et Gwen qui ont partagé le bureau avec moi. Adrien merci pour tes délicieuses créations culinaires et pour ta bonne humeur au quotidien, je te souhaite plein de belles choses dans ton aventure à Sainte-Hyacinthe. Gwen merci pour ton soutien et ta gentillesse et bon courage pour la suite de ton parcours.

Aux anciens thésards, Elodie, Sarah, Achraf, Daphné, Anthony, Mélanie et Camille, merci pour votre accueil et vos conseils. Camille, merci pour tous tes conseils, pour tes encouragements et pour ton écoute…

Merci aux différentes personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse, au personnel de l'animalerie, Claude CAHIER, Deborah CRESPIN et Marine CIROT pour les soins aux souris, c'était très agréable de travailler avec vous. Merci aux informaticiens Jean-Yves et Julien pour leur disponibilité, à Marie-

Françoise Pinault (pour les fichiers PDF-word….). Merci également à Didier Lomet, Ghislaine Ploux et à Sophie Marie pour leurs nombreux et précieux sevices.

Je remercie aussi mon entourage et mes amis en dehors du labo, qui ont contribué par leur soutien au bon déroulement de cette thèse. A Arnaud, Kevin, Clément, Stécie, Virginie, Kevinou et Amaëlys. Merci pour toutes ces soirées et discussions politico-économico-scientifiques, aux discussions destination post-doc aux sorties restos, cinés… ☺

Enfin, parce que c'est grâce eux que je suis arrivé là, je remercie chaleureusement ma famille. En premier lieu à mes parents qui m'ont appris à aimer les études et qui ont toujours cru en moi, merci pour leur aide et leur soutien inconditionnels. Je remercie profondément ma grand-mère qui a toujours suivi mon évolution de très près. Merci à mes sœurs et mon frère, j'espère avoir été à la hauteur de vos espérances, je vous souhaite beaucoup de réussite et plein de belles choses. Je tiens également à remercier tous ceux qui m'ont aidé ou soutenu dans mon aventure lors de mon arrivée en France pour continuer mes études, mes tantes et leurs familles de m'avoir gentiment accueilli et accompagné lors de mes premiers pas ici.

Résumé

L'objectif de ma thèse s'inscrit dans un programme qui vise à identifier les effets neuroendocrines des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction. L'éthinylœstradiol (EE2) est un œstrogène pharmacologique largement utilisé dans les contraceptifs oraux. L'objectif de notre étude était d'une part d'identifier, chez la souris, les conséquences *in vivo* d'une exposition chronique à des doses faibles d'EE2 pendant les phases critiques de développement et de maturation du cerveau (*in utero*, périnatale et péri-pubertaire) sur les fonctions neuroendocrines et les conséquences physiologiques et comportementales chez les individus à l'âge adulte et leur descendance. D'autre part, en utilisant des modèles de cultures *in vitro,* notre deuxième objectif était d'identifier les mécanismes potentiels impliqués dans la perturbation des circuits neuronaux pendant leur développement.

Dans une expérimentation *in vivo*, nous avons exposé des souris par voie orale à des doses environnementale (0,1 µg / kg / jour) ou pharmacologique (1 µg / kg / jour) d'EE2 dilué dans l'eau de boisson à partir de la deuxième moitié de leur développement *in utero,* de manière chronique jusqu'à la puberté. À l'âge adulte, différents paramètres physiologiques et comportementaux et neuro-anatomiques ont été mesurés. Chez les femelles exposées à l'EE2, nos résultats ont mis en évidence un avancement de l'âge de l'ouverture vaginale, une perturbation de la cyclicité ovarienne, une perturbation des comportements socio-sexuels, une augmentation du taux d'anxiété et une perturbation du réseau neuroendocrine à GnRH. Chez les mâles, l'EE2 induit un comportement sexuel exacerbé, une perturbation du réseau de neurones à GnRH et des neurones à calbindine de l'aire pré-optique médiane (APOm). Pour tester la transmission éventuelle de ces effets aux générations suivantes, nous avons croisé des animaux de la première génération (F1) et obtenus les individus F2, F3 et F4. De manière surprenante, les mâles F2 à F4 présentaient également un comportement sexuel exacerbé et une perturbation de la neuro-anatomie de l'APOm. Ces résultats montrent qu'une exposition à l'EE2 pendant le développement altère la fonction neuroendocrine et les comportements de la reproduction et met en évidence une transmission transgénérationnelle de ces effets.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons utilisé des cellules souches neurales embryonnaires (CSNe) de souris en culture en présence d'EE2 pour évaluer ses effets sur les différents processus impliqués dans le neuro-développement. Des cellules issues de striata, de diencéphale ou de placodes olfactives embryonnaires ont

été mises en culture par différentes méthodes appropriées, en présence ou non d'EE2. Les résultats principaux de ces expériences ont montré que l'EE2 est capable de moduler l'apoptose, le cycle cellulaire et la différenciation neuro-gliale des progéniteurs des CSNe. Ces résultats suggèrent une différence de sensibilité à l'EE2 selon le stade de développement et la région de provenance de ces cellules. Les mécanismes de régulation du développement de ces cellules par l'EE2 seraient donc différents en fonction du stade de développement et de l'origine des CSNe.

L'ensemble de ces résultats met en évidence un spectre large d'effets suite à une exposition développementale chronique à l'EE2. Ces effets sont capables d'influencer de manière irréversible différents paramètres de la vie reproductrice adulte des individus exposés et de leurs descendances. Actuellement, les mécanismes d'action sur le neuro-développement, les mécanismes de maintien de ces effets à long terme et les mécanismes de transmission transgénérationnelle de certains effets sont loin d'être connus. A terme des réponses à ces questions sont indispensables dans le but de mieux appréhender et de prévenir les effets de l'EE2 et d'autres perturbateurs endocriniens sur la santé et la reproduction.

Abstract

The aim of my thesis is part of a program aiming to identify neuroendocrine effects of endocrine disruptors on reproductive function. Ethinylestradiol (EE2) is a pharmacological estrogen widely used in oral contraceptives. The objective of our study was in one hand identifying in vivo consequences of chronic exposure to low doses of EE2 during critical phases of mouse brain development (in utero, perinatal and peripubertal) on reproductive neuroendocrine, physiological and behavioral outcomes in adult animals and their progeny. On the other hand, using an *in vitro* approach, our second objective was to identify the mechanisms involved in the disruption of neural circuits during development.

In the *in vivo* experiments, we exposed mice chronically from the second half of their *in utero* development until they achieved puberty at doses of 0.1 µg/kg/day or 1 µg/kg/day of EE2 diluted in their drinking water. In adulthood reproductive physiology, behaviors and neuroanatomy were studied. In females EE2 advanced age of the vaginal opening, disrupted ovarian cyclicity and socio-sexual behavior, increased anxiety level and disrupted the neuroanatomy of GnRH neuroendocrine network. In males, EE2 induced an exacerbated sexual behavior, a disruption of the GnRH neurons neuroanatomy and the sexually dimorphic calbindin neurons of the medial preoptic area (mPOA). To test the potential transmission of these effects to future generations we crossed the animals of the first generation (F1) to obtain F2, F3 and F4. Surprisingly, F2 to F4 males also exhibited an exacerbated sexual behavior and a disruption of the neuroanatomy of the mPOA. These results show that EE2 induced lasting effects on reproductive neuroendocrine and behavioral functions and some effects of EE2 were transgenerationally transmitted.

In the second part of my thesis we used mice embryonic neural stem cells (eNSC) to evaluate effects of EE2 on neurodevelopment. Cells from striata, diencephalons or embryonic olfactory placode were cultured with various appropriate methods and supplemented or not with EE2 and different parameters were evaluated. Results of these experiments showed that EE2 modulated apoptosis, cell cycle and neuro-glial differentiation of eNSC progenitors. We highlighted EE2 effects are influenced by the developmental stage and the neuroanatomical origin of

eNSC. Thus, action mechanisms on EE2 on these cells would be different depending on developmental stage and the analyzed cell type.

Altogether these results highlighted broad spectrum effects of a chronic exposure to EE2 during development. These effects may sustainably influence different parameters of the adult reproductive function of an exposed individual and his progeny. Currently, the cellular and molecular mechanisms of action of EE2 during development, the mechanisms of induction of these enduring effects and the mechanisms of the transgenerational transmission remain to be determined.

Ultimately resolving these issues is essential in order to prevent the effects of EE2 and other endocrine disrupting chemicals on health and reproduction.

Sommaire

Remerciements 3
Résumé 6
Abstract 8
Liste des figures 13
Liste des tableaux 15
Liste des annexes 16
Liste des abréviations principales 17
AVANT-PROPOS 20
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 25

I.INTRODUCTION GENERALE 25

II.REGULATION NEUROENDOCRINE DE LA FONCTION DE REPRODUCTION 28
A- Ontogenèse des neurones à GnRH : exemple du modèle souris 29
B- L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (axe HHG) 32
C- Le réseau de neurones à GnRH 35
D- Le réseau de neurones à kisspeptine 38
E- Rétrocontrôle par les stéroïdes sexuels 39
F- La sécrétion pulsatile du GnRH et sa régulation 42
G- Pulsatilité de GnRH et conséquences physiologiques : déclenchement de la puberté et régulation des cycles 45

III- DIFFERENCIATION SEXUELLE DU CERVEAU ET COMPORTEMENTS REPRODUCTEURS 48
A- La théorie organisationnelle/activationnelle 48
B- Rôle de l'aromatase cérébrale dans la différenciation sexuelle du cerveau 50
C- Masculinisation et déféminisation du cerveau mâle par l'E2 50
D- Différenciation sexuelle femelle 51
E- Structures hypothalamiques sexuellement dimorphiques 51
G- Mécanismes d'action de l'E2 57

IV- LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS 62
A- Généralités 62
B- Origine et sources de contamination par les PEs 62
C- Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires potentiels des PEs 66
D- Effets des faibles doses et notion de courbe dose-réponse non monotone 68
E- Période de sensibilité et conséquences à long-terme 71
F- Effets transgénérationnels des perturbateurs endocriniens 71
G- L'éthinylœstradiol (EE2) 74

V- PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET RESEAUX NEUROENDOCRINES 77
A- Perturbateurs endocriniens et réseau de neurones à GnRH 78
B- Perturbateurs endocriniens et circuits hypothalamiques sexuellement dimorphiques 79
C- EE2 et réseaux neuroendocrines de la reproduction 81

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE 84

I- HYPOTHESE DE TRAVAIL 85

II- OBJECTIFS DE LA THESE 89
A- Etude des effets de l'EE2 sur le réseau de neurones à GnRH 90
B- Etudes des effets de l'EE2 sur la physiologie de la reproduction 91
C- Etude des comportements 91
D- Effets de l'EE2 sur les noyaux sexuellement dimorphiques 91
E- Transmission transgénérationnelle des effets de l'EE2 92
F- Mécanismes de perturbation neuroendocrine 92

CHAPITRE I : Exposition développementale à l'EE2, conséquences sur la fonction de reproduction chez la femelle et sa descendance 93

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE 93

II- ARTICLE I : L'EXPOSITION DEVELOPPEMENTALE A L'ETHINYLŒSTRADIOL PERTURBE LA PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION, LE RESEAU DE NEURONES A GNRH ET LES COMPORTEMENTS CHEZ LA SOURIS FEMELLE 94
A- Protocole expérimental 94
B- Résultats 95

II- EFFETS DE L'EXPOSITION DEVELOPPEMENTALE A L'EE2 CHEZ LES FEMELLES F2 109
A- Effets de l'EE2 sur la physiologie de la reproduction femelle 109
B- Effet de l'EE2 sur les comportements de la reproduction 111

III- CONCLUSION CHAPITRE I 113

Chapitre II : Exposition développementale à l'EE2, conséquences sur la fonction de reproduction chez le mâle et sa descendance 115

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE 115

II- ARTICLE II : L'EXPOSITION DEVELOPPEMENTALE A L'ETHINYLŒSTRADIOL AFFECTE LE COMPORTEMENT SEXUEL D'UNE MANIERE TRANSGENERATIONNELLE CHEZ LA SOURIS MALE 116
A- Protocole expérimental 116

B- Résultats 117

III- MECANISMES DE TRANSMISSION DES EFFETS DE L'EE2 135

IV- CONCLUSION CHAPITRE II 137

Chapitre III : étude in vitro des effets de l'éthinylœstradiol sur le développement neural 139

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE 139

II- EFFETS DE L'EE2 SUR LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES SOUCHES NEURALES EMBRYONNAIRE MURINES 140

A- Introduction 140
B- Matériel et méthodes 142
C- Résultats 149
D- Discussion 159
E- Conclusion 164

III- EFFET DE L'EE2 SUR LE DEVELOPPEMENT DES NEURONES A GNRH *IN VITRO* 168

A- Introduction 168
B- Méthode 169
C- Résultats 172
C- Discussion 174

IV- CONCLUSION CHAPITRE III 177

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 178

I- Fenêtre de sensibilité développementale et conséquences à long terme 180

A- La période périnatale 180
B- La période péri-pubertaire 183

II- Transmission multigénérationnelle et transgénérationnelle des effets de l'EE2 .. 183

III- Conclusions 186

Références bibliographiques 188

Résumé courts 212

Liste des figures

Figure 1: Courbe modélisée du déclin des concentrations spermatiques dans différentes régions du monde en fonction des années. D'après Swann et al. 2000. 9
Figure 2 : Ontogenèse des neurones à GnRH-1 chez la souris. 29
Figure 3 Facteurs impliqués dans la migration et le guidage des neurones à GnRH lors de leur trajet de migration de la placode olfactive à l'aire pré-optique. 31
Figure 4 : Physiologie de l'axe gonadotrope. 33
Figure 5 : Structure du gène GnRH-1 et du peptide GnRH 34
Figure 6 : Neuroanatomie des réseaux neuroendocrines hypothalamiques GnRH et kisspeptine. 37
Figure 7 : Evénements neuroendocrines impliqués dans la synchronisation des neurones à GnRH. 40
Figure 8 : Mécanismes neuroendocrines de déclenchement de la puberté. 46
Figure 9 : Effets de la castration et du traitement à la testostérone en période périnatale sur la différenciation du cerveau mâle et femelle d'après les travaux de Phoenix et al 1959) 47
Figure 10 : Différenciation sexuelle du cerveau chez les rongeurs pendant le développement 49
Figure 11 : Structure reconstituée en trois dimensions du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique (SDN-POA) chez le mâle et la femelle 52
Figure 12: Noyau sexuellement dimorphique fortement marqué par la calbindine-d28k chez le rat Sprague-Dawley. 53
Figure 13 : Mécanismes cellulaires et moléculaires de différenciation sexuelle des noyaux hypothalamiques chez les rongeurs. 56
Figure 14 : Modèle de travail de l'action de l'œstradiol (E2) sur la mise en place du dimorphisme sexuel dans l'aire pré-optique (APO). 59
Figure 15 : Sources de contamination par les perturbateurs endocriniens œstrogéno-mimétiques. 63
Figure 16 : Mécanismes d'action géniques des hormones stéroïdes gonadiques 67
Figure 17 : Calcul des valeurs toxicologiques de référence. 70
Figure 18 : Structures de l'EE2 et de l'E2. 73
Figure 19 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail 87
Figure 20 : Effet de l'EE2 sur l'ontogenèse du réseau de neurones à GnRH chez l'embryon de souris 89
Figure 21 : Effets de l'EE2 sur la physiologie de la reproduction des femelles F2 110

Figure 22 : Préférence socio-sexuelle des femelles F2. 112
Figure 23: Protocole de croisement des animaux pour identifier les mécanismes de transmission des effets de l'EE2 136
Figure 24 : Tests de comportement sexuel des mâles F'2. 137
Figure 25: Protocole expérimental de culture de cellules souches embryonnaires de souris : 144
Figure 26 : Photographies en microscopie confocale d'un marquage TUNEL (vert) colocalisé avec un marquage DAPI (bleu). 149
Figure 27 : Comptage et classification des neurosphères après quatre jours de croissance en présence d'EGF 150
Figure 28 : Effet de l'EE2 sur l'apoptose pendant la différenciation des progéniteurs neuraux de diencéphale et de striata. 152
Figure 29 : Effet de l'EE2 sur la division cellulaire pendant la différenciation des progéniteurs neuraux de diencéphale et de striata. 153
Figure 30 : Phénotype des cellules en différenciation à 7, 14 et 21DIV 155
Figure 31 : Double marquage βIII-tubuline, GFAP à 7DIV en condition contrôle 156
Figure 32 : Photographies confocales montrant la morphologie des cellules βIII-tubuline immunoréactives à 21DIV en condition contrôle 156
Figure 33: Photographies confocales de cultures de diencéphale à 7DIV dans les différentes conditions de culture. 157
Figure 34 : Effet de l'EE2 sur la différenciation cellulaire à différents stades de développement. 158
Figure 35 : Photographies confocales de culutres issues de striata à 14DIV dans différentes conditions de culture 160
Figure 36 : Photogphies confocales d'un triple marquage βIII-tubulin, GFAP et Ki-67 à 7DIV en condition contrôle 166
Figure 37 : Etapes de dissections d'explants d'embryons de souris 170
Figure 38 : Réseau de neurones immunoréactifs à la GnRH à 7DIV. 173
Figure 39 : Marquage GnRH sur deux plans focaux situé à proximité de la limite de l'explant 173
Figure 40 : Double marquage GnRH-PSA-NCAM sur une placode fixée à 7DIV. 174
Figure 41 : Schéma récapitulatif des résultats des expériences menées in vivo 179

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de perturbateurs endocriniens agonistes ou antagonistes des récepteurs aux œstrogènes ou androgènes..... 64

Tableau 2 : Exemples de concentrations en EE2 dans l'eau dans différentes régions du monde..... 74

Tableau 3 : Concentration en EE2 dans les sédiments d'eaux douces et d'eau de mer dans différents régions du monde 76

Tableau 4 : Liste des études menées récemment sur les effets de l'EE2 sur les réseaux neuroendocrines hypothalamiques de la reproduction 83

Tableau 5 : Comportement maternel des femelles F2 111

Tableau 6 : Anticorps utilisés pour la caractérisation phénotypique des cellules. ... 146

Tableau 7 : Protocole de répartition des effectifs pour chaque dissection de placodes 171

Tableau 8 : Comptages des cellules GnRH et PSA-NCAM immunoréactives (ir).... 174

Liste des annexes

Annexe 1 : Composition du milieu de culture SFM……..211

Annexe 2 : Poster présenté au colloque de la société française des neurosciences. Montpellier, mai 2015…….212

Annexe 3 : Poster présenté au colloque joint des sociétés française et anglaise de neuroendocrinologie. Lille, septembre 2015……...213

Liste des abréviations principales

µg	Microgramme	E2	Œstradiol 17-β
AhR	Récepteur Aryl hydrocarbon	E3	Estriol
AR	Récepteur aux androgènes	EE2	Ethinylœstradiol
AVPV	Aire Ventriculaire antéro-ventrale	EM	Éminence Médiane
APO	Aire pré-optique		
BAX	Bcl-2 associated protein	ERE	Élément de réponse à l'E2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	ERα, β	Récepteur aux œstrogènes de type α ou β
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	ESR1	Gène codant ERα
BNSTp	Noyau du lit de la strie terminale, partie postérieure	ESR2	Gène codant ERβ
BPA	Bisphénol A	F1	Génération F1
Calb-D28k	Cabindine D-28k	FSH	Follicle Stimulating Hormone
DDT	Dichlorodiphénytrichloroéthane	GABA	Acide γ-aminobutyrique
DES	Diéthylstilbestrol	GFP	Green Fluorescent Protein
DOHaD	Developmental origins of health and disease	GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
E	Jour embryonnaire	GnRH-1	gène codant la GnRH
E1	Estrone	GPR30	Récepteur membranaire aux œstrogènes (G protein-coupled receptor)

GPR54	G protein-coupled receptor 54
HHG	Axe Hypothalamo-hypophyso-gonadique
HRE	Elément de réponse aux hormones
IHC	Immunohistochimie
jpn	Jour post natal
Kg	Kilogrammes
kiss1R	Récepteurs à la kisspeptine
LH	Luteinising Hormone
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect level
MTX	Méthoxychlor
NA	Noyau Arqué
NCAM	Neural Celle Adhesion Molecule
NFkB	Nuclear factor-kappa B
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
NOAEL	No-observed-adverse-effect level
NSD-APO	Noyau sexuellement dimorphique de l'APO
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OVLT	Organe Vasculaire de la Lame Terminale.
PCB	Polychlorobiphényle
PEs	Perturbateurs endocriniens.
PGE2	Prostaglandine E2
RP3V	Noyau para-ventriculaire Pré-optique.
SL (v)	Septum latéral (ventral).
SRY	Sex-determining Region of Y chromosome
T	Testostérone
VMN	Noyau Ventro-médian

AVANT-PROPOS

Au cours des cinquante dernières années, la pollution environnementale causée par le développement industriel et l'explosion de l'utilisation des produits chimiques (pesticides, herbicides, agents plastifiants, molécules pharmacologiques, etc.) et leurs conséquences délétères sur la santé, ont suscité un intérêt grandissant. Dès 1962, Rachel Carson, dans son livre intitulé « Silent Spring » publié aux États-Unis, a rapporté les effets désastreux d'une utilisation incontrôlée des pesticides et herbicides comme le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) sur la faune (oiseaux et poissons) et sur l'Homme. Ces travaux remarquables sont restés dans l'ombre pendant plusieurs années, sans que les professionnels de la santé et les pouvoirs publics ne s'en préoccupent sérieusement.

Ce n'est qu'à partir des années 1990s qu'une prise de conscience réelle du danger de la pollution sur la santé humaine a pu se forger une place considérable suite à la publication de plusieurs rapports et études scientifiques sur l'impact des polluants qualifiés de perturbateurs endocriniens (PEs). La notion de PE a été introduite pour la première fois en 1991 lors d'une conférence à Wingspread (Wisconsin ; USA) par Theo Colborn, pionnière dans la recherche sur les PEs, qui a révolutionné la recherche en toxicologie grâce à ses travaux de grande ampleur mettant en lien la pollution par certaines molécules chimiques et leur interaction avec le système hormonal animal et humain (Colborn et al., 1993). Cinq ans plus tard, Theo Colborn et ses collaborateurs ont publié un livre sous le titre « Our Stolen Future » préfacé par Al Gore, vice-président de l'époque des Etats-Unis d'Amérique. Cela témoigne du fort impact qu'aura plus tard cet ouvrage et de la prise de conscience concernant cette problématique au plus haut niveau dans l'opinion publique et politique. Ce livre, traduit dans quinze langues, a été une véritable révolution dans le domaine de la toxicologie, il a permis de mettre en lumière les PEs et leurs effets potentiels pendant le développement utérin, et leurs conséquences sur la santé humaine à l'âge adulte. Dans ce livre, les auteurs ont défini les PEs comme des molécules capables d'interagir avec le système hormonal et perturber le développement normal, leurs effets, parfois indétectables pendant des années, voire des décennies après l'exposition, sont capables d'altérer le système immunitaire, la fertilité, le comportement et la cognition.

AVANT-PROPOS

Les débuts d'utilisation des stéroïdes de synthèse remontent aux années 1940s dans l'industrie agroalimentaire, dans le but d'optimiser les conditions d'élevage (régulation des cycles des chaleurs, amélioration de la productivité des élevages). Par la suite, des composés comme le diéthylstilbestrol (DES), l'éthinylœstradiol (EE2) ou le mestranol ont été développés comme agents contraceptifs ou de traitement de certains désordres pendant la grossesse chez la femme (Millen and Schenck, 1947, Birnberg et al., 1952, Walker, 1964). Chez l'humain, l'un des cas avéré de perturbation endocrinienne a été décrit à partir des années 1970s sur les effets du DES ou Distilbène, prescrit entre 1948 et la fin des années 1970s pour prévenir les fausses couches. Cette molécule, présentée comme un remède miracle pour prévenir les complications de la grossesse, s'est avérée particulièrement dangereuse pour le fœtus dont la mère avait été traitée au DES.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré un lien entre la prise du DES et l'apparition de malformations congénitales, de problèmes de fertilité et de cancers chez les enfants mais aussi chez les petits enfants des mères traitées. Ces effets dramatiques ont été aussi observés en laboratoire, grâce à des modèles animaux reproduisant l'exposition développementale à cette molécule (McLachlan et al., 1975). Il a été estimé que cinq à dix millions de femmes aux USA (Marty et al., 2011) et environ cinq cent mille femmes en France ont été traitées au DES (Fenichel et al., 2015). Suite aux premiers signes d'alerte sur les effets de cette exposition, observés au début des années 1970's, la FDA (Food and Drug Administration) a recommandé aux médecins d'arrêter la prescription de cette molécule pour les femmes enceintes. En France, le Distilbène n'a été officiellement proscrit pour les femmes enceintes qu'en 1977. En 1978, l'enquête de Brackbill a révélé que cette molécule n'a aucun effet bénéfique pendant la grossesse, et serait même responsable de cas d'accouchements prématurés. Les conséquences de cette exposition de plusieurs millions de personnes à travers le monde ne se sont pas limitées aux femmes exposées et à leur descendance immédiate. En effet, les études épidémiologiques actuelles mettent en évidence une relation de cause à effet du traitement chez la descendance à la troisième génération de femmes ayant pris du DES pendant leur grossesse (Clement et al., 2014).

De nos jours, l'hypothèse de l'origine développementale des dysfonctionnements observés chez l'adulte est largement admise par la communauté scientifique. En 2012, un rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS)

concernant l'état de l'art sur les PEs, rédigé par des experts pour le Programme Environnement des Nations Unies et de l'OMS, a pointé du doigt le fait que la totalité de la population mondiale et de la faune sauvage sont exposés aux PEs, qu'il existe un manque évident d'études épidémiologiques sur l'éventuel lien entre les PEs et les maladies liées au système endocrinien telles que le cancer du sein, le diabète et l'obésité. Ce rapport a aussi mis l'accent sur les effets d'une exposition aux PEs pendant le développement fœtal, périnatal, l'enfance et jusqu'à la puberté, qui sont des fenêtres de sensibilité accrues et qui seraient à l'origine des maladies à apparition tardive et probablement à la transmission de ces effets sur plusieurs générations. La thématique de l'étude des PEs pendant le développement s'inscrit dans un concept plus général actuellement connu sous le nom de DOHaD pour Developmental Origins of Health and Diseases ou « origines développementales de la santé et des maladies ». Ce concept regroupe l'étude de divers facteurs environnementaux pendant le développement, tels que la nutrition, la pollution, le stress, les interactions sociales de l'individu avec son entourage qui pourraient avoir un impact durable sur l'individu lui-même et parfois se transmettre à sa descendance sur plusieurs générations.

Les enjeux scientifiques actuels dans l'étude des effets des PEs se déclinent en différents points essentiels qui permettraient de comprendre et de prévenir l'effet néfaste de ces molécules sur la santé. En effet, de nos jours, l'exposition aux PEs est devenue ubiquiste et peut survenir à tout moment pendant la vie de l'individu. De plus, les effets de mélange de plusieurs molécules, des faibles doses et du caractère chronique de l'exposition pendant les phases de développement sensibles sont autant de points qui restent à clarifier. A terme, tous ces paramètres nous permettraient d'établir une relation de cause-à-effet, et de comprendre les mécanismes de transmission de ces effets aux générations futures.

Parmi les molécules qui présentent un risque avéré pour la santé humaine et celle des animaux sauvages, on trouve les œstrogènes naturels et synthétiques. L'éthinylœstradiol (EE2), largement utilisé dans la pilule contraceptive à travers le monde, est excrété par le corps, avec les œstrogènes naturels (estrone (E1), œstradiol (E2) et œstriol (E3)) dans l'environnement. Ces composés agissent par les mêmes voies de signalisation et peuvent donc constituer un risque réel si leur présence dans l'environnement n'est pas contrôlée. De plus, l'EE2 possède une activité

œstrogénique beaucoup plus puissante que l'E1, l'E2 et l'E3 et son élimination par les processus conventionnels de traitement des eaux usées s'est avérée inefficace. En 2012, la Commission Européenne a publié un rapport proposant d'ajouter l'EE2 à la liste des substances à surveiller en priorité dans le but d'une régulation complète à l'horizon de 2027. Ces dispositions soulignent l'importance d'une prise de conscience de l'impact de cette substance sur la santé et la nécessité de comprendre quels sont les effets et les mécanismes d'actions sur la santé.

L'objectif de cette thèse s'inscrit dans la problématique des PEs œstrogénomimétiques pouvant interagir avec l'organisme en développement et les conséquences de cette exposition sur les individus à l'âge adulte et leur descendance. L'étude des effets de ces molécules telles que l'EE2, sur les réseaux neuroendocrines et les comportements reproducteurs constitue un concept émergent qui pourrait contribuer à expliquer certains troubles de la reproduction, tels que la baisse de la qualité du sperme et les problèmes de la fertilité observés au cours des dernières décennies.

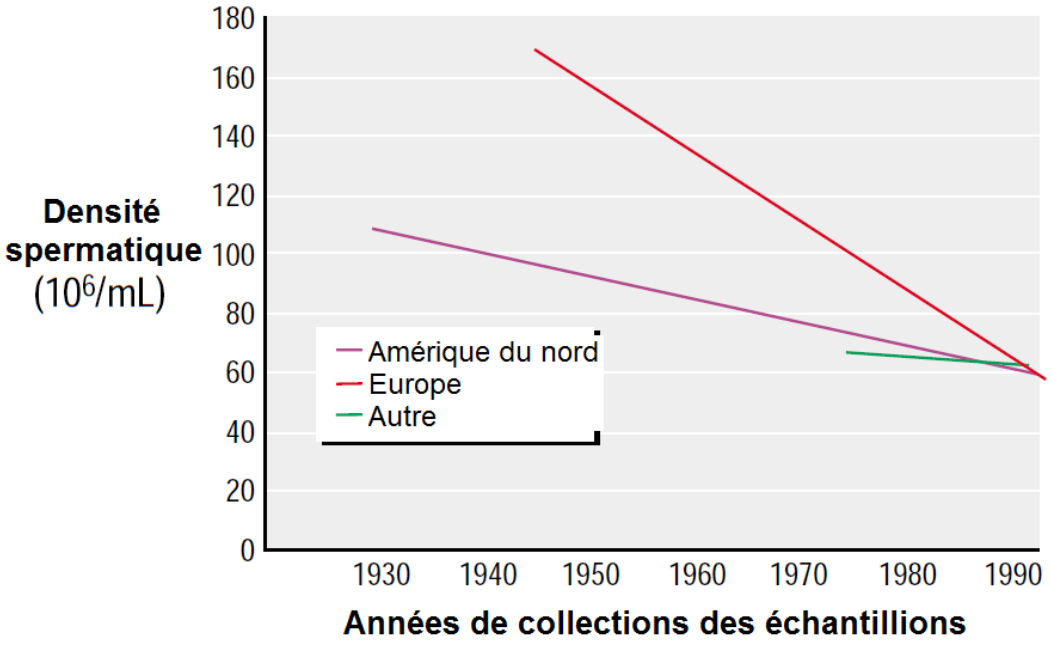


Figure 1: Courbe modélisée du déclin des concentrations spermatiques dans différentes régions du monde en fonction des années. D'après Swann et al. 2000.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION GENERALE

La survie de toute espèce animale, y compris l'espèce humaine, dépend impérativement du bon déroulement de la fonction de reproduction chez les deux partenaires sexuels. L'équilibre des interactions socio-sexuelles, un fonctionnement physiologique normal et une régulation hormonale et centrale adéquates sont les trois paramètres indispensables et complémentaires permettant l'interaction avec l'environnement naturel, le maintien de la fertilité de l'espèce et ainsi sa survie. Un environnement naturel en équilibre (lieu de vie, interactions sociales, populations, climat) est donc un facteur primordial et essentiel auquel tout être vivant s'est acclimaté convenablement par des interactions comportementales, physiologiques et génétiques appropriées qui lui permettent d'optimiser ses chances de survivre et de se reproduire. La pollution induite par les produits chimiques engendre des variations parfois brutales et présente l'un des facteurs de risque majeurs pouvant interagir, perturber, voire altérer les réponses adaptatives des individus à leurs environnementaux. Certaines de ces molécules chimiques sont capables d'interagir avec le système hormonal et induire des perturbations endocriniennes qui présentent une réelle menace pour la santé de l'Homme, des animaux d'élevage et de la faune sauvage. Ces molécules, qualifiées de perturbateurs endocriniens (PEs), ont été définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « toute substance ou mélange exogène pouvant altérer le système endocrinien et induire des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous) populations ».

Les études épidémiologiques et méta-analyses sur les soixante-dix dernières années révèlent clairement un déclin de la santé reproductrice chez l'humain. En effet, la qualité du sperme chez l'homme, a connu une régression significativement importante entre les années trente et les années quatre-vingt-dix **(Figure 1)** (Carlsen et al., 1992, Swan et al., 2000). D'une façon inquiétante, une corrélation statistiquement significative de ce déclin avec la qualité de l'environnement a été établie par plusieurs études épidémiologiques chez les deux sexes (Hauser and Sokol, 2008, Mendola et al., 2008). L'incidence des cancers testiculaires, les malformations congénitales de l'appareil reproducteur (exemples de la cryptorchidie et de l'hypospadias) ont connu une augmentation significative parmi les populations européennes et nord-américaines (Toppari et al., 1996, Holmes et al., 2008). Les effets

des PEs sur la physiologie de la reproduction ont fait l'objet de nombreuses études qui ont démontré la vulnérabilité des fonctions gonadiques endocrines et exocrines (stéroïdogenèse, ovogenèse, folliculogenèse et spermatogenèse). Cependant, les mécanismes d'action qui sous-tendent ces perturbations sont encore mal connus. Plus récemment, la vulnérabilité des circuits neuroendocrines et neuraux aux PEs, impliqués respectivement dans la régulation des fonctions gonadiques et l'expression des comportements reproducteurs et socio-sexuels, a fait l'objet de plusieurs investigations. Face à ce constat, l'hypothèse avérée de perturbation neuroendocrine évoquée dans plusieurs études scientifiques fait actuellement l'objet de recherche de plusieurs laboratoires (*pour revue,* Trudeau 2011).

Chez les vertébrés, la fonction de reproduction est régie par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (axe HHG). L'hypothalamus est la structure centrale qui contient des réseaux neuroendocrines mis en place pendant le développement intra-utérin, post-natal et juvénile. Certaines régions de l'hypothalamus présentent un dimorphisme sexuel indispensable à l'expression et au maintien des fonctions physiologiques et comportementales spécifiques au mâle ou à la femelle. Cette différence sexuelle dans l'organisation neuroanatomique et neurochimique de l'hypothalamus est mise en place pendant des fenêtres spécifiques du développement, particulièrement la période de fin de gestation et la période post-natale. Pendant ces périodes, les niveaux élevés de stéroïdes sexuels chez le mâle et faibles chez la femelle permettent une imprégnation du cerveau mâle en testostérone et en œstradiol, qui est issu de l'activité aromatase cérébrale, alors que le cerveau femelle se développe en présence de niveaux bas de stéroïdes sexuels (McCarthy, 2008). Pendant cette période de sensibilité accrue, l'exposition aux PEs pourrait interférer et moduler le processus de différenciation sexuelle et induire des modifications permanentes dans le fonctionnement des réseaux sexuellement dimorphiques chez l'individu à l'âge adulte. Ces modifications pourraient engendrer des réponses inadaptées induisant des perturbations physiologiques, comportementales et (neuro) endocrines dont les mécanismes d'action et les conséquences à long terme sur la fertilité sont encore mal connus.

Plusieurs études ont rapporté récemment que l'exposition aux PEs induit des effets non seulement sur les individus exposés, mais que ces effets sont capables de se transmettre à leur descendance sur plusieurs générations par des mécanismes qui impliquent des modifications épigénétiques (Anway et al., 2005, Anway et al., 2008, Walker and Gore, 2011). Au regard de ces constatations alarmantes, de nombreux

chercheurs se sont intéressés à cette problématique et ont voulu développer des méthodes afin d'évaluer les risques sur la santé des organismes et de comprendre les mécanismes et les origines de ces perturbations.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les conséquences de l'exposition développementale à un PE œstrogénomimétique, l'EE2, et les conséquences à long terme sur la fonction reproductrice mâle et femelle adultes et de leur descendance. Le réseau de neurones à GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) constitue le régulateur majeur de l'axe HHG ou axe gonadotrope. L'hypothalamus est la partie du système nerveux central qui joue le rôle d'intégrateur et de régulateur des signaux hormonaux (œstrogènes, androgènes, progestérone) qui lui parviennent des gonades et qui exercent des rétrocontrôles permettant de réguler l'axe HHG. Les circuits neuroendocrines tels que le GnRH pourraient donc être une cible privilégiée des xénobiotiques (œstrogénomimétiques, androgénomométiques) et induire des réponses adaptatives qui peuvent engendrer un stress voire une perturbation endocrinienne dont les conséquences physiologiques à long terme restent à définir. La finalité de ce travail était, d'une part, d'établir et de comprendre les relations de cause à effet suite à une exposition à l'EE2 en menant une approche intégrative permettant de mettre en lien des perturbations neuroendocrines et leurs conséquences physiologiques et comportementales sur la reproduction. D'autre part, nous avons eu comme deuxième objectif de décrire, par des modèles d'études *in vitro*, les cibles cellulaires et moléculaires pouvant être à l'origine de la perturbation de certains réseaux centraux impliqués dans la régulation du comportement et de la physiologie de la reproduction.

Ce manuscrit est axé sur quatre grands volets principaux, les deux premiers sont une introduction bibliographique suivie du contexte et des objectifs de la thèse. Le troisième volet concernera la partie expérimentale dans laquelle seront présentés les résultats des expériences menées. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit concernera la discussion générale des résultats obtenus, les conclusions et les perspectives qui en découlent.

II. REGULATION NEUROENDOCRINE DE LA FONCTION DE REPRODUCTION

Les circuits neuroendocrines qui orchestrent les fonctions gonadiques constituent le régulateur central principal de l'axe gonadotrope (axe HHG). D'une part, la population hypothalamique de neurones à GnRH constitue l'incitateur des évènements endocriniens qui permettent de synthétiser et de secréter les gonadotrophines, lutéinisante LH (Luteinizing Hormone) et folliculostimulante FSH (Follicle Stimulating Hormone) *via* l'action du neuropeptide GnRH. Ce dernier représente l'effecteur principal de l'axe HHG, capable d'atteindre des cibles extra-cérébrales et d'initier l'activation de l'axe hypophyso-gonadique. D'autre part, les populations de neurones à kisspeptine découvertes récemment, jouent un rôle crucial dans l'établissement du dialogue entre les hormones périphériques et le réseau neurones à GnRH. Les neurones à kisspeptine représentent l'intégrateur des signaux physiologiques périphériques et seraient à l'origine de l'activation de la synthèse, de la libération pulsatile de GnRH. Cette pulsatilité est à l'origine de l'organisation des phases du cycle sexuel chez la femelle et la régulation de la gamétogenèse et la stéroïdogenèse chez les deux sexes.

Dans cette partie, je vais aborder de manière détaillée les mécanismes de mise en place des réseaux neuroendocrines qui contrôlent la fonction de reproduction pendant le développement, puis je reviendrai sur les aspects fonctionnels physiologiques qui impliquent ces réseaux chez l'individu à l'âge adulte.

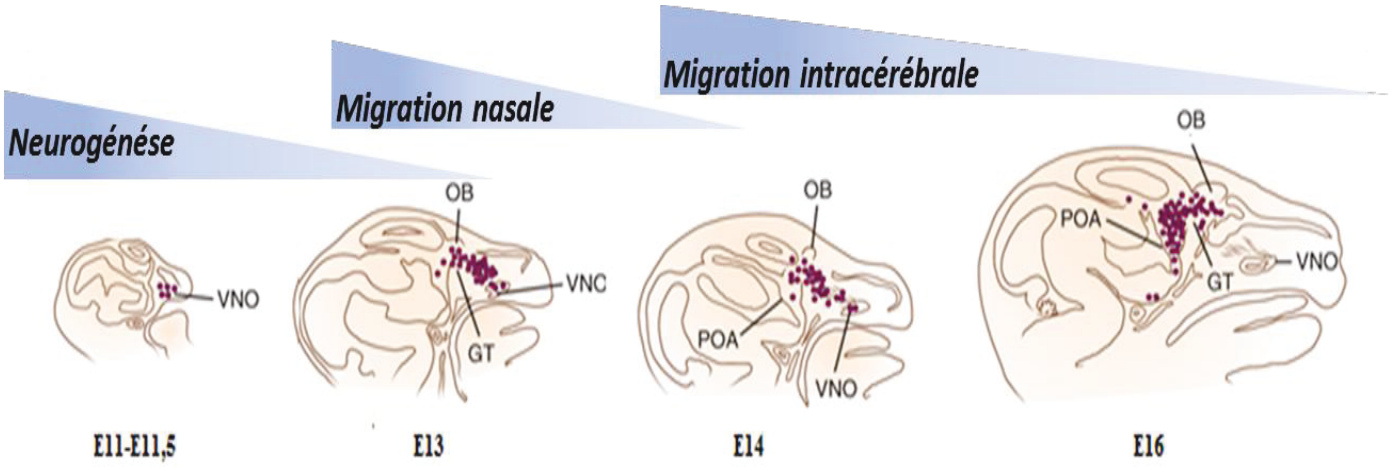


Figure 2 : Ontogenèse des neurones à GnRH-1 chez la souris.

Les neurones à GnRH sont représentés par les points rouges. A 11, 11,5 jours de développement embryonnaire (E11- E11,5), les neurones à GnRH sont localisés dans le bourgeon de l'organe voméronasal (VNO). A E13, le nombre de neurones est plus important, les neurones sont localisés pour la plupart dans le septum nasal, le long des nerfs voméronasaux. A E14, la majorité des neurones sont dans les ganglions terminaux (GT) et entre le cerveau antérieur et l'hypothalamus. A E16, la majeure partie des neurones est dans l'aire pré-optique (POA) et la migration est pratiquement achevée (*d'après* Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989)

A- Ontogenèse des neurones à GnRH : exemple du modèle souris

Les neurones à GnRH présentent la particularité de provenir d'une aire extra-cérébrale pendant le développement embryonnaire. En effet, les premiers neurones qui expriment l'ARNm du gène *GnRH-1* ou qui sont immunoréactifs au peptide GnRH ont été détectés chez la souris à partir de E11 (11ème jour de développement embryonnaire) dans le l'organe voméronasal et dans la paroi médiale de l'épithélium des fosses nasales (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989, Wray et al., 1989) (**Figure 2)**. Ces neurones migrent hors de l'épithélium olfactif le long des nerfs olfactifs et voméronasaux **(Figure 3A)**. La migration nasale suit le trajet de ces nerfs qui passent le long du septum nasal et traversent la lame criblée de l'éthmoïde (structure osseuse qui sépare l'épithélium olfactif des bulbes olfactifs) et entrent dans le bulbe olfactif principal (nerfs olfactifs) et dans le bulbe olfactif accessoire (nerfs voméronasaux) **(Figure 3A,B)**. Par la suite, les neurones entament une phase de migration intra-cérébrale le long des nerfs terminaux qui sont issus des organes voméronasaux. Les

neurones suivent un trajet médial au niveau des bulbes olfactifs puis continuent dans le diencéphale jusqu'à la bande diagonale de broca. Par la suite, ils suivent un trajet plus ventral jusqu'à la lame terminale et l'aire pré-optique (APO) où les neurones à GnRH sont dispersés sous forme d'un continuum rostro-caudal essentiellement entre l'aire septale médiale et l'hypothalamus antérieur.

La migration des neurones à GnRH implique une multitude de facteurs très variés décrits dans la littérature (Wierman et al., 2011). On distingue principalement deux types de molécules, les morphogènes et les facteurs de transcription d'une part, et les neuromédiateurs et les hormones d'autre part (Duittoz and Prévot, 2014) **(Figure 3B)**. Ces facteurs interviennent à différents niveaux pendant la phase de neurogénèse et les phases migratoires nasale et cérébrale des neurones à GnRH. A titre d'exemple, la phase de migration implique des molécules d'adhésion cellulaire comme la NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) et la PSA-NCAM (*Polysialilated*-NCAM) qui permettent une interaction étroite avec les cellules gliales qui co-migrent avec les neurones à GnRH (Geller et al., 2013). Des molécules de types chémokines sont aussi impliquées dans la migration intra-cérébrale comme les sémaphorines (Sema3A essentiellement) et leurs récepteurs spécifiques Neuropiline 1 dont la perte de fonction induit une perturbation de la répartition des neurones à GnRH dans l'APO, et une diminution de l'innervation de l'éminence médiane (EM) chez ces animaux (Hanchate et al., 2012). Le neurotransmetteur GABA et le facteur de croissance SDF-1 jouent un rôle très important dans le guidage des neurones à GnRH lors de leur trajet intracérébral (Casoni et al., 2012).

Les stéroïdes gonadiques pendant le développement néonatal ne n'influenceraient pas le développement normal des neurones à GnRH *in vivo* (Wray and Gainer, 1987). *In vitro*, le rôle de la signalisation induite par les antagonistes ou agonistes des récepteurs aux œstrogènes (Tamoxifène et œstradiol-17α) sur la neurogénèse et la croissance neuritique des neurones à GnRH issus de cultures de placodes nasales d'embryons ovins a été démontré (Agca et al., 2008). Cette étude a montré que l'inhibition de la signalisation œstrogénique par du tamoxifène sur des neurones à GnRH en culture induit une diminution significative de leur nombre.

Enfin, la dernière étape du développement des neurones à GnRH est la croissance axonale des terminaisons nerveuses de ces neurones qui innervent l'EM. Les fibres des neurones à GnRH sont détectées chez la souris à partir de E14,5 (Livne et al., 1993). Plusieurs études ont rapporté un possible rôle de molécules chémo-

attractives diffusibles provenant de l'hypothalamus médio-basal (Rogers et al., 1997) telles que le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) dans le guidage des terminaisons nerveuses vers l'EM (Gibson et al., 2000).

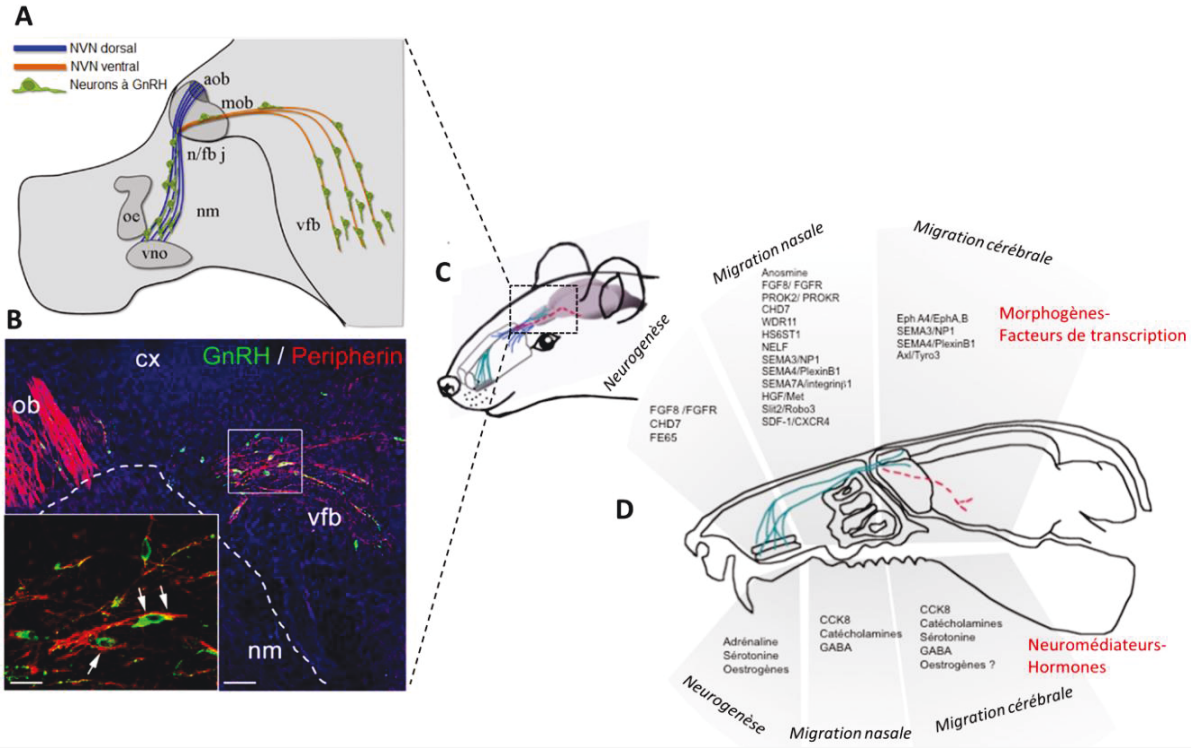


Figure 3 Facteurs impliqués dans la migration et le guidage des neurones à GnRH lors de leur trajet de migration de la placode olfactive à l'aire pré-optique.

A) Schéma d'une coupe sagittale de tête d'embryon de souris à E14,5 localisant le nerf voméronasal (NVM) et terminal le long desquels migrent les neurones à GnRH à partir de l'organe voméronasal (VNO) jusqu'au cerveau antérieur ventral (vfb). **B)** Co-marquages par immunofluorescence de la GnRH (vert) et de la périphérine (rouge, marqueur spécifique des nerfs voméronasaux), mettant en évidence la proximité des neurones à GnRH avec les nerfs marqués à la périphérine (flèches blanches) **(d'après Messina and Giacobini, 2013)**. **C,D)** Facteurs moléculaires impliqués dans l'ontogenèse des neurones à GnRH. **C)** Représentation schématique de l'anatomie des nerfs voméronasaux (vert), olfactifs (bleu) et terminaux (rouge) chez la souris. **D)** Les facteurs moléculaires qui interviennent à différents stades du développement des neurones à GnRH, la neurogenèse, la migration (nasale ou cérébrale) sont divisés en deux catégories, les morphogènes et facteurs de transcription d'une part et les neuromédiateurs-hormones d'autre part **(d'après Duittoz and Prévot, 2014).** Aob : bulbe olfactif accessoire, mob : bulbe olfactif principal, oe : épithélium olfactif, nm : mésenchyme nasal, n/fbj : jonction cérébro-nasale, cx : cortex cérébral.

B- L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (axe HHG)

L'axe HHG ou axe gonadotrope est constitué de trois composantes principales : l'hypothalamus qui est une structure diencéphalique située à la base du cerveau ; ce dernier est anatomiquement relié à la glande pituitaire ou hypophyse, située à la base du cerveau, par la tige pituitaire **(Figure 4).** Cette glande endocrine, sous l'action du neuropeptide GnRH hypothalamique, régule les gonades *via* deux hormones, les gonadotrophines, LH et FSH, secrétées par des cellules gonadotropes situées dans l'adénohypophyse. Ces cellules possèdent les récepteurs à sept domaines transmembranaires, spécifiques au GnRH, permettant la libération des gonadotrophines LH et FSH drainées par la circulation générale pour agir au niveau des gonades.

Chez la femelle, comme chez le mâle, les gonadotrophines LH et FSH ont une double action, stimuler la gamétogenèse (et la folliculogenèse ovarienne), et une deuxième fonction endocrine permettant la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles nécessaires à la régulation des cycles et des comportements sexuels. Les stéroïdes sexuels, œstradiol, progestérone et testostérone, exercent un rétrocontrôle négatif ou positif sur l'étage hypothalamo-hypophysaire, formant ainsi une boucle qui s'autorégule et permet de maintenir le fonctionnement de l'ensemble de l'axe HHG.

Les mécanismes de régulation de l'axe HHG par les stéroïdes sexuels et les différents acteurs neuroendocrines impliqués sont discutés ci-dessous.

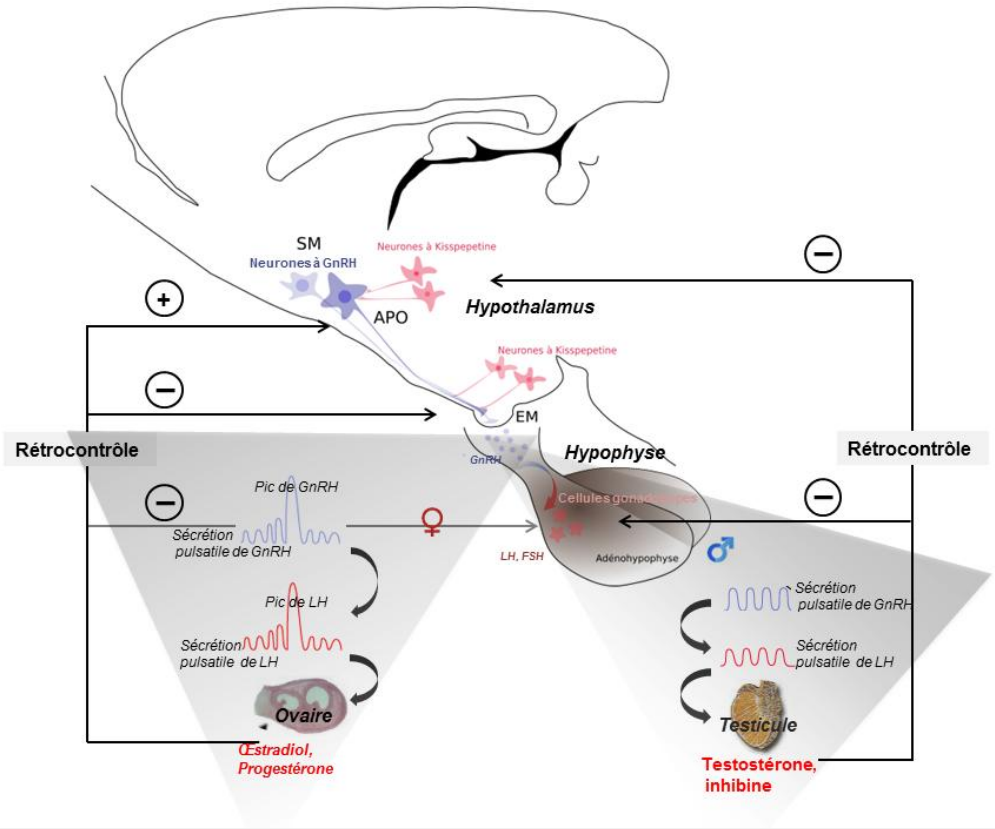


Figure 4 : **Physiologie de l'axe gonadotrope.**

La GnRH est synthétisée par les neurones à GnRH dont les corps cellulaires sont situés dans l'aire pré-optique (APO) et le septum médian (SE) et les terminaisons nerveuses projetant dans l'éminence médiane (ME). Les sécrétions pulsatiles de GnRH stimulent la sécrétion des gonadotrophines FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinising Hormone). Les gonadotrophines sont libérées dans la circulation générale et stimulent la production des stéroïdes sexuels. Ces derniers exercent un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH) pour réguler la production de FSH et LH. Chez la femelle, l'E2 exerce le rétrocontrôle positif pendant la période pré -ovulatoire en agissant sur les neurones à kisspeptine de l'APO, induisant ainsi le pic pré-ovulatoire de GnRH puis de LH. Pendant la phase lutéale, l'E2 exerce un rétrocontrôle négatif au niveau de l'éminence médiane *via* les neurones à kisspeptine du noyau arqué et au niveau des cellules gonadotropes adénohypophysaires. Chez le mâle les stéroïdes sexuels exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe (HH).

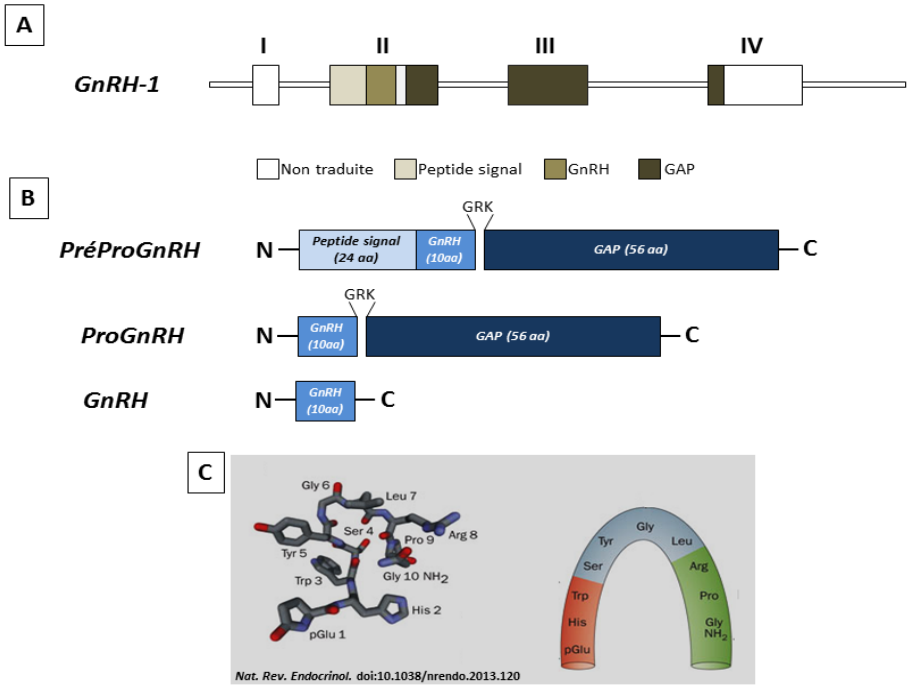


Figure 5 : Structure du gène *GnRH-1* et du peptide GnRH

A) Le gène GnRH-1 est constitué de quatre exons qui codent différents peptides du produit de sa transcription. **B)** Le préproGnRH est constitué d'un peptide signal qui joue un rôle dans l'adressage du peptide dans le réticulum endoplasmique (RE), le décapeptide GnRH et le peptide GAP (GnRH Associated Peptide). Le peptide signal clivé à la sortie du RE, le proGnRH (GnRH+GAP) est stocké dans les vésicules de sécrétion. **C)** Structure du GnRH par spectroscopie par résonnance magnétique (gauche) et structure schématique en fer à cheval mettant en évidence les domaines de liaison au récepteur (vert) et d'activation (rouge) du peptide GnRH) (d'après les données de Nikolics et al., 1985).

C- Le réseau de neurones à GnRH

1- Le gène et le peptide du GnRH

Le GnRH est un décapeptide hypothalamique synthétisé par les neurones à GnRH et codé par le gène *GnRH-1*. Il existe plusieurs formes de GnRH. Chez les mammifères, c'est le GnRH de type-I ou mGnRH qui contrôle la physiologie des gonades. Une autre forme de GnRH a été identifiée chez les mammifères. En effet, le GnRH-II ou cGnRH (pour chicken) est exprimé dans l'hippocampe, l'amygdale et le noyau caudal mais aussi dans les tissus extra-cérébraux comme les reins, la moelle épinière et la prostate (White et al., 1998) son rôle exact est encore inconnu. Chez la souris, la seule forme conservée du système GnRH est la forme I codée par le gène *GnRH-1*. La séquence du gène est composée de quatre exons intercalés par trois introns. Les exons codent pour un précurseur, le prépro-GnRH (**Figure 5).** Le premier exon n'est pas traduit, le second code pour un peptide signal, la séquence du décapeptide GnRH, le site de clivage G-R-K (Glycine-Lysine-Arginine), et les 11 acides aminés du peptide GAP associé au GnRH (GnRH-associated Peptide). Le troisième exon pour les acides aminés 12 à 43 du GAP. Le quatrième exon contient une partie codant pour le reste du GAP et une partie 3' non codante. Le peptide GAP est clivé de la séquence du GnRH lors de sa maturation post-traductionnelle, par la suite le décapeptide GnRH subit une amidation de sa partie C-terminale et une cyclisation de la glutamine N-terminale en pyroglutamine. Ces modifications lui confèrent sa structure typique en fer à cheval et le protègent de la dégradation par les protéases (**Figure 5C**). Le GnRH est stocké puis transporté dans les granules de sécrétion avec le peptide GAP vers les terminaisons axonales des neurones qui projettent dans l'EM (Rangaraju et al., 1991).

2- Neuroanatomie

Les neurones à GnRH sont une population de neurones hypothalamiques synthétisant et secrétant un décapeptide, la gonadolibérine. Chez la souris, cette petite population de neurones, environ 800, contrairement à la plupart des populations neuronales chez les mammifères, ne forme pas de noyau neuroanatomique défini, mais est distribuée sous forme d'un continuum rostro-caudal localisé entre l'hypothalamus antérieur et le bulbe olfactif (Jasoni et al., 2009). Les corps cellulaires de ces neurones sont localisés dans le septum médian (SM), l'APO et l'hypothalamus antérieur. La population de neurones à GnRH la plus danse

est localisée dans l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) **(Figure 6)** (Jasoni et al., 2009)**.** Les terminaisons nerveuses de ces neurones se projettent essentiellement dans l'éminence médiane (EM), un organe neurohémal, situé dans la partie caudale de l'hypothalamus permettant de secréter le décapeptide GnRH dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire qui le draine dans l'adénohypophyse **(Figure 6)**. Ce réseau neuronal diffus est intégré dans un réseau neuroendocrine hypothalamique étroitement connecté avec les neurones à GnRH, permettant la régulation de la synthèse et de libération du GnRH en fonction de l'état physiologique. Le réseau de neurones à kisspeptine découvert au cours des dix dernières années joue un rôle très important dans la régulation du réseau de neurones à GnRH (Messager et al., 2005). Les mécanismes de cette régulation sont détaillés plus loin.

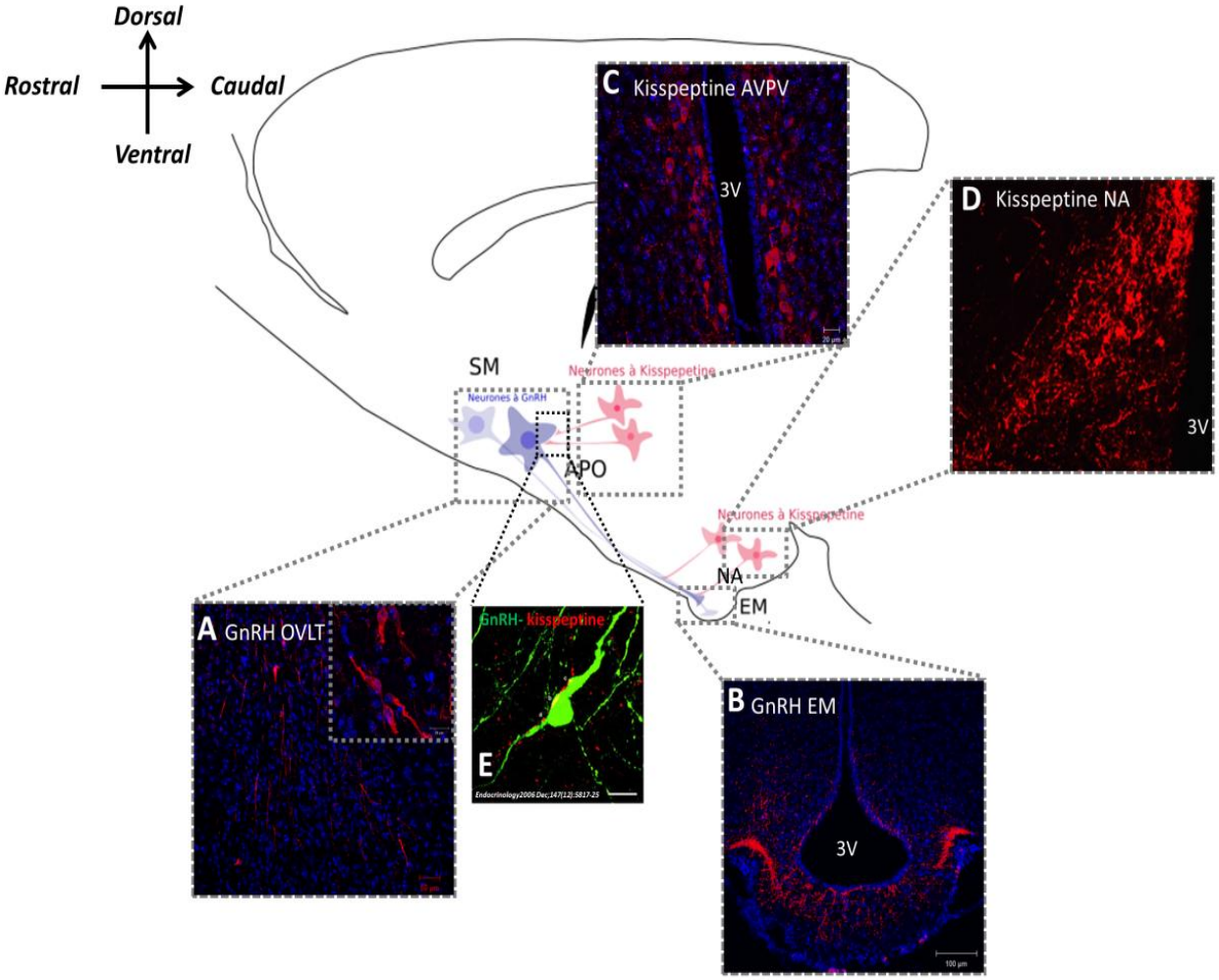


Figure 6 : Neuroanatomie des réseaux neuroendocrines hypothalamiques GnRH et kisspeptine.

Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur permettant de localiser les différentes populations neuronales révélées par immunofluorescence (images A-D). **A)** Les corps cellulaires des neurones à GnRH (ici révélés par immunofluorescence anti-GnRH) sont localisés dans l'aire préoptique (APO) et dans le Septum median (SM). La population la plus dense est localisée dans l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT). **B)** : Les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH sont localisées dans l'éminence médiane (EM) où le peptide est libéré dans les vaisseaux du système porte. **C)** Deux populations de neurones à kisspeptine ont été identifiées, une population rostrale, localisée dans l'aire Antéro-Ventrale Para-Ventriculaire (AVPV) et une deuxième population plus caudale retrouvée dans le noyau arqué (NA) (D). **E)** Les doubles marquages par immunohistochimie mettent en évidence la présence de fibres immunoréactives à la kisspeptine (rouge) à proximité des corps cellulaires des neurones à GnRH (Vert).

D- Le réseau de neurones à kisspeptine

1- Neuroanatomie du réseau kisspeptine

Chez le mâle comme chez la femelle, il existe deux populations distinctes de neurones à Kisspeptine, une population localisée dans l'APO et une autre population plus rostrale, localisée dans le noyau arqué (NA) **(Figure 6C,D)**. Chez l'individu adulte, dans l'APO, les neurones à kisspeptine présentent un dimorphisme sexuel dans leur nombre. En effet, chez les femelles le nombre de neurones à kisspeptine détectés par immunohistochimie est 10 fois plus important que chez les mâles (Franceschini et al., 2006, Smith, 2008, Clarkson et al., 2009b). Ces neurones sont localisés dans deux noyaux de l'APO, le noyau Péri-Ventriculaire Para-Ventriculaire (AVPV) et le noyau Péri-Ventriculaire pré-optique (PVpo) et projettent leurs terminaisons axonales directement sur les neurones à GnRH **(Figure 6E)** (Clarkson and Herbison, 2006). Dans le NA aucune différence sexuelle n'a été mise en évidence. Les neurones à kisspeptine du NA expriment également deux neuropeptide, la Neurokinine et la Dynorphine qui jouent un rôle important dans la régulation des neurones à GnRH. Ces neurones ont récemment été renommés « neurones KNDy » (**k**isspetine, **N**eurokinine et **Dy**norhine) et seraient impliqués dans le rétrocontrôle négatif de l'axe gonadotrope, induit de l'E2 (Mittelman-Smith et al., 2012, Helena et al., 2015).

2- Mise en évidence du rôle du kisspeptine dans la physiologie de l'axe HHG

Le rôle des neurones à kisspeptine dans la régulation de la fonction de reproduction n'a été mis en évidence qu'à partir du début des années 2000s. En effet, la découverte de leur rôle dans la régulation de l'axe HHG a ouvert un nouveau chapitre dans l'étude de la neuroendocrinologie de la reproduction et de la physiologie de l'axe gonadotrope. Le kisspeptine est un puissant sécrétagogue du GnRH, il stimule directement sa synthèse et sa sécrétion *via* son récepteur Kiss1R (GPR54) (Messager et al., 2005, Choe et al., 2013). Le maintien de la pulsatilité de sécrétion de GnRH nécessite une activation épisodique de la libération du GnRH dans les granules de sécrétion situés dans les terminaisons nerveuses de l'éminence médiane, mais aussi l'activation de la transcription et la traduction du gène *GnRH-1* par la signalisation kisspeptinergique dans l'APO (Choe et al., 2013). Le rôle autocrine du GnRH dans le maintien de la pulsatilité semble primordial pour faciliter

l'action du kisspeptine sur la pulsatilité de synthèse et de sécrétion du GnRH (Xu et al., 2004, Choe et al., 2013).

Il a été montré récemment que l'infusion de kisspeptine dans l'éminence médiane de brebis induit une sécrétion de GnRH et de LH dans les 30 minutes suivant la stimulation, ce qui montre encore une fois le rôle important du kisspeptine dans la génération des pulses de sécrétion de GnRH (Ezzat et al., 2015). Cependant, il n'a pas été mis en évidence la présence du récepteur Kiss1R ni de structures synaptiques entre les terminaisons sécrétrices de GnRH et les fibres des neurones à kisspeptine (Ezzat et al., 2015). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence une activité c-Fos dans les neurones glutamatergiques et kisspeptinergiques dans le noyau arqué mais pas dans les neurones à GnRH. Ces données suggèrent le rôle important du kisspeptine dans la génération de la pulsatilité de GnRH et que le kisspeptine agirait probablement en synergie avec d'autres neurotransmetteurs dans la zone du NA. Les mécanismes exacts de la régulation de cette pulsatilité restent à définir (Ezzat et al., 2015). Un modèle de régulation des neurones à GnRH *via* des terminaisons axonales qui impliqueraient une activation de la transcription du gène GnRH par les neurones à kisspeptine de l'AVPV a été proposé (Choe et al., 2013). Dans ce modèle, les neurones à kisspeptine stimuleraient *via* des sécrétions pulsatiles de kisspeptine, la synchronisation de la réponse des neurones à GnRH. Cette synchronisation permettrait la production *de novo* et le transport des vésicules contenant le GnRH au niveau des terminaisons axonales. Dans l'EM, les neurones à kisspeptine du NA stimuleraient la libération épisodique de GnRH contenu dans les vésicules vers le système porte (Choe et al., 2013**) (Figure 7).**

E- Rétrocontrôle par les stéroïdes sexuels

1- Les récepteurs des stéroïdes

Les androgènes, les œstrogènes et la progestérone exercent leurs rétrocontrôles respectifs sur l'hypothalamus par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques exprimés dans les différents noyaux hypothalamiques mâles et femelles (Scott et al., 2000). Les androgènes chez le mâle exècrent leur rétrocontrôle sur l'axe gonadotrope *via* les récepteurs des androgènes (AR) (Raskin et al., 2009). Smith et al. (2005) ont montré que les neurones à kisspeptine de l'AVPV et du NA, expriment les AR, suggérant ainsi que le rétrocontrôle sur les neurones à GnRH impliquerait les neurones à kisspeptine.

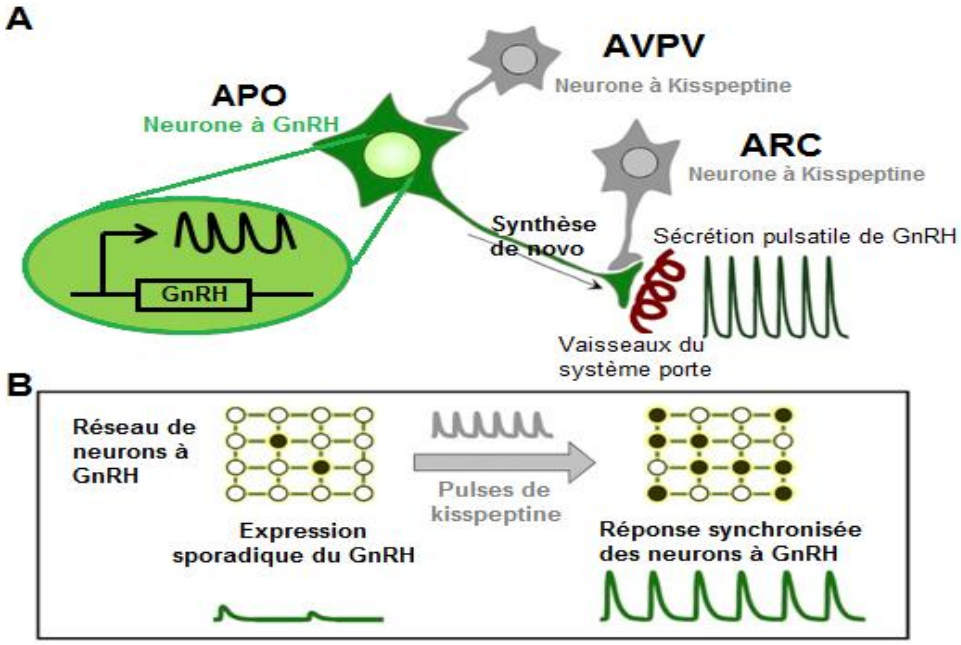


Figure 7 : Evénements neuroendocrines impliqués dans la synchronisation des neurones à GnRH.

A) les neurones à GnRH synthètisent et secrètent de manière pulsatile le GnRH au niveau de l'éminence médiane où sont localisés les vaisseaux du système porte. Les neurones à kisspeptine de l'aire antéro-ventrale péri-ventriculaire (AVPV) régulent les neurones à GnRH au niveau des corps cellulaires localisés dans l'aire pré-optique (APO) et ceux du noyau arqué (NA) agissent au niveau des terminaisons axonales. **B)** En conditions basales, l'activité transcriptionnelle du gène *GnRH-1* est sporadique. Cette activité est stimulée par l'activité pulsatile des neurones à kisspeptine. En réponse, les neurones à GnRH synchronisent leur activité. Chaque rond représente un neurone à GnRH individuel, les ronds pleins représentent des neurones dont l'activité est synchronisée. La synthèse *de novo* de peptide et l'activité sécrétoire pourraient être à l'origine de la synchronisation. (*D'après Choe et al., 2013*)

Les œstrogènes se fixent sur leurs récepteurs spécifiques. Il existe deux types de récepteurs des œstrogènes, les récepteurs nucléaires de type α et de type β (ERα et ERβ) et le récepteur à sept domaines transmembranaires (GPR30), découvert plus récemment (Toran-Allerand et al., 2002). Les récepteurs nucléaires sont capables d'agir comme des facteurs de transcription et d'induire la transcription de gènes cibles (action génomique), en se fixant au domaine ERE (Estrogen responsive Element) de liaison à l'ADN (Heldring et al., 2007, Maggi and Villa, 2014). Les récepteurs membranaires qui induisent l'activation d'une cascade de signalisation cytoplasmique seraient impliqués dans l'action rapide des œstrogènes (Noel et al., 2009).

La progestérone également agit *via* deux types de récepteurs, à action génomique et non génomique (action rapide). Les premiers ont un rôle facilitateur dans l'apparition du pic pré-ovulatoire de LH et les seconds joueraient un rôle dans le rétrocontrôle négatif des œstrogènes (Chappell et al., 1999).

2- Mécanismes de régulation de l'axe HHG par les stéroïdes

L'action des stéroïdes sexuels qui exercent un rétrocontrôle positif ou négatif sur la sécrétion de GnRH, s'effectue d'une manière différente entre le mâle et la femelle. En effet, chez le mâle, les stéroïdes exercent un rétrocontrôle uniquement négatif sur la sécrétion pulsatile de GnRH tandis que chez la femelle, il existe un rétrocontrôle négatif et un rétrocontrôle positif qui surviennent à des moments précis du cycle. Cela permet d'induire un profil de pulsatilité de sécrétion de GnRH spécifique à une phase précise du cycle. Le rétrocontrôle positif par l'E2 chez la femelle est responsable de l'induction de la décharge ovulatoire de GnRH puis de LH « pic de LH » qui induit l'expulsion de l'ovocyte. Ce dimorphisme sexuel dans le fonctionnement de l'axe HHG est maintenu grâce aux différences neuroanatomiques des réseaux neuroendocrines hypothalamiques. Par ailleurs, il a été démontré que ce rétrocontrôle positif implique ERα mais pas ERβ (Wintermantel et al., 2006). Or aucune étude n'a pu montrer que les neurones à GnRH expriment ERα. Ces données suggèrent le rôle d'autres populations cellulaires dans la médiation de l'effet de l'E2 sur les neurones à GnRH.

Il a été montré qu'il existe une proximité des fibres de l'APO immunoréactives à la kisspeptine et des corps cellulaires des neurones à GnRH **(Figure 6E)** (Clarkson

and Herbison, 2006). De plus, les neurones à kisspeptine expriment les ERα (Franceschini et al., 2006), suggérant ainsi leur rôle dans l'intégration du rétrocontrôle par les œstrogènes. Cette hypothèse a été confortée par plusieurs études qui ont montré une activation œstrogéno-dépendante de c-Fos et la transcription du gène *kiss-1* par les œstrogènes dans la région péri-ventriculaire du troisième ventricule (RP3V) contentant l'AVPV et PVpo (Wintermantel et al., 2006, Adachi et al., 2007) mais également l'expression du récepteurs kisspeptine (kiss1R ou GPR54) par les neurones à GnRH (Messenger et al 2005).

La régulation différentielle de l'activité des neurones à GnRH entre les mâles et les femelles ne serait pas liée à leur neuroanatomie puisque celle-ci n'est pas sexuellement dimorphique. Le nombre réduit de neurones à kisspeptine chez le mâle serait à l'origine de l'absence d'un rétrocontrôle positif par les stéroïdes gonadiques et du maintien d'une pulsatilité constante de GnRH chez le mâle tandis que chez la femelle ce rétrocontrôle positif est induit *via* ERα exprimé dans les neurones à kisspeptine de l'APO, permettant ainsi d'induire le pic de LH. Le rétrocontrôle négatif s'exerce sur l'axe HHG chez les deux sexes, *via* la population de neurones à kisspeptine (neurones KNDy du NA qui est située à proximité des terminaisons axonales des neurones à GnRH **(Figure 6D)** (Smith, 2008). Cette population de neurones à Kisspeptine ne présente pas de dimorphisme sexuel, d'où l'absence de différences fonctionnelles entre le mâle et la femelle.

F- La sécrétion pulsatile du GnRH et sa régulation

La sécrétion de GnRH dans les vaisseaux du système porte qui irriguent l'éminence médiane se fait d'une manière pulsatile et épisodique. L'importance de cette pulsatilité dans l'activation et la régulation de l'axe HHG a été mise en évidence à la fin des années soixante-dix grâce aux travaux de Belchetz (1978). Les auteurs ont observé chez des singes dont la production de GnRH était supprimée par des lésions hypothalamiques, une absence de réponse des cellules gonadotropes lors d'une administration continue de GnRH, alors qu'une administration épisodique (une toutes les cinquante minutes) permettait de restaurer la sécrétion pulsatile de LH et de FSH. Wildt *et al*. (1981) ont démontré que c'est la régulation différentielle de la fréquence des pulses de GnRH qui détermine le profil de sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse. En effet, les hautes fréquences favorisent la sécrétion de LH alors que les basses fréquences impliquent la sécrétion de FSH. De ce fait, le changement de fréquence de sécrétion de GnRH serait à l'origine de la

cyclicité ovarienne et du développement folliculaire. Par la suite, d'autres études ont montré l'importance de la pulsatilité de sécrétion de GnRH dans le processus de déclenchement de la puberté, du maintien de la régulation cyclique (Karsch and Evans, 1996) et saisonnée (Karsch et al., 1988) de la fonction de reproduction (Knobil, 1990). Cependant, à ce jour, les mécanismes exacts impliqués dans la génération des pulses et l'activité sécrétoire épisodique, représentent l'une des énigmes encore mal élucidée dans le domaine de la physiologie de la reproduction.

Trois questions ont été identifiées, visant à comprendre les mécanismes de cette pulsatilité. 1) Quelles sont les populations cellulaires sous-jacentes ? 2) Quels mécanismes cellulaires sont impliqués dans ces cellules ?, et 3) Comment les neurones à GnRH, distribués en neurones isolés dans plusieurs zones, coordonnent leur activité pour induire des pulses réguliers ?

Les modèles de cultures *in vitro* des neurones à GnRH immortalisés et d'explants de placodes olfactives ont permis de mettre en évidence une pulsatilité intrinsèque de sécrétion de GnRH avec un intervalle de temps équivalent à celui de sécrétion des gonadotrophines *in vivo* (Terasawa et al., 1999a). L'enregistrement de l'activité électrique spontanée des neurones à GnRH montre aussi une pulsatilité *ex vivo* sur des tranches hypothalamiques de souris transgéniques qui expriment la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur du gène *GnRH-1* (Suter et al., 2000a, Suter et al., 2000b) mais aussi sur la lignée cellulaire GT1-7 (Nunemaker et al., 2001). Ces expériences ont permis d'établir que les neurones à GnRH sont à l'origine de la pulsalitité de LH et de FSH et que le générateur de la pulsatilité est intrinsèque aux neurones à GnRH. Les mécanismes intracellulaires responsables de la sécrétion pulsatile sont peu connus. Une corrélation entre cette sécrétion pulsatile et les oscillations de calcium intracellulaires, nécessaire à l'activité sécrétrice, a été mise en évidence dans les neurones en développement chez le singe (Terasawa et al., 1999b) et chez la souris (Constantin et al., 2009). L'hypothèse d'une activité sécrétrice intrinsèque des neurones à GnRH provient des études *in vitro* qui confirment que le réseau est fonctionnel de manière autonome. Cependant, il n'y a pas de données évidentes qui confirment si chaque neurone individuel possède cette capacité, ou alors si c'est le fonctionnement synergique du réseau qui permet cette autonomie de sécrétion pulsatile. Ces deux hypothèses font encore l'objet de recherches de plusieurs laboratoires.

Plusieurs neurotransmetteurs sont impliqués dans la régulation des neurones à GnRH en développement *in vitro* dont le GABA, l'un des facteurs majeurs décrits dans la littérature pouvant moduler les flux calciques et l'activité électrique des neurones à GnRH (Kusano et al., 1995). La signalisation GABAergique serait fortement impliquée dans l'initiation de la synchronisation des événements calciques. Une fois initiée, cette synchronisation peut être maintenue indépendamment du GABA. Néanmoins, ce dernier est capable de la moduler (Moore et al., 2002). D'autres facteurs comme le glutamate ou le CCK-1 (cholécystokinine-1) seraient aussi impliqués dans les événements de synchronisation et de l'activité pulsatile des neurones à GnRH (*pour revue, voir* Constantin, 2011).

G- Pulsatilité de GnRH et conséquences physiologiques : déclenchement de la puberté et régulation des cycles

L'initiation de la puberté résulte d'une succession d'événements physiologiques et hormonaux qui entrainent des modifications morphologiques biologiques et comportementales aboutissant à l'activation de la fonction de reproduction à l'âge adulte. Peu après la naissance (quelques mois chez l'humain et quelques heures à quelques jours chez les rongeurs), l'axe gonadotrope déjà activé pendant la période périnatale se met en quiescence pendant toute la période de l'enfance et la vie juvénile. Ce n'est qu'à partir de la puberté, suite à une succession d'événements physiologiques et environnementaux que l'axe gonadotrope est réactivé. Au niveau neuroendocrine, le déterminant majeur de la puberté est l'augmentation de sécrétion de GnRH. En effet, avant la ménarche, la fréquence des pulses de GnRH et leur amplitude augmentent considérablement, induisant ainsi la sécrétion de FSH et de LH puis l'ovulation. Le fonctionnement des neurones à GnRH est régi par de nombreux facteurs centraux, endocrines et environnementaux qui stimulent et régulent sa sécrétion pulsatile.

Parmi les neurotransmetteurs qui régulent étroitement les neurones à GnRH, on trouve le glutamate et le GABA, qui exercent des actions antagonistes sur les neurones à GnRH. Pendant la période pré-pubertaire, le glutamate stimulerait la pulsatilité des neurones à GnRH après une levée d'inhibition par les neurones GABA hypothalamiques, induisant l'augmentation des fréquences des pulses de GnRH. Cela pourrait être l'un des mécanismes impliqués dans le processus complexe de déclenchement de la puberté (Bourguignon et al., 1997).

De Roux et al. (2003) ont mis évidence le rôle majeur du kisspeptine codé par le gène *kiss-1*, et son récepteur le kiss1R (GPR54) dans le déclenchement de la puberté. En effet, des mutations de perte de fonction du récepteur GPR54 chez l'humain ont mis en évidence une absence de puberté chez plusieurs patients. Le rôle du kisspeptine dans le processus de puberté neuroendocrine est mis en évidence par la corrélation d'une augmentation progressive de sa production **(Figure 8A)** en fin de phase juvénile jusqu'à la puberté chez les rongeurs et chez les primates (Shahab et al., 2005, Keen et al., 2008, Clarkson et al., 2009a, Semaan and Kauffman, 2015). Un modèle théorique des événements neuroendocrines induisant la puberté a été proposé par Clarkson et al., (2009a), illustré sur la **figure 8B**.

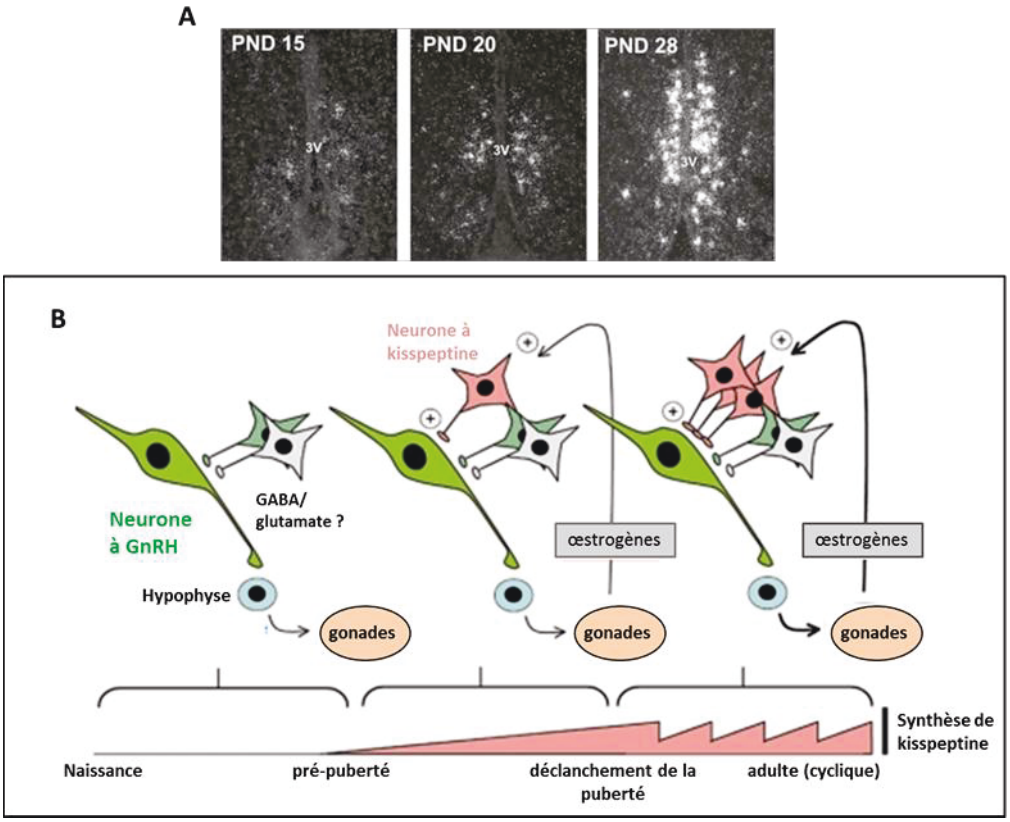


Figure 8 : Mécanismes neuroendocrines de déclenchement de la puberté.

A) Hybridations *in situ* marquant l'expression du kisspeptine chez des femelles souris en période pubertaire (de 15 à 28 jours post-natal) (Semaan and Kauffman, 2015). **B)** Modèle schématique de déclenchement de la puberté : pendant la période entre la naissance et la période pré-pubertaire le kisspeptine est indétectable dans l'AVPV. A partir de ce stade, les concentrations en E2 simuleraient la production de kisspeptine qui va induire l'activation des neurones à GnRH et de l'axe HHG. A l'âge adulte la sécrétion de kisspeptine devient pulsatile, ce qui va faciliter la génération du pic de GnRH/LH (Clarkson et al., 2009a).

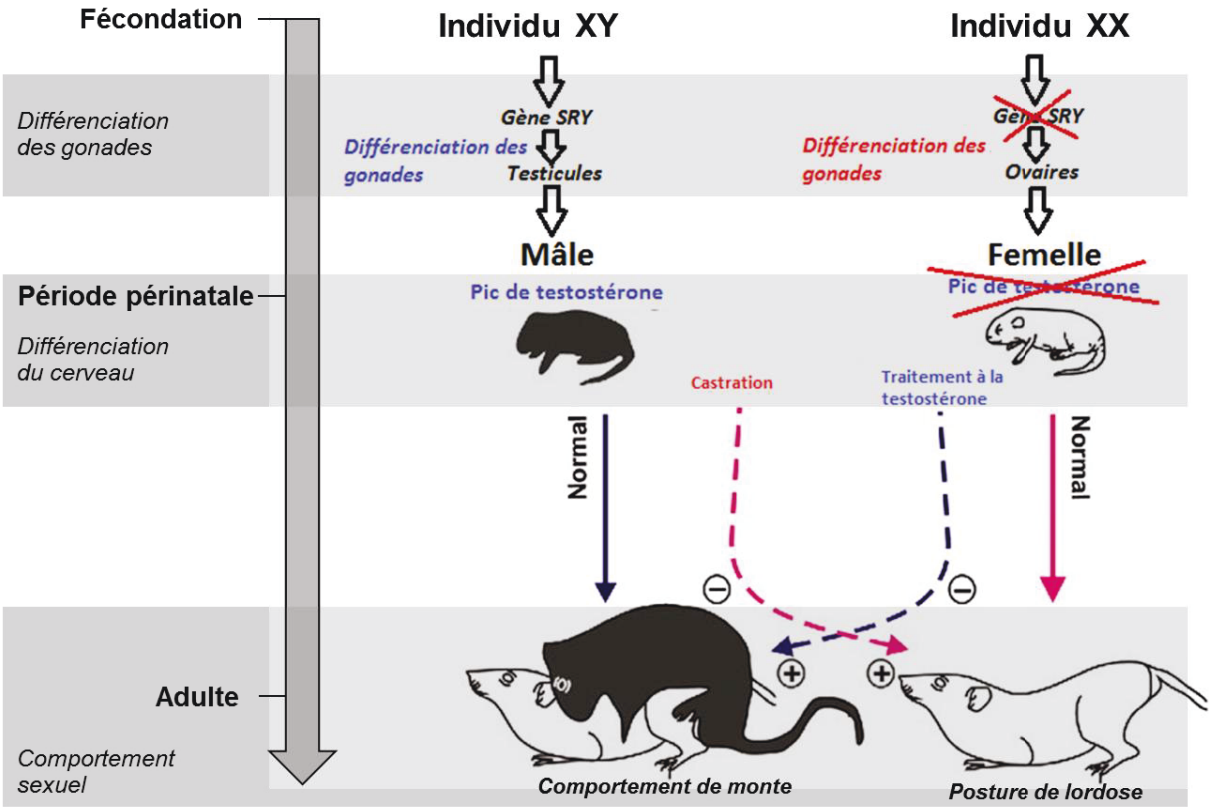


Figure 9 : Effets de la castration et du traitement à la testostérone en période périnatale sur la différenciation du cerveau mâle et femelle d'après les travaux de Phoenix et al 1959)

La différenciation des gonades sous l'action du génotype de l'individu (*XY* pour le mâle et *XX* pour la femelle) en testicules et en ovaires est à l'origine de l'imprégnation en testostérone (T) chez le mâle qui permet le développement du cerveau et l'expression du comportement de monte. Chez la femelle l'absence de T permet la différenciation femelle et l'expression de la lordose à l'âge adulte. Indépendamment du sexe génétique, la différenciation du cerveau mâle peut être induite chez les femelles par un traitement à la T pendant la période périnatale et induire un comportement de monte à l'âge adulte. Chez le mâle la castration périnatale induite une différenciation de type femelle et l'expression du comportement de lordose (*modifié d'après* MacCarty M, 2008).

III- DIFFERENCIATION SEXUELLE DU CERVEAU ET COMPORTEMENTS REPRODUCTEURS

Les réseaux neuroendocrines qui contrôlent la fonction de reproduction ainsi que les réseaux centraux sexuellement dimorphiques impliqués dans l'expression des comportements sexuels mâles et femelles sont les deux composantes essentielles qui permettent de mettre en place et de maintenir la fonction de reproduction à l'âge adulte. Chez le mâle, le processus de différenciation sexuelle est initié très tôt pendant le développement grâce au gène *SRY* porté par le chromosome Y qui va induire, dans un premier temps la différenciation testiculaire puis *via* la testostérone produite par ces testicules, induire la différenciation du tractus génital mâle. Plus tard dans le développement, la testostérone va induire la différenciation sexuelle du cerveau et permettre ainsi de coordonner les fonctions physiologiques et comportementales induites par l'appareil génital et le cerveau respectivement. Chez la femelle, en absence de *SRY*, la différenciation testiculaire n'est pas induite. En absence d'androgènes un tractus génital de type femelle va se développer. Pendant la période de différenciation sexuelle du cerveau, l'absence d'androgènes permet une différenciation du cerveau de type femelle (**Figure 9).**

Le processus de différenciation sexuelle du cerveau est initié pendant la vie intra-utérine et se poursuit pendant la vie post-natale. A partir de la puberté, ces circuits différenciés deviennent fonctionnels, permettant ainsi de maintenir les différentes fonctions comportementales et physiologiques nécessaires pour se reproduire.

A- La théorie organisationnelle/activationnelle

Le développement de circuits neuroendocrines sexuellement dimorphiques fonctionnels chez l'adulte, requiert deux processus différents, l'organisation neuroanatomique de ces réseaux et leur activation. Ces deux phénomènes qui ont lieu sur une échelle temporelle développementale spécifique, sont décrits sous forme d'une hypothèse des effets organisationnels et activationnels des œstrogènes. Cette hypothèse présume que la différenciation est régie par les stéroïdes sexuels synthétisés en quantités adéquates à des moments bien précis de la vie de l'individu, permettant la mise en place de processus physiologiques et comportementaux

spécifiques et complémentaires activés à la puberté chez les deux sexes **(Figure 10)** (McCarthy, 2008).

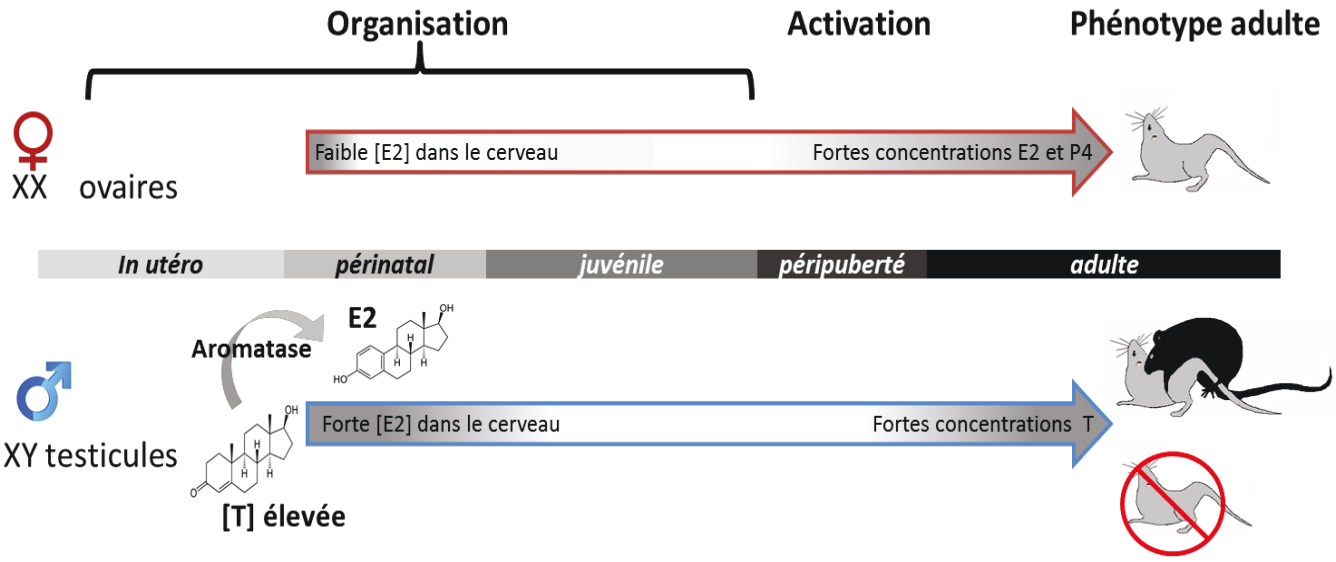


Figure 10 : Différenciation sexuelle du cerveau chez les rongeurs pendant le développement

Chez le mâle, dans le cerveau les concentrations élevées en œstradiol (E2), synthétisé à partir de la testostérone (T) périnatale induisent la déféminisation et la masculinisation du cerveau permettant à l'âge adulte, d'inhiber le comportement de lordose (déféminisation) et d'activer le comportement de montre (masculinisation). Chez la femelle, les concentrations basses en E2 induiraient la féminisation du comportement et le maintien du réflexe de lordose (Lenz et al., 2012)

Des études pionnières menées sur le cochon d'Inde dans les années cinquante ont mis en évidence l'effet de la testostérone (T) sur l'organisation sexe-spécifique du cerveau, et le rôle crucial de cette hormone dans l'organisation sexe-spécifique du cerveau mâle (Phoenix et al., 1959, Phoenix, 2009). Chez les femelles, ces études ont mis en évidence l'effet irréversible d'un traitement périnatal à la T sur la baisse du comportement sexuel, suggérant un rôle important de la T dans la masculinisation des comportements sexuels pendant le développement **(Figure 9)**. Cela suggère le rôle crucial de la T périnatale dans l'organisation fonctionnelle du cerveau. Ces auteurs ont permis de mettre en évidence le caractère bi-potentiel du cerveau mâle et

femelle et la capacité de cette structure à se différencier par induction hormonale pendant la période périnatale en cerveau mâle ou femelle, indépendamment du sexe chromosomique de l'individu (**Figure 10**).

B- Rôle de l'aromatase cérébrale dans la différenciation sexuelle du cerveau

La découverte du rôle de l'aromatase (cytochrome P450), qui métabolise la T en E2, a permis de comprendre les mécanismes d'action de l'E2 et l'implication directe de ce dernier dans le processus de la différenciation sexuelle du cerveau (Roselli et al., 2009, Xiong et al., 2011). En effet, chez le mâle, la T secrétée sous forme de deux pics, par les testicules pendant les phases pré- et post-natale, agit indirectement au niveau du cerveau par l'enzyme aromatase P450 (codée par le gène *CYP19*), qui la transforme en E2 (MacLusky and Naftolin, 1981) **(Figure 10)**. Cette enzyme est exprimée dans différentes régions du cerveau, dont l'hypothalamus médio-basal (MBH) et L'APO pendant le développement et à l'âge adulte (Wu et al., 2009). Cela suggère un rôle important de cette enzyme dans la mise en place des noyaux hypothalamiques sexuellement dimorphiques et dans leur fonctionnement à l'âge adulte.

La production périnatale de T résulte d'une activation transitoire de l'axe gonadotrope permettant ainsi la différenciation sexuelle des circuits neuroendocrines et centraux qui contrôlent les comportements chez le mâle adulte (Korenbrot et al., 1975, Gogan et al., 1981, Kauffman et al., 2007b, Clarkson et al., 2014).

C- Masculinisation et déféminisation du cerveau mâle par l'E2

L'E2, en se fixant sur les récepteurs des œstrogènes, agit par deux processus différents : la masculinisation et la déféminisation du cerveau mâle (McEwen et al., 1977). La masculinisation consiste à induire le développement de circuits spécifiques et leur différenciation de manière à établir des connexions entre différentes régions du cerveau qui permettent aux mâles adultes de réaliser l'accouplement et d'effectuer des comportements de monte. La déféminisation permet d'abolir les comportements de type femelle (comportement de lordose, cf. paragraphe suivant) **(Figure 10)**.

D- Différenciation sexuelle femelle

Chez la femelle, contrairement aux mâles, les ovaires pendant la période périnatale sont inactifs. L'absence d'hormones gonadiques permet un profil d'imprégnation différent en hormones stéroïdes et un développement des circuits typiques femelles. De plus, le cerveau femelle est protégé des hormones maternelles grâce à l'action de l'alpha-fœto-protéine qui, en se liant aux œstrogènes, forme un complexe inactif, protégeant ainsi le cerveau des œstrogènes circulants (Gabant et al., 2002, Bakker et al., 2006). La différenciation sexuelle du cerveau femelle a longtemps été assignée à un phénomène qui se produit par défaut, en absence de stéroïdes sexuels. Plus récemment, le rôle de l'aromatase dans le cerveau femelle a été mis en évidence, suggérant ainsi un rôle de l'œstradiol néo-synthétisé par le cerveau femelle à partir de la testostérone dans le processus de différenciation sexuelle (Bakker et al., 2003) et dans l'expression des comportements sexuels chez la femelle (Brock et al., 2011). Ces études ont ainsi remis en question la théorie longtemps établie selon laquelle le cerveau femelle est organisé par défaut.

E- Structures hypothalamiques sexuellement dimorphiques

1- L'aire pré-optique médiane (APOm)

Les expériences de lésions au niveau de l'APOm ont permis de mettre en évidence le rôle de cette dernière dans le comportement sexuel. Au regard des dimorphismes comportementaux observés entre les mâles et les femelles, ces observations ont poussé certains chercheurs à analyser la structure de l'APOm des mâles et des femelles. Les travaux du groupe de Gorski ont permis de montrer l'existence d'un noyau médian au niveau de l'APO (APOm) qui est cinq fois plus volumineux chez le mâle que chez la femelle. Ce noyau mis en évidence par une simple coloration histologique, est connu sous le nom de NSD-APO (Noyau Sexuellement Dimorphique de l'Aire Pré-Optique) (Gorski, 1978) **(Figure 11)**. L'existence de cette structure chez l'espèce humaine a aussi été mise en évidence (Swaab and Fliers, 1985). Par la suite, d'autres études plus récentes ont permis de décrire la protéine de transport calbindin-D28k (Calb-D28k) comme marqueur neuronal du NSD-POA chez le rat (**Figure 12**) (Sickel and McCarthy, 2000) et chez la souris (Orikasa and Sakuma, 2010).

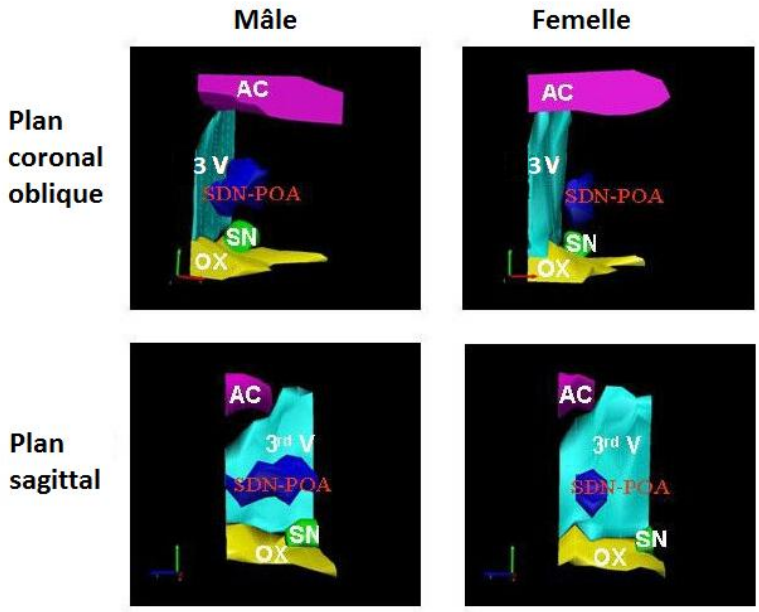


Figure 11 : Structure reconstituée en trois dimensions du noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique (SDN-POA) chez le mâle et la femelle

Ce noyau est situé dans la partie médiale de part et d'autre du 3ème ventricule (3V), entre la commissure antérieure (AC) et le chiasma optique (OX). Le plan coronal oblique montre que la taille de ce noyau est plus importante chez le mâle comparé à la femelle. Le plan sagittal met en évidence un volume plus important chez le mâle, réparti sur un plan rostro-caudal (épaisseur). SN : noyau supra-chiasmatique (D'après He et al., 2013)

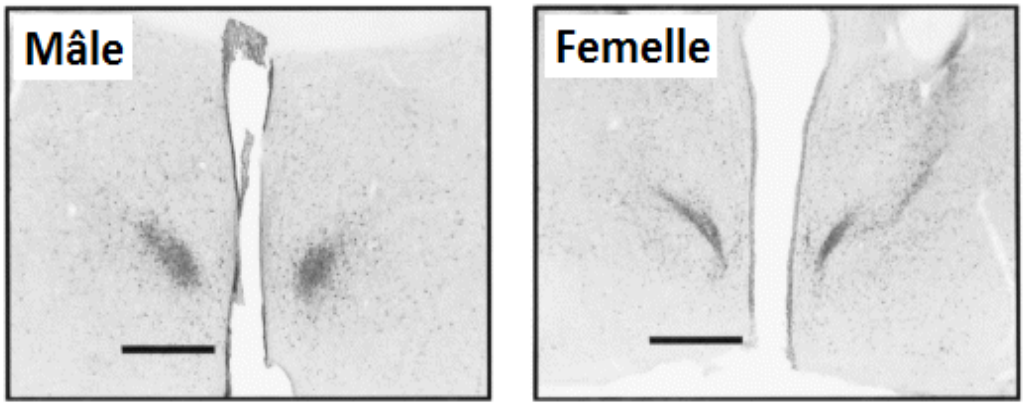


Figure 12: Noyau sexuellement dimorphique fortement marqué par la calbindine-d28k chez le rat Sprague-Dawley.

Le volume du noyau marqué par la calbindine est nettement plus volumineux chez le mâle comparé à la femelle. Barre d'échelle = 400µm (Sickel and McCarthy, 2000).

Chez les rongeurs, il a été montré que le nombre de cellules calb-d28k dans le NSD-APO est identique chez les mâles et les femelles avant le pic périnatal de T (Orikasa et al., 2010). Ce n'est qu'à partir de l'apparition du premier pic de T à la fin de la gestation et pendant les premiers stades de développement post-natal que le dimorphisme sexuel se met en place **(Figure 12)** (Tsukahara et al., 2006a). Différents mécanismes tels que l'apoptose (Arai et al., 1996, Gilmore et al., 2012, Kato et al., 2012) ou la migration cellulaire (Henderson et al., 1999) ont été impliqués dans ce processus. Chez le mâle l'E2 issu de la T permettrait de maintenir les neurones calb-d28k dans le NSD alors que chez la femelle l'absence de testostérone et par conséquence de l'E2 en concentrations élevées dans le cerveau ne permettrait pas de maintenir ces cellules (Davis et al., 1996a). Chez la femelle les cellules calb-d28k vont entrer en apoptose, leur nombre sera cinq fois moindre que chez les mâles (Davis et al., 1996a).

2- L'aire péri-ventriculaire du troisième ventricule (RP3V)

Dans l'APO, le deuxième noyau présentant un dimorphisme sexuel est localisé au niveau de l'AVPV et du noyau pré-optique péri-ventriculaire (PVpo). Ces deux noyaux sont responsables de la régulation sexuellement dimorphique de l'axe HHG (Simerly, 1998). Dans ces deux régions, l'action de l'E2 pendant le développement

pour mettre en place un dimorphisme sexuel est contraire à ce qui se produit dans le NSD. En effet, tout comme dans le NSD, les mâles et les femelles possèdent au départ le même nombre de neurones, et dans l'AVPV chez le mâle, l'E2 favorise l'apoptose alors que chez les femelles ces deux noyaux sont protégés de ce phénomène (Murakami and Arai, 1989, Forger et al., 2004). Ceci instaure un dimorphisme sexuel favorable pour la femelle en termes de nombre de neurones maintenus. Plusieurs populations neuronales sont sexuellement dimorphiques dont les neurones à kisspeptine fortement impliqués dans la physiologie de l'axe HHG et qui sont douze fois plus nombreux chez la femelle (Kauffman et al., 2007a).

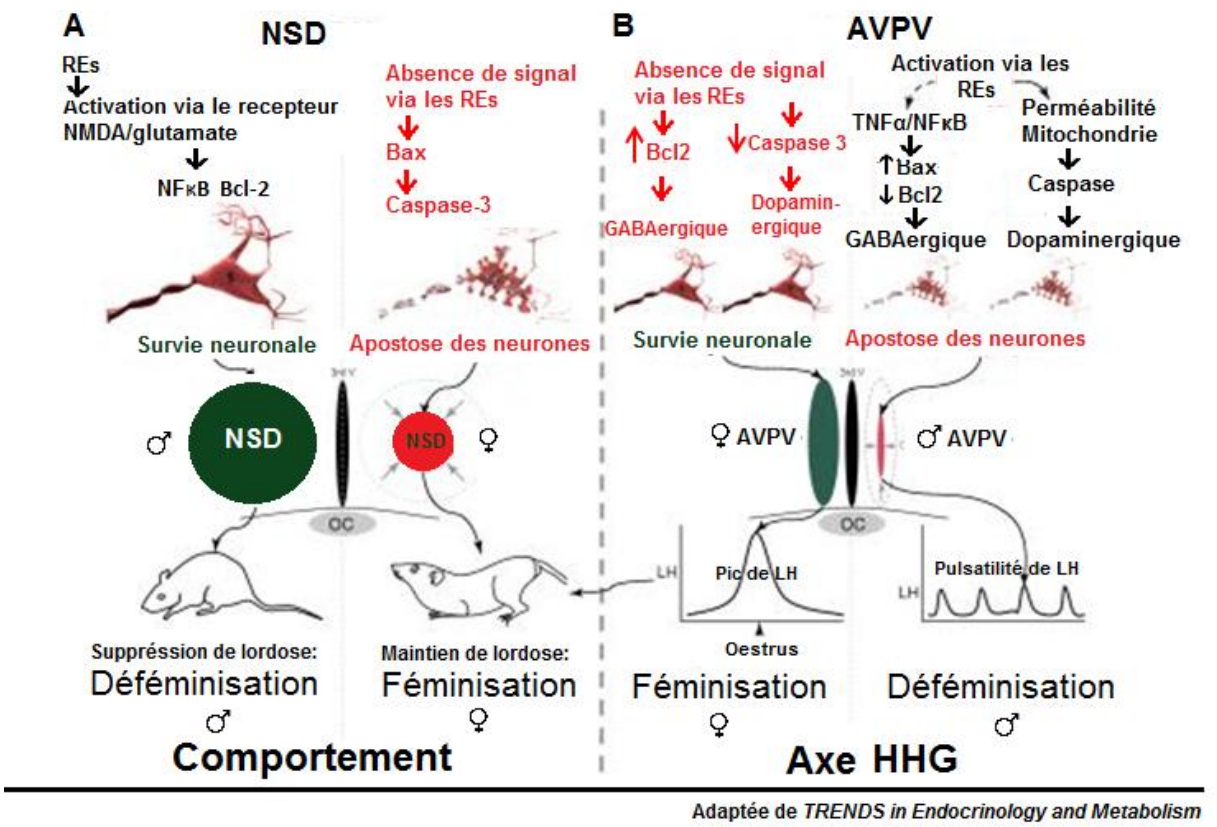
Le VMN (noyau ventro-médian) qui joue un rôle essentiel dans le comportement femelle présente un dimorphisme sexuel dans la quantité des dendrites et des épines dendritiques qui forment des synapses. Celles-ci sont plus importantes chez le mâle par rapport à la femelle (Matsumoto and Arai, 1986). Ces changements morphologiques dans la forme des cellules sont attribués à l'action de l'E2 pendant le développement et qui est désignée comme une action de déféminisation du cerveau mâle qui permettra d'inhiber le réflexe de lordose exprimé par les femelles et inapproprié chez le mâle.

F- Dimorphisme sexuel et régulation des comportements sexuels

La posture de lordose et le comportement de monte, exprimés par la femelle et le mâle respectivement, permettent à un moment opportun d'accomplir un accouplement et une fécondation. Chez la plupart des mammifères, le comportement sexuel dépend largement de l'action des hormones et des phéromones (Lindzey and Crews, 1992, Johnston, 1998, Taziaux and Bakker, 2015). Chez la femelle, le comportement spontané de lordose, qui correspond à une posture spécifique permettant la copulation avec le mâle, est exclusivement observé chez les femelles en œstrus. C'est pendant cette fenêtre précise du cycle sexuel que la copulation se produit. Une ablation des ovaires pendant la phase pré-pubertaire ou à l'âge adulte empêche l'expression du comportement de lordose (Sodersten and Hansen, 1977, Hlinak, 1985). Ce dernier peut être restauré par un traitement à l'œstradiol et à la progestérone (Sodersten and Hansen, 1977, Hlinak, 1985). Chez le mâle, le comportement sexuel est déclenché par les phéromones femelles qui induisent l'activation de processus neurophysiologiques permettant d'accomplir une monte, des mouvements pelviens, un intromission et une éjaculation (Johnston, 1998). Le comportement sexuel chez le mâle dépend surtout des stéroïdes gonadiques adultes

(testostérone essentiellement). En effet, une castration de rats à l'âge adulte induit une perte progressive du comportement sexuel (Davidson, 1966).

Différentes régions du cerveau sont impliquées dans la régulation des comportements sexuels. Chez la rate, le VMN et l'APO sont très impliqués dans le comportement de lordose (Pfaff and Sakuma, 1979). Le VMN reçoit des afférences de l'amygdale, des aires septales médiale et latérale, du lit de la strie terminale et de l'hypothalamus antérieur, l'APO et de la moelle épinière. L'APO chez la rate joue un rôle stimulateur sur la proceptivité mis en évidence par des expériences de lésions de l'APO chez la femelle qui, lors d'un test comportemental où la femelle contrôle le contact avec le mâle, celle-ci exhibe des nombres de contacts et de comportements de sollicitation significativement inférieurs à ceux des contrôles (femelles sans lésions) (Whitney, 1986). Le rôle inhibiteur sur la réceptivité a été mis en évidence par des expériences de stimulations électriques de la région de l'APO qui induisent une abolition complète du la lordose chez les femelles. Ce rôle inhibiteur impliquerait la région de la strie terminale (Takeo et al., 1993) et de l'aire tegmentale ventrale (Sakuma, 1995). Chez le mâle la région de l'APO et précisément la partie médiale (APOm) joue un rôle clé dans le comportement sexuel. L'APOm est connectée à différents réseaux neuroendocrines, thalamiques, limbiques et du système nerveux autonome (sympathique et parasymathique) qui permettent d'accomplir ce comportement (*pour revue, voir* Hull and Dominguez, 2007, Veening and Coolen, 2014).



Adaptée de *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*

Figure 13 : Mécanismes cellulaires et moléculaires de différenciation sexuelle des noyaux hypothalamiques chez les rongeurs.

Dans le NSD (noyau sexuellement dimorphique), chez le mâle, l'œstradiol activerait la voie NMDA/glutamate et induirait l'expression de Bcl-2 (anti-apoptotique) et réprimerait Bax (pro-apoptotique) permettant le maintien des neurones dans le NSD. Ceci va contribuer au processus de déféminisation du comportement à l'age adulte. Chez la femelle, l'absence (ou du moins l'expression faible) de la signalisation par les REs (récepteurs des œstrogènes) induit l'activation de la voie caspase-3 qui programme l'apoptose des neurones du NSD. A l'âge adulte le volume du NSD sera très réduit, ce qui contribuerait à maintenir le réflexe de lordose. Axe HHG : axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (*Modifié d'après* Wright et al., 2010).

G- Mécanismes d'action de l'E2

1- E2 et NDS-APO

Chez le rat, dans le NSD le rôle de l'E2 dans la mise en place du dimorphisme sexuel se fait par l'intermédiaire des récepteurs des œstrogènes nucléaires (DonCarlos and Handa, 1994). En effet, pendant le développement, il y a une forte expression de ces récepteurs dans le NSD (DonCarlos and Handa, 1994, Arai et al., 1996). ERβ est exprimé chez les rongeurs à partir de E10,5 de développement alors que ER*α* n'est détecté qu'à partir de E16,5 (Lemmen et al., 1999). Kudwa *et al.* (2005) ont rapporté que ER*α* serait impliqué dans le processus de masculinisation et ERβ serait impliqué dans la déféminisation du cerveau mâle pendant le développement. L'un des mécanismes qui interviennent dans la mise en place du dimorphisme sexuel est la régulation de l'apoptose pendant le développement **(Figure 13).** La survie des neurones à cald-d28k chez le mâle se fait grâce à l'E2 qui induit l'activation du récepteur NMDA. L'activation de NMDA par son substrat, le glutamate induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et la répression de la protéine pro-apoptotique Bax **(Figure 13**). Ce profil d'expression de Bcl-2 et Bax va induire la répression de la voie pro-apoptotique caspase-3, permettant ainsi la survie cellulaire chez le mâle. Chez la femelle, l'absence de l'E2 pendant la période périnatale ne permet pas d'activer la signalisation NMDA/glutamate, le rapport Bcl-2/Bax est inversé, la voie caspase-3 est favorisée, induisant la mort cellulaire (*pour revue* Wright et al., 2010). Le phénomène d'apoptose à lui seul ne serait pas l'unique mécanisme qui induit ce dimorphisme sexuel, du moins le nombre de neurones calb-d28k du NSD. L'invalidation de la protéine pro-apoptotique Bax chez la souris induit la survie des neurones calb-d28k dans le noyau du lit de la strie terminale postérieur (BNSTp) mais le nombre de cellules en survie n'est pas différent entre les mâles et les femelles, ce qui suggère que le dimorphisme sexuel n'est pas dû exclusivement à une différence du taux d'apoptose, mais aussi à des mouvements cellulaires comme la migration et la localisation finale des cellules (Gilmore et al., 2012). Ces données, ainsi que d'autres études, suggèrent la contribution de la migration et l'organisation cellulaire dans le cerveau en développement pour la mise en place du dimorphisme sexuel adulte (Henderson et al., 1999).

D'autres études ont suggéré un rôle de la protéine calb-d28k dans la protection des neurones qui l'expriment, permettant la survie de ces cellules (Guo et al., 1998). Ce mécanisme suggère un rôle de la testostérone et son métabolite l'E2, dans

l'orientation de la différenciation des neurones en développement par induction de l'expression de protéines permettant leur survie (Gilmore et al., 2012).

2- E2 et AVPV

Contrairement au NSD, dans l'AVPV, le nombre de neurones est plus important chez les femelles comparées aux mâles (**Figure 13**). Le nombre de neurones dopaminériguques, GABA/glutamatergiques et kisspeptinergiques est plus important chez la femelle que chez le mâle (Simerly et al., 1985, Ottem et al., 2004, Bodo et al., 2006). Le rôle de l'E2 dans la mise en place de ce dimorphisme serait, contrairement au NSD chez les mâles, pro-apoptotique mais les mécanismes seraient différents pour chaque population neuronale. Dans les neurones dopaminergiques, il a été montré *in vitro* que le traitement à l'E2 active la voie des caspases et induit la mort de ces neurones (Waters and Simerly, 2009). Chez des souris invalidées pour la protéine pro-apoptotique Bax (souris Bax-KO), il a été observé une augmentation du nombre de total de neurones détectés dans l'AVPV chez les deux sexes et une abolition du dimorphisme sexuel du nombre total de neurones détectés dans l'AVPV (Forger et al., 2004). Bax semble donc nécessaire pour la différenciation sexuelle du nombre de neurones total dans l'AVPV. Néanmoins, l'absence de Bax n'abolit pas le dimorphisme sexuel dopaminergique et n'a pas d'impact sur le nombre de ces neurones chez le mâle ou chez la femelle (Forger et al., 2004, Semaan et al., 2010). Cela suggère l'implication d'autres mécanismes dans la différenciation sexuelle de l'AVPV tels que la différenciation neuronale

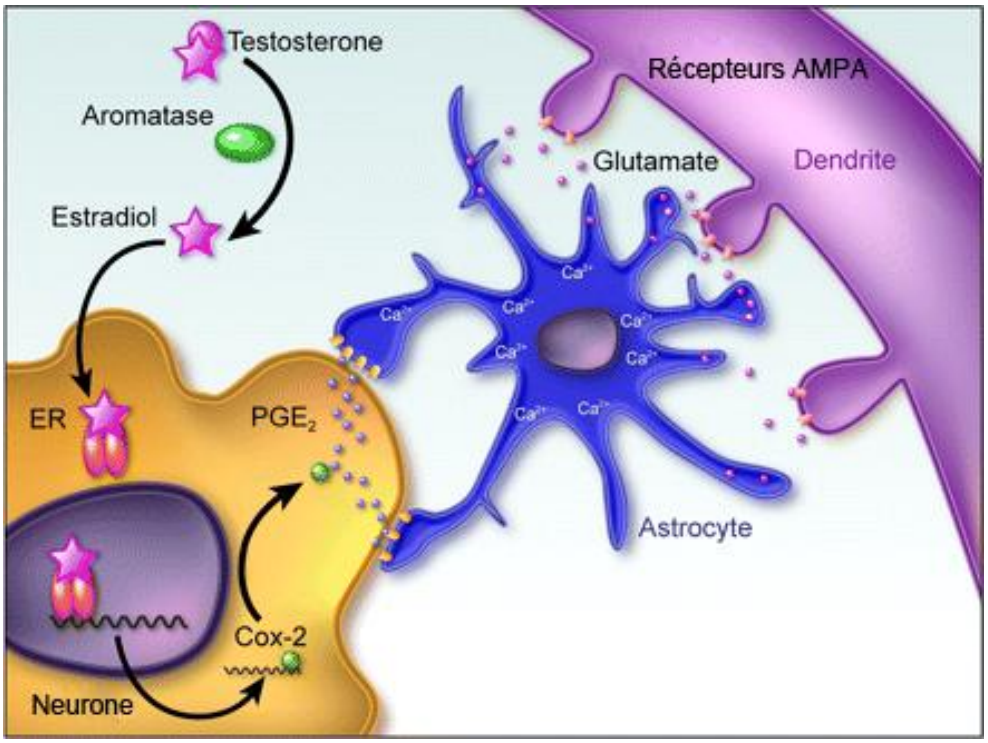


Figure 14 : Modèle de travail de l'action de l'œstradiol (E2) sur la mise en place du dimorphisme sexuel dans l'aire pré-optique (APO).

Dans l'APO, chez le mâle le nombre d'épines dendritiques est environ deux fois plus important comparé à la femelle. Les astrocytes présentent également une morphologie plus complexe dans l'APO des mâles. Ces différences entre les sexes sont mises en place sous d'action de l'E2 périnatal. Le facteur initiateur de la différenciation est le COX-2 qui est une enzyme clé dans le processus de synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2). La signalisation *via* les récepteurs à la PGE2 couplés aux protéines G situés sur les membranes des astrocytes induit une augmentation de la sécrétion de glutamate de manière calcium-dépendante. Ce dernier va favoriser la croissance dendritique. Le traitement à la PGE2 induit une expression deux à trois fois plus importante du nombre d'épines dendritiques dans l'APO. Cet effet est contrecarré par un bloqueur des récepteurs AMPA au glutamate. Dans ce modèle, le dialogue astro-glial s'avère indispensable à mise en place du dimorphisme sexuel par l'action de l'E2 périnatal (D'après McCarthy MM, 2008).

3- Cibles cellulaires et moléculaires de l'E2

Chez la femelle, en absence de quantités suffisantes d'E2 pendant la période périnatale dans les neurones GABA/glutamatergiques, l'activation d'une cytokine pro-inflammatoire, la TNFα (Tumor Necrosis Factor α) qui agit *via* les récepteurs NFkB, permet le maintien de ces neurones en survie. Chez le mâle, l'E2 induit l'expression de la protéine TRIP (*TRAF2-Inhibiting Protein*) qui inhibe la voie TNFα/NFkB et la protéine anti-apototique Bcl-2. Cela induit l'activation de la voie caspase-3 et la mort de ces neurones chez le mâle (Krishnan et al., 2009). La voie TNFα/NFkB chez les femelles est uniquement exprimée dans l'AVPV mais jamais dans le NSD-APO, ce qui est cohérent avec le taux d'apoptose élevé dans ce noyau **(Figure 13)** (Krishnan et al., 2009). Cela explique l'absence de dimorphisme sexuel des neurones à kisspeptine dans l'AVPV et dans le PVpo pendant la période périnatale et qui n'est observé que vers le 12ème jour post-natal (Semaan et al., 2010). Les souris Bax-KO présentent une légère augmentation du nombre de neurones à Kisspeptine mais ne perdent pas le dimorphisme sexuel. Ces données suggèrent que la voie de l'apoptose *via* Bax n'est pas à l'origine -ou du moins pas la seule- du dimorphisme sexuel des neurones à kisspeptine de l'AVPV et du PVpo (Semaan et al., 2010).

Le dimorphisme sexuel concerne non seulement le volume des noyaux hypothalamiques et le nombre de neurones mais aussi l'ultrastructure et la morphologie des cellules. En effet, chez les rongeurs, il a été montré que la densité des épines dendritiques jouant un rôle important dans la transmission de signaux neuronaux excitateurs, est plus importante chez les mâles comparés aux femelles (Amateau and McCarthy, 2002). Ces signaux excitateurs sont directement impliqués dans le comportement sexuel mâle. Les travaux d'Amateau et McCarthy (2002, 2004) ont mis en évidence le rôle de la prostaglandine E2 (PGE2) dans la croissance dendritique pendant la période périnatale chez les mâles et une corrélation entre le taux d'expression de la PGE2 et le comportement sexuel mâle **(Figure 14**) (Amateau and McCarthy, 2002, 2004). La PGE2 induite par la surexpression des cyclooxygénases 1 et 2 (COX1 et COX2), elles-mêmes induite par l'E2 périnatal. Le traitement des femelles avec de la PGE2 en période périnatale induit une masculinisation de l'arborescence dendritique dans l'APO et l'expression du comportement sexuel mâle à l'âge adulte. Le mécanisme d'induction de l'expression de COX1 et COX2 sont encore indéfinis. Le rôle du glutamate comme médiateur de

l'effet de l'E2 dans la production de la prostaglandine PGE2 a été évoqué. L'E2 induit la sécrétion du glutamate en activant une voie de signalisation non génomique impliquant les PI3 kinase. Cela induirait une activation des MAP kinases dans les neurones post-synaptiques, ce qui mène à l'activation de la spinophiline, une protéine indispensable à la croissance dendritique (Amateau and McCarthy, 2002, 2004)

L'équilibre hormonal pendant le développement s'avère donc comme un paramètre primordial pour la mise en place des circuits hypothalamiques et leur différenciation fonctionnelle pendant le développement et leur activation chez les individus mâles et femelles à l'âge adulte. La rupture de cet équilibre par une exposition accidentelle à des molécules exogènes ayant une activité stéroïdienne agoniste ou antagoniste ou ayant la capacité d'interférer avec la synthèse et l'activité des hormones endogènes pendant le développement, pourrait directement interférer avec la mise en place et le fonctionnement de ces réseaux. De ce fait, les réseaux neuroendocrines hypothalamiques peuvent constituer une cible de choix des PEs œstrogéno-mimétiques.

IV- LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

A- Généralités

La définition *ad hoc* adoptée par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE), de l'OMS en 1996 est la suivante : « *Un perturbateur endocrinien est une substance exogène capable de causer des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact ou sur sa descendance suite à des changements dans les fonctions endocrines*[1] ». Les PEs sont capables de mimer les hormones naturelles, d'inhiber leur action ou d'altérer la fonction régulatrice de ces dernières. Ils sont capables d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles nécessaires au maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du comportement et du développement des organismes (Kavlock et al., 1996). Actuellement, la définition opérationnelle retenue est celle donnée par l'OMS (*cf.* voir l'introduction générale). D'un point de vue scientifique, la société d'endocrinologie qualifie de PE: « *toute substance exogène naturelle ou synthétique capable d'altérer le système hormonal et homéostatique suite à une exposition environnementale inappropriée, rendant incapable les organismes exposés à communiquer et s'adapter à l'environnement* [2] ».

B- Origine et sources de contamination par les PEs

Les PEs peuvent donc être d'origine naturelle (ex : hormones naturelles), issus de l'activité humaine (élevage intensif et grandes aires urbaines) ou synthétique, essentiellement issus de l'industrie chimique (agents plastifiants, produits phytosanitaires, etc.), ou de l'industrie pharmaceutique (œstrogènes de synthèse, antibiotiques, etc.). Les PEs capables d'induire des perturbations de la fonction de reproduction sont essentiellement les molécules ayant une activité œstrogénique, androgénique, ou antagoniste de ces dernières.

[1] *European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings, 2–4 December, Weybridge, UK, 1996.*

[2] *U.S. Government Environmental Protection Agency (EPA). Endocrine Disruptor ScreeningTesting Advisory Committee (EDSTAC), final report, 199).*

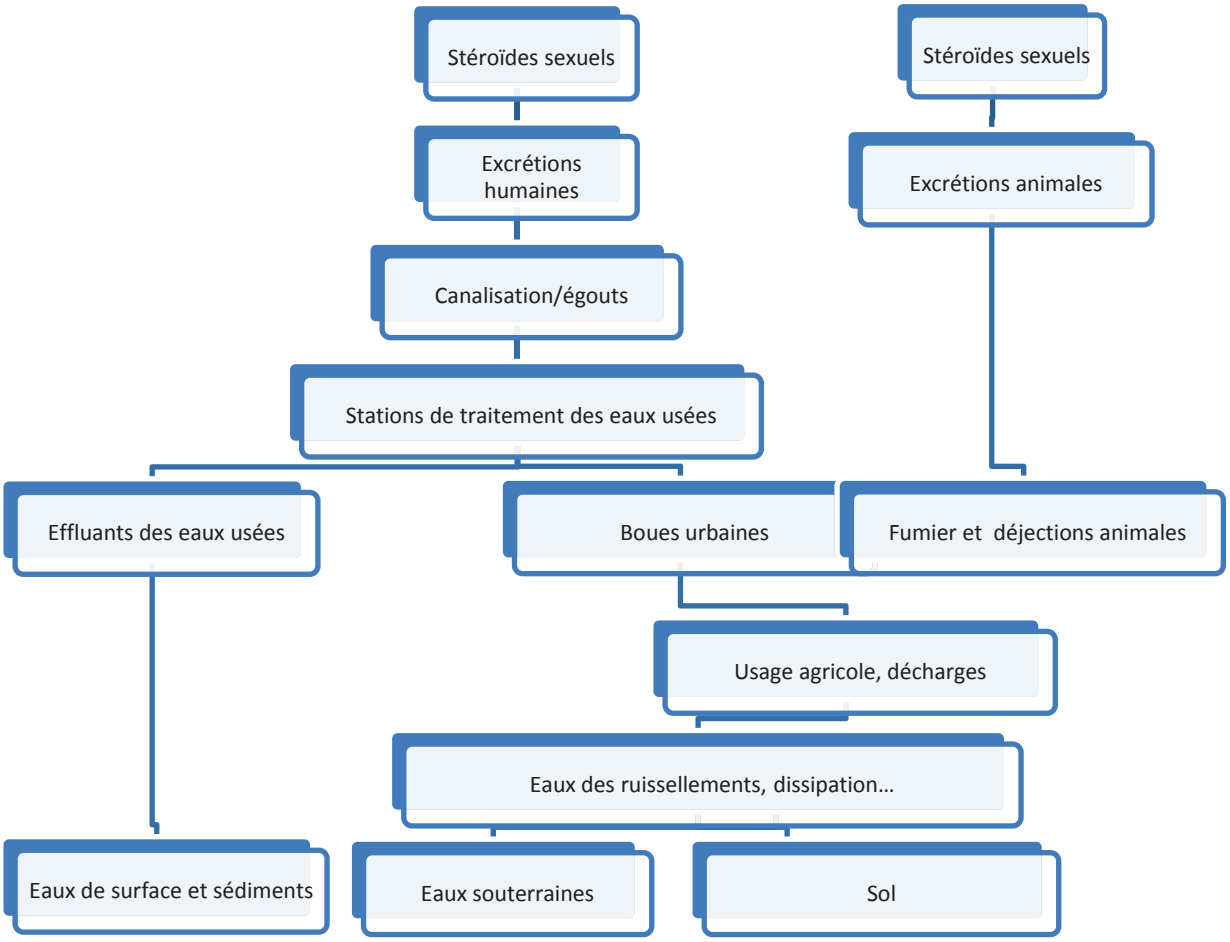


Figure 15 : Sources de contamination par les perturbateurs endocriniens œstrogéno-mimétiques.

La majorité des stéroïdes retrouvés dans l'environnement provient des zones périurbaines (stéroïdes endogènes et synthétiques excrétés par le corps). Une partie de la pollution par les oestrogènes provient de l'activité agricole (élevages intensifs d'animaux de rente), les hormones issues de cette activité agricole échappent aux traitements par les stations d'épuration et se retrouvent directement dans les eaux souterraines et les plans d'eau de surface (rivières, lacs, sol, etc.).

De nombreuses études expérimentales sur différents modèles animaux ou modèles *in vitro* ont permis d'identifier le mode d'action spécifique à chaque molécule au niveau cellulaire et moléculaire. Dans le **tableau 1** sont cités quelques exemples de PEs les plus étudiés et qui sont capables d'interférer avec la signalisation et la biodisponibilité des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes.

La plus grande source de contamination par les hormones œstrogéniques provient essentiellement de l'activité l'humaine **(Figure 15)**. Les hormones excrétées par les urines essentiellement (Pauwels et al., 2008) dans les eaux usées peuvent échapper aux stations d'épuration, notamment, les œstrogènes de synthèse comme l'EE2. Celles-ci ne sont pas complétement éliminées et se retrouvent véhiculées dans les eaux de surface et les eaux souterraines. Les PEs peuvent provenir des déchets issus de l'industrie chimique et pharmaceutique, mais également des rejets massifs des établissements hospitaliers, des élevages intensifs d'animaux de rente (animaux traités par des hormones) *via* le rejet de leurs matières fécales et des urines dans les circuits (*pour revue, voir* Aris et al., 2014). Les élevages en aquaculture, utilisant les hormones de synthèse pour contrôler le sexe phénotypique des poissons, constituent une source de contamination pour l'environnement, mais aussi pour l'homme par l'alimentation (Beardmore; et al., 2001).

Tableau 1 : Exemples de perturbateurs endocriniens agonistes ou antagonistes des récepteurs aux œstrogènes ou androgènes.

Catégorie	**Substances**	**Modes d'action**	**Références**	**Sources de contamination**
Stéroïdes naturels	Œstrogènes : œstradiol, estrone, estriol	Agonistes ERα, ERβ, GPR30	(Lopez et al., 2015)	Effluents municipaux, cours d'eau agricoles
	Androgènes : Testostérone, androstérone	Agonistes AR		
Stéroïdes	Ethinylestradiol,	Agonistes ERα,	(Owens and	Effluents

synthétiques	mestranol, Diethylstilbestrol	ERβ, GPR30	Koeter, 2003, King et al., 2015, Lopez et al., 2015)	municipaux, agricoles, hospitaliers, industrie pharmaceutique
Phytœstrogènes	Genistein, Daizen, Coumestrol		(Owens and Koeter, 2003)	Effluents des usines alimentaires, contamination alimentaire (maïs).
Pesticides/herbicide / insecticides	Atrazine	Expression du gène de l'aromatase cytochrome P450-19 hydroxylase	(Hayes et al., 2006)	Agriculture, effluents, pollution de l'air, incinération, aliments contaminés
	Vinclozolin	Anti androgénique	(Robitaille et al., 2015)	
	dichlorodiphényltrichloro méthane (DDT)			
Composés organiques et plastifiants	Bisphénol A	Agonistes ERs	(Xu et al., 2005, Bonefeld-Jorgensen et al., 2007)	vêtements, cosmétiques, ustensiles, jouets
	Dibutyl phtalate	Antagonistes AR		
Alkylphenols (detergents, surfactants)	Nonylphenols, Octylphenol	Stimule l'activité AhR, agonists ERs, antagonists AR	(Xu et al., 2005, Bonefeld-Jorgensen et al., 2007)	détergents, herbicides, pesticides, plastiques
Les polychlorodibenzo-p-dioxines ou (Dioxines)	2,3,7,8-TCDD, Furanes (PCDF), PCB (*Dioxin-like*)	Stimule la dégradation des ERs, AR via les récepteurs AhR	(Ohtake et al., 2007)	Produits issues de la combustion des déchets (ex. industrie métallurgique)

ERα, ERβ : récepteurs des œstrogènes α, β. GPR30 : récepteur couplé aux protéines G. AR : récepteur des androgènes. AhR : récepteur Aryl hydrocarbon.

C- Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires potentiels des PEs

1- Activité oestrogéno-mimétique

Les molécules dotées d'une activité œstrogénique (œstrogènes naturels ou synthétiques, phytœstrogènes) sont capables de diffuser dans la cellule de manière passive et de se fixer aux récepteurs des œstrogènes nucléaires et d'activer la transcription de gènes spécifiques. Les récepteurs des œstrogènes α et β, lorsqu'ils fixent un agoniste naturel ou synthétique, forment des dimères (homo- ou hétéro-dimères) biologiquement actifs capables de former des complexes transcriptionnels qui vont se lier aux éléments de réponse aux hormones (HRE ; Hormone Respensive Elements) situés au niveau de la partie régulatrice des gènes cibles. Ce complexe induit la transcription de gènes et la synthèse de protéines spécifiques marqueurs de l'activité endocrine du complexe hormone-récepteur. Les protéines synthétisées (enzymes, hormones, facteurs de transcription, facteurs de croissance) vont induire une activité biologique locale ou peuvent être transportées vers d'autres cibles cellulaires **(Figure 16)**.

2- Activité androgéno-mimétique

Les récepteurs des androgènes sont une cible privilégiée des PEs androgéno-mimétiques ou anti-androgéniques. *In vivo* l'exposition à des molécules comme la vinclozoline induit une perturbation des structures sexuellement dimorphiques dans le cerveau et des comportements sexuels (Colbert et al., 2005, Bisenius et al., 2006). Les pesticides comme la vinclozoline ayant une activité anti-androgénique peuvent interagir directement avec le récepteur AR pour induire ainsi une phosphorylation kinase dépendante et une activation, mais aussi agir sur les enzymes de la stéroïdogénése, pouvant induire une altération dans le processus de phosphorylation et mener à une perte d'affinité, accumulation ou une dégradation du récepteur (Robitaille et al., 2015). Les AR sont impliqués dans la différenciation sexuelle du cerveau pendant le développement chez le mâle et la femelle (Martini et al., 2008, Allieri et al., 2013), mais aussi dans la physiopathologie de certains cancers tels que celui de la prostate (Daniels et al., 2014)

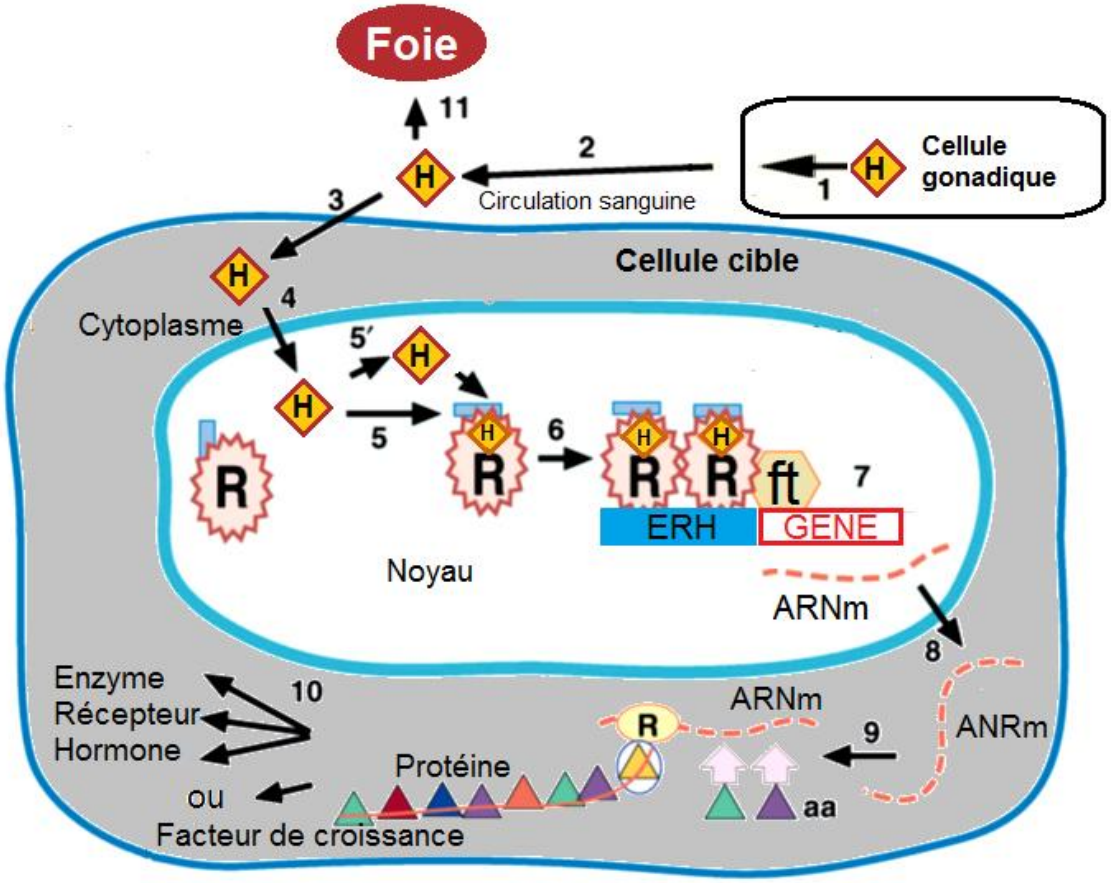


Figure 16 : Mécanismes d'action géniques des hormones stéroïdes gonadiques sur les cellules cibles.

L'hormone (H) synthétisée par la cellule gonadique **(1)** est véhiculée par le sang vers les cellules cibles (ex. cellule gonadotrope, cellule neuroendocrine) **(2)**. Grâce à sa liposolubilité, elle diffuse dans la cellule cible par voie passive à travers la membrane plasmique pour atteindre le cytoplasme **(3)**. L'hormone va se fixer à son récepteur spécifique (R) qui est localisé dans le cytoplasme ou dans le noyau **(4-5)**. Dans les deux cas le complexe hormone-récepteur agit au niveau nucléaire après un changement de conformation qui le rend capable de se fixer sur l'élément de réponse à l'hormone (HRE), localisé dans la région promotrice d'un gène cible **(5-6).** Ce complexe mobilisera des facteurs de transcription nucléaire s(ft) qui vont activer la synthèse de l'ARN messager (ARNm) **(7)** qui est traduit en protéine dans le cytoplasme **(8-9).** Selon son rôle physiologique, la protéine synthétisée (enzyme, récepteur, hormone ou facteur de croissance) va jouer son rôle localement ou sur d'autres cellules cibles adjacentes ou dans d'autre région de l'organisme **(10)**. L'excès d'hormone circulant est métabolisé par le foie **(11)**.

3- Le récepteur aryl hydrocarbon (AhR)

Les effets de certains perturbateurs endocriniens comme les dioxines (les polychlorobiphényles ou PCB) sont médiés par les AhR. Ce récepteur est présent dans plusieurs tissus de l'organisme et aussi dans le cerveau (Hays et al., 2002). La toxicité *via* les AhR suite à une exposition aux PEs induit des troubles comportementaux et cognitifs chez la souris (Eriksson and Talts, 2000). Les mécanismes d'induction de ces perturbations sont largement mal connus. Certaines études ont démontré que ces récepteurs activés *via* les dioxines sont capables d'altérer plusieurs processus impliqués dans la différenciation sexuelle du cerveau comme le phénomène d'apoptose neuronale pendant le développement (Frye et al., 2012), l'activité enzymatique de l'aromatase (Carlson and Perdew, 2002), la production ou la dégradation des ERs et ARs par l'activation du protéasome (Wormke et al., 2003). Certaines études ont suggéré que la voie de signalisation induite par les AhR est capable d'interférer avec la voie de signalisation des REs, ce qui peut contribuer à moduler les effets des oestrogénomimétiques (Matthews and Gustafsson, 2006)

D- Effets des faibles doses et notion de courbe dose-réponse non monotone

Les règles des tests toxicologiques pour évaluer les risques chimiques chez l'Homme sont basées sur la détermination des doses de référence telles que la dose **NOAEL** (dose n'ayant pas d'effet notable) et la dose **LOAEL** (dose la plus faible produisant un effet notable), la dose maximale journalière tolérée (**MTD**) et la dose « **sûre** » **(Figure 17A)**. Ces valeurs sont déterminées en testant les doses fortes jusqu'à la dose NOAEL pour des paramètres bien définis. Un facteur de sécurité (X100) est ensuite appliqué pour déterminer la dose « sûre ». Cependant, dans la majorité des cas, les effets réels de cette dose présumée « sûre » n'ont pas été testés et sont considérés comme théoriquement nuls (Vandenberg et al., 2012). Or, de plus en plus d'études ont décrits des effets significatifs suite à une exposition à de très faibles doses, en dessous des doses définies comme « sûres ». De plus, les courbes dose-réponse de certaines molécules ne répondent pas de manière linéaire puisque certains effets à très faible dose ne sont pas observés à des doses intermédiaires et ne sont détectés qu'à de très fortes doses (courbe dose réponse en U ou en U inversé) **Figure 17A, 17B).**

Certaines études ont montré que pour les molécules ayant une activité endocrine telles que l'E2, les doses seuils déterminées par les tests règlementaires n'ont pas été détectées. En effet, l'étude réalisée par Sheehan et ses collaborateurs sur l'effet de l'E2 sur la sex-ratio des œufs de tortue a montré que des concentrations très faibles d'E2 peuvent induire des effets biologiques significatifs. Cette étude a démontré, en utilisant des mesures biologiques concrètes, que les doses théoriquement présumées sans risque (doses sûres) , induisent des effets significatifs même à de très faibles doses, situées en dessous des doses seuils de référence (Sheehan et al., 1999).

Les hormones endogènes peuvent agir à très faible dose sur l'organisme et les effets produits par les très faibles doses de molécules exogènes peuvent s'additionner aux effets des œstrogènes endogènes et donc d'amplifier leurs effets **(Figure 12B)**. En suivant ce raisonnement, aucune dose, même infiniment faible ne peut être considérée comme sûre. Les auteurs de cette étude concluent que dans l'environnement, les PEs sont présents à des concentrations estimées très faibles qui se situent en dessous des doses maximales journalières acceptées et que les effets de ces faibles doses doivent être réévalués pour estimer leur impact réel sur la santé (Sheehan et al., 1999).

Par ailleurs, pour tester les effets PEs pour une molécule, plusieurs paramètres doivent être pris en compte: Les doses à tester doivent prendre en compte les doses de références toxicologiques, les doses nécessaires pour induire des concentrations dans les liquides biologiques dans le modèle animal utilisé équivalentes à celles retrouvées chez l'humain. Le métabolisme de la molécules, la période d'exposition (période développementale et effets à long-terme), et enfin la nécessité d'évaluer l'effet de ces molécules sur des paramètres plus sensibles que ceux évalués par les tests toxicologiques classiques sont également des paramètres important à prendre en considération avant d'entreprendre une étude sur l'effet PE d'une molécule (Myers et al., 2009, Vandenberg et al., 2012).

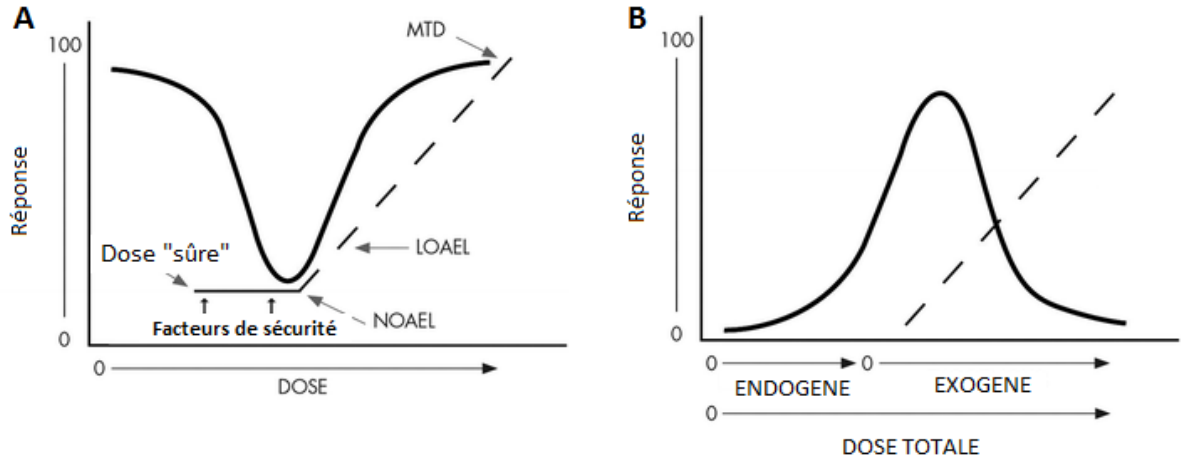


Figure 17 : **Calcul des valeurs toxicologiques de référence**.

A) Les doses de référence en toxicologie, Dose maximale tolérée (**MTD**), la dose **NOAEL** (No Observed Adverse Effect Level) et **LOAEL** (Lowest Observed Adverse Effect Level) sont obtenues en testant des doses fortes d'une molécule sur des paramètres morphématiques (courbe de croissance, sex-ratio, malformations, etc.). Des **facteurs de sécurité** sont ensuite appliqués pour calculer la dose de référence présumée sans danger (**dose « sûre »**). La ligne en pointillés représente les doses testées pour définir les doses de référence et la dose sûre après application des facteurs de sécurité. Plusieurs études ont montré que certaines de ces molécules induisent des effets qui peuvent être observés à des niveaux en dessous de la dose de référence. La ligne épaisse représente la réponse réelle, en forme de U, de la molécule testée, cette réponse met en évidence un effet à des doses très faibles équivalent à un effet obtenu par la forte dose. **B)** Courbe dose-réponse mettant en évidence le fait que la réponse à un PE est toujours observée en présence d'une hormone endogène. En effet, une hormone exogène (ou PE) pourrait avoir une réponse linéaire dans la gamme testée (ligne en pointillés), mais ces effets doivent tenir compte de l'activité des hormones endogènes qui n'induisent pas de courbe de réponse linéaire. Des données expérimentales (courbe en U inversé) indiquent que les perturbateurs endocriniens et les hormones n'ont pas de dose NOAEL ou doses de seuil, ce qui implique qu'aucune dose ne peut être considérée comme sûre (D'après Vandenberg et al. 2012).

E- Période de sensibilité et conséquences à long-terme

Le mode de vie actuel, basé sur une industrie chimique intense et génératrice de pollution à différents niveaux des écosystèmes qui nous entourent, a engendré une exposition ubiquiste et continue aux PEs des populations humaines et de la faune sauvage. Les individus sont exposés d'une manière chronique et pendant toutes les phases de leur vie y compris la période de développement. Les études évaluant les facteurs de risques impliqués dans le neurodéveloppement ont pu mettre en lien l'exposition à des événements environnementaux pendant la gestation et la vie postnatale, et l'apparition de certains troubles comme la dépression et l'autisme chez l'Homme et chez des modèles animaux reproduisant ces maladies (Miodovnik et al., 2011, Harley et al., 2013, Wolstenholme et al., 2013). Cela suggère que ces événements sont capables d'induire des modifications irréversibles pendant la période développementale où a eu lieu l'exposition (Bale, 2015). Les périodes critiques comme le développement intra-utérin et périnatal, se sont avérées particulièrement sensibles aux PEs. Les molécules agonistes des récepteurs des hormones peuvent induire une réponse semblable à celle induite par les hormones naturelles, permettant ainsi une action inadaptée induisant une réaction physiologique erronée. Pendant le développement, les œstrogènes exercent un rôle organisationnel sur le développement du système nerveux central. Un apport exogène en œstrogènes est capable de perturber la balance hormonale et induire des réponses inadaptées et persistantes capables d'altérer à long-terme la physiologie et les comportements chez l'adulte. Plusieurs études récentes menées sur des animaux de laboratoire ont montré que ces modifications qui peuvent être latentes et n'apparaitre qu'à l'âge adulte sont la conséquence d'une altération de marques épigénétiques *(voir l'encadré plus loin*)* des gènes cibles qui sont induites lors de l'exposition aux PEs en question (Skinner, 2014, Vaiserman, 2014, Guerrero-Bosagna and Jensen, 2015).

F- Effets transgénérationnels des perturbateurs endocriniens

Au-delà des effets directs sur l'individu lui-même, il est actuellement établi que certaines molécules ont des effets qui se transmettent sur plusieurs générations (*pour revue, voir* Crews at Gore 2011). En effet, l'exposition à certains PEs, comme par exemple la vinclozoline, pendant le développement chez la souris, induit une augmentation du taux d'apoptose testiculaire ainsi qu'une réduction du nombre de spermatozoïdes chez les individus exposés pendant leur développement intra-utérin

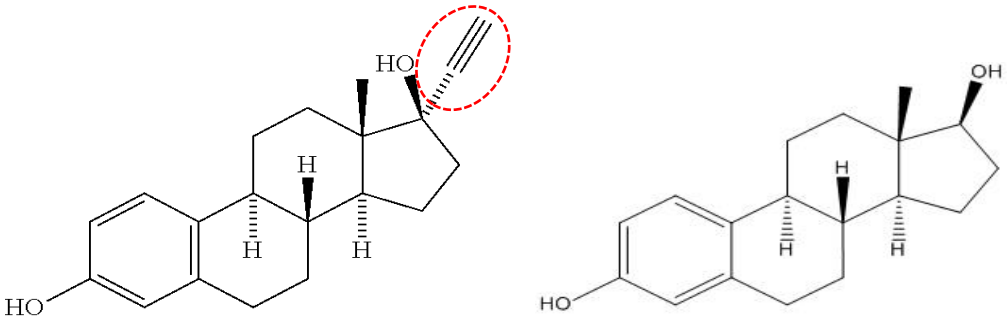
(E8-E15) et d'une manière surprenante, ces phénotypes sont retrouvés chez leur descendance jusqu'à la quatrième génération (Anway et al., 2005).

L'analyse des marques épigénétiques des cellules germinales des mâles exposés à la vinclozoline a révélé des altérations de la méthylation de 17 gènes différents chez les souris traitées comparées aux souris contrôles de toutes les générations (Anway et al., 2005).

D'autre part, des études épidémiologiques ont aussi rapporté des effets transgénérationnels potentiels des PEs chez l'humain. Les études récentes menées sur des femmes dont les mères ont été exposées aux DES pendant leur développement intra-utérin suggèrent un lien entre l'incidence de certains désordres à la naissance et à l'âge adulte des individus dont les grand-mères ont reçu du DES pendant leur grossesse (Titus-Ernstoff et al., 2008, Titus-Ernstoff et al., 2010). Cependant, ces études restent préliminaires et requièrent de plus amples recherches afin de confirmer la relation causale.

***Les marques épigénétiques**

Ce sont l'ensemble des facteurs cellulaires, protéines, microARN qui modulent la structure chromatinienne d'un gène, sans altérer sa séquence nucléotidique originelle, permettant ainsi une expression différentielle ou une répression de son expression, en fonction du type cellulaire, du contexte physiologique, développemental, environnemental, physiopathologique ou évolutif de l'individu (Bale, 2015). Les principaux mécanismes impliqués dans la mise en place de l'empreinte épigénétique sont la méthylation des histones, la méthylation des séquences nucléotidiques des gènes (des îlots CpG) ou la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation des histones (Sweatt, 2013). Pendant le développement, le contrôle épigénétique de l'expression des gènes est l'un des mécanismes essentiel permettant la mise en place et la différenciation tissu-spécifique, organe-spécifique et sexe-spécifique des cellules. L'exemple du processus le plus commun en biologie du développement, et qui requiert des mécanismes épigénétiques, est l'inactivation d'un chromosome X chez la femelle pendant l'embryogenèse. (Pour revue, voir Okamoto and Heard, 2009).



17α-Ethinylestradiol (EE2) **17β-Estradiol (E2)**

Figure 18 : Structures de l'EE2 et de l'E2.

La structure de l'EE2 est très similaire à celle de l'E2 naturel. Un groupement éthinyl en position 17-α a été ajouté (entouré en rouge) à la molécule d'E2 pour en dériver l'EE2, lui permettant ainsi de mieux résister à la dégradation enzymatique par le foie.

G- L'éthinylœstradiol (EE2)

1- *Propriétés physico-chimiques*

L'EE2 est une molécule pharmacologique de synthèse dérivée de l'E2 et ayant une activité hormonale de type œstrogénique **(Figure 18)**. Cette molécule active par voie orale est utilisée dans la composition de la pilule contraceptive et dans les traitements hormonaux pour le syndrome post-ménopausique et certains cancers, tels que le cancer de la prostate. D'un point de vue physico-chimique, l'EE2 a un poids moléculaire de 296.40 g. mol^{-1}, soluble dans l'éthanol (1volume/6volume d'éthanol) et dans les compartiments lipidiques. Peu soluble dans l'eau (4,8 -11,3 mg/L à 27°C), la valeur du coefficient de partage entre l'octanol et l'eau (3.67-4.2) indique le taux relativement haut de coefficient de répartition. Ceci rend l'EE2 relativement persistant, préférentiellement dans les compartiments organiques des milieux aquatiques. Cette propriété d'hydrophobicité, son faible taux de volatilité et sa résistance à la biodégradation le rendent hautement absorbable par les sédiments et les sols et bioaccumulable dans les compartiments organiques des écosystèmes aquatiques comme les algues (Lai et al., 2002a) les planctons et les poissons (Lai et al., 2002b, Dussault et al., 2009). Ceci peut d'ailleurs contribuer à une sous-estimation de ses concentrations dans les compartiments aquatiques.

Tableau 2 : Exemples de concentrations en EE2 dans l'eau dans différentes régions du monde

Localisation	EE2 ($ng.L^{-1}$)	Référence
139 cours d'eau, USA	n.d.-831	(Kolpin et al., 2002)
14 rivières, Portugal	n.d.-<3.15	(Rocha et al., 2013)
Mer Egée, Grèce	<7.00	(Arditsoglou and Voutsa, 2012)
Rivière Dagu , Chine	ND–35.6	(Lei et al., 2009)
Trois rivières du Tianjin, Chine	n.d.-24.4	(Rao et al., 2013)
Lac de Taihu, Chine	n.d.-33.5	(Wang et al., 2015)

2- EE2 et pollution environnementale

L'EE2 est relativement persistant dans l'environnement, sa demi-vie est de 46 jours à 20°C. Les concentrations environnementales d'EE2 dans les compartiments aquatiques (**Tableau 2**) sont très variables selon la localisation géographique, la nature des écosystèmes dans lesquels l'hormone a été dosée et les méthodes de détection utilisées, voire même la saison pendant laquelle les prélèvements ont été réalisés (Zhou et al., 2012). Les concentrations en EE2 dans les eaux de surface (rivières et lacs) sont généralement très faibles, de l'ordre de 0,4 à 4,3 $ng.L^{-1}$ en Europe (Belfroid et al., 1999), mais peuvent atteindre exceptionnellement 75 $ng.L^{-1}$ dans certains plans d'eau très pollués par les déchets anthropiques (Pojana et al., 2004). Dernièrement, des concentrations extrêmement élevées ont été rapportées dans certains effluents (entrée des stations d'épuration) en Chine, pouvant atteindre 4100 $ng.L^{-1}$. La concentration moyenne en EE2 rapportée dans 16 plans d'eau sur les 17 analysés est de 14,1 $ng.L^{-1}$ en été et de 510 $ng.L^{-1}$ en hiver (Zhou et al., 2012). Cette variabilité serait due à une variation de la demi-vie de l'EE2 en fonction de la température (Balsiger et al., 2010).

La précision de ces mesures est dépendante de plusieurs paramètres, parfois difficiles à maîtriser. En effet, la limite de sensibilité des méthodes de mesure utilisées, la température, la méthode de prélèvement et de conservation des échantillons sont des paramètres sujets à la variabilité expérimentale. De plus, pour des molécules peu solubles dans l'eau, comme c'est le cas de l'EE2, la limite du dosage dans l'eau devient partiellement biaisée puisque la molécule est capable de se fixer sur des résidus organiques et les sédiments, et donc échappe au dosage dans le compartiment liquidien. La concentration en EE2 dans les sédiments serait comprise entre 5 et 500 $ng.kg^{-1}$ dans les sédiments marins des côtes australiennes (Braga et al., 2005), et entre 4 à 184 $\mu g.kg^{-1}$ dans les sédiments de lac en Chine (Wang et al., 2015) **(Tableau 3)**. Tous ces paramètres peuvent contribuer à une sous-estimation des concentrations réelles en EE2 dans l'environnement et par conséquence sous-estimer les effets sur la santé de la faune sauvage et celle des humains.

Tableau 3 : Concentration en EE2 dans les sédiments d'eaux douces et d'eau de mer dans différents régions du monde

Localisation	[EE2] µg.kg^{-1}	Référence
Mer Égée, Grèce	<7.00	(Arditsoglou and Voutsa, 2012)
La Mangrove, Brésil	n.d.-130	(Froehner et al., 2012)
Rivière Tagu, Chine	0,81-9,26	(Lei et al., 2009)
Lac Taihu, Chine	4.32-184	(Wang et al., 2015)

3- Propriétés pharmacologiques et biologiques

L'EE2 pris par voie orale est doté d'une activité biologique très forte, grâce au groupement éthinyl en position C17 qui le protège de la dégradation hépatique (Bolt, 1979) **(Figure 18)**. Contrairement à l'E2, l'EE2 possède une haute affinité à l'albumine sérique et se lie très peu aux protéines de liaison aux hormones stéroïdes (SHBG - Sex Hormone Binding Globulin) et à l'α-foeto-protéine (Raynaud, 1973, Fotherby, 1996). Chez l'humain comme chez les rongeurs, la biodisponibilité de l'EE2 est très variable en fonction de l'individu, elle peut aller de 20 à 80 % de la quantité initiale ingérée (Fotherby, 1996). La demi-vie de l'EE2 est d'environ 6 heures chez la femelle (rongeur, humain) et de 2 heures chez le mâle. Cette différence dans la durée de demi-vie suggère une différence dans les voies de métabolisation, de transport ou une interaction avec les processus de métabolisation des œstrogènes endogènes chez les femelles comparées aux mâles.

Ces caractéristiques biologiques lui confèrent une biodisponibilité plus importante et une activité oestrogénique plus forte que l'E2. Cette activité biologique a été évaluée par trois paramètres différents : La capacité de l'EE2 a transloquer les REs dans le noyau, son affinité de fixation aux REs et enfin l'activité transcriptionnelle induite sur des gènes cibles.

La capacité de l'EE2 a transloquer les REs dans du cytosol au noyau est cent fois plus puissante que celle de l'E2 (Dickson and Eisenfeld, 1981 citée par Kunz et al. 2013). L'affinité de l'EE2 aux REs, évaluée par des mesures d'affinité relatives

(relative binding capacity), a montré que l'affinité de l'EE2 aux REs est environ deux fois plus forte que celle de l'E2 (Blair et al., 2000). Enfin, l'activité transcriptionnelle induite par l'EE2 dans un système de culture cellulaire exprimant la luciférase sous contrôle de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) (voir figure 4) *via* ERα est trente fois plus forte que celle induite via ERβ (Escande et al., 2006). Par ailleurs, le métabolisme de l'E2 par les cellules du parenchyme s'est avéré beaucoup plus important que celui de l'EE2. Ces données suggèrent que, *in vivo,* l'activité oestrogénique plus forte de l'EE2 serait aussi dû à sa capacité à échapper à la métabolisation hépatique, contrairement à l'E2 (Dickson and Eisenfeld, 1981).

V- PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET RESEAUX NEUROENDOCRINES

Chez l'adulte, les réseaux neuroendocrines hypothalamiques sont capables d'intégrer les informations physiologiques, les transmettre à d'autres réseaux du système nerveux et déclencher ainsi un processus de régulation de diverses fonctions physiologiques, mais ils sont aussi capables d'interagir directement ou *via* d'autres réseaux du système nerveux, avec l'environnement extérieur et induire une réponse permettant à l'organisme de s'adapter à son environnement par une réaction physiologique adéquate. Un exemple d'interaction environnement-physiologie connu chez l'animal est la régulation de la saisonnalité de la reproduction chez les espèces saisonnées. Cette capacité d'interaction avec l'environnement est présente dès les premiers stades de la vie de l'individu, puisque les réseaux neuroendocrines sont hautement sensibles aux variations hormonales permettant leur développement et leur différenciation. Etant donné cette capacité à interagir avec leur environnement, il n'est pas surprenant que les réseaux neuroendocrines soient une cible des PEs (Frye et al., 2012, Bourguignon et al., 2013).

La capacité du réseau neuroendocrine à GnRH à intégrer le rétrocontrôle par les hormones stéroïdes *via* leurs récepteurs spécifiques, permet le maintien des secrétions pulsatiles et cycliques des hormones gonadotropes régulant ainsi les fonctions gonadiques endocrines et exocrines, nécessaires au maintien de la fertilité. Ce réseau mis en place pendant le développement est organisé de manière à répondre à différents stimuli nerveux et hormonaux qui lui permettent de réguler

l'ensemble des fonctions physiologiques liées à la reproduction. Ce réseau fonctionne en synergie avec d'autres réseaux neuronaux qui communiquent avec les corps cellulaires, les terminaisons dendritiques et axonales par une transmission électrique ou synaptique médiée par différents neurotransmetteurs comme le GABA, le glutamate, la neurokinine B ou le kisspeptine (Maffucci and Gore, 2009, Christian and Moenter, 2010). Ainsi, un défaut de fonctionnement des neurones à GnRH ou de l'un des réseaux neuroendocrines qui le régulent est capable d'engendrer le dysfonctionnement de l'ensemble de l'axe HHG.

A- Perturbateurs endocriniens et réseau de neurones à GnRH

Pendant cette période développementale de plasticité neuronale, des événements comme l'exposition aux PEs sont capables de modifier la structure du réseau et induire ainsi un défaut fonctionnel à l'âge adulte. Les données de la littérature qui soulignent la sensibilité des neurones à GnRH aux œstrogènes environnementaux proviennent des études *in vitro* sur les lignées cellulaires immortalisées de mammifères dérivées de neurones adultes GT1 (Mellon et al., 1990). Ces données ont montré que les neurones à GnRH sont sensibles aux polychlorobiphényles (PCB). En effet, ces molécules classées comme écotoxiques et reprotoxiques induisent une modification de l'expression du gène *GnRH-1* (Gore, 2002), une modification de la sécrétion du peptide GnRH par les GT1-7 (McGarvey et al., 2001) et des modifications de la morphologie cellulaire (Gore et al., 2002). Certains résultats montrent un profil de réponse type des PEs. En effet, la courbe dose-réponse des effets montre un profil non linéaire où la faible dose induit des effets plus marqués que la forte dose (Cook and Calabrese, 2006). Par ailleurs, le blocage spécifique de ERα permet d'atténuer les effets observés.

La culture d'explants hypothalamiques est un autre modèle performant pour étudier la régulation physiologique des neurones à GnRH (Purnelle et al., 1997). Le traitement d'explants hypothalamiques de rates juvéniles avec de l'E2 ou un insecticide le DDT, induit une réduction de la concentration secrétée de GnRH ainsi qu'une réduction de l'intervalle entre les pulses de sécrétion. D'une manière intéressante, ces effets ont été contrecarrés par un antagoniste des récepteurs ERα et du récepteur AhR, suggérant leur implication dans la maturation physiologique des neurones à GnRH (Rasier et al., 2007).

Les effets des PEs sur le système à GnRH *in vivo* n'ont été que peu étudiés. Chez le lapin, l'exposition prénatale à la vinclozoline induit une réduction du nombre de neurones immunoréactifs à la GnRH dans la région de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et une augmentation du contenu hypothalamique en GnRH dans la région médio-basale chez les mâles et les femelles adultes (Wadas et al., 2010). Rasier et al (2007) ont montré qu'un traitement aux DDT pendant le développement post-natal (6 à 10 jours post-natal-jpn) induit une avance de l'ouverture vaginale et du premiers œstrus avec une tendance à la baisse de la réponse LH à une stimulation au GnRH mesurée *ex-vivo*. Une exposition plus prolongée (6 à 40 jpn) induit un retard dans l'apparition du premier œstrus et réduction de la concentration sérique en LH. L'ensemble de ces études met en évidence une forte sensibilité du système GnRH pendant le développement pré- et postnatal aux PEs et les conséquences potentielles sur la physiologie à l'âge adulte.

B- Perturbateurs endocriniens et circuits hypothalamiques sexuellement dimorphiques

Le cerveau pendant le développement est hautement sensible aux variations, même minimes, des concentrations hormonales. En effet, des études menées chez les rongeurs ont mis en évidence l'effet de la position intra-utérine sur la mise en place des dimorphismes sexuels femelle. Ces études ont comparé les taux de testostérone chez des femelles en fonction de leur position dans l'utérus. Les résultats de ces études mettent en évidence un taux de testostérone plus importants chez des femelles positionnées entre deux fœtus mâles comparées à des femelles positionnées entre deux femelles *in utero* (Hernandez-Tristan et al., 2006). D'autres études ont pu corréler la position intra-utérine à une masculinisation des profils d'expression des récepteurs aux œstrogènes dans l'APO chez des femelles positionnées à côté d'un mâle (DonCarlos, 1996) et enfin des modifications comportementales telles que la masculinisation du comportement de lordose de femelles (Hernandez-Tristan et al., 1999). Ces études laissent penser que l'exposition du cerveau pendant le développement à des concentrations hormonales même à faibles doses, pourrait induire des modifications physiologiques et comportementales significatives à l'âge adulte.

L'action des PEs pendant les périodes fœtale et périnatale pourrait affecter de manière permanente l'organisation et la différenciation sexuelle du cerveau. Par

conséquent, ces effets peuvent avoir des répercussions fonctionnelles sur la physiologie et le comportement à l'âge adulte. Plusieurs études dans la littérature ont décrit des perturbations significatives des réseaux neuroendocrines sexuellement dimorphiques pendant les périodes critiques telles que le développement intra-utérin et la période périnatale.

Chez le rat, l'exposition aux PEs pendant des phases courtes, dès la deuxième moitié de gestation peut avoir des conséquences sur l'organisation des structures sexuellement dimorphiques, détectables dès les premiers stades de la vie post-natale (Dickerson et al., 2011). L'exposition au bisphénol A (BPA) ou à la Génistéine (GEN) pendant la période périnatale induit une augmentation du nombre de cellules immunoréactives à la calbindine dans le NSD-APO et des neurones à tyrosine hydroxylase (TH) dans l'AVPV des mâles adultes (Patisaul and Polston, 2008). Chez les femelles, le BPA et la GEN induisent une diminution du nombre des neurones TH qui co-expriment ERα dans l'AVPV et des conséquences fonctionnelles sur la régularité des cycles ovariens à l'âge adulte (Patisaul and Polston, 2008). L'administration du DES à des rates pendant la période post-natale est capable d'induire une déféminisation du cerveau impliquant un volume du NSD-APO équivalent à celui de mâles contrôles (Dohler et al., 1984). Certains de ces effets observés sur les structures hypothalamiques pourraient avoir des conséquences comportementales en lien avec diverses fonctions telles que la mémoire, l'anxiété et les interactions socio-sexuelles. Les comportements socio-sexuels peuvent être impactés par l'exposition développementale à des PEs œstrogéno-mimétiques ou anti-androgéniques. L'exposition à la Vinclozoline (anti-androgénique) induit chez les rats mâles une réduction significative des comportements d'interactions et de jeux juvéniles et une diminution du comportement sexuel chez ces mêmes rats à l'âge adulte (Colbert et al., 2005).

L'exposition au BPA pendant le développement chez les primates et les rongeurs induit une réduction de la synaptogénèse hippocampique connue pour être fortement impliquée dans la mémoire (MacLusky et al., 2005, Leranth et al., 2008). Les effets des PEs sur les comportements ne se limitent pas à ceux impliqués dans la reproduction. En effet, les travaux du laboratoire de Paola Palanza ont rapporté dans plusieurs études les effets du BPA et du méthoxychlor (MXC, insecticide oestrogénomimétique) sur la réduction du dimorphisme sexuel et des comportements d'exploration chez la souris femelle adulte exposée *in utero* (Gioiosa

et al., 2007, Palanza et al., 2008). Ces données suggèrent que l'interaction des PEs avec les processus de différenciation sexuelle peut concerner non seulement les réseaux neuroendocrines mais également les réseaux centraux impliqués dans les fonctions cognitives telles que la mémoire, l'anxiété et les comportements d'exploration qui présentent des différences mâles/femelles marquées à l'âge adulte (Panzica et al., 2007) ;

C- EE2 et réseaux neuroendocrines de la reproduction

Chez le rat, l'exposition *in utero* à l'EE2 pendant le développement à des doses fortes (10µg/kg) induit une surexpression des gènes *Esr1* dans l'AVPV, le NA et le MBH (hypothalamus médiobasal) chez les mâles et chez les femelles au premier jour post-natal. (Cao et al., 213). Chez les rats, une exposition plus longue, incluant la période de développement post-natal, induit à 21 jours post natal une augmentation du nombre de cellules calbindine-d28k chez les mâles et chez les femelles (He et al 2012). Ces phénotypes seraient le résultat d'une réorganisation des réseaux hypothalamiques suite à l'exposition pendant les phases clés de leur mise en place chez ces individus. L'exposition de rates femelles à l'EE2 pendant la période péri-pubertaire induit une surexpression du gène de la kisspeptine, du gène *Kiss1R* et du gène de la *GnRH-1* dans l'APO (Kriszt et al., 2015). Ce traitement induit aussi une augmentation de la densité des fibres kisspeptine et du nombre d'appositions GnRH-kisspeptine dans l'APO. Ces observations suggèrent une avance de puberté neuroendocrine, induite par l'EE2 chez ces femelles *via* les circuits neuroendocrines impliquant le kisspeptine et la GnRH. Les études qui se sont intéressées aux effets de l'EE2 sur les réseaux neuroendocrines sont récentes et peu nombreuses **(Tableau 4)**. De plus, les conséquences de ces modifications dans l'expression de certains gènes, de l'organisation neuroanatomique de certains réseaux ou du volume de certains noyaux n'a été que très peu corrélée à des conséquences fonctionnelles physiologiques ou comportementales. Par ailleurs, la variabilité de certains paramètres tels que les doses administrées, la période de traitement ou la voie d'administration rend parfois difficile la comparaison et l'interprétation des effets observés. Davantage d'études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes et évaluer les risques d'exposition développementale à l'EE2 sur la fonction neuroendocrine et reproductrice adulte.

L'ensemble de ces études témoigne d'une vulnérabilité évidente et accrue du système nerveux, et spécifiquement des réseaux neuroendocrines hypothalamiques

et les conséquences potentielles de ces altérations sur la physiologie et les comportements chez l'adulte. Au regard de la diversité des sources et des modes de contamination, du nombre difficilement estimable de molécules pouvant induire des perturbations neuroendocriniennes et des conséquences parfois inattendues de ces molécules sur le développement et la fertilité des individus ; il semble nécessaire de continuer à étudier l'effet de l'exposition aux PEs dans le but d'identifier les mécanismes d'actions de ces substances et d'appréhender les conséquences et les dangers potentiels sur la santé humaine et celle de la faune sauvage.

Tableau 4 : Liste des études menées récemment sur les effets de l'EE2 sur les réseaux neuroendocrines hypothalamiques de la reproduction

Référence bibliographique	Espèce	Administration et dose	Stade/durée traitement	Stade d'analyse	Effets neuroendocrine/ dimorphisme sexuel hypothalamique
(Kriszt R et al. 2015)	rat	10µg/kg/jour Par gavage	18JPN à 28JPN	28 JPN	♀AVPV/PeV : ↑ ARNm ***kiss1***, GnRH, Kiss1R(GPR54) APO : ↑ densité fibres KP, ↑appositions KP-GnRH.
(Rebuli et al., 2014)	rat	0,5 et 5 µg/kg/j par gavage	E6 à 21 JPN	21 JPN	♀ EE 5: ↓***Esr1*** AVPV (masculinisation) ? ♀ EE 0,5 et 5: pas d'effets sur l'AVPV et la mPOA
			E6 à 90 JPN	90 JPN	♀ EE 0,5 et EE 5:↓***Esr2***AVPV ♀ EE 0,5 et EE 5:↓***Esr2*** mPOA
(Takahashi et al., 2014)	rat	0,02, 0,2, 2, 20 et 200 µg/kg Injection sous-cutanée	Injection unique 1 JPN	14 JPN	♀ toutes les doses: ↓ **ARNm *kiss-1*** *hypothalamus*
				21 JPN, 34 JPN et 10 semaines	♀ toutes les doses: ARNm *kiss-1* hypothalamus: Aucune différence entre les lots
(Overgaard et al., 2013)	rat	5, 15 et 50 µg/kg/j	E7 à 22 JPN	50 JPN	♀ ARNm *kiss-1*: pas d'effets (AVPV, ARC) ♂ ARNm *kiss-1*: pas d'effets (AVPV, ARC) (RT-qPCR)
(Cao et al., 2013)	rat	5, 10 µg/kg/j gavage	E6 à E22	1 JPN	♀ AVPV ***Esr1*** *et* ***Esr2*** : pas d'effet ARC: EE10: ↑***Esr1*** mPOA: *Esr1 et Esr2* pas d'effet. MBH: EE10: ↑***Esr1*** ♂ AVPV Esr1 et Esr2: pas d'effet. ARC: EE10: ↑***Esr1*** mPOA: pas d'effets. MBH: EE10: ↑***Esr1***
(He et al., 2012)	rat	5 et 10.0 µg/kg/j gavage	E6 à 21 J PN	21 JPN	♀ NSD-POA: EE5 et EE10: ↑ **nombre de cellules calb-d28k** ♂ NSD-POA: EE5: ↑**nombre de cellules calb-d28k**

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Parmi les PEs pouvant constituer un danger pour la santé et spécifiquement pour la fonction de reproduction, les œstrogéno-mimétiques issus de l'industrie pharmaceutique. En effet, les molécules pharmacologiques œstrogéno-mimétiques sont conçues pour agir spécifiquement et avec une affinité élevée *via* les récepteurs aux œstrogènes endogènes. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules dans différentes parties de l'organisme, y compris au niveau de l'axe HHG. De plus, pendant le développement, ils jouent un rôle fondamental dans l'organisation, la différenciation et l'activation de différents systèmes physiologiques et neurophysiologiques impliqués dans la fonction de reproduction. Par conséquent, l'interaction de ces récepteurs avec les xénœstrogènes serait capable d'induire une perturbation à différents niveaux de l'axe gonadotrope.

Ce travail de thèse s'est intéressé à l'étude de l'impact d'une molécule pharmacologique de synthèse, le 17α-l'éthinylœstradiol (EE2) qui est un puissant œstrogène issu de l'industrie pharmaceutique, sur les réseaux neuroendocrines hypothalamiques qui régulent la fonction de reproduction. La vulnérabilité des réseaux neuroendocrines et neuraux qui contrôlent la physiologie et les comportements de la reproduction n'a été évoquée que relativement récemment (Trudeau et al., 2011). Il paraît donc essentiel d'étudier les conséquences d'une perturbation neuroendocrine et d'investiguer les potentielles conséquences fonctionnelles sur la physiologique et les comportements.

Des études toxicologiques précliniques et cliniques ont été menées pour détecter la toxicité *in vivo* et *in vitro* de l'EE2 sur des paramètres bien décrits dans la littérature en toxicologie réglementaire tels que la courbe de croissance, les malformations congénitales, la sex-ratio, etc. (National Toxicology Program., 2010). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'étude des effets de l'EE2 sur les réseaux neuroendocrines et sur les conséquences de cette exposition sur l'organisation du cerveau pendant le développement. De plus les études toxicologiques s'intéressent aux effets immédiats et n'évaluent pas les conséquences à long-terme après une exposition développementale. Or, les perturbations endocriniennes pouvant survenir à un moment de la vie, très éloignés du moment de l'exposition, voire chez des individus non exposés directement, mais *via* leurs parents. La recherche d'effets transgénérationnels d'une exposition parentale aux PEs

ayant des effets organisationnels représente l'une des pistes importantes qui pourrait expliquer l'apparition de certains troubles non expliqués à ce jour en clinique et en conditions expérimentales.

I- HYPOTHESE DE TRAVAIL

Comme évoqué dans la partie introductive, les réseaux neuroendocrines qui régulent la reproduction sont mis en place pendant les différentes phases du développement intra-utérin, post-natal et juvénile de l'individu. Certains réseaux, comme le réseau de neurones à GnRH chez la souris, sont mis en place à partir de la deuxième moitié de gestation. Ce processus s'étale sur une grande partie de la vie intra-utérine de l'individu. Par la suite, ces réseaux sont activés à la puberté pour assurer leur fonction physiologique chez l'adulte en âge de se reproduire. La période critique peut être définie comme la phase de développement pendant laquelle surviennent l'ensemble des événements permettant d'organiser d'une manière permanente et irréversible les circuits centraux qui seront fonctionnels chez l'adulte. L'existence d'une fenêtre temporelle n'est pas évidente si on considère l'ensemble des processus qui se succèdent pendant le développement. A l'échelle cellulaire, si on prend l'exemple du développement d'un neurone, celui-ci est issu d'une cellule souche neurale qui va se différencier en neuroblaste tout en suivant un trajet de migration dans le système nerveux central. Ce neurone, une fois différencié, va s'intégrer dans un réseau, grâce à des poussées axonales et dendritiques avec d'autres neurones autour et dans d'autres régions du cerveau. Il va établir des connexions avec les cellules gliales environnantes puis acquérir une identité pharmacologique et neurophysiologique lui permettant d'établir un profil fonctionnel qui a été programmé génétiquement ou épigénétiquement pendant sa différenciation (Kurian and Terasawa, 2013, Nugent et al., 2015).

La théorie organisationnelle/activationnelle repose sur le principe établi sur le fait que les réseaux neuroendocrines différenciés dont l'organisation est achevée pendant le développement vont rester quiescents pendant les périodes infantile et juvénile et ne seront réactivés que lors de la puberté en réponse à des signaux environnementaux, endocrines et/ou métaboliques. Plusieurs études font état de l'existence d'une maturation de l'axe HHG et des réseaux centraux impliqués dans le comportement sexuel pendant la période péri-pubertaire (*pour revue voir* (MacLusky et al., 2005, Sisk and Zehr, 2005). A titre d'exemple, les projections axonales de

l'AVPV vers les neurones à GnRH et les régions péri-ventriculaires hypothalamiques et pré-optiques semblent être mises en place sur une échelle temporelle relativement restreinte correspondant à la période de fin de gestation (E19) et semblent ne pas varier à l'âge adulte. Cependant, ceci n'est pas le cas pour d'autres régions du cerveau telles que le noyau postérieur du lit de la strie terminale (BNSTp) ou le septum latéral ventral (LSv) qui reçoivent les innervations axonales de l'AVPV plus tardivement, durant le stade juvénile (deuxième semaine post-natale) (Polston and Simerly, 2006). Cette étude conclu que le développement des connections axonales entre l'AVPV et d'autres structures sexuellement dimorphiques est orchestré spatio-temporellement à partir de la vie prénatale et continue jusqu'à l'âge adulte.

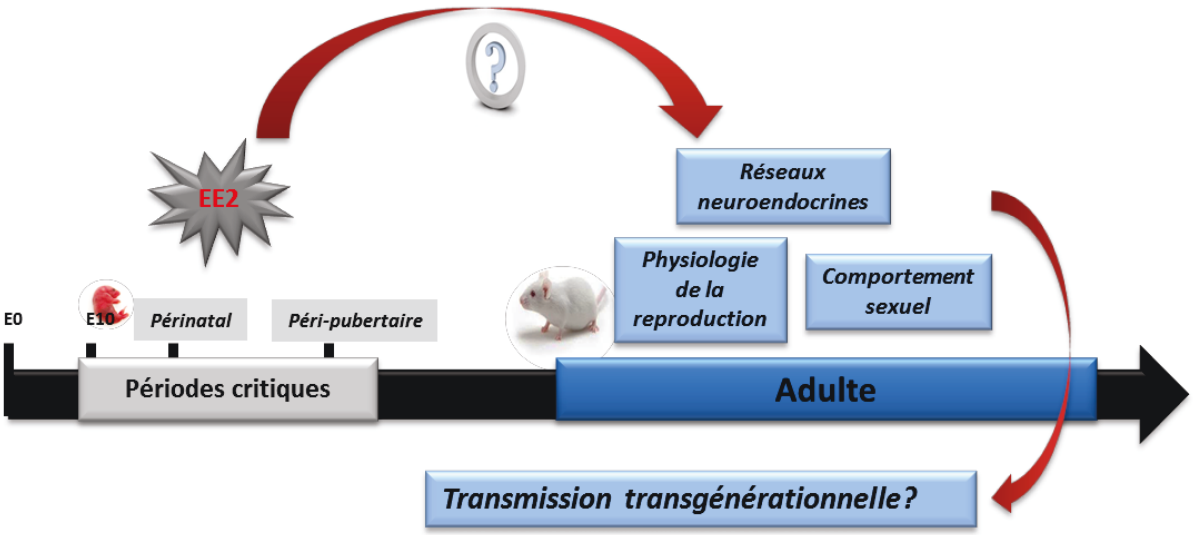


Figure 19 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail

Les réseaux neuroendocrines présenteraient une sensibilité aux hormones pendant une période plus étendue que la fenêtre périnatale, permettant la maturation et l'activation de leurs fonctions. La sensibilité de ces réseaux aux variations des facteurs environnementaux tels que l'exposition aux PEs ne se restreint pas uniquement à la période de développement intra-utérin mais peut s'étendre tout au long des processus d'organisation et de maturation pendant les périodes infantile, juvénile et péri-pubertaire.

Parallèlement, pour étudier l'impact des œstrogènes sur la reproduction, une approche intégrative prenant en compte les composantes neuroendocrine, comportementale et physiologique est nécessaire pour considérer la problématique dans sa globalité. Par ailleurs, étant donné le caractère ubiquiste de l'exposition aux perturbateurs endocriniens dans l'environnement naturel, celle-ci survient souvent de manière chronique pouvant couvrir une grande partie, voire toute la vie de l'individu **(Figure 19)**.

Considérant les paramètres évoqués ci-dessus, la démarche expérimentale pour laquelle nous avons optée a eu pour objectif de prendre en compte le caractère chronique d'une exposition aux PEs par voie orale modélisée chez la souris, se rapprochant ainsi le plus possible d'une exposition environnementale. En effet, nous avons administré l'EE2 à partir du dixième jour de gestation à des mères gravides puis directement pour les individus après le sevrage (21 jpn), par voie orale dans l'eau de boisson, d'une manière continue jusqu'au 40ème jpn. Ce protocole a ciblé l'intégralité des étapes de l'ontogénèse des réseaux neuroendocrines tels que le GnRH et le kisspeptine, la période de différenciation sexuelle périnatale, la période de maturation pendant la phase juvénile et enfin la période d'activation péri-pubertaire de ces réseaux.

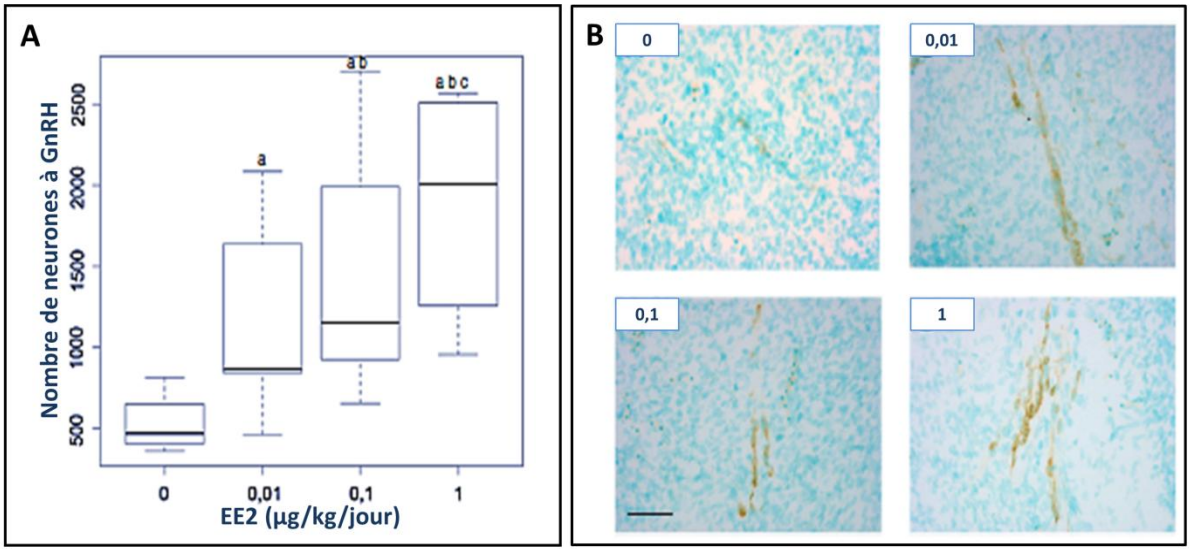


Figure 20 : Effet de l'EE2 sur l'ontogenèse du réseau de neurones à GnRH chez l'embryon de souris.

A) Le comptage des neurones à GnRH immunomarqué sur des coupes de cerveaux d'embryons de souris à E13,5 met en évidence une augmentation du nombre de neurones en fonction de la dose administrée. **B)** Photographies illustrant des marquages immunohistochimiques des neurones à GnRH en migration chez des embryons à E13,5 de développement des quatre groupes d'animaux. EE2 : éthinylœstradiol. Barre d'échelle=50µm **(*D'après* Pillon et al 2012).**

II- OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de ce travail ont porté d'une part sur l'identification sur le modèle souris, des effets d'une exposition à l'EE2 pendant le développement sur les réseaux neuroendocrines et hypothalamiques et l'impact physiologique et comportemental sur la fonction de reproduction des individus exposés et de leur descendance. Au sein du laboratoire une étude publiée en 2012 menée sur des embryons de souris exposés à de faibles doses d'EE2 pendant la période de l'ontogenèse des neurones à GnRH a montré une augmentation du nombre de neurones à GnRH chez les embryons à E13,5 **(Figure 20).** Dans la présente étude le but était de savoir si cette augmentation observée chez l'embryon persistait à l'âge adulte. Parallèlement, nous nous sommes questionnés sur

les conséquences d'une exposition chronique sur la fonction de l'axe HHG et sur le dimorphisme sexuel neuroendocrine chez l'adulte. Afin d'évaluer l'impact potentiel de l'exposition à l'EE2 sur la descendance des individus exposés, nous avons généré par différents croisements les individus des générations F2, F3 et F4 et recherché une éventuelle transmission des effets observés en F1 aux générations suivantes.

D'autre part, une approche de culture de cellules souches neurales issues de différentes zones du cerveau embryonnaire a été menée dans le but d'évaluer l'impact direct de l'EE2 sur le développement neural et la mise en place de réseaux neuraux en présence ou non de l'EE2. Pour étudier les mécanismes d'action de l'EE2 sur les neurones à GnRH, nous avons entrepris des cultures d'explants de placodes olfactives embryonnaires qui ont permis d'obtenir des cultures de neurones à GnRH *in vitro*. Ces approches ont pour objectif de contribuer à comprendre les mécanismes d'action cellulaires par lesquels l'EE2 pourrait modifier les réseaux neuroendocrines chez les individus exposés pendant le développement.

La finalité de ce travail était en premier lieu d'apporter de nouvelles connaissances sur les effets d'une exposition à des œstrogénomimétiques puissants, largement utilisés et répandu dans l'environnement tels que l'EE2, pendant des phases clés du développement de l'individu sur les composantes neuroendocrine et comportementale de la reproduction pouvant être à l'origine de troubles de la reproduction chez des individus et leurs descendances. Dans un deuxième temps, en utilisant un modèle de culture de cellules souches neurales embryonnaires, décrire les mécanismes pouvant être impliqués dans la perturbation des réseaux du système nerveux central impliqués dans cette régulation.

A- Etude des effets de l'EE2 sur le réseau de neurones à GnRH

Pour étudier l'impact de l'EE2 sur la neuroanatomie des neurones à GnRH adulte, nous avons opté pour la technique d'immunohistochimie (IHC), une technique de choix dans l'étude de la neuroanatomie et spécifiquement de celle des neurones à GnRH, compte tenu de leur distribution anatomique sous forme d'un continuum localisé à travers différents noyaux hypothalamiques et préoptiques, les rendant relativement difficiles à étudier. L'IHC nous a permis de décrire avec précision la distribution et la

localisation des corps cellulaires et leurs projections axonales. Par des techniques de microscopie et d'analyse d'images, nous avons quantifié le nombre de neurones, comparé la neuroanatomie de ces neurones dans les différentes zones de leur localisation initiale, entre les lots contrôle et traités, et enfin de quantifier la densité des terminaisons axonales des neurones à GnRH dans l'EM.

B- Etudes des effets de l'EE2 sur la physiologie de la reproduction

La perturbation des réseaux neuroendocrines qui contrôlent le fonctionnement de l'axe HHG peut avoir un impact sur la physiologie de la reproduction adulte tel que le déclenchement de la puberté, la régularité des cycles ovariens, les concentrations en stéroïdes sexuels et la fertilité. Ces paramètres ont été évalués chez les mâles et/ou les femelles.

C- Etude des comportements

Pour évaluer l'effet de l'EE2 sur l'organisation du cerveau, nous avons analysé les comportements liés à la fonction de reproduction. L'étude des comportements sexuels mâle et femelle, des comportements sociaux tels que le choix du partenaire et du comportement maternel, constitue un indicateur de l'état des réseaux sexuellement dimorphiques dont dépendent ces comportements.

D- Effets de l'EE2 sur les noyaux sexuellement dimorphiques

Nous avons analysé deux structures sexuellement dimorphiques dont le développement est fortement dépendant des estrogènes développementaux. Le réseau de neurones à kisspeptine dans l'APO, impliqué dans la régulation de l'axe HHG et le NSD-APO qui aurait une implication dans le comportement sexuel mâle.

L'étude de ces deux noyaux hypothalamiques pourrait contribuer à expliquer l'origine de certaines perturbations physiologiques et comportementales observées chez les individus adultes tels que la modification de l'âge de la puberté, la dérégulation des cycles hormonaux et les perturbations des comportements reproducteurs.

E- Transmission transgénérationnelle des effets de l'EE2

Pour étudier une éventuelle transmission aux générations suivantes des effets d'une exposition développementale, nous avons croisé des mâles et des femelles exposés à l'EE2 et généré les individus F2, F3 et F4. Nous avons analysé différents paramètres physiologiques, neuroendocrines et comportementaux, de la même manière que chez les F1.

F- Mécanismes de perturbation neuroendocrine

Le modèle de culture de cellules souches neurales embryonnaires nous a permis étudier les effets sur le développement, la prolifération et la différenciation des cellules souches à l'origine des réseaux fonctionnels adultes. Les éventuels effets neurogéniques et anti /pro-apoptotiques de l'EE2 ont été explorés. Pour étudier les effets de l'EE2 spécifiquement sur les neurones à GnRH, nous avons utilisé un modèle de culture d'explants de placodes olfactives embryonnaires. Cela nous a permis de tester l'effet de l'EE2 directement sur l'ontogenèse de ces neurones *in vitro*.

Les résultats des expériences menées in vivo sont présentés sous forme de deux chapitres. Le chapitre I concernera les résultats obtenus chez les femelles F1 et leur descendance. Dans le chapitre II sont présentés les résultats obtenus chez les mâles. Ces résultats sont valorisés dans deux publications différentes présentées dans les chapitres et complétées par des données d'expériences complémentaires non publiées. Enfin, les résultats obtenus sur les expériences in vitro sont présentés dans le troisième chapitre.

Par souci de clarté, j'ai choisi de ne pas détailler le matériel et méthodes dans un chapitre séparé. Les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques comprenant une introduction bibliographique, le matériel et les méthodes, les résultats obtenus et une discussion explicative argumentée par des données de la littérature.

CHAPITRE I : Exposition développementale à l'EE2, conséquences sur la fonction de reproduction chez la femelle et sa descendance

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chez la femelle, comme chez le mâle, le dimorphisme sexuel mis en place pendant le développement devient fonctionnel à l'âge adulte et permet l'expression de comportements sexuels stéréotypés et complémentaires qui aboutissent à l'accomplissement de la fonction de reproduction. En effet, plusieurs comportements impliquées dans les interactions sociales sont sexuellement dimorphiques et se mettent en place dès les premiers stades de la vie infantile et juvénile tel que le comportement de jeux, l'agressivité et l'anxiété. Les effets des facteurs environnementaux tels que le stress subi pendant le développement, peut parfois induire des effets opposés chez les mâles et chez les femelles (Ziabreva et al., 2003). Chez la plupart des mammifères, la conséquence de la différenciation sexuelle sur le comportement reproducteur chez l'adulte se manifeste par des comportements différents tels que le comportement de lordose, la proceptivité, la préférence sociale, le comportement maternel et le comportement d'allaitement chez la femelle. Chez la femelle, en plus de cette différence mise en place par des processus développementaux, les cycles hormonaux pendant toute la vie de l'individu régulent non seulement la physiologie des gonades mais aussi les différents processus cognitifs en liens avec les comportements sociaux et reproducteurs.

Dans ce premier chapitre sont présentés les résultats des expériences menées *in vivo* sur les effets de l'exposition à l'EE2 sur la physiologie et les comportements de la reproduction chez les femelles exposées directement et chez leurs descendances femelles qui sont issues de croisements de ces femelles avec des mâles appartenant au même lot expérimental. Nous avons décrit les effets de l'exposition à l'EE2 sur les femelles exposées directement durant leur développement sur les paramètres de la vie reproductive adulte incluant la physiologie, la neuroanatomie neuroendocrine et les comportements de la reproduction.

II- ARTICLE I : L'EXPOSITION DEVELOPPEMENTALE A L'ETHINYLŒSTRADIOL PERTURBE LA PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION, LE RESEAU DE NEURONES A GNRH ET LES COMPORTEMENTS CHEZ LA SOURIS FEMELLE

A- Protocole expérimental

L'exposition à l'EE2 s'est faite par voie orale en diluant l'EE2 dans l'eau de boisson des animaux. Les individus de la génération F1 ont été exposés à l'EE2 pendant leur développement embryonnaire à partir du 10ème jour de gestation (E10) par exposition de leurs mères F0 gestantes. A la naissance, les individus F1 recevaient l'EE2 *via* le lait maternel, puis dans l'eau de boisson après sevrage et jusqu'à 40 jpn. Un lot a été exposé à une dose de 0,1 µg/kg/jour, susceptible d'être présente dans les environnements pollués par l'EE2; un autre à une dose de 1 µg/kg/jour, qui correspond à une exposition pharmacologique par la prise de la pilule contraceptive contenant 15 à 40 µg d'EE2. Un troisième lot n'a pas reçu de traitement (lot contrôle). Pour obtenir la génération F2, les individus femelles et mâles des générations parentales ont été mis en reproduction, les croisements ont été faits entre les individus de mêmes lots.

La croissance des animaux a été suivie par des pesées hebdomadaires de la naissance jusqu'à 90 jpn. Pour estimer la puberté des femelles, des suivis d'ouvertures vaginales ont été effectués entre 22 et 32 jpn. A l'âge adulte, après l'arrêt du traitement, la régularité des cycles a été évaluée par des frottis vaginaux sur trois cycles.

Les comportements dépendant des œstrogènes tels que le comportement maternel, le comportement de lordose et le choix de partenaire ont été évalués par des tests spécifiques afin d'évaluer l'impact de l'EE2 sur les circuits centraux qui régulent ces comportements. Enfin l'état d'anxiété des femelles, pouvant influencer différents comportements liés à la fonction de reproduction, a été évalué par le test de labyrinthe en croix surélevée.

Les effets de l'EE2 sur l'anatomie des réseaux neuroendocrines à GnRH et sur le réseau de neurones à kisspeptine ont été évalués par des marquages immunohistochimiques sur les coupes de cerveau des animaux euthanasiés à l'âge adulte.

B- Résultats

Les résultats de cette étude montrent que l'exposition aux deux doses d'EE2 (0,1 et 1 µg/kg/jour) induit un avancement de l'âge de l'ouverture vaginale, un raccourcissement de la durée moyenne des cycles œstraux, mais une fertilité comparable à celle des femelles non exposées. L'analyse de la neuroanatomie du réseau de neurones à GnRH a montré que les femelles exposées à la forte dose d'EE2 présentent une augmentation du nombre de neurones à GnRH immunoréactifs dans l'aire préoptique. La dose faible n'a pas d'effet sur le nombre mais affecte la distribution des neurones dans le continuum hypothalamique. Les deux doses d'EE2 induisent une diminution importante de l'immunoréactivité des terminaisons nerveuses à GnRH dans l'éminence médiane.

Les tests de comportements ont mis en évidence que les femelles exposées à l'EE2 présentent une perturbation du comportement maternel, une augmentation du quotient de lordose et une perte de la préférence pour un mâle non castré au profit d'un mâle castré. Ces femelles présentent également une augmentation du niveau d'anxiété.

Les détails de la procédure expérimentale et des résultats obtenus sont décrits dans l'article I ci-dessous :

frontiers in Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 09 December 2015
doi: 10.3389/fnins.2015.00463

Developmental Exposure to Ethinylestradiol Affects Reproductive Physiology, the GnRH Neuroendocrine Network and Behaviors in Female Mouse

Lyes Derouiche, Matthieu Keller, Mariangela Martini, Anne H. Duittoz and Delphine Pillon*

PRC, UMR 7247 INRA/CNRS/Université François-Rabelais de Tours/IFCE, Nouzilly, France

During development, environmental estrogens are able to induce an estrogen mimetic action that may interfere with endocrine and neuroendocrine systems. The present study investigated the effects on the reproductive function in female mice following developmental exposure to pharmaceutical ethinylestradiol (EE2), the most widespread and potent synthetic steroid present in aquatic environments. EE2 was administrated in drinking water at environmentally relevant (ENVIR) or pharmacological (PHARMACO) doses [0.1 and 1 μg/kg (body weight)/day respectively], from embryonic day 10 until postnatal day 40. Our results show that both groups of EE2-exposed females had advanced vaginal opening and shorter estrus cycles, but a normal fertility rate compared to CONTROL females. The hypothalamic population of GnRH neurons was affected by EE2 exposure with a significant increase in the number of perikarya in the preoptic area of the PHARMACO group and a modification in their distribution in the ENVIR group, both associated with a marked decrease in GnRH fibers immunoreactivity in the median eminence. In EE2-exposed females, behavioral tests highlighted a disturbed maternal behavior, a higher lordosis response, a lack of discrimination between gonad-intact and castrated males in sexually experienced females, and an increased anxiety-related behavior. Altogether, these results put emphasis on the high sensitivity of sexually dimorphic behaviors and neuroendocrine circuits to disruptive effects of EDCs.

Keywords: ethinylestradiol, reproduction, GnRH, neuroendocrinology, sexual behavior, endocrine disruption

OPEN ACCESS

Edited by:
Hubert Vaudry,
University of Rouen, France

Reviewed by:
Gustavo M. Somoza,
Instituto de Investigaciones Biotecnologicas-Instituto Tecnologico de Chascomus, Argentina
Francisco Gaytán,
University of Cordoba, Spain

****Correspondence:***
Anne H. Duittoz
duittoz@univ-tours.fr

Specialty section:
This article was submitted to Neuroendocrine Science, a section of the journal Frontiers in Neuroscience

Received: *27 August 2015*
Accepted: *23 November 2015*
Published: *09 December 2015*

Citation:
Derouiche L, Keller M, Martini M, Duittoz AH and Pillon D (2015) Developmental Exposure to Ethinylestradiol Affects Reproductive Physiology, the GnRH Neuroendocrine Network and Behaviors in Female Mouse. Front. Neurosci. 9:463. doi: 10.3389/fnins.2015.00463

INTRODUCTION

Evidence that exposure to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) during development contributes to disturbing various parameters of animal and human reproductive function, such as puberty onset, fertility, and behaviors, has been largely highlighted (Walker et al., 2014; Parent et al., 2015). It is widely accepted that natural hormones and potentially EDCs modulate the development of the central and peripheral nervous systems, including the setting of neuroendocrine circuits controlling physiological and behavioral outcomes of reproductive function (McCarthy, 2008; Gore et al., 2011). In mammals, hypothalamic neuroendocrine circuits orchestrating the pituitary-gonadal activity are established during prenatal, early postnatal, and juvenile periods under the

organizational effects of specific patterns of endogenous estrogens, leading to masculinization or feminization of a bipotential developing brain (McCarthy, 2008). In male, late fetal and postnatal testosterone aromatized to estradiol is responsible for neuroanatomical and functional masculinization of neuroendocrine circuits, leading to the expression of adult male typical sexual behaviors (Bakker, 2003). In female, perinatal brain develops in much lower steroid hormones and is protected from maternal estrogens by the alpha-fetoprotein, which binds estradiol with high affinity (Bakker et al., 2006). Thus, disruption of the ongoing patterns of estrogens during development may durably alter the establishment of neuroendocrine networks and consequently affect physiological, neuroendocrine and behavioral components of reproductive function in adulthood.

Pharmaceutical 17α-ethinylestradiol (EE2) is a potent estrogenic compound that is used mainly in oral contraceptives. EE2 is among the most dominant environmental estrogens (Snyder et al., 2001; Pojana et al., 2004; Laurenson et al., 2014). Its concentration in aquatic environments is highly variable according to environmental localization throughout the world. In the USA and Europe, EE2 has been detected in surface water at concentrations ranging from non-detectable to 273 $ng.L^{-1}$ (Pojana et al., 2004; Hannah et al., 2009). In Asia, EE2 concentrations are largely higher, reaching 4100 $ng.L^{-1}$ in some wastewater treatment plants (WTPs) in Beijing (Zhou et al., 2012). Moreover, a low rate of EE2 removal from wastewater (20%) may considerably contribute to its bioaccumulation in WTP outputs and potentially in natural aquatic environments (Ternes et al., 1999; Balsiger et al., 2010). Given the concern raised by the large EE2 pollution, it has thus received increasing attention and, recently, the European Parliament and the Council of Europe added EE2 to the priority "Watch list" of substances presenting a significant risk to or *via* aquatic environments according to the Environmental Quality Standards (Directive 2013/39/EU)[1]. Due to its high estrogenic potency and the fact that it does not bind to alpha-fetoprotein (Sheehan and Branham, 1987), EE2 can affect endocrine and neuroendocrine systems, and consequently impair the ability of wildlife and humans to reproduce (National Toxicology Program, 2010).

Reproduction is controlled by the hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) neurons (Knobil, 1988; Wierman et al., 2011). This neuroendocrine network constitutes the final output of the hypothalamus, that regulates reproduction after integrating numerous signals coming from the organism, such as circulating sex hormones, and from the environment (Herbison, 2008). The present study investigated whether developmental sub-chronic exposure to an environmental-range or a pharmacological dose of EE2 from critical fetal and perinatal periods up to puberty disturbed reproductive function in adult female mice, including physiological and behavioral parameters, and neuroendocrine networks regulating the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis.

We already demonstrated in our laboratory that exposure to EE2 altered ontogenesis of GnRH neurons in mouse embryos, by increasing the number of these neurons (Pillon et al., 2012). In this previous study, embryos were exposed during a short period to specifically target GnRH neuron neurogenesis and nasal migration, which occur between embryonic day (E) E10 and E13 in mouse. In the current study, we investigated whether this alteration may persist into adulthood in females exposed to EE2 from fetal to peripubertal life. The neuroanatomy of the hypothalamic GnRH neuronal network was studied in adult female mice, both in the preoptic area (POA) where most of the GnRH cell bodies are scattered, and in the median eminence (ME), in which most GnRH axonal terminals are concentrated. As the highly estrogen-sensitive kisspeptin neuroendocrine network closely regulates GnRH neurons activity to control gonadotropins' secretion (Piet et al., 2013; Yeo, 2013), we also analyzed kisspeptin neurons immunoreactivity in the POA. Since alterations in such main neuroendocrine networks should impact on physiological reproductive parameters, we assessed the onset of puberty, the length of the estrus cycle and its regularity, and fertility in adult females. Moreover, perinatal and peripubertal estrogens are known to exert a facilitator role on female brain organization (Bakker et al., 2003) for the expression of maternal (Keller et al., 2010) and socio-sexual (Bakker et al., 2002) behaviors in adulthood. Thus, to test the hypothesis that EE2-exposure during development may affect these behaviors in adult females, we assessed maternal nurturing behaviors, mating partner preference, and sexual receptivity. Finally, we evaluated the anxiety level of adult females. Anxiety is known to be sensitive to estrogens and estrogen-like molecules during brain sexual differentiation (Farabollini et al., 1999; Dugard et al., 2001) and may trigger several reproductive-related behavioral disorders such as maternal care (Neumann, 2008).

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were conducted in accordance with the European directive 2010/63/EU[2] on the protection of animals used for scientific purposes (agreement number E37-175-2) and approved by an ethical committee for animal experimentation (CEEA Val-de-Loire, Tours, France, C2EA-19). Fifteen pregnant Swiss mice (F0), purchased from a commercial breeder (Charles River—France), were divided into three groups: CONTROL ($n = 5$), ENVIR ($n = 5$), and PHARMACO ($n = 5$) (see **Figure 1** for Experimental design). Mice were housed in individual standard cages ($45 \times 25 \times 15\,cm^3$) and given free access to food (Safe, Augy, France) and water, under controlled temperature (22°C), humidity (50–60%) and photoperiod cycle (12 h light/12 h dark).

Ethinylestradiol Treatment

A stock solution of EE2 (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was prepared in 100% ethanol at $1\,\mu g.mL^{-1}$. Dilutions to final doses of exposure were prepared in drinking water. The daily dose was calculated according to the animals' weights and their water consumption. Animals were exposed to EE2

[1]http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32013L0039.

[2]http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:32010L0063.

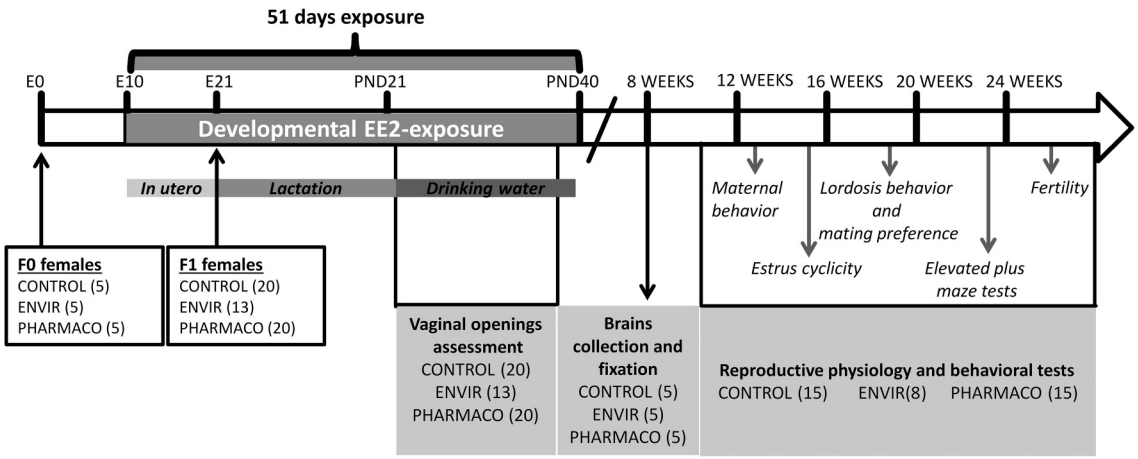


FIGURE 1 | Experimental design. F1 females were exposed to 0.1 and 1 μg of ethinylestradiol (EE2)/kg (body weight)/day, corresponding respectively to environmentally-relevant (ENVIR) and pharmacological (PHARMACO) doses. Exposure began at embryonic day (E) 10 by exposing F0 pregnant and then lactating dams through their drinking water until postnatal day (PND) 21. After weaning, F1 females continued to be exposed through drinking water until PND40. Vaginal opening was assessed during the peripubertal period (PND23 to PND32). Neuroanatomical studies were performed on 8-week-old females. Estrus cyclicity was assessed between 14 and 17 weeks of age. Maternal behavior was assessed on nulliparous females. Social-sexual preference tests were performed on sexually-naïve females, lordosis behavior was then assessed in 7 trials which were followed by a second test of social-sexual preference. Anxiety-like behavior was assessed in an elevated plus maze device. Finally, females were mated with fertile males to assess fecundity and fertility.

from embryonic day (E) E10 through pregnant dams' (F0 generation) exposure to drinking water. After birth, pups were sexed; litters were culled to four females and four males *per* dam and returned to their mothers up to weaning. Animals (F1 generation) continued to be exposed through feeding up to weaning. After weaning, animals were separated from their mothers and from the opposite sex individuals. Females were housed in standard cages (4–5 females *per* cage) and continued to be treated with EE2-containing drinking water until postnatal day 40 (PND40) (**Figure 1**). The three groups were treated as follows: two groups were exposed to EE2, the ENVIR group exposed to 0.1 μg/kg body weight (bw)/d (day) ($n = 13$ females), a dose corresponding to an exposure range found in highly polluted environments (Mashchak et al., 1982), and the PHARMACO group ($n = 20$ females) exposed to a pharmacological dose of 1 μg/kg bw/d of EE2 (Stanczyk et al., 2013). The third group received vehicle without EE2 (CONTROL group; $n = 20$ females).

Among the five F0 females in the ENVIR group, only three were pregnant although vaginal plugs had been observed in the five females, leading to the effective of 13 F1 females in the ENVIR group (4 female' pups for two females and 5 female' pups for the third one), instead of 20 for the CONTROL and PHARMACO groups (4 female' pups for each FO female).

This experimental design was established to study the effect of EE2 on female and male reproductive function. Due to the different aspects being assessed requiring different scheduling and experimental procedures on animals (estrus cyclicity, behavioral tests), female and male EE2 effects were studied separately. Only the results obtained from female offspring are presented here.

Reproductive Physiology

Body Weight

Females from the tree treatment groups were weighted from PND22 up to PND92.

Vaginal Opening

The age at vaginal opening was assessed through daily visual examination. Vaginal opening was observed each day from PND23, until complete opening was detected on all the females.

Cyclicity in Adult Females

To evaluate the regularity of the estrus cycles, daily vaginal smears were carried out over 3 weeks between postnatal weeks 14 and 18. Smears were collected by flushing the entrance of the vagina with physiological saline, which was then colored with methylene blue to visualize the cells under optical microscopy. The stages of proestrus, estrus and metestrus/diestrus were determined from the cytology observed on smears.

Fertility Study

Female fertility was assessed at the end of all the behavioral analyses. Each 26-week-old female was housed with a fertile male mouse for 1–14 days until a vaginal plug was observed. The number of pups and litters were recorded for each experimental group of females.

Neuroanatomical Studies

Tissues Collection and Preparation

Fifteen 8-week-old females (5 *per* group) were euthanized using an intra-peritoneal injection of a lethal dose of sodium-pentobarbital (100 mg/kg). Intracardiac perfusions with a nitrite buffer solution followed by a solution of phosphate buffer saline

0.1 M, pH 7.4 (PBS) with 4% paraformaldehyde (PBS 4% PFA) were performed. The mouse heads were dissected and brains removed and post-fixed in PBS 4% PFA for 24 h. Brains were then immersed in 20% sucrose solution in PBS for cryoprotection and stored at 4°C. Each brain was embedded in TissuTek© and frozen in Isopentane at −40°C, before being sliced with a cryostat into 20 µm coronal sections collected on SuperFrost glass slides (Menzel, Germany) and stored at −20°C until immuhistochemistry.

Immunohistochemistry for GnRH Neurons

Thirty serial coronal brain slices (Bregma 0.14 to Bregma 0.86; Franklin and Paxinos, 1997) covering within a rostro-caudal axis the median septum (MS), the *Organum Vasculum of the Stria Terminalis* (OVLT) and the medial preoptic area (mPOA) from each female were immunolabeled for GnRH perikarya. To label GnRH terminal nerves in the median eminence (ME), three coronal sections *per* female were selected from the rostral, medial and caudal ME (Bregma −1.70, Bregma −1.94, and Bregma −2.08 respectively; Franklin and Paxinos, 1997).

Brain slices were treated for 15 min at room temperature (RT) in PBS with 0.3 Triton X-100 (PBST) and 1% H_2O_2 to block endogenous peroxidases, and then rinsed three times (3 × 5 min). After being incubated for 1 h at RT in PBST and 10% of normal goat serum (PBST-NGS) to reduce background noise, slices were incubated in the primary antibody 19,900 rabbit IgG (1:3000) (Geller et al., 2013) diluted in PBST-NGS overnight at 4°C. For GnRH perikarya labeling, sections were rinsed three times (3 × 5 min) in PBS and incubated for 2 h at RT with the secondary biotinylated anti-rabbit immunoglobulin goat antibody (Vector Lab) diluted at 1:500 in PBST-NGS. Slices were washed twice in PBS and once in Tris-HCl buffer (0.05 N, pH 7.6), before being incubated for 1 h in ABC peroxidase (horseradish peroxidase) complex [Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA kit Vectastain Elite (PK6100)] at a dilution of 1:600 in PBST. The signal was revealed with 3.3″ diaminobenzidine (DAB) and 0.02% H_2O_2. The enzymatic reaction was stopped in Tris-HCL. Finally, sections were dehydrated in graded alcohol and toluene, and mounted with DEPEX.

GnRH terminal nerves in the ME sections were labeled by rinsing three times in PBS and then incubating in the secondary antibody goat anti-rabbit IgG Alexa 546 (Molecular Probes) diluted at 1:1000 in PBST-NGS for 2 h at RT. The secondary antibody was rinsed three times in PBS and nuclei were counterstained with DAPI (1:1000) for 1 min. Sections were washed, mounted on glass slides and coverslipped with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL).

Analysis of GnRH Cells Bodies and Terminal Nerves

Counting of GnRH neurons perikarya was performed under a light microscope at 20X magnification. One brain from the ENVIR group presented high background noise with DAB labeling and was excluded from this analysis. As GnRH neurons perikarya are scattered in their distribution area and distinct from each other, it is easy to identify individual GnRH labeled neurons between the n and the n+1 slices according to their neuroanatomical location (Zhu et al., 2015). Immunoreactive perikarya in 30 serial slices within a rostro-caudal continuum were counted (Bregma 0.14 to Bregma 0.86; Franklin and Paxinos, 1997). The total number of summed neurons from the 30 slices *per* animal was compared between groups. Subsequently, to compare GnRH neuron distributions, the number of neurons from each five consecutive slices was summed to establish a distribution curve of neurons from the MS up to the mPOA.

Analyses of GnRH terminal nerves in the ME were performed using epifluorescence microscope images computerized with Mercator Software (Explora Nova, La Rochelle, France). Under a magnification of 20X, anatomical regions in the ME were localized using DAPI labeling. A selected region was centered in a rectangle of 10,000 μm^2 and labeling was observed at a wavelength of 555 nm. The image was captured, digitalized and thresholded to detect the GnRH immunolabeled area. This area was automatically calculated and divided by the total surface of the region to obtain a percentage. To get a surface of labeled GnRH area, an average surface area was obtained from the three sections corresponding to rostral, middle and caudal ME for each animal. The final value of labeled area *per* group is a mean of the GnRH surface for 5 animals.

Immunohistochemistry for Kisspeptin Neurons

Two coronal 20 µm brain slices *per* female from the periventricular preoptic nucleus (PVpo) (Bregma 0.02 mm; Franklin and Paxinos, 1997) were processed to immunostain kisspeptin neurons (Clarkson et al., 2014). Slices were incubated in PBS with 0.3 Triton X-100 and 10% of normal goat serum (PBST-NGS) for 1 h at RT, and then in sheep anti-kisspeptin antibody (AC053) at a dilution of 1:2000 (Franceschini et al., 2013) at 4°C overnight. The following day, slices were rinsed three times (3 × 5 min) with PBS, and then processed for immunofluorescence labeling for 2 h at RT using Alexa 546-conjugated donkey anti-sheep IgG second antibody (1:1000; Molecular Probes). After three rinses in PBS, nuclei were counterstained with DAPI (1:1000) and incubated for 1 min. Slides were rinsed in water and coverslipped with Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA), before being stored in the dark at 4°C.

Behavioral Analyses

Two weeks before starting the behavioral tests, females were housed individually in a standard cage with free access to food and water. Except for the elevated plus maze test, all the behavioral tests were conducted under red light during the dark phase of the dark/light cycle 2 h after lights off.

Maternal Behavior

Females were tested for induction of maternal behavior by exposing them to cross-fostered newborn pups (Rosenblatt, 1967; Keller et al., 2010). Individually housed 12- to 14-week-old females were tested as nulliparous in their usual home cage after replacing the top with a clear Plexiglas cover to allow observation. Each female was allowed a 5-min habituation period before maternal behavior was assessed for 30 min. To this end, 3- to 5-day-old pups from another female were placed at the opposite sides of the cage (three *per* female). Measures recorded

were: the latency to retrieve the first pup to the nest, and then the cumulative duration over the 30-min test for each of the following behaviors: sniffing pups, licking/grooming, nursing (arched-back position), nest building and self-grooming, while other activities such as rearing, leaning or digging were recorded as non-maternal care behaviors.

Lordosis Behavior

Lordosis behavior was assessed in transparent Plexiglas aquaria during the first 2–5 h after lights off. To evaluate normal physiological response, intact-estrus females were used. Each 17- to 23-week-old female was tested seven times, once *per* estrus cycle. Each estrus female was placed in the aquarium with a stimulus male for 20 min. Stimulus males were allowed to become habituated to the aquaria with their own bedding at least 2 h before introducing the female. The number of attempted mounts, successful mounts and lordosis postures (when pelvic thrusts were observed) were scored. To avoid any unwanted pregnancies, the male was removed from the female 3 s after intromission (pelvic thrust). If females received 20 attempted or successful mounts, the test was stopped before the end of the 20-min trial. The lordosis quotient (LQ) was calculated as the number of scored lordosis postures/total number of successful mounts $\times$ 100. The first three trials served as experience acquisition for the females and the LQ was scored from the fourth to the seventh trial (Kercmar et al., 2014).

Social-Sexual Investigatory Behavior

The mating preference of females was evaluated through a choice between a gonad-intact male and a castrated male. Females were tested during estrus, first as sexually inexperienced (naïve), and then after sexual interactions with males (16- and 24-week-old respectively), in a Plexiglas device divided into three compartments enabling free movement of the tested animal. Lateral compartments were divided into two and the partition had small holes at its base allowing diffusion of odors and nose-to-nose contacts. The cumulative time spent in each lateral compartment and the cumulative time spent sniffing each male were recorded for 10 min.

Elevated Plus Maze Test

An elevated plus maze test (EPM) was used to assess the anxiety level of 25-week-old females. The EPM consists of two open and two closed cross-shaped arms (5 cm wide $\times$ 40 cm long) elevated 50 cm from the floor. Each diestrus female was placed in the central square and allowed to investigate the EPM arms for 5 min. The time spent in the two open and two closed arms and the number of entries into each arm were recorded.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad prism5 software (GraphPad Software San Diego, CA). Normality of distributions was tested using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. A Two-way ANOVA with the Bonferroni post-test was used to compare body weights across animal age, and to compare and analyze lordosis behavior data. A Chi^2 test was used to compare the percentages of vaginal opening and lordosis postures. Time spent sniffing gonad-intact and castrated males in the sexual preference test were compared using a paired *t*-test for each group. A One-way ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test was used to compare the three groups of animals when distributions were Gaussian and variances equal (Bartlett test) (estrus cycle length). If data did not fit Gaussian distribution and/or variances were unequal, we used a non-parametric Kruskal-Wallis with Dunn's multiple-comparison test (maternal behavior, anxiety-like behavior and number of GnRH neurons). GnRH neurons distribution was compared with an Extra sum-of-square-test F. Differences were considered significant for $p < 0.05$. Non-parametric or parametric data are respectively presented as Tukey's boxplots or as histograms (mean $\pm$ SEM).

RESULTS

Reproductive Physiology

EE2 and Body Growth Curves

Two-way ANOVA showed that the kinetics of body weight exhibited a significant overall effect of EE2-treatment [$F_{(2,300)} = 6.22$, $p = 0.002$] and age [$F_{(5,300)} = 291.78$, $p < 0.0001$] on growth curve between PND22 and PND92. In spite of a statistically significant effect of EE2-treatment, this accounts for approximately 0.68% of the total variance against 80% for age-effect. Bonferroni post-test did not show any statistically significant effect of EE2 for both ENVIR and PHARMACO doses at different ages (**Figure 2A**).

EE2 and Vaginal Opening

Vaginal opening was detected from PND24 in 15 and 10% of the EE2-exposed females in the ENVIR and PHARMACO groups respectively, whereas no vaginal opening was detected in CONTROL females (**Figure 2B**). A Chi^2 test revealed significant earlier vaginal opening in EE2-exposed animals in PND24 and PND25 ($p = 0.0007$). In CONTROL females, the first vaginal openings were detected at PND26 (Chi^2 CONTROL vs. PHARMACO, $p = 0.05$). Then, up to PND31 when all the females of the three groups presented an opened vagina, the proportion of females with vaginal opening was always statistically higher in the EE2-exposed females than in the unexposed CONTROL females. The Chi^2 test revealed significant differences in the cumulative percentages of female mice with vaginal opening between the three experimental groups from PND24 to PND31.

EE2 and Estrus Cyclicity

The estrus cyclicity of the adult females was assessed through daily vaginal smears for a period of three estrous cycles beginning at the 14th week of age. Histograms in **Figure 2C** show the percentages of females which have completed a full cycle in four successive days, i.e., females showing a return to the state of the first day of the cycle on day 5 of daily vaginal smears. In the CONTROL group, only 38% of females had accomplished a complete cycle within 4 days, compared to 80 and 78% of ENVIR and PHARMACO females respectively ($p < 0.0001$). Thus, EE2-exposed females showed shortened estrus cycles.

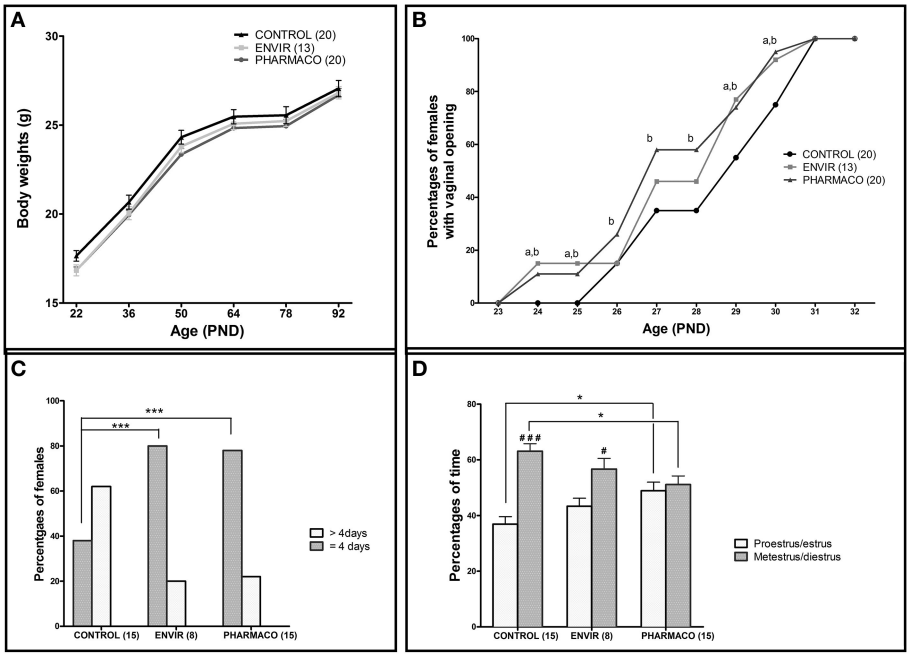


FIGURE 2 | Effects of developmental EE2 exposure on reproductive physiology. (A) Body weight of female mice exposed to the vehicle (Control; $n = 20$) or to EE2 [ENVIR ($n = 13$) and PHARMACO ($n = 20$)] was evaluated from PND22 up to PND92. Data are expressed as means ± SEM. **(B)** Vaginal opening pattern for each experimental group. Cumulative percentages of female mice showing vaginal opening according to age and experimental condition are presented from PND23 to PND32. Dissimilar letters indicate significant differences at each PND, $p < 0.05$ using the Chi^2 test of Pearson (a = ENVIR vs. Control. b = PHARMACO vs. Control. **(C,D)** The estrus cycle was evaluated daily for 14- to 18-week-old females during three cycles. **(C)** Estrus cycle length given as a percentage of females showing a complete cycle over four consecutive days (4 days) and females that did not complete a cycle over 5 days of vaginal cytology analyses (>4 days). Chi^2 test comparing Control vs. ENVIR or Control vs. PHARMACO groups, $^{***}p < 0.001$. **(D)** Average occurrence of proestrus/estrus (follicular phase) vs. metestrus/diestrus (luteal phase) stages and *per* experimental group during 3 weeks of vaginal cytology analyses in adult females. One-way ANOVA ($F = 4.32$). *Tukey's multiple comparison test; $^{*}p < 0.05$. Paired *t*-test: $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#\#}p < 0.001$.

Analyses of follicular and luteal phases' length show that, for CONTROL females, 37% of the total cycle length was proestrus/estrus, whereas for EE2-exposed ENVIR and PHARMACO females proestrus/estrus represented about 43 and 49% of the total cycle length respectively [One-way ANOVA, $F_{(2,42)} = 4.32$, $p = 0.01$; **Figure 2D**). The Bonferroni multiple comparison test showed that the lengths of the follicular and luteal phases were statistically significantly different from the CONTROL females only for the PHARMACO group ($p < 0.05$). The intragroup comparison of the cycle phases' lengths showed that, in CONTROL females, the proestrus/estrus phase is highly significantly shorter (37%) than the metestrus/diestrus phase (63%) (paired *t*-test; $^{\#\#\#}p < 0.001$). Within the ENVIR group, the difference between the two phases was also significant (43% in proestrus/estrus and 57% in metestrus/diestrus; $^{\#}p < 0.05$), as it was not in PHARMACO females which spent 49 and 51% in proestrus/estrus and metestrus/diestrus respectively.

EE2 and Fertility

No differences in fecundity and fertility were detected, since the relative number of litters (100% CONTROL, ENVIR, and PHARMACO mated females farrowed) and litter size (11.3 ± 0.8, 12.4 ± 1.1, and 10.5 ± 1.3 in CONTROL, ENVIR, and PHARMACO respectively) did not vary. There was no difference in sex ratio (number of males/number of females) between the three groups: 0.96 ± 0.18, 1.21 ± 0.17, and 1.16 ± 0.26 in CONTROL, ENVIR, and PHARMACO groups respectively (Kruskal-Wallis test, $p = 0.70$; data not shown).

Neuroanatomical Studies

EE2 and the Neuroendocrine GnRH System

The effects of developmental exposure to EE2 on the numbers and neuroanatomical distribution of hypothalamic GnRH neurons perikarya in adult female mice were assessed (**Figure 3**). Immunohistochemical analysis of the GnRH neuroendocrine network in the main areas of their perikarya distribution in the median septum (MS), the *Organum Vasculum* of the *Lamina Terminalis* (OVLT) and the medial preoptic area (mPOA) revealed a statistically significant effect of EE2 treatment on the number of neurons (Kruskal-Wallis test, $p = 0.01$) (**Figure 3A**). Dunn's multiple comparison test revealed a significant increase in females exposed to the PHARMACO dose during development, with an increase to 193% (304 ± 29 neurons) compared with the CONTROL group (158 ± 30 neurons). No significant difference was detected for the ENVIR group (171 ± 11 neurons) compared to the CONTROL group. **Figure 3D** (upper panel) illustrates these differences in GnRH neuron numbers in the OVLT between the three groups.

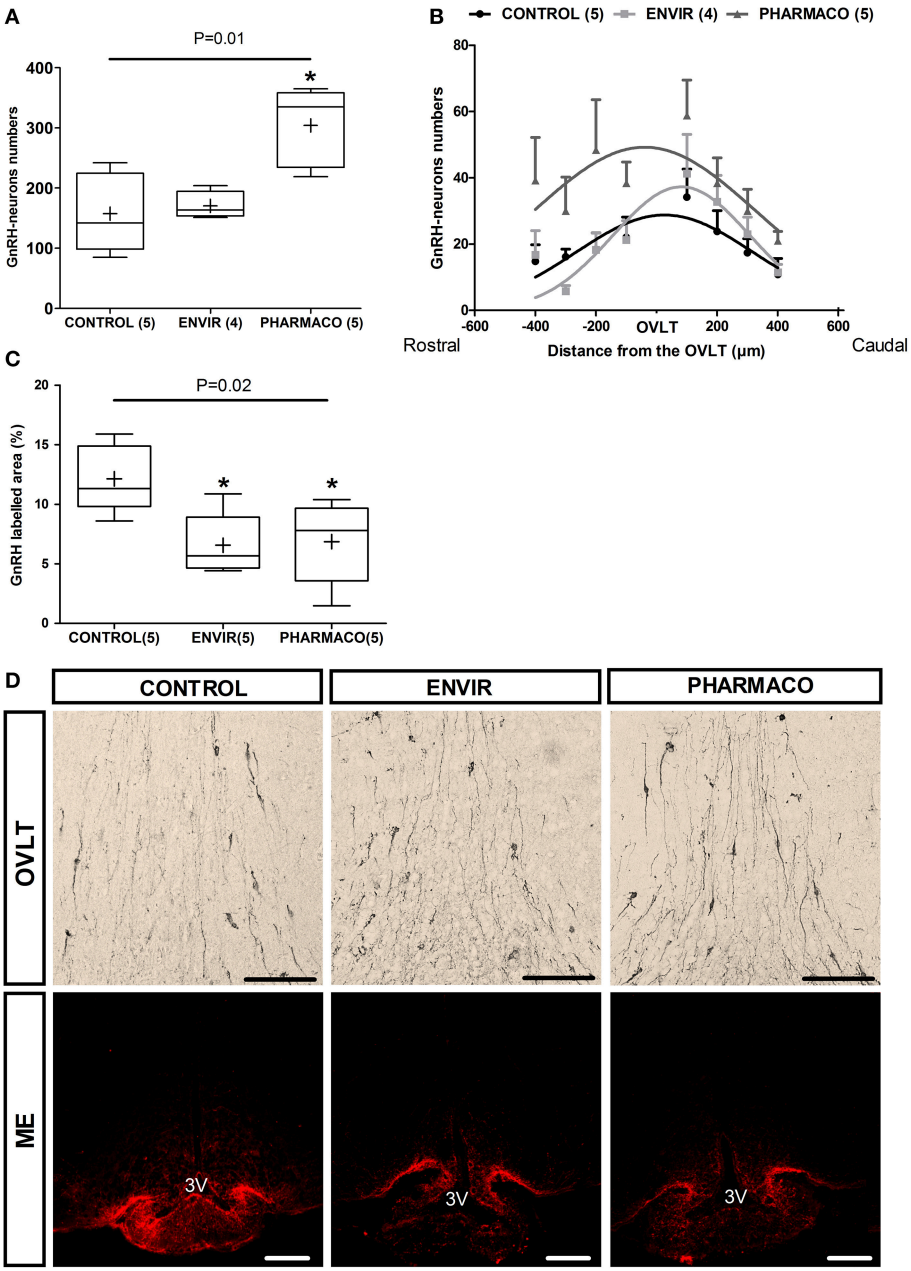


FIGURE 3 | EE2 altered the establishment of GnRH neuron network. (A) Total number of GnRH immunoreactive neurons in the POA for each experimental group. **(B)** Curve fit of the distribution of GnRH neurons centered on the OVLT through a rostro-caudal axis from the median septum (-400 µm) up to the medial preoptic area mPOA (+400 µm). Extra sum-of-square-test $F_{(6,103)} = 5.75$, $P < 0.0001$. **(C)** Quantification of the labeled area of GnRH in three parts of the median eminence (posterior, middle and anterior). Tukey's box-plots of GnRH labeling according to the experimental group. The band is the median and (+) is the mean. Kruskal-Wallis test; *$p < 0.05$. Dunn's Multiple Comparison test (statistically different from Control). Numbers in brackets are effectives of animals *per* group. **(D)** Representative photographs of immunohistochemical labeling with DAB-Ni staining of GnRH perikarya in the *Organum Vasculum* of the *Lamina Terminalis* (OVLT) (upper panel) and immunohistochemical staining with fluorescence of GnRH fibers in the median eminence (ME) (lower panel). 3V: third ventricle. Scale bar = 100 µm.

The neuroanatomical distribution of the GnRH neurons was investigated through a rostro-caudal axis within a continuum centered on the OVLT and extending from the MS (-400 µm) up to the mPOA (+400 µm) (**Figure 3B**). The number of neurons is indicated in each 100 µm position by summing the number of neurons from five serial slices. In CONTROL females, the distribution shows a bell-shaped curve whose peak is located at the OVLT level. Statistical comparison using an Extra sum-of-square-test F shows statistically significant differences between the three curves [$F_{(6,103)} = 5.75$, $p < 0.0001$], indicating that neuronal distribution in adult has been disturbed by EE2 developmental exposure (**Figure 3B**).

Most of the hypothalamic GnRH neurons project their axons into the ME. The analysis of the anterior, middle and posterior parts of the ME from each animal allowed the proportion of GnRH labeled area to be determined, reflecting the density of GnRH fibers. In females that were developmentally exposed to EE2 (ENVIR and PHARMACO groups), the GnRH labeled area was significantly reduced. Results are shown in **Figure 3C**, illustrated in **Figure 3D** microphotographs (lower panel). Compared to the CONTROL group (12.1 ± 1.3%), the reduction was about 46% in the ENVIR group (6.6 ± 1.2%), and 44% in the PHARMACO group (6.9 ± 1.5%) (Kruskal-Wallis test, $p = 0.02$; Dunn's multiple comparison test, $^{*}p < 0.05$).

EE2 and Kisspeptin Neurons

Kisspeptin neurons were counted in two adjacent coronal slices in the periventricular preoptic nucleus (PVpo) for each animal. **Figure 4A** represents Tukey's boxplots of the mean numbers in the two slices for each animal of the three groups. As illustrated in **Figure 4B**, no difference *per* slice *per* animal was detected between CONTROL and EE2-exposed females, with 60 ± 9, 64 ± 3, and 64 ± 11 neurons in the CONTROL, ENVIR, and PHARMACO groups respectively.

Behavioral Analyses

EE2 and Maternal Behavior

Females of the ENVIR group spent significantly more time (980 ± 206 s) to retrieve the first pup to the nest than CONTROL and PHARMACO females (543 ± 159 s and 673 ± 152 s respectively) (Kruskal-Wallis test, $p = 0.05$; Dunn's multiple comparison test, $p < 0.05$) (**Table 1**). EE2-treated females spent significantly more time in activities that are not pups-related (51.28 ± 7.78% and 41.69 ± 5.87% in the ENVIR and PHARMACO groups, respectively), compared to the CONTROL group (29.07 ± 6.44) (Kruskal-Wallis test, $p = 0.04$). No statistically significant effect was observed for any of the other evaluated parameters related to pups' nursing (**Table 1**).

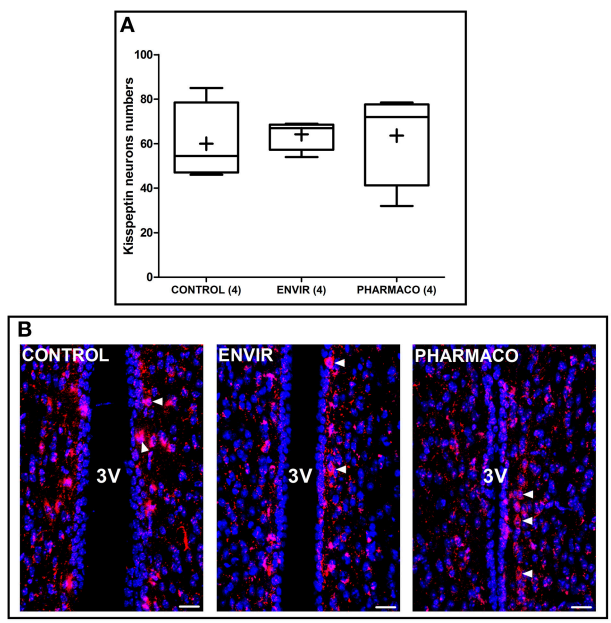


FIGURE 4 | The number of kisspeptin neurons was not disturbed by EE2 exposure. (A) Tukey's boxplots of the numbers of kisspeptin neurons counted in the periventricular preoptic nucleus (PVpo). (+) is the mean, numbers in brackets are effective of animals *per* group. No statistical differences were detected. **(B)** Photomicrographs of coronal brain sections counterstained with DAPI (blue) and immunostained for kisspeptin (red). Arrowheads indicate kisspeptin perikarya along the third ventricle (3V). Scale bar = 20 μm.

EE2 and Mate Preference

Mating preference tests on naïve females showed that females from the three groups did not exhibit any preference for the gonad-intact or the castrated male (**Figure 5A**). In contrast, the sexually-experimented CONTROL females exhibited a preference for the gonad-intact male over the castrated male (*t*-test, $t = 4.29$; $p = 0.009$). This preference was found neither in ENVIR females (*t*-test, $t = 1.67$; $p = 0.14$) nor in PHARMACO females (*t*-test, $t = 1.02$; $p = 0.3$).

EE2 and Lordosis Behavior

A Two-way ANOVA test demonstrated an overall significant effect of trial number [$F_{(3, 143)} = 2.95$, $p = 0.03$] and EE2-exposure on the lordosis quotient (LQ) [$F_{(2, 143)} = 3.94$, $p = 0.02$]. As an example, during the seventh trial, PHARMACO females showed a 200% increase in the LQ compared with the CONTROL females (**Figure 5B**).

The percentages of females showing a lordosis posture were also compared between the three different groups (**Figure 5C**). During the fourth trial, 20% of the CONTROL females showed a lordosis posture, vs. 11 and 33% of females in the ENVIR and PHARMACO groups respectively. This rate increased to 33% during the seventh trial for the CONTROL group vs. 63 and 60% for the ENVIR and PHARMACO groups respectively. A Chi^2 test revealed a statistically significant increase ($p = 0.0002$) for the ENVIR and PHARMACO groups (**Figure 5C**).

TABLE 1 | Maternal behavior tests.

Experimental Group Scored parameter	Control (15)	ENVIR (8)	PHARMACO (15)
Latency to retrieve the first pup to the nest	543 ± 159 s	980 ± 206*s	673 ± 152 s
Sniffing	3.35 ± 0.70	4.20 ± 0.87	3.93 ± 0.60
Licking/grooming	29.13 ± 3.5	22.57 ± 3.77	18.41 ± 3.30
Arched-back nursing	23.28 ± 5.12	8.30 ± 3.52[a]	15.28 ± 3.84
Nest building	9.94 ± 1.42	7.08 ± 1.04	11.51 ± 2.46
Self-grooming	5.44 ± 1.28	6.56 ± 1.65	9.19 ± 1.73
Not pups-related activities	29.07 ± 6.44	51.28 ± 7.78*	41.69 ± 5.87

*The latency to retrieve the first pup to the nest is shown in seconds (mean ± SEM). Results are mean percentages (±SEM) of time spent per animal in each scored behavior during a 30-min test. *Kruskal Wallis test with Bonferroni multiple comparison ($p < 0.05$; [a]$p = 0.06$).*

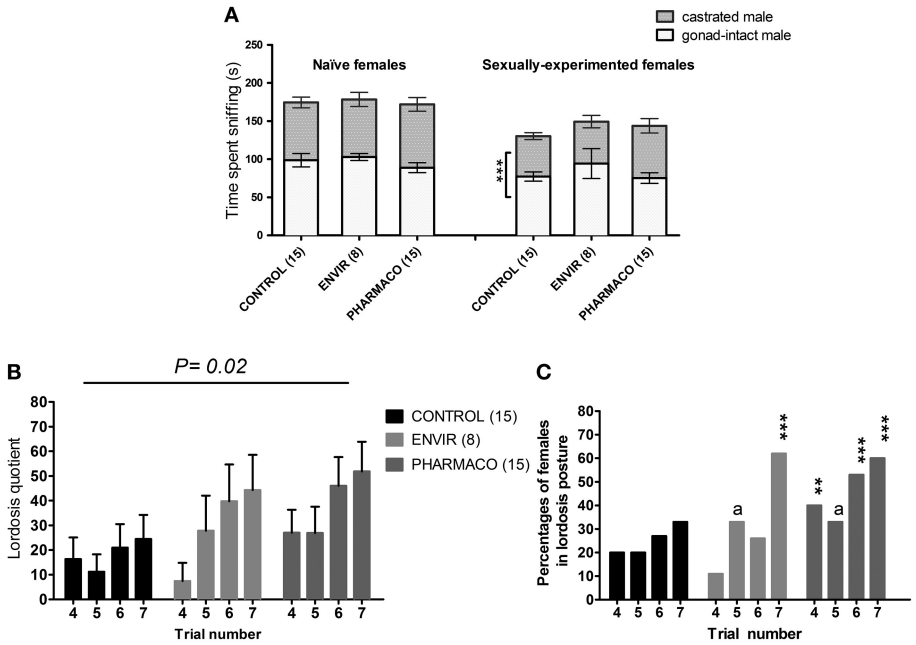


FIGURE 5 | EE2 impaired social and sexual behaviors of females. (A) Sexual preference tested in naïve (without any contact with an adult male) and experienced (after mating behavior tests) females at the estrus stage. Histograms present the time spent sniffing the gonad-intact or the castrated male over 10 min. *** Unpaired *t*-test comparing the average time spent by females with the gonad-intact or the castrated male. **(B,C)** Female sexual behavior (lordosis behavior): females were tested on 7 trials at the day of estrus: for each female, a trial was carried out once *per* cycle. **(B)** Lordosis quotient (LQ): number of lordosis postures/total number of successful mounts × 100. Two-way ANOVA, $p = 0.02$. **(C)** Percentages of females showing lordosis posture during behavioral tests. Chi^2 test comparing each exposed group to the Control group for each trial. $^a p = 0.06$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.

EE2 and Anxiety-Like Behavior

The EPM test revealed that EE2 treatment increased the anxiety-like behavior of the F1 generation females in adulthood. Females from the ENVIR and PHARMACO groups spent less time in the open arms of the EPM device than the CONTROL group (Kruskal-Wallis, $p = 0.01$, with ∗Bonferroni multiple comparison; $p < 0.001$) (**Figure 6A**). EE2-exposure also decreased significantly the number of entries into the open arms from 17.1 ± 1.3 in the CONTROL group to 12.6 ± 1.1 in the ENVIR group ($p < 0.001$) and 11.7 ± 0.6 in the PHARMACO group (Kruskal-Wallis, $p = 0.001$; with ∗Bonferroni multiple comparison) (**Figure 6B**).

DISCUSSION

The environmental EE2 contamination may be considered as an emerging issue that might affect animal and human health[1] (Owen and Jobling, 2012; Green et al., 2013). In the present study, we investigated the long-term effects of a developmental exposure to EE2 on reproductive function in female mice. We demonstrated that chronic exposure to EE2 in drinking water during critical phases from intrauterine development until puberty, at doses in a range of environmental exposure and much lower than the previously reported Low-Observed-Adverse-Effect-Level (LOAEL) dose (Kanno et al., 2001), induced enduring effects on reproductive function in females. Indeed, we observed advanced vaginal opening and shortening of estrous cyclicity. The GnRH neuroendocrine network, the main regulator of the gonadotropic axis, was altered, suggesting that neuroendocrine effects are involved. Moreover, behavioral outcomes were disrupted, namely a decrease in maternal nurturing behavior, a decrease in social-sexual preference, an increased lordosis behavior and an increased anxiety level. All these points will be discussed in the following paragraphs.

Developmental Exposure to EE2 Altered Reproductive Physiology

Our results showed that EE2 developmental exposure induced advanced vaginal opening and modifications of estrus cyclicity at both ENVIR and PHARMACO doses. Fertility and fecundity over one breeding period were not significantly affected by EE2 treatments.

We demonstrated that both doses of EE2 (0.1 and 1 μg/kg bw/d) significantly accelerated the vaginal opening when compared with the CONTROL group. These results are broadly consistent with several other studies in Sprague-Dawley rats conducted at the National Center for Toxicological Research for the National Toxicology Program (NTP) (National Toxicology Program, 2010). In these studies, authors used rats treated chronically with an oral dose range of 0.2–5.8 μg/kg/day during development up to PND140, using an experimental design comparable to our treatment protocol, even though doses were

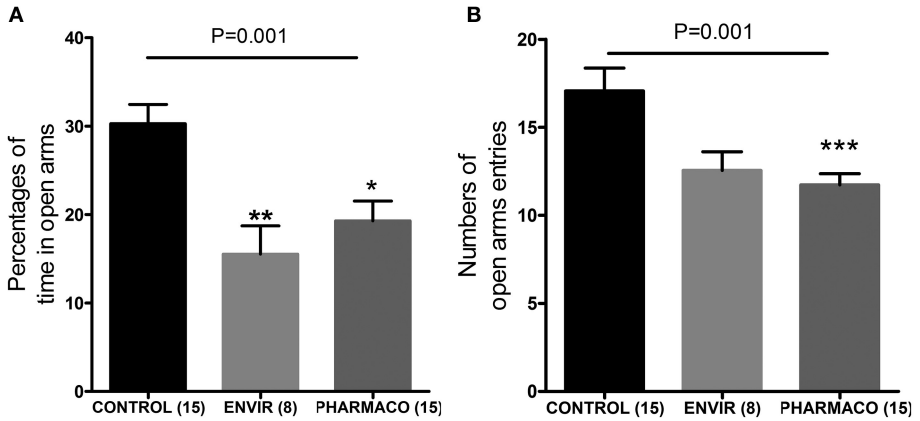


FIGURE 6 | EE2-exposure increased anxiety of females. (A) Percentages of time spent in the open arms of an elevated plus maze (EPM) (Kruskal Wallis test; $p = 0.001$). **(B)** Numbers of entries into the open arms of the EPM (Kruskal Wallis test; $p = 0.01$). Bonferroni multiple comparison test: $^{*}p < 0.05$; $^{*}p < 0.001$; $^{***}p < 0.001$.

notably higher than those used herein. Likewise, they found that EE2 disturbed vaginal opening and estrus cycles at 5.8 μg/kg/d, but had no effect on fertility. Another study conducted with Long-Evans rats (Ryan et al., 2010) showed that 5 μg/kg/d of EE2 exposure from embryonic day 7 up to PND18 accelerated vaginal opening, reduced body weight at vaginal opening and induced some genital malformations in females.

In our study, EE2 exposure extended from gestation up to PND40. As females were still exposed to EE2 at vaginal opening, then the significant alteration of pubertal timing may be the consequence of peripheral effects through a direct action of EE2 on vagina epithelium, suggesting that the observed advanced vaginal opening do not necessarily imply central and/or ovarian pubertal changes. Nevertheless, the advanced vaginal opening may also result from central effects through an interference of EE2 with the neuroendocrine system during critical developmental periods (Franssen et al., 2014). Indeed, we found in adult females developmentally exposed to EE2 an alteration in GnRH neurons neuroanatomical localization in the POA and a decrease in their terminal nerves density in the ME. During embryonic development, GnRH neurons migrate from the olfactory placode through the nose up to their final main localization in the median septum, rostral hypothalamus and preoptic area (POA) (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Wray et al., 1989). Delay in nasal to brain migration of GnRH neurons has been associated with a delay in puberty and disruption of estrus (Parkash et al., 2012), implying that the onset of puberty is dependent on the correct timing of GnRH neuron migration. Moreover, Rasier et al. (2007) demonstrated that transient exposure to EDCs (estradiol, *o*, *p*′-DDT) in early postnatal life can induce an early maturation of the pulsatile GnRH secretion and a subsequent early developmental reduction of LH response to GnRH, constituting a possible mechanism of the sexual precocity.

We also demonstrated that exposure to EE2 induced shortening of estrous cycles in the two treated groups, as well as a proportional shortening metestrus/diestrus phase toward the proestrus/estrus phase, all the more in the PHARMACO group. The hypothalamic control of ovulation and estrous cycling is developmentally organized (Foster et al., 2006) and the activity of the GnRH secretion system is sexually differentiated during the postnatal period. Therefore, exposure to some EDCs can cause inappropriate sexual differentiation of the female hypothalamus and alterations in estrous cyclicity after puberty (Gore, 2008). We can suspect that the alterations that we detected in GnRH network led to disruptions in patterns of pituitary gonadotropins secretion, and consequently to altered production and secretion of ovarian hormones regulating estrus cycle. Subsequently, it will be interesting to investigate whether gonadotropic hormonal levels are altered in EE2-exposed females.

Developmental Exposure to EE2 Altered the Establishment of GnRH Neuron Network

The present study showed that EE2 exposure during a period in which GnRH neurons were developing led to an increase in the number of these neurons mainly in the POA. A previous study published by our laboratory already demonstrated that a short exposure to EE2 during the neurogenesis and the nasal migration of GnRH neurons between E10.5 and E13.5 led to a significant increase in the number of these neurons in embryos (Pillon et al., 2012). We now demonstrated that this increase in GnRH neurons number in embryos is still detectable in adult females, suggesting a developmental embryonic origin of this phenotype at adulthood. Such an increase in the number of GnRH neurons has already been reported after developmental EE2-exposure in zebrafish (Vosges et al., 2012).

In a birth-date study using bromodesoxyuridine pulse labeling during early GnRH neurons ontogeny, Jasoni et al. (2009) described that early-born GnRH neurons stopped their migration in the most rostral areas, while later-born GnRH neurons settled more caudally. In our study, in spite of the absence of difference in GnRH neurons number between ENVIR and CONTROL females, we detected a greater proportion of GnRH neurons located at the OVLT level and more caudally in ENVIR females

than in the CONTROL group. This mislocalization may result from defects in the neuronal migration occurring between E11 and E16 (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Parkash et al., 2012).

Furthermore, we observed a dramatic decrease in the immunoreactivity of the GnRH terminal nerves for the ENVIR and PHARMACO groups compared with the CONTROL group in the ME. This difference in fibers immunofluorescence density can be due to a developmental alteration disrupting the axonal GnRH growth for projections, leading to a lowest density of GnRH fibers in this brain area. Other studies using an *in vitro* GT1-7 cell line reported that estrogenic EDCs impaired *GnRH-1* gene expression, cell survival and neurite outgrowth (Gore, 2001). It can also be due to an increased exocytotic release of GnRH detected as neuropeptide depletion within the neurons, a hypothesis compatible with the modification in estrus cyclicity that we observed in our current study. Overall, these results clearly show that the formation of the GnRH neuroendocrine network is vulnerable to estrogenic EDCs, leading to potential alterations in adult reproductive function, such as puberty onset or estrus cyclicity.

The mechanisms of action by which EE2 may affect GnRH neuron development remain unknown. GnRH neurons are usually described as not being directly affected physiologically by estrogens. However, GnRH neurons express low levels of *Esr2* gene coding for estrogen receptor β (ERβ) early in development (Skynner et al., 1999; Sharifi et al., 2002), consistent with a possible direct regulation of EE2 on GnRH neurons. Nonetheless, other mechanisms might occur, such as an indirect effect through the glial microenvironment believed to be a target of estrogenic compounds *via* ERs and GPR30 during development (McCarthy et al., 2002; Merlo et al., 2007; Rao and Sikdar, 2007) and closely communicating with developing and adult neurons (Kuo et al., 2010; Geller et al., 2013).

We could have hypothesized that the hypothalamic circuits governing the release of GnRH should be impaired. Kisspeptin neurons are highly sensitive to estrogens and kisspeptin neuronal network plays a key role in the cellular basis for estrogen feedback action on GnRH neurons in female reproductive function, including regulation of ovulation and estrous cyclicity (D'anglemont De Tassigny and Colledge, 2010; Roa et al., 2011). We did not observe any significant differences in the number of neurons within the dimorphic kisspeptin neurons population in the periventricular preoptic nucleus (PVpo).

The embryonic development of kisspeptin neurons in rodents shows no sexual dimorphism (Desroziers et al., 2012). However, it has been clearly established that the kisspeptin neuroendocrine network is highly dependent on gonadal steroids during postnatal development (Clarkson et al., 2009a), and there is some growing evidence for the susceptibility of the kisspeptin neuroendocrine network to environmental pollution during the postnatal period (Franceschini and Desroziers, 2013). In female rats, perinatal exposure to 5, 15, or 50 μg/kg/d EE2 did not induce significant changes in *kiss-1* mRNA levels in adulthood (Overgaard et al., 2013), as Takahashi et al. (2014) found that a single injection of a low dose of 0.02 μg/kg EE2 at PND1 decreased hypothalamic *Kiss-1* mRNA levels at PND14. In the present study, kisspeptin immunoreactivity was investigated in the PVpo, but not in the anteroventral periventricular (AVPV) nucleus or arcuate nucleus (Clarkson et al., 2009b). Therefore, though no change in kisspeptin neurons in the PVpo was observed, we cannot rule out an alteration of the dimorphic AVPV population or in the density of kisspeptin fibers.

Developmental EE2 Exposure Decreased Maternal Behavior

Females were tested as nulliparous for innate maternal care on cross-fostered pups. Results showed that EE2-exposed females exhibited a lower motivation to retrieve pups and a lower level of care toward pups. Estrogenic EDCs exposure has already been shown to alter maternal behavior. Indeed, developmental exposure to the estrogenic compound Bisphenol A (BPA) has previously been shown to alter maternal behavior of females exposed as a fetus or during their own pregnancy (Palanza et al., 2002). A recent study reported that diethylstilbestrol (DES) exposure during pregnancy modified maternal behavior of females and induced higher anxiety levels in adult offspring exposed during their prenatal development and receiving care from exposed or oil-treated mothers (Tomihara et al., 2015). This latest study showed two possible effects of perinatal exposure to disrupting events. The first one is a direct effect of exposure on neural circuits leading to behavioral alteration. The second one is an indirect effect through a disruption of the dams nurturing behavior or anxiety level, which may lead to offspring's behavioral alterations. In our study, the EE2-exposed female mice demonstrated higher anxiety in an elevated plus maze test, as previously reported (Ryan and Vandenbergh, 2006; Ryan et al., 2010). Therefore, disrupted maternal behavior observed in EE2-exposed females may be attributed to a direct effect of EE2 on target specific genes or central circuits such as POA, directly involved in maternal care behaviors. Nevertheless, we cannot rule out that an altered F0 maternal care could have influenced the behavioral outcomes of their offspring behaviors at adulthood, such as maternal care and anxiety level (Tomihara et al., 2015).

Developmental Exposure to EE2 Altered Socio-Sexual Recognition and Increased Sexual Behavior

We demonstrated that EE2 treatment modified sexual behavior of females by increasing their lordosis quotient (LQ). In rats, Ryan et al. (2010) found that EE2 treatment at doses equivalent to ours (0.15 and 1.5 μg/kg/d) did not change the LQ, as a higher dose (15 μg/kg/d) induced a significantly lower LQ. In their study, the LQ was monitored in ovariectomized (OVX) and estradiol-primed females. In our study, we recorded LQs in intact cycling females in the estrus phase to be in physiological conditions. This difference in the testing protocol could explain the apparently contrasting responses. Increased sexual receptivity after developmental exposure to BPA has been reported in intact

cycling female rats (Farabollini et al., 2002) and in C57/Bl6 strain female mice (Naulé et al., 2014). Social and sexual behaviors in rodents are highly gender stereotyped as a consequence of brain sexualization occurring under steroid hormone action during perinatal organizational and peripubertal activational periods (McCarthy, 2008). Sexual differentiation of the female brain has long been considered as a default state of development in the absence of testosterone, suggesting that estrogen does not play any feminizing role (Gorski, 1985). Recently, several mouse knock-out (KO) models have provided evidence for a possible active role of estrogens in female brain feminization (Bakker et al., 2003; Brock and Bakker, 2011). Brock et al. (2011) demonstrated that aromatase KO-mice, unable to convert testosterone to estradiol, exhibited deficient lordosis behavior. In these mice, peripubertal priming with estradiol restored lordosis behavior in adulthood, thus suggesting a role of estradiol during the peripubertal period to express typical female sexual behaviors (Brock et al., 2011). Therefore, this raises the question as to whether EE2 exposure induced an organizational effect during perinatal and/or peripubertal sensitive periods leading to a "hyperfeminizing" phenotype.

A role of estrogens in the implementation of sexually olfactory cues in females during early development has been already evidenced (Pierman et al., 2008). Here we tested the females for their social-sexual preference through a choice between gonad-intact and castrated males. Our results showed that sexually experienced but not sexually naïve CONTROL females preferred the gonad-intact to the castrated male. By contrast, EE2-exposed females did not exhibit any preference, even when having experienced sexual behavior. Mating partner recognition has been reported to be less dependent on perinatal than on postnatal estrogens (Bakker et al., 2007). Partner recognition for mating behavior involves volatile and non-volatile odors detected by the main and the accessory olfactory bulbs (MOB, AOB) (Keller et al., 2006a). In the literature, partner recognition has been described as being mainly supported by MOB detection, whereas lordosis behavior involves AOB detection (Keller et al., 2006b). More research is needed to investigate whether a failure of EE2-exposed females to recognize adequate males is due to a disruption in the treatment of olfactory sensory cues involved in social and sexual interactions. Further, other downstream estrogen sensitive neural networks involved in processing of olfactory cues stimuli such as the sexually dimorphic medial preoptic area could be targeted by EE2 (Henley et al., 2011).

CONCLUSION

In its report in answer to the state-of-the-science regarding the study of endocrine disruptors (EDs), the World Health Organization has provided recommendations and key concerns that policy-makers should take into account. This report highlighted the subtle effects of exposure during sensitive periods in intra-uterine, perinatal life, juvenile, and peripubertal periods, which may be observed throughout or only in later life, particularly for reproductive function. The present study is an additional piece of evidence further supporting the concept of "developmental origins of health and diseases" and providing evidence of neuroendocrine mechanisms underlying disruption. Since the neuroendocrine system regulates many physiological functions, it is not surprising that deregulation of this system could be the cause of disruption of several physiological functions such as reproductive and hormonal systems, growth and metabolic homeostasis. Therefore, considering the high sensitivity of neuroendocrine circuits and sexually dimorphic behaviors, it is essential to consider these parameters in the assessment of a disruptive potential of chemicals on animal and human health.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DP, LD, MK, MM carried out the experiments. MK, DP, AD supervised the experiments. DP, LD, AD analyzed and interpreted the data. LD, AD, DP wrote the draft. MK, MM critically revised the draft. All authors approved the final version of the submitted manuscript.

FUNDING

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) grant NEED (#AF08CES 011).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ms. Deborah Crespin, Ms. Marine Cirot, and Mr. Claude Cahier, experimental unit PAO n°1297 (EU0028) from INRA Centre Val-de-Loire, for animals' care. They also thank the imaging platform staff (PIC) of UMR PRC for their cooperation.

REFERENCES

Bakker, J. (2003). Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *J. Neuroendocrinol.* 15, 615–621. doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.01036.x

Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpirer, J., et al. (2006). Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* 9, 220–226. doi: 10.1038/nn1624

Bakker, J., De Mees, C., Szpirer, J., Szpirer, C., and Balthazart, J. (2007). Exposure to oestrogen prenatally does not interfere with the normal female-typical development of odour preferences. *J. Neuroendocrinol.* 19, 329–334. doi: 10.1111/j.1365-2826.2007.01540.x

Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2002). The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J. Neurosci.* 22, 9104–9112.

Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2003). The aromatase knockout (ArKO) mouse provides new evidence that estrogens are required for the development of the female brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1007, 251–262. doi: 10.1196/annals.1286.024

Balsiger, H. A., De La Torre, R., Lee, W. Y., and Cox, M. B. (2010). A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. *Sci. Total Environ.* 408, 1422–1429. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.12.027

Brock, O., and Bakker, J. (2011). Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice. *Horm. Behav.* 59, 83–89. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.10.012

Brock, O., Baum, M. J., and Bakker, J. (2011). The development of female sexual behavior requires prepubertal estradiol. *J. Neurosci.* 31, 5574–5578. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0209-11.2011

Clarkson, J., Boon, W. C., Simpson, E. R., and Herbison, A. E. (2009a). Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150, 3214–3220. doi: 10.1210/en.2008-1733

Clarkson, J., Busby, E. R., Kirilov, M., Schütz, G., Sherwood, N. M., and Herbison, A. E. (2014). Sexual differentiation of the brain requires perinatal kisspeptin-GnRH neuron signaling. *J. Neurosci.* 34, 15297–15305. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3061-14.2014

Clarkson, J., D'anglemont De Tassigny, X., Colledge, W. H., Caraty, A., and Herbison, A. E. (2009b). Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J. Neuroendocrinol.* 21, 673–682. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x

D'anglemont De Tassigny, X., and Colledge, W. H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology* 25, 207–217. doi: 10.1152/physiol.00009.2010

Desroziers, E., Droguerre, M., Bentsen, A. H., Robert, V., Mikkelsen, J. D., Caraty, A., et al. (2012). Embryonic development of kisspeptin neurones in rat. *J. Neuroendocrinol.* 24, 1284–1295. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02333.x

Dugard, M. L., Tremblay-Leveau, H., Mellier, D., and Caston, J. (2001). Prenatal exposure to ethinylestradiol elicits behavioral abnormalities in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 129, 189–199. doi: 10.1016/S0165-3806(01)00205-X

Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F., and Dessì-Fulgheri, F. (2002). Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ. Health Perspect.* 110(Suppl. 3), 409–414. doi: 10.1289/ehp.02110s3409

Farabollini, F., Porrini, S., and Dessì-Fulgherit, F. (1999). Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 687–694. doi: 10.1016/S0091-3057(99)00136-7

Foster, D. L., Jackson, L. M., and Padmanabhan, V. (2006). Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult reproductive activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254–255, 109–119. doi: 10.1016/j.mce.2006.04.004

Franceschini, I., and Desroziers, E. (2013). Development and aging of the kisspeptin-GPR54 system in the mammalian brain: what are the Impacts on female reproductive function? *Front. Endocrinol.* 4:22. doi: 10.3389/fendo.2013.00022

Franceschini, I., Yeo, S. H., Beltramo, M., Desroziers, E., Okamura, H., Herbison, A. E., et al. (2013). Immunohistochemical evidence for the presence of various kisspeptin isoforms in the mammalian brain. *J. Neuroendocrinol.* 25, 839–851. doi: 10.1111/jne.12069

Franklin, K. B. J., and Paxinos, G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* New York, NY: Academic Press.

Franssen, D., Ioannou, Y. S., Alvarez-Real, A., Gerard, A., Mueller, J. K., Heger, S., et al. (2014). Pubertal timing after neonatal diethylstilbestrol exposure in female rats: neuroendocrine vs peripheral effects and additive role of prenatal food restriction. *Reprod. Toxicol.* 44, 63–72. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.10.006

Geller, S., Kolasa, E., Tillet, Y., Duittoz, A., and Vaudin, P. (2013). Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development. *Glia* 61, 550–566. doi: 10.1002/glia.22455

Gore, A. C. (2001). Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine* 14, 235–246. doi: 10.1385/ENDO:14:2:235

Gore, A. C. (2008). Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 358–374. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.02.002

Gore, A. C., Walker, D. M., Zama, A. M., Armenti, A. E., and Uzumcu, M. (2011). Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Mol. Endocrinol.* 25, 2157–2168. doi: 10.1210/me.2011-1210

Gorski, R. A. (1985). Sexual dimorphisms of the brain. *J. Anim. Sci.* 61(Suppl. 3), 38–61.

Green, C., Williams, R., Kanda, R., Churchley, J., He, Y., Thomas, S., et al. (2013). Modeling of steroid estrogen contamination in UK and South Australian rivers predicts modest increases in concentrations in the future. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7224–7232. doi: 10.1021/es3051058

Hannah, R., D'aco, V. J., Anderson, P. D., Buzby, M. E., Caldwell, D. J., Cunningham, V. L., et al. (2009). Exposure assessment of 17alpha-ethinylestradiol in surface waters of the United States and Europe. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2725–2732. doi: 10.1897/08-622.1

Henley, C. L., Nunez, A. A., and Clemens, L. G. (2011). Hormones of choice: the neuroendocrinology of partner preference in animals. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 146–154. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.02.010

Herbison, A. E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res. Rev.* 57, 277–287. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.006

Jasoni, C. L., Porteous, R. W., and Herbison, A. E. (2009). Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. *Dev. Dynam.* 238, 524–531. doi: 10.1002/dvdy.21869

Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., and Owens, W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: phase 1. *Environ. Health Perspect.* 109, 785–794. doi: 10.1289/ehp.01109785

Keller, M., Douhard, Q., Baum, M. J., and Bakker, J. (2006a). Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem. Senses* 31, 315–323. doi: 10.1093/chemse/bjj035

Keller, M., Pawluski, J. L., Brock, O., Douhard, Q., and Bakker, J. (2010). The alpha-fetoprotein knock-out mouse model suggests that parental behavior is sexually differentiated under the influence of prenatal estradiol. *Horm. Behav.* 57, 434–440. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.01.013

Keller, M., Pierman, S., Douhard, Q., Baum, M. J., and Bakker, J. (2006b). The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur. J. Neurosci.* 23, 521–530. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04589.x

Kercmar, J., Tobet, S. A., and Majdic, G. (2014). Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 8:337. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00337

Knobil, E. (1988). The neuroendocrine control of ovulation. *Hum. Reprod.* 3, 469–472.

Kuo, J., Hamid, N., Bondar, G., Dewing, P., Clarkson, J., and Micevych, P. (2010). Sex differences in hypothalamic astrocyte response to estradiol stimulation. *Biol. Sex Differ.* 1:7. doi: 10.1186/2042-6410-1-7

Laurenson, J. P., Bloom, R. A., Page, S., and Sadrieh, N. (2014). Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. *AAPS J.* 16, 299–310. doi: 10.1208/s12248-014-9561-3

Mashchak, C. A., Lobo, R. A., Dozono-Takano, R., Eggena, P., Nakamura, R. M., Brenner, P. F., et al. (1982). Comparison of pharmacodynamic properties of various estrogen formulations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144, 511–518.

McCarthy, M. M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev.* 88, 91–124. doi: 10.1152/physrev.00010.2007

McCarthy, M. M., Amateau, S. K., and Mong, J. A. (2002). Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. *Biol. Reprod.* 67, 691–698. doi: 10.1095/biolreprod.102.003251

Merlo, S., Calafiore, M., Vancheri, C., Luigi Canonico, P., Copani, A., and Sortino, M. A. (2007). Astrocyte-like cells as a main target for estrogen action during neuronal differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 562–570. doi: 10.1016/j.mcn.2006.12.007

National Toxicology Program, N. T. (2010). Multigenerational reproductive toxicology study of ethinyl estradiol (CAS No. 57-63-6) in Sprague-Dawley rats. *Natl. Toxicol. Program Tech. Report Ser.* 1–312. Available online at: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr547.pdf

Naulé, L., Picot, M., Martini, M., Parmentier, C., Hardin-Pouzet, H., Keller, M., et al. (2014). Neuroendocrine and behavioral effects of maternal exposure to oral bisphenol A in female mice. *J. Endocrinol.* 220, 375–388. doi: 10.1530/JOE-13-0607

Neumann, I. D. (2008). Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J. Neuroendocrinol.* 20, 858–865. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01726.x

Overgaard, A., Holst, K., Mandrup, K. R., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., et al. (2013). The effect of perinatal exposure to ethinyl oestradiol or a mixture of endocrine disrupting pesticides on kisspeptin neurons in the rat hypothalamus. *Neurotoxicology* 37, 154–162. doi: 10.1016/j.neuro.2013.04.012

Owen, R., and Jobling, S. (2012). Environmental science: the hidden costs of flexible fertility. *Nature* 485, 441. doi: 10.1038/485441a

Palanza, P. L., Howdeshell, K. L., Parmigiani, S., and Vom Saal, F. S. (2002). Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ. Health Perspect.* 110(Suppl. 3), 415–422. doi: 10.1289/ehp.02110s3415

Parent, A. S., Franssen, D., Fudvoye, J., Gérard, A., and Bourguignon, J. P. (2015). Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front. Neuroendocrinol.* 38, 12–36. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.12.004

Parkash, J., Cimino, I., Ferraris, N., Casoni, F., Wray, S., Cappy, H., et al. (2012). Suppression of beta1-integrin in gonadotropin-releasing hormone cells disrupts migration and axonal extension resulting in severe reproductive alterations. *J. Neurosci.* 32, 16992–17002. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3057-12.2012

Pierman, S., Douhard, Q., and Bakker, J. (2008). Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur. J. Neurosci.* 27, 423–431. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.06016.x

Piet, R., Boehm, U., and Herbison, A. E. (2013). Estrous cycle plasticity in the hyperpolarization-activated current ih is mediated by circulating 17beta-estradiol in preoptic area kisspeptin neurons. *J. Neurosci.* 33, 10828–10839. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1021-13.2013

Pillon, D., Cadiou, V., Angulo, L., and Duittoz, A. H. (2012). Maternal exposure to 17-alpha-ethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. *Brain Res.* 1433, 29–37. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.030

Pojana, G., Bonfà, A., Busetti, F., Collarin, A., and Marcomini, A. (2004). Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1874–1880. doi: 10.1897/03-222

Rao, S. P., and Sikdar, S. K. (2007). Acute treatment with 17beta-estradiol attenuates astrocyte-astrocyte and astrocyte-neuron communication. *Glia* 55, 1680–1689. doi: 10.1002/glia.20564

Rasier, G., Parent, A. S., Gerard, A., Lebrethon, M. C., and Bourguignon, J. P. (2007). Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol. Reprod.* 77, 734–742. doi: 10.1095/biolreprod.106.059303

Roa, J., Navarro, V. M., and Tena-Sempere, M. (2011). Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. *Biol. Reprod.* 85, 650–660. doi: 10.1095/biolreprod.111.091538

Rosenblatt, J. S. (1967). Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156, 1512–1514. doi: 10.1126/science.156.3781.1512

Ryan, B. C., Hotchkiss, A. K., Crofton, K. M., and Gray, L. E. Jr. (2010). *In utero* and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicol. Sci.* 114, 133–148. doi: 10.1093/toxsci/kfp266

Ryan, B. C., and Vandenbergh, J. G. (2006). Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm. Behav.* 50, 85–93. doi: 10.1016/j.yhbeh.2006.01.007

Schwanzel-Fukuda, M., and Pfaff, D. W. (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338, 161–164. doi: 10.1038/338161a0

Sharifi, N., Reuss, A. E., and Wray, S. (2002). Prenatal LHRH neurons in nasal explant cultures express estrogen receptor beta transcript. *Endocrinology* 143, 2503–2507. doi: 10.1210/endo.143.7.8897

Sheehan, D. M., and Branham, W. S. (1987). Dissociation of estrogen-induced uterine growth and ornithine decarboxylase activity in the postnatal rat. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 7, 411–422. doi: 10.1002/tcm.1770070408

Skynner, M. J., Sim, J. A., and Herbison, A. E. (1999). Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140, 5195–5201.

Snyder, S. A., Villeneuve, D. L., Snyder, E. M., and Giesy, J. P. (2001). Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3620–3625. doi: 10.1021/es001254n

Stanczyk, F. Z., Archer, D. F., and Bhavnani, B. R. (2013). Ethinyl estradiol and 17beta-estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception* 87, 706–727. doi: 10.1016/j.contraception.2012.12.011

Takahashi, M., Inoue, K., Morikawa, T., Matsuo, S., Hayashi, S., Tamura, K., et al. (2014). Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J. Toxicol. Sci.* 39, 775–784. doi: 10.2131/jts.39.775

Ternes, T. A., Kreckel, P., and Mueller, J. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants–II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.* 225, 91–99. doi: 10.1016/S0048-9697(98)00335-0

Tomihara, K., Zoshiki, T., Kukita, S. Y., Nakamura, K., Isogawa, A., Ishibashi, S., et al. (2015). Effects of diethylstilbestrol exposure during gestation on both maternal and offspring behavior. *Front. Neurosci.* 9:79. doi: 10.3389/fnins.2015.00079

Vosges, M., Kah, O., Hinfray, N., Chadili, E., Le Page, Y., Combarnous, Y., et al. (2012). 17alpha-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reprod. Toxicol.* 33, 198–204. doi: 10.1016/j.reprotox.2011.04.005

Walker, D. M., Goetz, B. M., and Gore, A. C. (2014). Dynamic postnatal developmental and sex-specific neuroendocrine effects of prenatal polychlorinated biphenyls in rats. *Mol. Endocrinol.* 28, 99–115. doi: 10.1210/me.2013-1270

Wierman, M. E., Kiseljak-Vassiliades, K., and Tobet, S. (2011). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 43–52. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.07.005

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. doi: 10.1073/pnas.86.20.8132

Yeo, S. H. (2013). Neuronal circuits in the hypothalamus controlling gonadotrophin-releasing hormone release: the neuroanatomical projections of kisspeptin neurons. *Exp. Physiol.* 98, 1544–1549. doi: 10.1113/expphysiol.2013.071944

Zhou, Y., Zha, J., Xu, Y., Lei, B., and Wang, Z. (2012). Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1719–1729. doi: 10.1007/s10661-011-2073-z

Zhu, J., Xu, X. H., Knight, G. E., He, C., Burnstock, G., and Xiang, Z. (2015). A subpopulation of gonadotropin-releasing hormone neurons in the adult mouse forebrain is gamma-Aminobutyric acidergic. *J. Neurosci. Res.* 93, 1611–1621. doi: 10.1002/jnr.23610

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Derouiche, Keller, Martini, Duittoz and Pillon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II- EFFETS DE L'EXPOSITION DEVELOPPEMENTALE A L'EE2 CHEZ LES FEMELLES F2

Pour vérifier l'hypothèse d'une transmission des effets de l'EE2 sur la génération F1 exposée directement à sa descendance, des femelles F1 exposées pendant leur développement à l'EE2 ont été croisées avec des mâles du même lot expérimental pour générer leur descendance sur laquelle nous avons analysé différents paramètres physiologiques, neuroendocrines et comportementaux de la même façon que les individus F1.

A- Effets de l'EE2 sur la physiologie de la reproduction femelle

L'âge de l'ouverture vaginale chez les femelles F2 issues de parents F1 exposés à l'EE2 n'a pas été significativement avancé **(Figure 21A)**. Nous avons noté à 24 et 25 jours postnatals que le pourcentage de femelles ayant eu une ouverture vaginale, était deux fois plus important dans le lot de femelles exposées à la forte dose, mais ce pourcentage tend à s'homogénéiser entre les groupes après 25 jours.

La cyclicité ovarienne des femelles F2, évaluée par la même procédure que pour la F1, n'a pas été significativement perturbée chez les femelles dont les parents ont été exposés à l'EE2 **(Figure 21B-21C**).

Le croisement des femelles F2 avec des mâles du même groupe expérimental a permis de générer les individus F3. Le nombre de femelles gestantes, la taille des portées et la sex-ratio obtenue est sensiblement similaire entre les groupes traités à l'EE2 et le groupe contrôle. Cela laisse suggérer que la fertilité de ces individus n'a pas été modifiée.

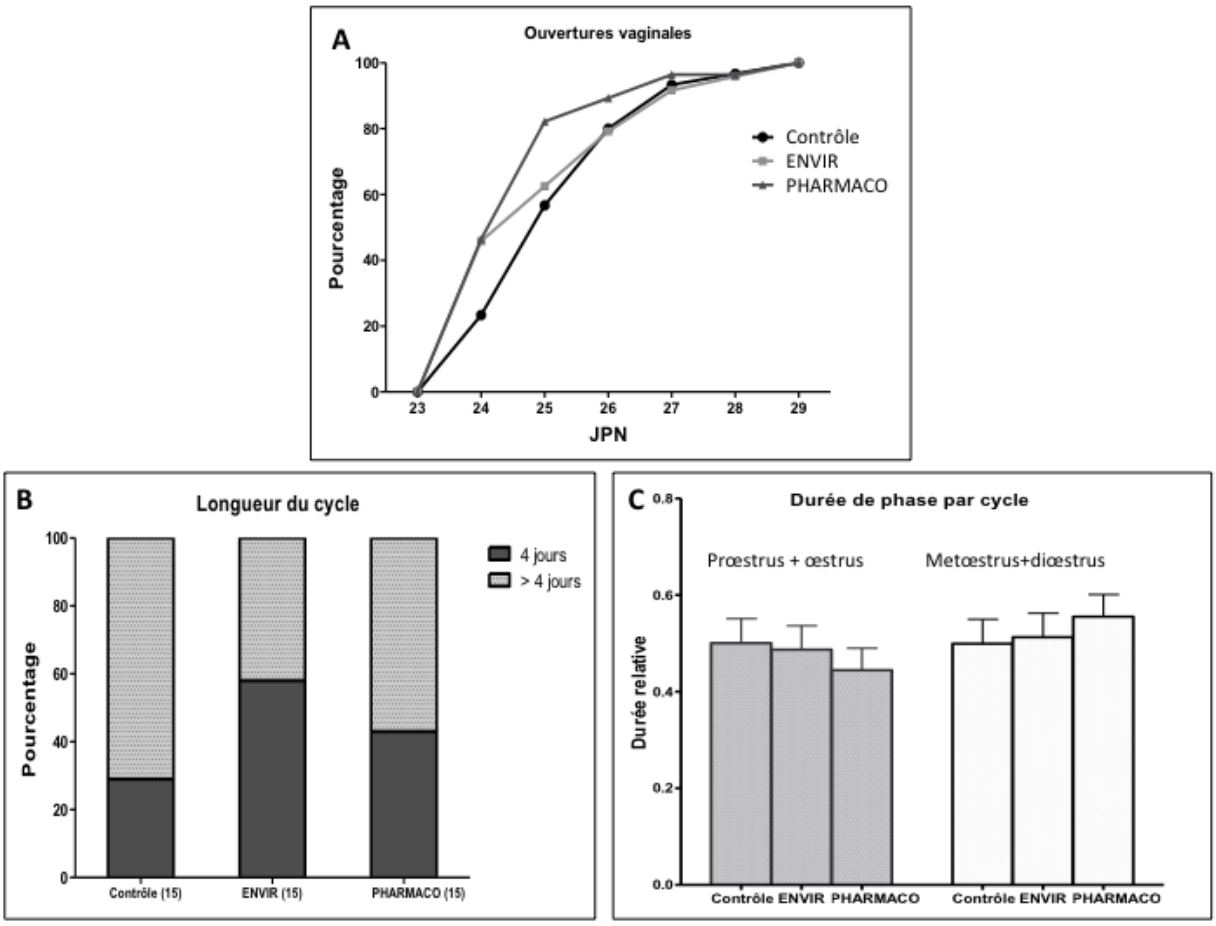


Figure 21 : Effets de l'EE2 sur la physiologie de la reproduction des femelles F2

A) Courbes des pourcentages de femelles ayant une ouverture vaginale par jour entre 23 et 29 jours postnatals (JPN). **B)** Histogrammes illustrant la longueur du cycle œstral représenté en pourcentages de femelles ayant un cycle de 4 jours et le pourcentage de femelles ayant un cycle plus long dans les trois lots expérimentaux. **C)** Durée relative de la phase folliculaire (proestrus+œstrus) et de la phase lutéale (metestrus + diestrus). La durée moyenne est obtenue sur trois cycles œstraux suivis par des frottis vaginaux quotidiens. Les chiffres entre parenthèses indiquent les effectifs d'animaux par groupe.

B- Effet de l'EE2 sur les comportements de la reproduction

1- *Comportement maternel*

Le comportement maternel **(Tableau 5)**, évalué pendant 30 minutes chez des femelles adultes sexuellement naïves (pour les détails de la méthode, voir article I) ne présente pas de modifications comportementales significatives sur les différents paramètres évalués entre les trois lots de femelles testées.

Tableau 5 : Comportement maternel des femelles F2

Groupe expérimental / Paramètre mesuré	Contrôle (9)	ENVIR (9)	PHARMACO (9)
Latence pour ramener le souriceau dans le nid	609.40±221.88 s	694.10±197.83 s	460.55± 82.80s
Reniflage	8.15±1.71	8.33±1.34	5.52±1.42
Léchage/toilettage	23.99±4.62	16.14±2.87	24.27±3.50
Position d'allaitement (position dos voûté)	19.23±3.49	21.17±4.99	12.43±2.65
Construction du nid	12.10±2.57	9.61±2.00	7.47±2.36
Auto-toilettage	6.98±1.23	6.61±2.78	12.43±2.31
Autres activité non liées au soin aux maternels	27.04±4.78	36.25±6.18	37.15±5.65

Les chiffres entre parenthèses indiquent les effectifs d'animaux. S : secondes. Les chiffres sont des pourcentages de temps moyens ± SEM

2- *EE2 et préférence socio-sexuelle*

Le test de choix du partenaire **(Figure 22)**, réalisé sur des femelles en œstrus sexuellement naïves ou après plusieurs contacts directs avec un mâle sexuellement actif ont montré que des femelles F2 contrôles sexuellement naïves passent plus de 60% du temps de reniflage pendant le test (10 minutes de test) avec le mâle entier (Test t de comparaison de données appariées ou paired t-test ; *p-value*=0,005). Cette préférence pour le mâle entier est retrouvée chez les femelles sexuellement naïves exposées à la

dose faible d'EE2 (ENVIR) (*p-value*=0,005) alors que chez les femelles exposées à la dose PHARMACO la préférence pour le mâle entier n'est pas significative (*p-value*=0,9). Après une expérience de contact avec un mâle sexuellement actif, les femelles traitées à l'EE2 dans les deux lots ne présentaient pas de préférence pour le mâle entier contre le mâle castré alors que les contrôles arrivent à distinguer les deux mâles et préfèrent renifler le mâle castré (*p-value*<0,0001).

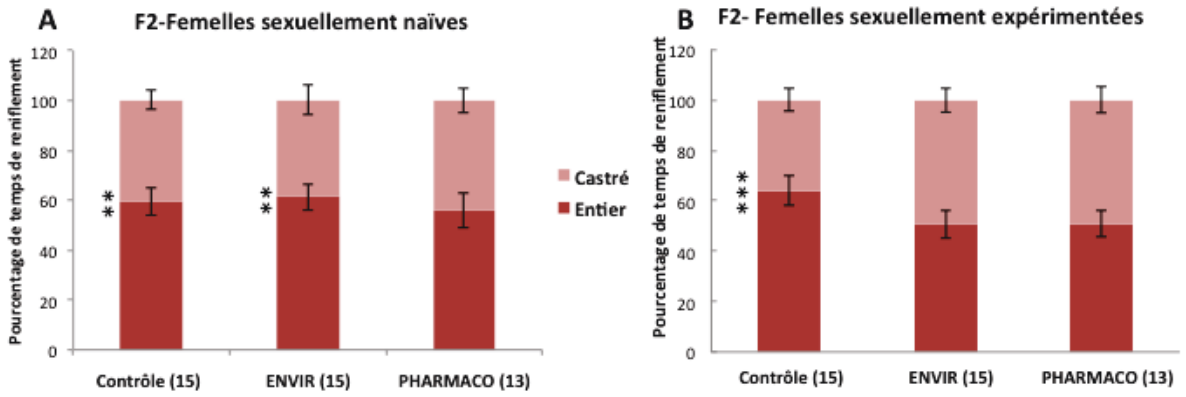


Figure 22 : Préférence socio-sexuelle des femelles F2.

Pourcentages de temps passé à renifler un mâle castré ou un mâle entier par les femelles sexuellement naïves (graphe de gauche) ou sexuellement expérimentées (graphe de droite). Paired t-test : p-value<0.01, p-value<0.001.

3- *EE2 et comportement sexuel*

Le comportement sexuel des femelles F2 n'a pas été évalué sur 7 sessions de tests comme pour les F1, mais uniquement sur trois sessions. Sur ces trois sessions, les quotients de lordose étaient faibles et leurs variations dans les différents lots ne mettent pas en évidence de différence significative. Dans le but d'évaluer ce paramètre dans des conditions physiologiques (imprégnation en hormones endogènes), nous avons soumis les femelles aux tests en phase d'œstrus détectés par des frottis vaginaux quotidiens le jour du test. Cette méthode étant relativement contraignante et chronophage, nous

avons fait le choix d'arrêter les tests à trois sessions et de focaliser sur l'évaluation d'autres paramètres qui nous semblaient plus pertinents et qui présentent moins de contraintes expérimentales. Chez les femelles F1, les tests de comportement sexuel (quotient de lordose) ne mettent en évidence des différences qu'à partir de la cinquième session de test. Chez les femelles F2, on ne peut donc pas conclure sur la possibilité d'une transmission de ce phénotype.

4- *EE2 et anxiété*

Les tests sur l'anxiété évalués en labyrinthe en croix surélevée n'ont pas révélé de différences significatives de niveaux d'anxiété entre les femelles contrôles et les femelles issues de parents exposés à l'EE2.

III- CONCLUSION CHAPITRE I

Dans cette étude nous avons mis en évidence les effets de l'EE2 administré à des doses faibles définies dans la littérature comme LOAEL (National toxicology Program, 2010) et pouvant être compatibles avec une exposition humaine accidentelle à des doses pharmacologiques ou une exposition à des doses environnementales dans les endroits hautement pollués par les xénœstrogènes tels que l'EE2.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont pu mettre en évidence les effets à long terme d'une exposition développementale à l'EE2 sur la physiologie et les comportements de la reproduction chez les souris femelles exposées directement pendant leur développement intra-utérin, juvénile et péri-pubertaire. En effet, les femelles exposées à l'EE2 présentent des ouvertures vaginales plus précoces que les contrôles, un raccourcissement du cycle œstral et une perturbation de la durée des phases folliculaire (prolongée) et lutéale (raccourcie). Le comportement maternel des femelles exposées a également été modifié d'une manière significative à la dose faible d'EE2 mais pas à la dose forte. Le comportement de lordose a été exacerbé chez les femelles exposées de manière dose dépendante. La préférence socio-sexuelle a également été modifiée par une absence de discrimination entre un mâle normal et un mâle castré. Le réseau neuroendocrine à GnRH impliqué dans la régulation des cycles et des comportements sexuels qui dépendent des cycles hormonaux chez la femelle, a été significativement impacté par l'EE2. La transmission de ces effets observés chez les

individus directement exposés à leur descendance n'a pas été observée sur tous les paramètres évalués. En effet, hormis l'effet sur la préférence sexuelle qui a été observé également chez les femelles de la génération F2, l'analyse de la neuroanatomie du système à GnRH, de la cyclicité ovarienne des femelles et du comportement maternel des femelles F2 exposées ne varient pas significativement par rapport aux contrôles.

Ces résultats mettent en évidence les effets à long terme de l'exposition développementale à l'EE2 sur la reproduction des individus adultes. Ces effets qui ont été observés chez des individus plusieurs semaines après l'arrêt du traitement témoignent de modifications irréversibles qui impliqueraient des remodelages cellulaires et moléculaires qui seraient à l'origine des modifications physiologiques et comportementales chez l'adulte. L'effet de l'EE2 sur la préférence socio-sexuelle a été retrouvé chez les femelles F2. Il y aurait donc une transmission multigénérationnelle de ces effets, qui impliquerait les cellules germinales parentales ayant intégré ces modifications dans leur matériel génétique. Les mécanismes possiblement impliqués dans la transmission transgénérationnelle de ces effets sont abordés dans la discussion générale.

Malgré les effets observés sur le réseau de neurones à GnRH et une perturbation de la cyclicité ovarienne et des comportements, l'EE2 à ces doses n'induit pas d'effets délétères majeurs sur la fertilité.

Chapitre II : Exposition développementale à l'EE2, conséquences sur la fonction de reproduction chez le mâle et sa descendance

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chez le mâle, la différenciation sexuelle du cerveau requiert l'action de l'œstradiol synthétisé localement par l'aromatase à partir de la testostérone synthétisée par les gonades fœtales pendant les périodes prénatale et postnatale. L'œstradiol masculinise et déféminise le cerveau mâle en agissant par différents mécanismes organisationnels impliquant l'apoptose, la neurogénèse, la croissance neuritique et axonale, des processus de migration et de réarrangement cellulaires qui vont induire l'ontogenèse des différents noyaux sexuellement dimorphiques qui seront impliqués dans la régulation physiologique et comportementale de la fonction de reproduction adulte (*cf. voir la partie III de l'introduction bibliographique pour plus de détails*). Chez le mâle se développe un comportement d'agressivité envers les congénères du même sexe et un comportement d'investigation et de reniflage génital, de monte, d'intromission envers une femelle sexuellement réceptive.

L'exposition aux œstrogènes environnementaux tels que l'EE2 est capable d'interagir avec les mécanismes de différenciation cellulaires et induire des modifications anatomo-fonctionnelles les réseaux centraux qui contrôlent la reproduction. Cette réorganisation serait capable d'induire à l'âge adulte des dysfonctionnements physiologiques périphériques et des changements comportementaux qui sont susceptibles de perturber les interactions sociales et sexuelles et *in fine* engendrer des problèmes de fertilité.

Dans ce deuxième chapitre sont présentés les résultats des expériences menées in vivo sur les effets de l'exposition à l'EE2 sur la physiologie et les comportements de la reproduction chez les mâles exposés à l'EE2 et chez leurs descendances mâles qui sont issus de croisements entre des animaux appartenant au même lot expérimental.

II- ARTICLE II : L'EXPOSITION DEVELOPPEMENTALE A L'ETHINYLŒSTRADIOL AFFECTE LE COMPORTEMENT SEXUEL D'UNE MANIERE TRANSGENERATIONNELLE CHEZ LA SOURIS MALE

Dans cet article, nous avons décrit les effets de l'exposition à l'EE2 sur les paramètres de la reproduction adulte incluant la physiologie, la neuroanatomie neuroendocrine et les comportements de la reproduction chez les mâles directement exposés durant leur développement. Nous avons testé l'hypothèse d'une transmission transgénérationnelle des effets de l'EE2 sur la descendance des animaux F1 jusqu'à la génération F4.

A- Protocole expérimental

Les mâles utilisés dans cette expérience proviennent des mêmes portées qui ont généré les femelles. Le protocole expérimental de l'exposition est décrit dans le chapitre I et dans l'article II ci-dessous. Les animaux de la génération F3 et ceux de la génération F4 ont été obtenus par le même protocole de croisement que les individus F2.

Le comportement sexuel des mâles a été évalué par des tests réalisés sur trois sessions en présentant aux mâles une femelle sexuellement réceptive. Plusieurs paramètres caractérisant le comportement sexuel mâle chez les rongeurs ont été évalués pendant 30 minutes de test.

Des mâles ont été euthanasiés et des prélèvements de sang ont été réalisés pour doser la testostérone et examiner l'appareil génital pour d'éventuelles malformations (testicules et glandes annexes).

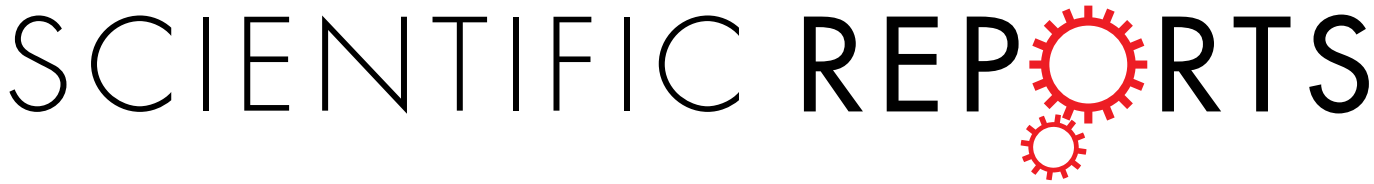
Sur une cohorte d'animaux, les cerveaux ont été fixés par du paraformaldéhyde et prélevés pour réaliser des analyses anatomiques du système neuroendocrine à GnRH, le réseau de neurones à kisspeptine du PVpo et de l'AVPV et des neurones à calbindine de l'APOm.

B- Résultats

Les mâles F1 et leurs descendants F2 à F4 présentaient une exacerbation des comportements sexuels de manière dose-dépendante, avec des temps latences de premières montes et de premières intromissions réduits et des fréquences d'intromissions plus élevées. Les animaux exposés à l'EE2 et leurs descendances avaient plus de cellules immunoréactives à la calbindine dans l'APOm.

Malgré les modifications neuro-anatomiques du réseau de neurones à GnRH chez les mâles F1 exposés à l'EE2, nous n'avons pas noté d'effets délétères majeurs sur la physiologie de la reproduction de ces mâles. Le réseau de neurones à kisspeptine de l'APO (PVpo et AVPV) ne présente pas de différence dans les nombres de neurones immunoréactifs. Les concentrations en testostérone ne varient pas en fonction du traitement. Les analyses des tractus génitaux ont pu mettre en évidence une incidence augmentée de malformations des vésicules séminales et des glandes coagulantes chez les mâles F1 et F2. Cet effet n'a jamais été observé chez les animaux contrôles ni chez les mâles F3 et F4 issus de parents exposés à l'EE2.

Les détails des procédures expérimentales et des résultats obtenus sont décrits dans l'article II ci-dessous.



OPEN

Received: 03 August 2015
Accepted: 29 October 2015
Published: 07 December 2015

Developmental exposure to Ethinylestradiol affects transgenerationally sexual behavior and neuroendocrine networks in male mice

Lyes Derouiche, Matthieu Keller, Anne Hélène Duittoz & Delphine Pillon

Reproductive behavior and physiology in adulthood are controlled by hypothalamic sexually dimorphic neuronal networks which are organized under hormonal control during development. These organizing effects may be disturbed by endocrine disrupting chemicals (EDCs). To determine whether developmental exposure to Ethinylestradiol (EE2) may alter reproductive parameters in adult male mice and their progeny, Swiss mice (F1 generation) were exposed from prenatal to peripubertal periods to EE2 (0.1–1 μg/kg/d). Sexual behavior and reproductive physiology were evaluated on F1 males and their F2, F3 and F4 progeny. EE2-exposed F1 males and their F2 to F4 progeny exhibited EE2 dose-dependent increased sexual behavior, with reduced latencies of first mount and intromission, and higher frequencies of intromissions with a receptive female. The EE2 1 μg/kg/d exposed animals and their progeny had more calbindin immunoreactive cells in the medial preoptic area, known to be involved in the control of male sexual behavior in rodents. Despite neuroanatomical modifications in the Gonadotropin-Releasing Hormone neuron population of F1 males exposed to both doses of EE2, no major deleterious effects on reproductive physiology were detected. Therefore EE2 exposure during development may induce a hypermasculinization of the brain, illustrating how widespread exposure of animals and humans to EDCs can impact health and behaviors.

Early life is a period of unique sensitivity during which endogenous hormones exert organizational effects on brain structure and function. During critical developmental periods, embryonic sex hormones promote sexual differentiation and cause permanent changes in the architecture of limbic-hypothalamic circuits by specifying cell number, density of dendritic and axonal connections, and neurotransmitter phenotype[1,2]. In the male, masculinization and defeminization are the processes whereby the brain is organized to express sex-specific reproductive mating behavior and appropriate hormonal secretion within the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis in adulthood[3]. These processes result from specific neural networks being induced by androgen production during the perinatal period, notably in rodents[4]. Testosterone acts mainly indirectly *via* estrogen receptors (ERs) after its aromatization into estradiol (E2)[5]. The major brain region mediating masculinization is the preoptic area (POA)[6]. In the murine POA, a cluster of calbindin-expressing cells containing more cells in males than in females corresponds to the sexually dimorphic nucleus (SDN) in the rat and is involved in the control of male sexual behavior[7]. The ontogenesis of the hypothalamic sexually dimorphic neuronal networks involved in the

PRC, UMR 7247 INRA/CNRS/Université François-Rabelais de Tours/IFCE, Nouzilly, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.P. (email: Delphine.Pillon@tours.inra.fr)

control of reproductive behavior and physiology depends on sex hormones, therefore during development the hypothalamus constitutes a key target for endocrine disrupting chemicals (EDCs).

EDCs are natural and synthetic molecules widespread in the environment which interfere with endogenous endocrine processes, and thus alter physiological functions. Pharmaceutical 17α-Ethinylestradiol (EE2) has recently been added to the European Directive 2013/39/EU[8] of priority substances found in surface water in the European monitoring list, the so-called "watch list". EE2 is a potent synthetic estrogen widely used in oral contraceptives, hormone replacement therapy and cancer (breast and prostate) treatments[9]. Much more resistant to metabolism and inactivation than E2 in humans[10], after its excretion EE2 enters the wastewater network and is not completely removed during wastewater treatment processes[11]. Consequently, EE2 is one of the major pharmaceutical products found as a contaminant in effluent waters. It is much more active than E2 because of the properties of the ethinyl group at the C17α position[10], exhibiting a high estrogenic activity and exerting its biological effects *via* interactions with various ERs through the same mechanisms as E2[9]. Its estrogenic activity is also higher than other estrogenic EDCs such as bisphenol A and phthalates.

Therefore it is reasonable to consider that environmental EE2 contamination could have deleterious effects on animal and human health[12], even at concentrations as low as $ng.L^{-1}$, constituting a potential risk for animal and human populations. To assess the level of this risk, it needs to be evaluated correctly.

There is now compelling evidence that ontogenesis of hypothalamic networks are altered after EDCs exposure during development[13,14]. We have previously demonstrated that exposure to environmentally relevant doses of EE2 from embryonic day 10 to 14 alters the ontogenesis of the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) neurons in the mouse embryo by increasing the number of these neurons[15]. To assess whether such developmental effects could impact on reproductive function in adulthood, we designed a transversal study in mice to evaluate the consequences of developmental exposure to low doses of EE2 (0.1 and 1 μg/kg (body weight)/day) on reproductive behavior, physiology and neuroanatomy of adult males. The aim was to determine whether exposure to estrogenic EE2 from embryonic development up to the peripubertal period could induce a hypermasculinization of the hypothalamic neuroendocrine networks, leading to alterations in the reproductive function of adult male mice (F1 generation) and their progenies (F2, F3 and F4 generations). Sexual behavior, plasma testosterone concentrations and genital tract anatomy were evaluated. Then the neuroanatomy of GnRH and kisspeptin neurons, key hypothalamic regulators of reproduction, and the sexually dimorphic calbindin cell population were investigated.

Results

Effect of EE2 developmental exposure on sexual behavior. Sexual behavior was evaluated in males of the F1 generation directly exposed to EE2 and in their F2, F3 and F4 progenies. Three discrete components of male sexual behavior enabling sexual motivation and performance to be compared for each F1 to F4 male are presented in Fig. 1: latencies to first mount (A) and to first intromission (B), and frequency of intromissions (C) for each 30-minute test. The mean numbers of ano-genital investigations, attempted mounts and mounts without intromission are presented in Supplemental Material Table S1. As male sexual behavior improves with sexual experience, these parameters were evaluated over three tests. A two-way ANOVA was conducted with treatment and trial number as the two factors.

The F1 EE2-exposed males and their F2 to F4 progenies exhibited lower latencies of first mount and intromission, and higher frequencies of intromissions, with the effects being EE2 dose-dependent. The differences increased from the first to the third trial, demonstrating a greater improvement in sexual behavior in the EE2 0.1 and EE2 1 μg/kg/d groups than in the Control animals. These differences between males of the three experimental groups are statistically significant for the second and/or third trials. As an example, for the third trial, F1 male latencies to the first mount and first intromission were 765.3 ± 198.1 and 1078.9 ± 238.9 s for the Control males, and 465.4 ± 118.1 and 827.1 ± 114.0 s, and 395.5 ± 85.0 and 549.4 ± 96.63 s for the EE2 0.1 (p-value < 0.05) and EE2 1 (p-value < 0.05 and p-value < 0.001) groups respectively. In the Control group, the frequency of intromissions was 0.28 ± 0.0 intromission *per* minute, and 0.35 ± 0.0 and 0.67 ± 0.0 for the EE2 0.1 and EE2 1 groups (p-value < 0.01 and p-value < 0.001) respectively. In some cases, the differences between groups were even significant for the first trial; i.e. in F3 EE2 1 animals, the latency to first mount was 622.1 ± 51.3 s, compared to 1060.2 ± 89.4 s in Control males (p-value < 0.05).

Male fertility. No differences in fertility were detected, since the relative number of litters and litter size did not vary (Supplemental Material Table S2). There was also no difference in sex ratio (number of males/number of females) between the three groups.

EE2 developmental exposure and adult plasma testosterone concentrations. No significant difference was detected in the mean plasma testosterone concentrations between the males of the three experimental groups either for F1, or for F2, F3 or F4 generations (Fig. 2A).

EE2 developmental exposure and genital tract in adults. There was no significant difference in animal weights between the three experimental groups (Fig. 2B). Figure 2C–E presents the mean indexes for ano-genital distances (AGD) (C), testes weights (D) and seminal vesicles/coagulating glands (SV/CG) weights (E) for F1 to F3 males. No significant difference was detected for any of these parameters.

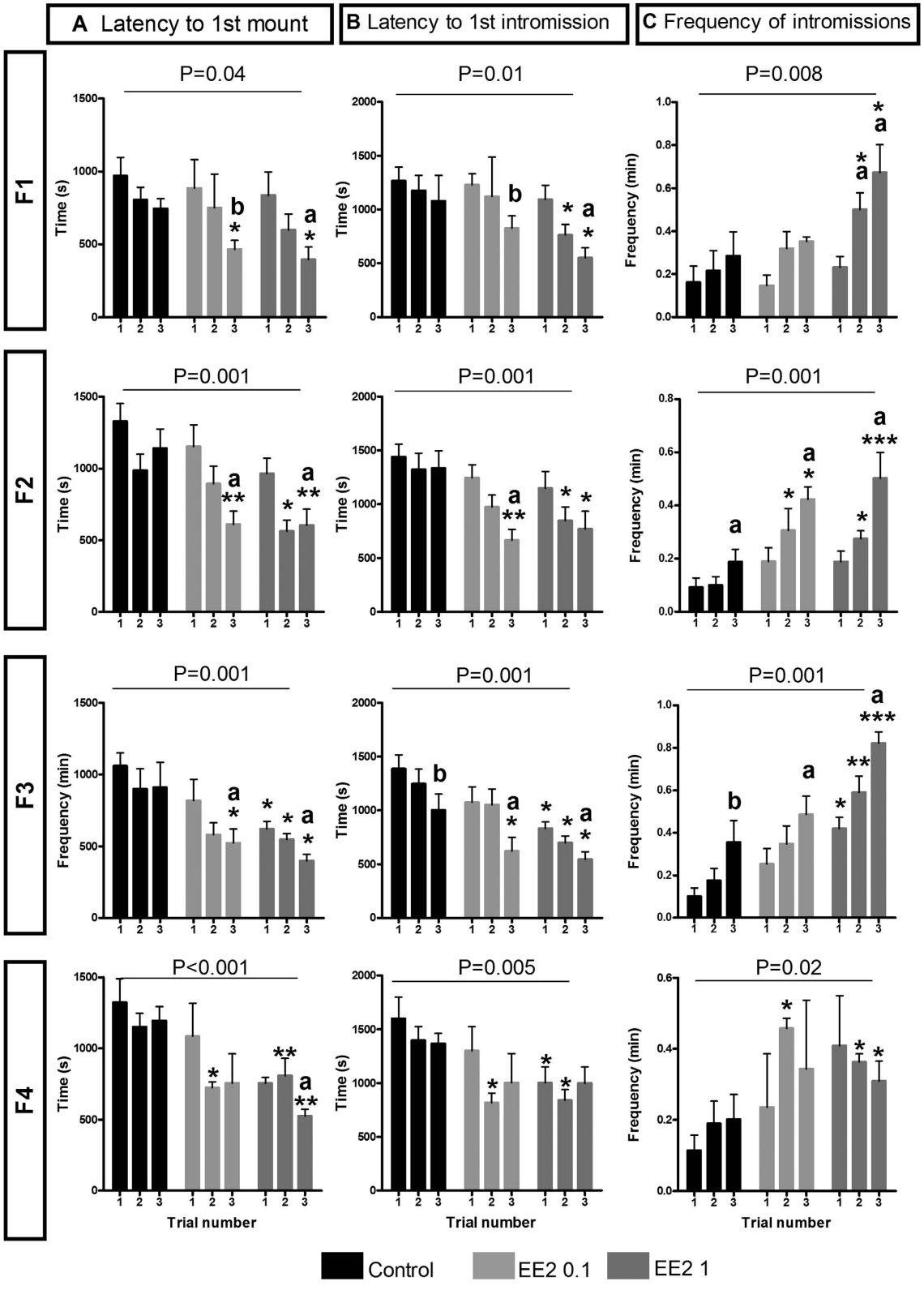


Figure 1. Developmental EE2 exposure affected male sexual behavior of adult F1 mice and their F2 to F4 progenies. Latencies *per* second to the first mount (**A**) and first intromission (**B**) and frequency of intromissions *per* minute (**C**) for each experimental group (Control, EE2 0.1 and EE2 1) (n = 3–5 litters for each group of each generation). Data are expressed as means ± SEM. **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01 and ****p*-value < 0.001; EE2 0.1 or EE2 1 group *versus* Control group of the same trial test by Bonferroni *post-hoc* tests after two-way ANOVA. a: *p*-value < 0.05, aa: *p*-value < 0.01, aaa: *p*-value < 0.001, b: *p*-value = 0.07; significantly different from trial 1 using Friedman tests within each experimental group.

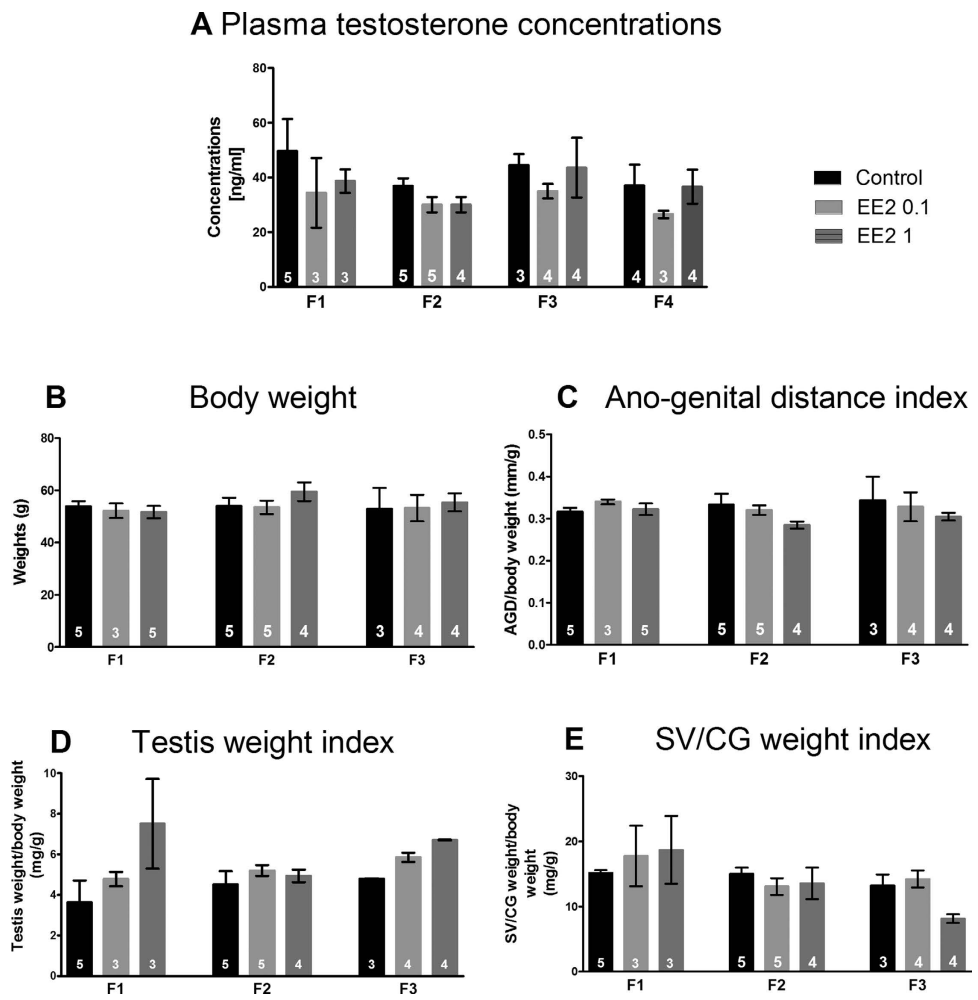


Figure 2. Developmental EE2 exposure did not alter reproductive physiology. EE2 exposure had no effect on plasma testosterone concentrations of F1 to F4 males (**A**), or on adult body weight (**B**), ano-genital distance (AGD) (**C**), testis weight (**D**) or seminal vesicles/coagulating glands (SV/CG) weight (**E**) of F1 to F3 males (n = 3–5 litters for each group of each generation) (Kruskal-wallis' test). Each parameter measured was reported to the animal's body weight to be expressed as an index of animal body weight. Since no significant alterations in reproductive tract morphometric parameters were detected, F4 males were not investigated for these analyses.

Nevertheless, although there was no significant change in mean VS/CG weights, recurrent abnormalities as right/left asymmetry in VS/CG of EE2 0.1 and EE2 1 males for the F1 and F2 generations were observed (see Supplemental Material Figure S2 for details). Moreover, testes sections counter-stained with eosin-haematoxylin were observed; no gross modification of testes histology was detected, but no quantification was performed (data not shown).

Neuroanatomical studies. *Effects of EE2 developmental exposure on hypothalamic GnRH neurons in adults.* In F1 adult male mice the hypothalamic GnRH neuron perikarya were assessed, in terms of their numbers and neuroanatomical distribution (Fig. 3A,B) in the main areas where they are scattered (Median Septum (MS), *Organum Vasculosum Laminae Terminalis* (OVLT) and medial PreOptic Area (mPOA)), and their fiber density was recorded in the Median Eminence (ME), where most of the hypothalamic GnRH neurons project their axons (Fig. 3C).

No significant effect of EE2 treatment on the number of perikarya neurons was detected (Fig. 3A; Kruskal-Wallis test; p-value > 0.05). The neuroanatomical distribution of the GnRH neuron' cell bodies through the MS, OVLT and mPOA revealed that in the Control group the majority of neurons were located in the OVLT (Fig. 3B). This distribution was not altered in the EE2 1 group but was significantly different in the MS of the EE2 0.1 group compared to the Control group (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison; p-value < 0.05) (Fig. 3B illustrated in Fig. 3D).

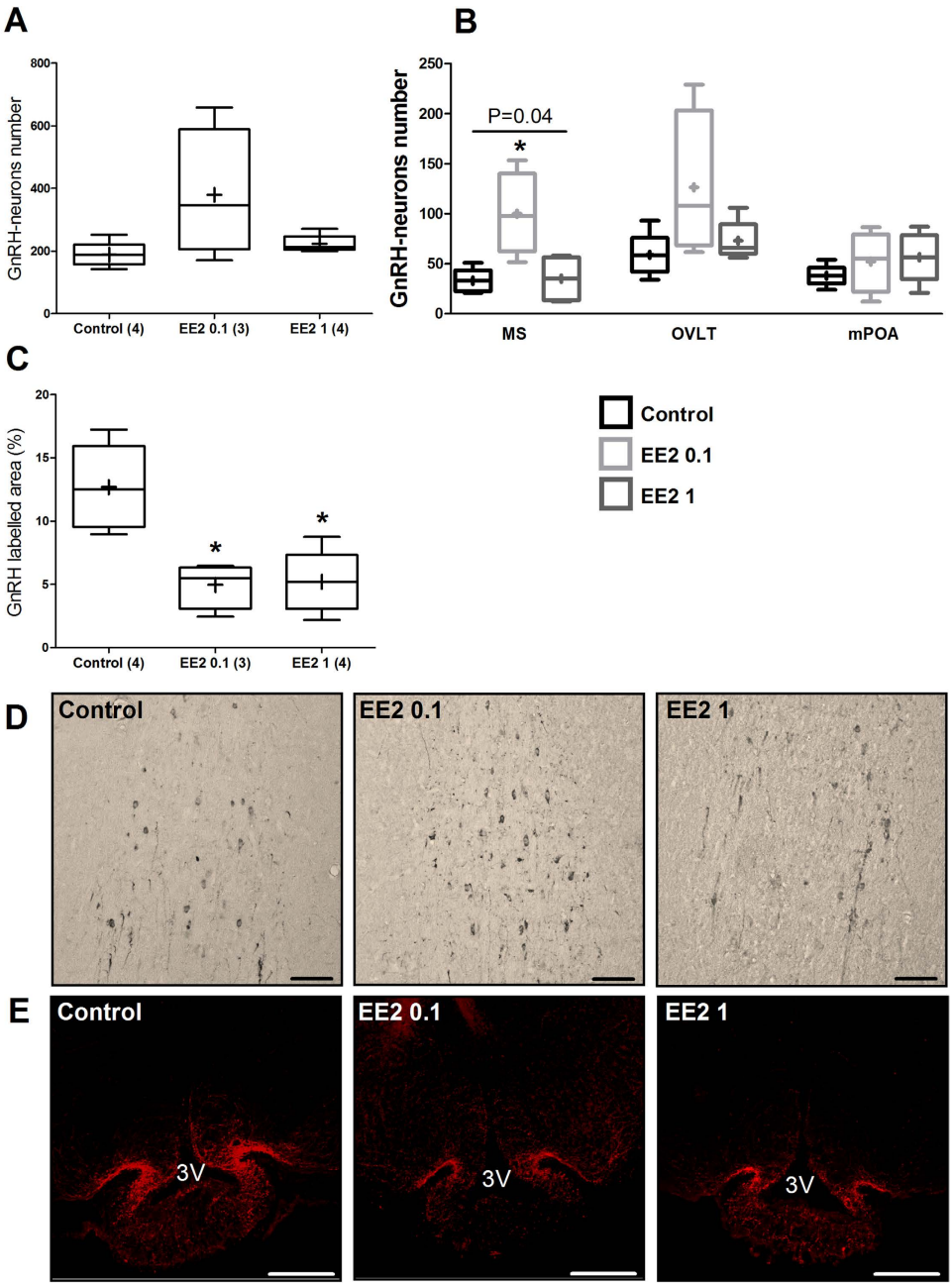


Figure 3. Developmental EE2 exposure disturbed GnRH neuron neuroanatomy in adult F1 male mice. (**A**) Tukey's boxplots of total numbers of GnRH immunoreactive neurons in the hypothalamic POA for each experimental group. (**B**) Numbers and distribution of GnRH immunoreactive neurons according to the three neuroanatomical areas where cell bodies were counted: Median Septum (MS), *Organum Vasculosum Laminae Terminalis* (OVLT) and medial PreOptic Area (mPOA). (**C**) Box-plots of the mean GnRH labeled surface in three areas of the median eminence (ME; anterior, middle and posterior). The line in the middle of the box is plotted at the median and (+) is the mean. Numbers in brackets represent litter numbers. Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test with $^{*}p$-value < 0.05. (**D**,**E**) Representative photographs of immunohistochemical labeling with DAD-Ni staining of GnRH neurons in the MS (**D**) and immunofluorescent terminal nerves in the ME (**E**) of Control, EE2 0.1 and EE2 1 males. Scale bars = 100 μm.

In males developmentally exposed to EE2, the average percentage of the GnRH labeled area in the ME was significantly lower in the EE2 0.1 (Kruskal-Wallis test; p-value = 0.02) and EE2 1 (Dunn's multiple comparisons; p-values < 0.05) groups than in the Control group (Fig. 3C,E).

As F1 males exhibited no defect in fertility, the GnRH neuron network was not studied in their progeny.

EE2 developmental exposure and hypothalamic kisspeptin neurons in adults. The hypothalamic kisspeptin neurons are key regulators of GnRH neuron activity. In males, during development, these neurons are organized in the Periventricular preoptic (PVpo) nucleus by gonadal steroids[16] rendering them potentially sensitive to xenoestrogens such as EE2. We therefore compared the numbers of immunoreactive kisspeptin neurons in the PVpo nuclei of Control and EE2-exposed males and no significant differences were observed for F1 generation animals or their F3 and F4 progeny (Fig. 4A).

Effects of EE2 developmental exposure on hypothalamic calbindin cells. Developmental exposure to EE2 significantly increased the number of calbindin immunoreactive (calb-ir) cells in the mPOA of F1 males of the EE2 1 group (80.5 ± 13.1) compared to the Control group (35.8 ± 8.0) (Kruskal-Wallis test; p-value $= 0.04$) (Fig. 4A), as illustrated in Fig. 4B. Similarly, in the mPOA of F3 males, EE2 increased the number of calb-ir neurons in the EE2 1 group (60.5 ± 1.2) compared to the Control group (41.2 ± 5.3) (Kruskal-Wallis test; p-value $= 0.02$). In F4 males, there were more calb-ir cells in both the EE2 0.1 (45.8 ± 2.5) and EE2 1 (46.1 ± 0.7) groups than in the Control group (31.3 ± 1.8) (Kruskal-Wallis test; p-value < 0.0001).

Discussion

We demonstrated in the mouse a crucial impact of developmental exposure to both doses of EE2 (0.1 and 1 μg/kg/day) on male sexual behavior and calbindin neuronal population in the hypothalamic mPOA. EE2-exposed males expressed increased sexual behavior and had more calbindin cells in the mPOA. These effects were EE2 dose-dependent and were transmitted up to the F4 generation. Despite neuroanatomical modifications observed in the GnRH neuron population of F1 males under both doses of EE2 exposure, no major deleterious effects on reproductive physiology was detected in F1 adult males or their progenies.

The ability of an individual to recognize and adequately interact with a breeding partner constitutes a key step in reproductive success and species survival. The competence to respond to hormonal and social stimuli of breeding partners through appropriate behavior strongly depends on key developmental events during which neural circuits controlling these behaviors are correctly implemented[17]. We demonstrated that EE2-exposed animals exhibited a significant EE2 dose-dependent decrease in the latency to initiate sexual behavior and in the frequency of intromissions. This phenotype reflects an increase in the sexual behavior of EE2-exposed males. Differences in testosterone production of males from the three experimental groups could explain such increased male sexual behavior, but the plasma testosterone concentrations after hCG stimulation in EE2-exposed and Control males were unchanged. However, we did not evaluate whether the circulating levels of testosterone or the concentration of biologically active hormone in the bloodstream changed.

Beyond its major role in regulating adult male reproduction, testosterone plays a crucial part during development, both in the differentiation of the genital tract and of the brain[17,18]. The developmental sexual differentiation of specific brain areas such as the mPOA, involving local aromatization of testosterone into E2, is essential for the masculinization of neural networks by E2, producing permanent behavioral changes in adulthood. EE2 has a strong estrogenic effect and this could have induced a hypermasculinization of the brain leading to increased sexual behavior in EE2-exposed mice. To test this hypothesis of an effect of EE2 on the organization of brain neuroanatomy, independently of variations in testosterone levels, the sexual behavior of adult castrated males exposed to EE2 during development and treated with a same dose of exogenous testosterone should be investigated. This could illustrate an organizational effect of EE2 rather than a physiological influence due to the circulating level of testosterone.

The mPOA constitutes the primary neuroendocrine structure regulating male sexual behavior in different species[7,18]. Within the mPOA, the sexually dimorphic nucleus (SDN-POA) has been largely studied in the rat[19] and other rodents[20–23] and has been shown to be highly sensitive to aromatized androgens during the perinatal period in the male[24–26]. This structure is characterized by a cluster of calbindin cells whose number is greater in males than in females. It has recently been demonstrated that the mPOA might be a target for EDCs[27]. Our study found more calbindin immunoreactive cells in the mPOA of the F1 generation of EE2-exposed males and of their F3 and F4 offspring than in Control males, mainly in the EE2 1 group. This increase supports the hypothesis of a hypermasculinization effect of EE2 on brain structures involved in the control of male sexual behavior.

The modifications in male sexual behavior and calbindin cell numbers in the mPOA were observed in adulthood in F1 males exposed to EE2 during development. These changes, established early in life during the perinatal period, endure until adulthood. Moreover, these modifications were also observed in their progeny up to the F4 generation. Epigenetic processes constitute a mechanism by which endogenous and exogenous cues can control gene expression in the long-term. Notably, DNA methylation is associated with long-term DNA transcriptional repression. In the mouse, Nugent *et al.*[28] demonstrated that masculinization of the POA and male sexual behavior lead to E2-mediated decreases in DNA methyltransferase enzymes. Moreover, in the rat, Anway *et al.*[29] and Skinner & Guerrero-Bosagna[30] showed that developmental exposure to the fungicide vinclozolin was able to alter mate preference and sperm epigenome, associated with epigenetic transgenerational inheritance for three generations. We can thus hypothesize that the increased male sexual behavior and the modifications in calbindin cells in the mPOA observed in our study over four generations may result from epigenetic processes, involving

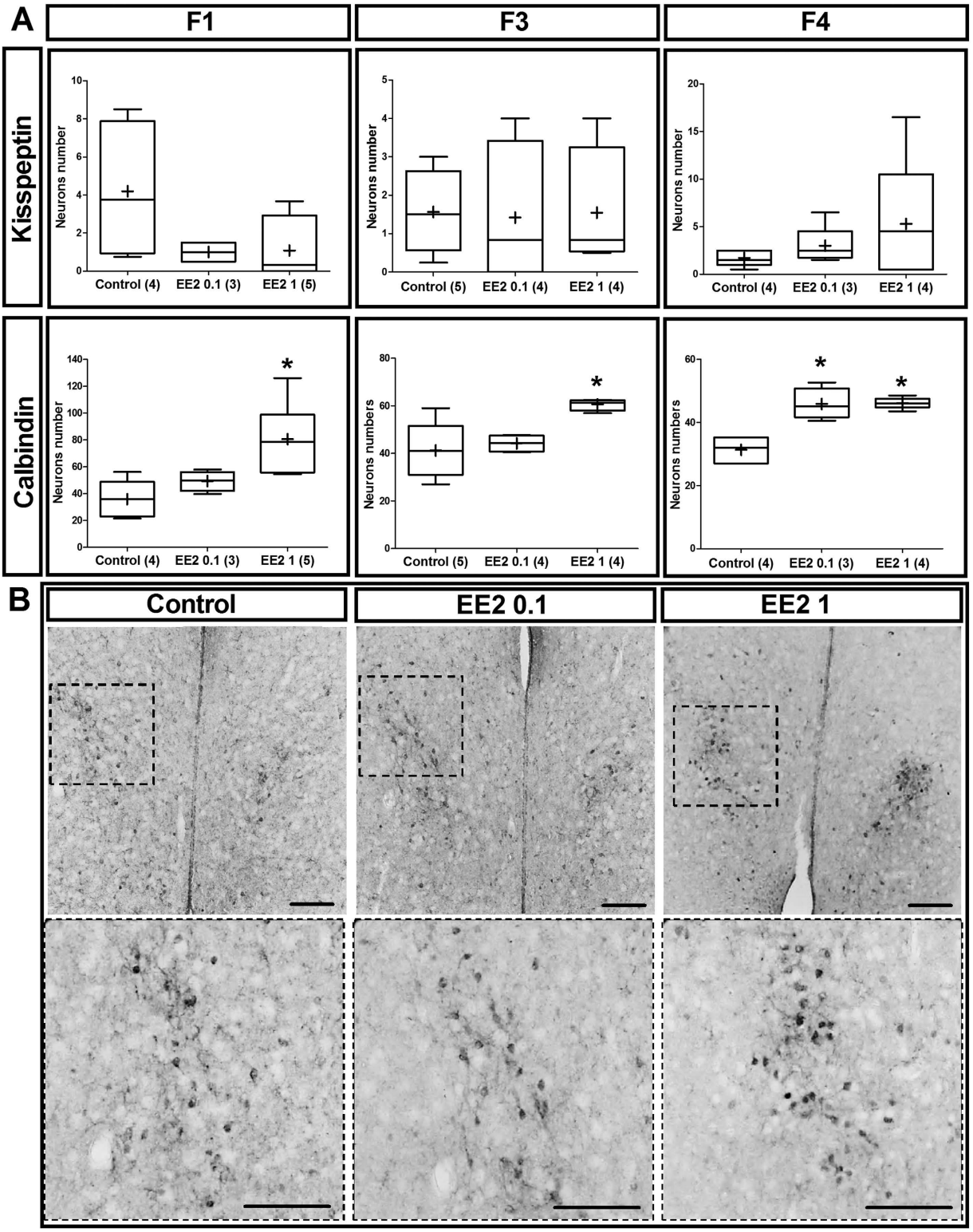


Figure 4. Unlike kisspeptin neurons, developmental EE2 exposure disturbed sexually dimorphic calbindin immunoreactive neurons in the medial PreOptic Area (mPOA). (**A**) Tukey's boxplots of the number of kisspeptin and calbindin-immunoreactive neurons *per* brain section in mPOA of F1, F3 and F4 males. The line in the middle of the box is plotted at the median and (+) is the mean. Numbers in brackets represent litter numbers. Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test with **p*-value < 0.05. (**B**) Representative anti-calbindin immunostaining in the mPOA showing the location of the sexually dimorphic calbindin population (NDS-POA). Images of the first panel present a low magnification giving an overview of the location of NDS-POA broadly delimited by the dotted squares magnified in the panel below. Scale bars = 100 μm.

alterations in the sperm epigenome, which could be responsible for the transgenerational inheritance of the phenotypes. However these mechanisms remain to be characterized.

Hypothalamic GnRH neurons constitute the major center for controlling the HPG axis and thus the reproductive function[31]. In the current study, developmental exposure to EE2 did not modify the overall number of GnRH cell bodies in the POA, but induced a differential increase in immunoreactivity of GnRH neurons in the rostral region with more perikarya in the MS of the adult EE2 0.1 group males. This enhanced immunoreactivity may be due to a greater GnRH peptide content in perikarya leading to more neurons being detected by immunohistochemistry. However, we cannot exclude defects in the neuronal migration occurring between embryonic day 11 and 16 leading to misallocated neurons[32,15]. Furthermore, the dramatic decrease in the immunoreactivity of the GnRH terminal nerves in the ME in the EE2 0.1 and EE2 1groups could be explained either by a modification in GnRH peptide storage or transport from perikarya to terminal nerves, or by increased exocytotic release of peptide detected as neuropeptide depletion within the neurons. Clements *et al.*[33] demonstrated in the rat that developmental exposure to dioxin induced changes in GnRH secretion in the ME linked to GnRH retention in perikarya. The major estrogen sensitive input onto GnRH neurons is the estrogen-sensitive kisspeptin neuronal network, but no effect on the dimorphic kisspeptin neuron population in the PVpo was observed in the present study. Altogether, despite the changes within the GnRH neuronal network, there was no major impact on reproductive physiology, fertility and genital tract anatomy.

One objective of this study was to determine whether oral exposure to low doses of EE2, below those tested in classical toxicology assays[34] would disrupt neuroendocrine and behavioral outputs of male reproductive function. Two dose levels were tested; the lowest (0.1 μg/kg of body weight *per* day) corresponded to an environmental pollution occasionally found in aquatic environments[35], and the highest (1 μk/kg of body weight *per* day) was within the range of a pharmacological dose[9]. An intake of EE2 at both 0.1 and 1 μkg/kg/day produced a dose-dependent effect on sexual behavior, calbindin cell number in the POA and GnRH fiber density in the ME. However, an effect on the number of GnRH soma was only observed at the lowest dose. This suggests that EE2 acts *via* different mechanisms depending on the target and the exposure time. It has been shown that EE2 has greater affinity to estrogen receptor ERα than ERβ[36], but we know that hormone concentration or binding affinity does not necessarily predict the severity of the *in vivo* effect[37–39]. The POA highly expresses ERα which is strongly implicated in the sexual differentiation of neuroendocrine networks[40]. Moreover, the fact that ERβ-KO males show normal, strong sexual behavior[41] implies that only ERα is important for sexual behavior. Together these data strongly suggest that the effects of EE2 on POA differentiation and sexual behavior are mediated by ERα rather than ERβ. However, during development, GnRH neurons express ERβ[42], which has not been confirmed for ERα[43], supporting the idea of a possible direct effect of EE2 on these neurons *via* ERβ. The absence of an effect at the highest EE2 dose could be related to differences in signaling pathways activated by different estrogen receptors at different EE2 concentrations. This hypothesis is in line with the well-established "low dose hypothesis" described in many EDCs studies and currently largely documented[44]. Several studies have reported that the effect of a low dose may be more potent than that of a higher dose for a specific parameter monitored towards a given endocrine active compound, particular regarding the risk assessment of reproductive parameters[45]. The nonlinear dose-response effect of endocrine-active molecules thus appears as the most significant and extensively peer-reviewed issue within the field of EDCs and it remains poorly understood (for review see refs 45,46).

Conclusions

This study demonstrated that although developmental exposure to low doses of EE2 resulted in no overall deleterious effect on reproduction in adult male mice, sexual behavior and neuronal networks were impacted. These effects were transmitted to the progeny up to the F4 animals. Here we were able to highlight some effects which would not have been detected with toxicological regulatory studies[34], since sexual behavior is not a parameter monitored *per se*. Such deep and transgenerational modifications of sexual behavior necessarily impact on individual and species fitness. Although care must obviously be taken when extrapolating from animal studies, it is possible to imagine the effect of such alterations induced by EE2 or other estrogenic EDCs on human health and the implied societal consequences. The relevance for effective health and safety of such new non-adverse, but biologically significant changes has to be seriously considered to understand the threats and to prevent risks to human health. Moreover, such long-term alterations in neuronal networks induced by developmental steroid perturbations may affect different social behaviors or even be involved in neurodegenerative diseases[47]. Demonstrating a significant elevation in progesterone and testosterone concentrations in amniotic fluids in the males with autism compared with controls, Baron-Cohen *et al.*[48] suggest links between the prenatal hormone environment, sexually dimorphic behaviors and autism. This concern therefore needs to be considered by stakeholders and politicians to prevent long-term deleterious consequences.

Methods

Animals. Animals were obtained from fifteen pregnant Swiss mice (5 dams *per* experimental group; F0 generation) purchased from a commercial breeder (Charles Rivers, France). Mice were housed in individual standard cages during gestation and with their pups for lactation, and each male was housed with three brothers from weaning up to the beginning of the sexual behavior tests. Animals were given a

free access to food and water under controlled temperature (22 °C) and photoperiod cycle (12 h light/12 h dark). All experiments were performed according to the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by an ethical committee for animal experimentation (CEEA Val-de-Loire, Tours, France, n°00302-01).

Ethinylestradiol exposure. A stock solution of EE2 (Sigma Aldrich) was prepared in absolute ethanol (1 μg/mL) and dilutions to final doses of exposure were performed directly in drinking water. The daily dose was adjusted according to animals' weights and water consumption. To estimate EE2 exposure, we previously evaluated the volume of drinking water ingested by a Swiss mouse per day (around 5 mL for an adult mouse). Animals were exposed to EE2 from embryonic day 10 until postnatal day (PND) 40 (F1 generation). This exposure period covered the whole developmental period, including *in utero* life from mid-gestation and the perinatal period until juvenile life, corresponding to the organizational window of neuroendocrine networks, and extended up to puberty, during which these neuroendocrine networks are activated[2]. The animals were divided into three groups. The first (EE2 0.1 group) was exposed to 0.1 μg of EE2 *per* kg body weight *per* day, a dose compatible with an exposure range found in highly polluted environments[35]. The second (EE2 1 group) was exposed to 1 μg of EE2 *per* kg body weight *per* day, corresponding to pharmacological exposure with a contraceptive pill or hormone replacement therapy[9], and defined as the lowest observed adverse effect level (LOAEL) in humans[34,49]. The third (Control group) received vehicle. In order to avoid bias on animal growth due to litter size, each litter was reduced to 4 males and 4 females at PND4. Analyses were carried out on adult animals (from 8 weeks of age). The males tested for sexual behavior were different from the males included in the neuroanatomical studies.

Animals of the F2, F3 and F4 generations were obtained by crossing females and males within each experimental group. Thus F2, F3 and F4 males of the EE2 0.1 and EE2 1 groups originated from EE2-exposed parents, grand- and great-grand-parents respectively.

Each experimental group of each F1 to F4 generation included 12-20 males originating from 3 to 12 litters.

Sexual behavior. Tests were performed in a dark room under red light. Naive males were individually housed for one week before the first test in a room devoid of the presence of any females. Each male of the F1, F2, F3 and F4 generations (n = 12–14 for each group of each generation obtained from 3 to 5 different litters *per* group) was tested three times, corresponding to the three trials, with a time interval of two weeks between trials. Males were tested in a cage containing fresh litter. After 10 min habituation an estrous female was introduced and the test lasted for 30 minutes. A mount involved a male placing its two anterior paws on either sides of the flank of the receptive female. Intromission was determined when the male carried out back and forth thrusting movements of the pelvic region. The numbers of ano-genital investigations and mount attempts, the latencies and the frequencies of mounts and intromissions were scored[41].

Estrous females used as stimuli were ovariectomized under general anesthesia (xylazine/ketamine) and implanted with Silastic implants (Dow Corning) containing 50 μg of E2-benzoate (Sigma-Aldrich). Four hours before the tests, females were given a subcutaneous injection of 1 mg of progesterone (Sigma-Aldrich) diluted in 100 μL of oil to induce receptivity.

Fertility study. Male fertility was assessed at the end of the behavioral analyses. A male mouse was housed with a female for 1 to 14 days until a vaginal plug was observed. The number of litters and pups *per* litter were recorded for each experimental group of males.

Plasma testosterone concentrations. Two hours before being euthanized, males of the F1 to F4 generations were injected intraperitoneally with 15 UI of human chorionic gonadotropin (hCG) (Intervet, France) diluted in physiological serum[50]. Blood was collected at death, plasma separated and stored at −20 °C until testosterone assays. Plasma testosterone concentrations were evaluated through a RIA using ^{3}H testosterone as previously described[51]. The sensitivity of the assay was 0.115 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation was 7%.

Genital tract analysis. When F1, F2 and F3 animals were euthanized, each male was weighted, the ano-genital distance (AGD) was measured, and testes, seminal vesicles and coagulating glands (SV/CG) were weighted.

Immunohistochemistry. Brains were collected according to the protocol described in Geller *et al.*[52]. After embedding in TissuTek®, brains were cut with a cryostat (Leica) into 20 μm coronal slices, stored at -20 °C until immunohistochemistry. Slices were processed for immunostaining with rabbit polyclonal anti-GnRH antibody (1:3000; ref. 52), sheep anti-kisspeptin antibody (1:2000; ref. 53) or mouse monoclonal anti-calbindin antibody (1:5000; C8948; clone CB-955; Sigma-Aldrich). GnRH immunostaining was performed in the POA and ME of F1 animals, and kisspeptin and calbindin immunostainings were performed respectively in the PVpo nucleus and mPOA of F1, F3 and F4 animals. Details of all the

procedures are provided in Supplemental Material Part1. No immunohistochemical analysis could be performed on F2 animals because of technical troubles.

Analysis and quantification of immunohistochemical studies. GnRH cell numbers were analyzed under an optical microscope at 20X magnification in three neuroanatomical regions: Median Septum (MS), *Organum Vasculosum Laminae Terminalis* (OVLT) and medial PreOptic Area (mPOA). In each region, GnRH immunoreactive cell bodies were counted on 10 consecutive coronal sections. The mean numbers of GnRH immunoreactive neurons were compared between the experimental groups both overall by summing the numbers determined in the three regions and within each neuroanatomical region.

Analysis of GnRH terminal nerves in the ME was performed using epifluorescence microscopic images computerized with Mercator Software (Explora Nova, La Rochelle, France). Three coronal slices corresponding to the anterior, middle and posterior parts of the ME were selected according to Paxinos & Franklin's brain atlas[54] (Supplemental Material Figure S1). The proportion of the area of GnRH fibers which were immunoreactive was quantified in $10.000\,\mu m^2$ taken from and centered on the ME (20X magnification). Results are presented as the distribution of mean labeled surface area *per* litter (1–2 animals *per* litter) for each group.

Kisspeptin neurons were counted on confocal images (LSM 700, 20X magnification) with Zen® software. For each animal, two brain coronal slices corresponding to the PVpo were analyzed. All the labeled neurons distributed around the third ventricle were counted and a mean number of neurons *per* section and *per* animal was obtained. Counting of calbindin positive cells in the mPOA was carried out on images taken at 20X magnification according to a method adapted from ref. 26. Details are described in Supplemental Material Part2. The values represent the mean numbers of cells counted on one side of the third ventricle.

Statistical analyses. Results are presented as average values *per* litter for each parameter monitored and obtained from values of animals from the same litter. For each litter one to two animals were used for neuroanatomical studies and two to four animals were analyzed for behavior. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism5® software (GraphPad Software, San Diego, CA). Data were compared using a non-parametric Kruskal Wallis test with a Dunn's post-test. Behavioral parameters were analyzed using a two-way ANOVA test with a Bonferroni post-test. A Friedman test was used for intragroup comparisons (trial number effect). A Chi-square test was used to compare frequencies. Differences were considered significant for p-value < 0.05. Data presented in the histograms are means $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM).

References

1. Bakker, J. *et al.* Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* **9,** 220–226 (2006).
2. McCarthy, M. M. Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev.* **88,** 91–124 (2008).
3. McCarthy, M. M. How it's made: organisational effects of hormones on the developing brain. *J. Neuroendocrinol.* **22,** 736–742 (2010).
4. Schwarz, J. M. & McCarthy, M. M. Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *J. Neurochem.* **105,** 1561–1572 (2008).
5. Balthazart, J. Steroid control and sexual differentiation of brain aromatase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **61,** 323–339 (1997).
6. Simerly, R. B. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* **25,** 507–536 (2002).
7. Coolen, L. M., Peters, H. J. & Veening, J. G. Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study. *J. Comp. Neurol.* **397,** 421–435 (1998).
8. European Union. [Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy] *Off. J. Eur. Union L 226 56* [E.P.a.C.o.t.E. Union (ed.)] [1–17] (2013).
9. Stanczyk, F. Z., Archer, D. F. & Bhavnani, B. R. Ethinylestradiol and 17β-estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception.* **87,** 706–727 (2013).
10. Kuhl, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric.* **8** (Suppl 1), 3–63 (2005).
11. Liu, J. *et al.* Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *Sci. Total Environ.* **511C,** 54–62 (2014).
12. Jobling, S. & Owen, R. [Ethinyl estradiol: Bitter Pill for the Pre-cautionary Principle] *Late Lessons from Early Warnings: Science, Precaution, Innovation* [Gee, D. (ed.)]. [331–339] (European Environment Agency, Copenhagen, 2013).
13. Gore, A. C. & Patisaul, H. B. Neuroendocrine disruption: historical roots, current progress, questions for the future. *Front. Neuroendocrinol.* **31,** 395–399 (2010).
14. León-Olea, M. *et al.* Current concepts in neuroendocrine disruption. *Gen. Comp. Endocrinol.* **203,** 158–173 (2014).
15. Pillon, D., Cadiou, V., Angulo, L. & Duittoz A. H. Maternal exposure to 17-alpha-ethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. *Brain Res.* **1433,** 29–37 (2012).
16. Semaan, S. J. Tolson, K. P. & Kauffman, A. S. The development of kisspeptin circuits in the Mammalian brain. *Adv Exp Med Biol* **784,** 221–252 (2013).
17. Lenz, K. M., Nugent, B. M. & McCarthy, M. M. Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Front. Neurosci.* **6,** 26 (2012).
18. Balthazart, J., Absil, P., Gérard, M., Appeltants, D. & Ball, G. F. Appetitive and consummatory male sexual behavior in Japanese quail are differentially regulated by subregions of the preoptic medial nucleus. *J. Neurosci.* **18,** 6512–6527 (1998).
19. Raisman, G. & Field, P. M. Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. *Science* **173,** 731–733 (1971).

20. Greenough, W. T., Carter, C. S., Steerman, C. & DeVoogd, T. J. Sex differences in dentritic patterns in hamster preoptic area. *Brain Res.* **126,** 63–72 (1977).
21. Tobet, S. A., Zahniser, D. J. & Baum, M. J. Differentiation in male ferrets of a sexually dimorphic nucleus of the preoptic/anterior hypothalamic area requires prenatal estrogen. *Neuroendocrinology* **44,** 299–308 (1986).
22. Bodo, C. & Rissman, E. F. The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinology* **149,** 4142–4150 (2008).
23. Orikasa, C. & Sakuma, Y. Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. *J. Comp. Neurol.* **518,** 3618–3629 (2010).
24. Gorski R. A. Sexual differentiation of the brain. *Hosp. Pract.* **13,** 55–62 (1978).
25. Arendash, G. W. & Gorski, R. A. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res. Bull.* **10,** 147–154 (1983).
26. Gilmore, R. F., Varnum, M. M. & Forger, N. G. Effects of blocking developmental cell death on sexually dimorphic calbindin cell groups in the preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis. *Biol. Sex. Differ*. **12,** 3–5 (2012).
27. Picot, M. *et al.* Vulnerability of the neural circuitry underlying sexual behavior to chronic adult exposure to oral bisphenol A in male mice. *Endocrinology* **155,** 502–512 (2014).
28. Nugent, B. M. *et al.* Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* **18,** 690–697 (2015).
29. Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. & Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **308,** 1466–1469 (2005).
30. Skinner, M. K. & Guerrero-Bosagna, C. Role of CpG deserts in the epigenetic transgenerational inheritance of differential DNA methylation regions. *BMC Genomics.* **15,** 692 (2014).
31. Herbison, A. E. [Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network] *Knobil and Neill's Physiology of Repro*duction [Neill, J. D. (ed.)] [1415–1482] (Academic Press, San Diego, 2006).
32. Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D. W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* **338,** 161–164 (1989).
33. Clements, R. J., Lawrence, R. C. & Blank, J. L. Effects of intrauterine 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the development and function of the gonadotrophin releasing hormone neuronal system in the male rat. *Reprod. Toxicol.* **28,** 38–45 (2009).
34. National Toxicology Program. Multigenerational reproductive toxicology study of ethinyl estradiol (CAS No. 57-63-6) in Sprague-Dawley rats [Natl Toxicol Program Tech Rep Ser] [547:1-312] (2010).
35. Zhou, Y., Zha, J., Xu, Y., Lei, B. & Wang, Z. Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. *Environ Monit Assess* **184,** 1719–1729 (2012).
36. Kunz, P. Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N. & Kase, R. *In vitro* bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* pii: S0731-7085(14) 00545–7 (2014).
37. Simon, J. *et al.* Ethinyl estradiol and levonorgestrel alter cognition and anxiety in rats concurrent with a decrease in tyrosine hydroxylase expression in the locus coeruleus and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* **62,** 265–278 (2015).
38. Melnick, R. *et al.* Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect* **110,** 427–431 (2002).
39. Vandenberg, L. N. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm* **94,** 129–165 (2014).
40. Sato, T. *et al.* Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* **101,** 1673–1678 (2004).
41. Ogawa, S. *et al.* Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **26,** 12887–12892 (1999).
42. Sharifi, N., Reuss, A. E. & Wray, S. Prenatal LHRH neurons in nasal explant cultures express estrogen receptor beta transcript. *Endocrinology* **143,** 2503–2507 (2002).
43. Herbison, A. E. & Pape, J. R. New Evidence for Estrogen Receptors in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* **22,** 292–308 (2001).
44. Vandenberg, L. N. *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* **3,** 378–455 (2012).
45. Beausoleil, C. *et al.* Low dose effects and non-monotonic dose responses for endocrine active chemicals: Science to practice workshop: Workshop summary. *Chemosphere* **93,** 847–856 (2013).
46. Vandenberg L. N. *et al.* Regulatory decisions on endocrine disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reprod Toxicol* **8,** 1–15 (2013).
47. Gore, A. C., Martien, K. M., Gagnidze, K. & Pfaff, D. Implications of prenatal steroid perturbations for neurodevelopment, behavior, and autism. *Endocr. Rev.* **35,** 961–991 (2014).
48. Baron-Cohen, S. *et al.* Elevated fetal steroidogenic activity in autism. *Mol. Psychiatry.* **20,** 369–376 (2015).
49. Mashchak, C. A. *et al.* Comparison of pharmacodynamic properties of various estrogen formulations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **144,** 511–518 (1982).
50. Lécureuil, C. *et al.* Transferrin overexpression alters testicular function in aged mice. *Mol. Reprod. Dev.* **74,** 197–206 (2007).
51. Hochereau-de Reviers, M. T., Perreau, C., Pisselet, C., Fontaine, I. & Monet-Kuntz C. Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domest. Anim. Endocrinol.* **7,** 63–73 (1990).
52. Geller, S., Kolasa, E., Tillet, Y., Duittoz, A. & Vaudin, P. Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development. *Glia*. **61,** 550–566 (2013).
53. Franceschini, I. *et al.* Immunohistochemical evidence for the presence of various kisspeptin isoforms in the mammalian brain. *J Neuroendocrino*. **25,** 839–851 (2013).
54. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, San Diego, 1996).

Acknowledgements

This work has been supported by the French National Research Agency (ANR) grant NEED (#AF08CES 011). Mr Derouiche is a Ph.D. student supported by the French MESR. We thank Mr. Cahier and Ms. Crespin and Ms. Cirot for the care of the animals at the Experimental unit PAO n°1297 (EU0028), INRA Centre Val-de-Loire, and the INRA PRC hormonal assay platform for testosterone assays. We are grateful to Dr Fouchécourt for the discussion on the hCG injection protocol, Dr Martini for her participation in testing mouse behavior and Ms. Torchy for the kisspeptin study.

Author Contributions

D.P. designed the study. L.D. and D.P. performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. M.K. and A.H.D. supervised the design of the study and revised the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript for intellectual content and gave final approval for the version to be submitted for publication.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Derouiche, L. *et al.* Developmental exposure to Ethinylestradiol affects transgenerationally sexual behavior and neuroendocrine networks in male mice. *Sci. Rep.* **5**, 17457; doi: 10.1038/srep17457 (2015).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Supplemental Material

Table of contents:

- Part 1: Immunohistochemistry.

- Part 2: Analysis and quantification for the calbindin immunohistochemical study.

- Table S1: Male sexual behavior in F1 to F4 animals.

- Figure S1: Analysis and quantification for the GnRH immunohistochemical study in the median eminence.

- Figure S2: Occurrence of abnormalities in seminal vesicles and coagulating glands (SV/CG).

- Part 1: Immunohistochemistry.

For immunostaining of GnRH, kisspeptin and calbindin, slices were immersed for 15 minutes in PBS containing 0.3 Triton X100 (PBST) and 1% H_2O_2. The sections were blocked for 1 hour in 10% normal goat serum in PBST (PBST-NGS), and then incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-GnRH antibody (1:3000; Geller et al. 2013), sheep anti-kisspeptin antibody (1:2000; Franceschini et al. 2013) or mouse monoclonal anti-calbindin antibody (1:5000; C8948; clone CB-955; Sigma-Aldrich). GnRH and calbindin immunostainings in the POA were carried out over a 2 hour-period at room temperature (RT) using respectively the biotinylated goat anti-rabbit (1:500; Vector laboratories) or anti-mouse (1:250) immunoglobulin antibodies. Bound antibodies were visualized following 1 hour incubation with the ABC horseradish peroxidase complex (1:600; Vector Burlingame, CA, USA kit Vectastain Elite (PK6100)). The revelation of the signal was performed with 3'3-diaminobenzidine and 0.02 % H_2O_2 (Sigma-Aldrich).

For immunostaining of GnRH in the ME and kisspeptin in the PVpo, GnRH and kisspeptin immunofluorescence labeling were carried out over a 2 hours period at RT using respectively the Alexa 546-conjugated goat anti-rabbit or donkey anti-sheep IgG second antibody (1:1000; Molecular Probes). After three rinses in PBS, nuclei were counterstained with DAPI (1:1000) for 1 minute incubation. Slides were rinsed in water and coverslipped with Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) before being stored at 4°C in the dark.

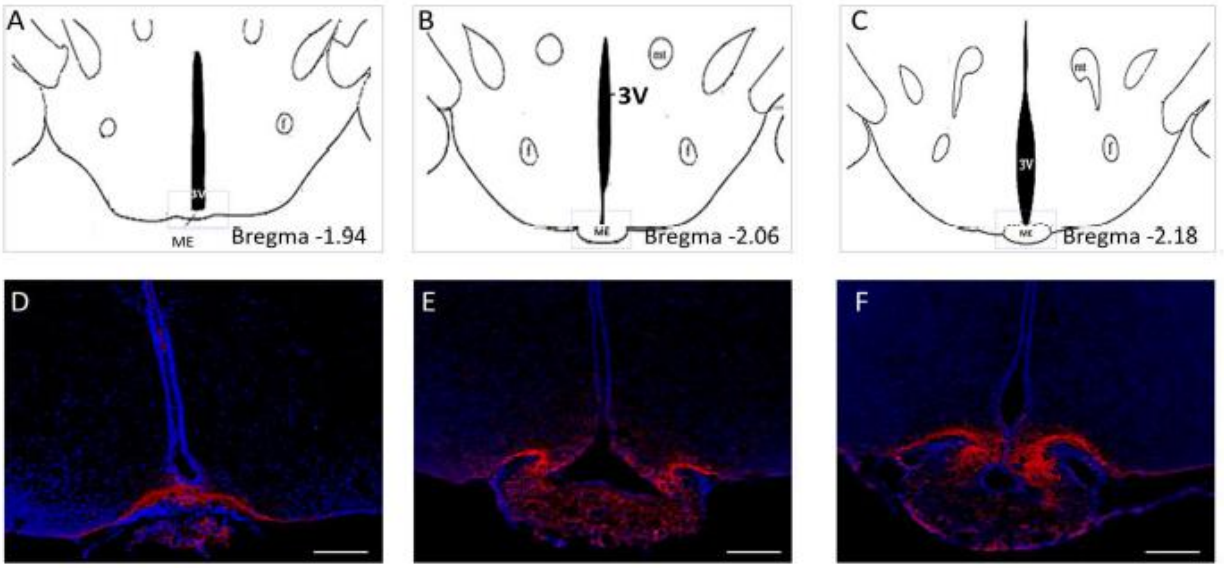
- Part 2: Analysis and quantification for the calbindin immunohistochemical study.

For each animal, four sections were selected in the area of interest, two adjacent sections and other two sections separated by 100 µm from the firsts two. The counting area was delimited by a framework of 200 µm, placed laterally at a distance of 200 µm from the wall of the third ventricle and 600 µm from the optic chiasma. On ImageJ® software (NIH), each image was binarized and the cell bodies were pointed using the cell counter plugin.

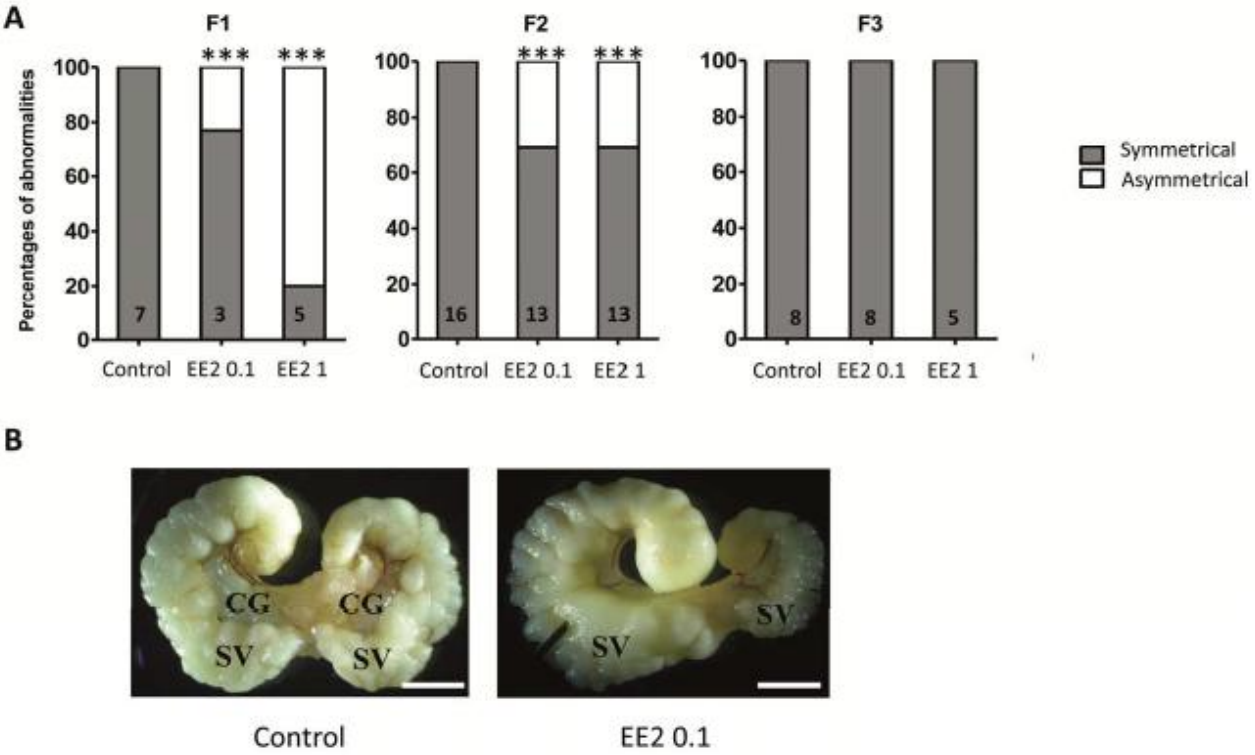
Table S1: Male sexual behavior in F1 to F4 animals.

	Ano-genital investigation (AGI)			Attempted mounts (AM)			Mounts without intromission (MWI)		
	Trial1	Trial2	Trial3	Trial1	Trial2	Trial3	Trial1	Trial2	Trial3
Control	16.62 ± 1.14	19.14 ± 1.14	17.53 ± 1.56	5.68 ± 1.28	6.06 ± 1.72	5.60 ± 2.62	5.35 ± 1.2	4.10 ± 1.67	8.41 ± 1.66
EE2 0.1	13.22± 86	14.86 ± 4.86	15.16 ± 4.73	7.34 ± 2.90	8.41 ± 2.45	6.41± 0.71	5.55± 1.14	5.5 ± 2.50	11.25 ± 1.42
EE2 1	14.53 ± 2.52	14.86 ± 1.36	16.48 ± 2.83	6.76 ± 1.76	7.50 ± 2.05	6.73 ± 1.34	5.90 ± 1.47	8.88 ± 1.17	9.21 ± 1.72
Control	21.20 ± 2.87	24.33 ± 2.89	26.16 ± 3.98	2.69 ± 0.69	2.96 ± 0.45	1.68 ± 0.66	1.80 ± 0.47	4.33 ± 0.97	2.68 ± 12.12
EE2 0.1	24.05 ± 3.96	15.036± 4.17	18.62± 1.89	1.50 ± 0.99	3.26 ± 0.62	2.6 ± 0.78	1.72 ± 0.67	3.13 ± 1.34	10.61± 2.27***
EE2 1	23.72 ± 4.37	25.91 ± 4.02	28.31 ± 3.15	3.63 ± 0.59	3.55 ± 0.34	3.12 ± 0.81	3.43 ± 0.73	3.81 ± 1.08	6.37 ± 1.37*
Control	34.52 ± 2.99	24.06 ± 2.23	30.06 ± 1.44	4.45± 0.20	3.45 ± 1.01	2.80 ± 0.45	3.62 ± 0.59	5.23 ± 1.31	5.90 ± 1.42
EE2 0.1	28.00± 2.72	23.75 ± 2.96	22.60 ± 1.64	3.40 ± 0.67	3.37 ± 0.93	3.00 ± 0.76	5.00 ± 1.01	8.25± 1.31	6.35 ± 1.50
EE2 1	29.33 ± 2.04	24.670± 4.45	25.33 ± 2.09	3.25 ± 0.47	2.79 ± 1.18	3.08 ± 0.51	4.54 ± 0.46	6.14 ± 1.56	8.45 ± 1.51
Control	29.125 ± 1.54	32.18 ± 1.13	17.93 ± 1.55	2.12 ± 0.41	1.43 ± 0.20	2.87 ± 0.30	2.12 ± 0.37	4.31 ± 0.78	5.00 ± 1.16
EE2 0.1	20.58 ± 3.41	19.91 ± 0.95	15.66 ± 2.22	3.08 ± 0.11	2 ± 0.34	2.36 ± 0.27	3.50 ± 0.78	4.16 ± 0.52	3.77 ± 0.32
EE2 1	32.31 ± 2.69	29.54± 1.27	21.12 ± 2.27	3.41 ± 0.08	1.66 ± 0.33	5;04 ± 0.88	5.10 ± 0.75	5.72 ± 1.72	7.77 ± 1.29

We also evaluated the mean numbers of ano-genital investigations, attempted mounts and mounts without intromission for each experimental group (Control, EE2 0.1 and EE2 1) of the F1, F2, F3 and F4 generations, along the three tests (trials 1 to 3). Data are expressed as means number of the event ± SEM during each trial for the three groups. Two-ways ANOVA with Bonferroni post-test: $P < 0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$.



Supplementary figure1: Analysis and quantification for the GnRH immunohistochemical study in the median eminence. Drawings from the atlas *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (from Franklin and Paxinos 1996) illustrating the analyzed areas from the anterior **(A)**, middle **(B)** and posterior **(C)** median eminence (ME). **(D, E, F)** GnRH labeling by immunofluorescence from control individual in the three areas corresponding respectively to the boxes above. Scale bar=100 µm.



Supplementary figure 2: Occurrence of abnormalities in seminal vesicles and coagulating glands (SV/CG). Abnormality was defined when SV/CG were asymmetrical, exhibiting remarkable differences in size between right and left SV/CG. **(A)** Histograms of the percentages of asymmetrical SV/CG in F1 and F2 males. No asymmetrical SV/CG were observed in F3. *** P<0.001: Fisher's exact test, statistically different from Control. The numbers at the bottom of the histograms represent effectives of examined animals. **(B)** Representative photomicrographs of normal and asymmetrical SV/CG. No abnormality was ever observed in males of the Control group.

III- MECANISMES DE TRANSMISSION DES EFFETS DE L'EE2

Les résultats présentés dans l'article II montrent clairement que les effets de l'EE2 qui ont été observés chez les mâles F1 ont été transmis à leurs descendances jusqu'à la génération F4 sans avoir réexposé ces animaux directement à l'EE2. Ces observations démontrent que l'exposition parentale à l'EE2 a induit des modifications irréversibles qui seraient portées par les cellules germinales d'un des deux parents, voire des deux en même temps et qui ont permis de transmettre ces phénotypes acquis par les parents pendant leur développement à leur descendance.

Dans notre expérience, les générations F2, F3 et F4 ont été obtenues par des croisements de mâles et de femelles issus du même groupe expérimental. Ce protocole ne nous permet pas de conclure quant au mode de transmission, maternel ou paternel, des phénotypes observés chez ces animaux. Pour répondre à cette question, nous avons mené une expérience préliminaire dont l'objectif était d'identifier si la transmission de ces effets se faisait par la lignée germinale mâle ou par la lignée germinale femelle. Ainsi nous avons croisé des mâles F1 exposés à l'EE2 avec des femelles F1 contrôles **(Figure 23A)**, de même nous avons croisé des femelles traitées à l'EE2 avec des mâles contrôles **(Figure 23B)** et obtenu une génération d'animaux dont uniquement **le père (F'2)** ou **la mère (F2')**, a été exposé(e) à l'EE2 pendant le développement. Ainsi, les mâles issus de ces croisements ont été testés pour évaluer leur comportement sexuel par le même protocole expérimental utilisé pour tester le comportement des mâles F1 à F4 issus des croisements en intra-lots.

Concernant les **mâles F'2**, les résultats **(Figure 24)** montrent que la latence de première monte, de première intromission et le nombre d'intromissions accomplies au cours du test par les mâles dont le père a été exposé à l'EE2 est statistiquement significatif (Two-way ANOVA, voir figure 24) comparé aux mâles dont les deux parents n'ont pas été exposés (contrôles). Cet effet va dans le même sens que l'effet observé chez les mâles dont les deux parents avaient été exposés et qui ont un comportement sexuel exacerbé. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'EE2 sur le comportement sexuel mâle peut être transmis à la génération suivante *via* la lignée germinale paternelle. Le post-test de Bonferroni ne met en évidence des différences significatives que pour la dose forte d'EE2 à la session 2 pour la latence de monte ($p<0,05$) et pour le nombre d'intromissions à la session 3 ($p<0,05$). Concernant les mâles F2' descendant de mâles contrôles croisés avec des femelles traitées à l'EE2, les

croisements n'ont pas pu générer un nombre suffisant d'animaux permettant d'exploiter les résultats.

Cette expérience a été réalisée sur des effectifs d'animaux relativement réduits, les résultats obtenus sont donc préliminaires et devraient être renforcés par l'augmentation des effectifs pour confirmer ces conclusions.

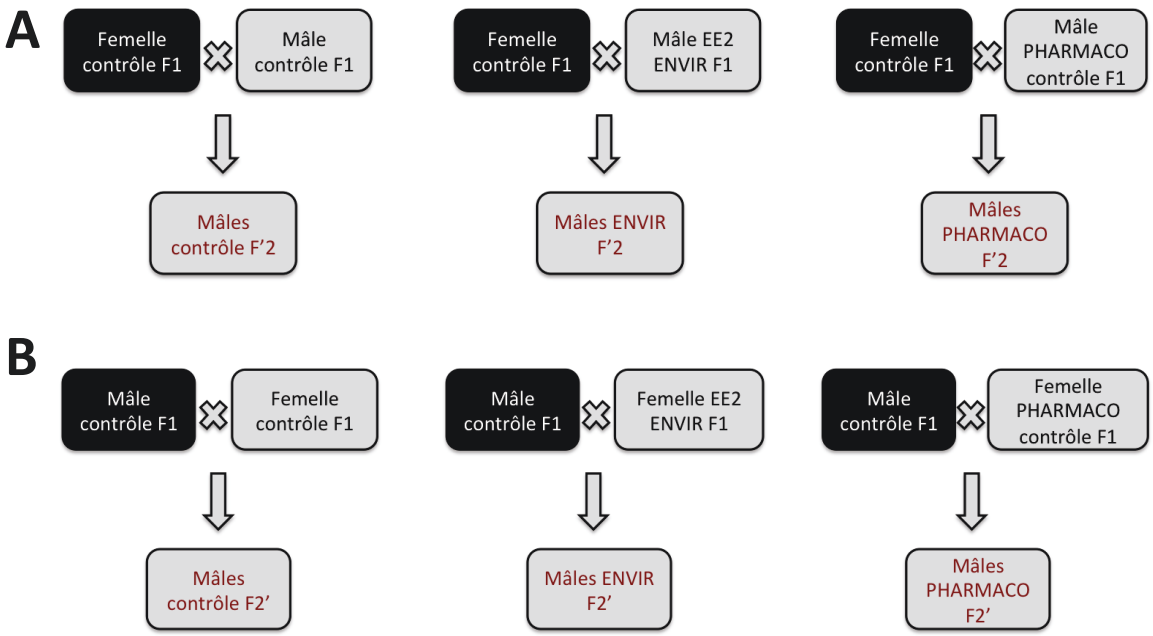


Figure 23: Protocole de croisement des animaux pour identifier les mécanismes de transmission des effets de l'EE2

A) Des femelles contrôles de la génération F1 ont été croisées avec des mâles contrôles, avec des mâles exposés à la dose faible (ENVIR) ou à la dose forte (PHARMACO) d'EE2, pour obtenir la génération F'2. **B)** Des femelles des lots exposés à l'EE2 ont été croisées avec des mâles contrôles pour obtenir la génération F2'

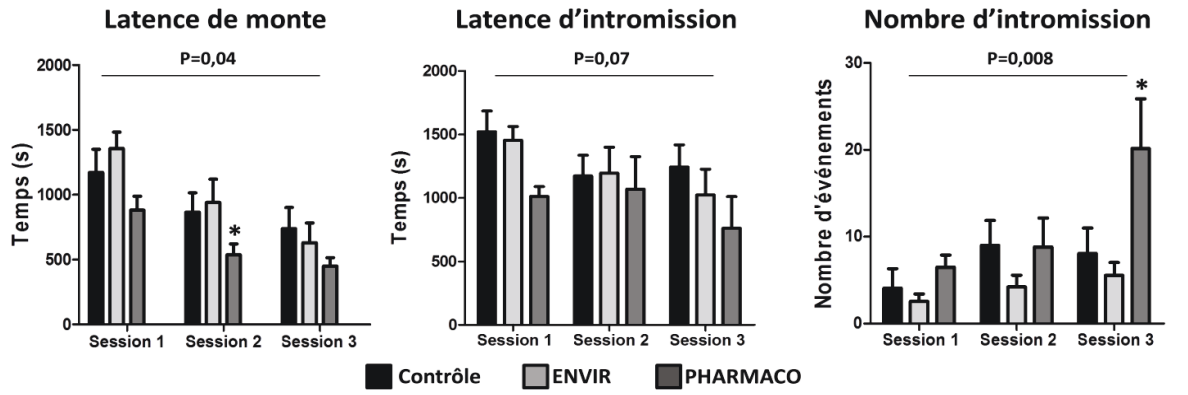


Figure 24 : Tests de comportement sexuel des mâles F'2.

Histogrammes de la latence de première monte, de première intromission et du nombre d'intromissions accomplies par les mâles des trois lots pendant les trente minutes de test. Chaque animal a été testé trois fois, les trois sessions de tests étaient séparées de deux semaines d'intervalle. ANOVA à deux facteurs (Traitement X session de test). Les valeurs de P indiquées sur les histogrammes correspondent au facteur traitement. Test de Bonferroni pour les comparaisons multiples p-value <0.05. Contrôle, n=11; ENVIR, n=9; PHARMACO, n=6.

IV- CONCLUSION CHAPITRE II

L'exposition chronique à l'EE2 pendant le développement chez le mâle induit des effets très marqués sur le comportement sexuel chez ces animaux à l'âge adulte. Les mâles exposés à l'EE2 expriment un comportement sexuel exacerbé lorsqu'ils sont mis en interaction avec une femelle sexuellement réceptive. Ce comportement exacerbé est d'autant plus marqué avec l'acquisition de l'expérience sexuelle. En effet, après trois sessions de tests séparées par un intervalle de temps de deux semaines, les différences entre les mâles contrôles et les mâles traités s'accentuent.

Par ailleurs, les analyses de la neuroanatomie des structures hypothalamiques sexuellement dimorphiques ont mis en évidence une augmentation du nombre de cellules immunoréactives à la calbindine, localisées sous forme d'un cluster sexuellement dimorphique dans l'APOm. D'une manière intéressante, une corrélation positive entre le volume du noyau de l'APOm immunoréactif à la

calbindine et le comportement sexuel mâle a déjà été démontrée (Anderson et al., 1986, Rhees et al., 1999, Lephart et al., 2001). Ces observations concomitantes d'une exacerbation du comportement sexuel et la modification de la structure de l'APOm suggèrent un lien de cause à effet de ces deux phénotypes.

Les analyses comportementales et neuroanatomiques effectuées sur la descendance des mâles croisés avec des femelles également exposées à l'EE2 pendant leur développement mettent en évidence exactement les mêmes effets observés chez leurs parents jusqu'à la troisième génération après l'exposition parentale. Enfin, l'étude préliminaire du comportement des mâles issus de croisements de mâles exposés à l'EE2 avec des femelles non exposées, suggère que l'exposition paternelle seule serait suffisante pour induire la transmission de ces effets à leurs descendances. Ces observations mettent en évidence la robustesse et le caractère persistant de ce phénotype induit par l'EE2.

La transmission transgénérationnelle des phénotypes acquis, impliquerait des modifications épigénétiques transmises par les cellules germinales de l'individu à sa descendance. Ces modifications épigénétiques seraient intégrées de manière irréversible et pourraient être le support de l'hérédité des événements environnementaux survenus pendant la vie de l'individu. Les mécanismes probablement impliqués dans la transmission transgénérationnelle des effets de l'EE2 seront discutés dans la discussion générale.

Chapitre III : étude in vitro des effets de l'éthinylœstradiol sur le développement neural

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE

L'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur le neurodéveloppement implique l'utilisation de modèles animaux, principalement les rongeurs (rat et souris). Ceux-ci présentent de nombreux avantages tels qu'une connaissance largement documentée de leur physiologie et leur génome, l'existence de différentes lignées, une reproduction rapide, etc. Néanmoins, dans le contexte actuel d'une multiplication des risques pour la santé des molécules chimiques telles que les perturbateurs endocriniens (PEs) et des impératifs éthiques relatifs à la législation sur l'expérimentation animale, le développement de méthodes alternatives plus rapides, plus éthiques et moins coûteuses devient nécessaire afin d'évaluer les risques réels de ces molécules sur la santé.

Les modèles de cultures *in vitro* offrent non seulement la possibilité de prédire certains effets *in vivo* mais permettent également d'étayer les mécanismes d'action à l'échelle cellulaire et moléculaire. La compréhension des mécanismes d'actions de ces molécules à l'échelle de la cellule et d'un réseau cellulaire fonctionnel s'avère indispensable pour mieux appréhender leurs effets réels sur la santé des organismes ou des populations.

Dans ce troisième chapitre, sont présentés les résultats des expériences que nous avons menées *in vitro* pour décrire l'impact de l'exposition à l'EE2 sur le développement neural. Pour cela, nous avons utilisé différentes approches permettant de décrire ces effets sur différents types cellulaires selon l'origine anatomique dont ils sont issus.

L'hypothalamus se développe à partir d'une structure embryonnaire appelée le diencéphale, cette structure va se différencier au cours du développement et donner l'hypothalamus et le thalamus (Puelles and Rubenstein, 1993). Les neurones du cortex sont issus d'autres structures télencéphaliques, telles que le striatum qui constitue une zone neurogénique accrue pendant le développement et qui est la source principale des

populations neurales qui vont coloniser et former le cortex cérébral chez l'adulte (Fentress et al., 1981). Par ailleurs, les neurones à GnRH dont le développement a été évoqué en détails dans la partie introductive de ce manuscrit, qui sont localisés chez l'adulte dans l'hypothalamus, proviennent de la placode olfactive à partir de laquelle ils migrent vers le cerveau (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989). Cette origine différente des populations neurales suppose une différence de sensibilité aux stimuli de l'environnement des cellules souches neurales qui donnent naissance à ces populations des différentes régions cérébrales. Pour étudier les effets de l'EE2, nous avons utilisé deux approches différentes. D'une part, nous avons mis en culture des cellules souches neurales embryonnaires issues de deux régions différentes du cerveau, le diencéphale et le striatum, et comparé les effets obtenus sur ces deux types de cellules en fonction de différents traitements (division cellulaires, cycle cellulaire, apoptose, différenciation). D'autre part, pour étudier l'effet de l'EE2 spécifiquement sur les neurones à GnRH, nous avons utilisé le système de cultures de placodes olfactives embryonnaires dont les neurones à GnRH sont issus (Terasawa et al., 1993).

II- EFFETS DE L'EE2 SUR LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES SOUCHES NEURALES EMBRYONNAIRE MURINES

Cette partie constitue un article en préparation.

A- Introduction

Les œstrogènes jouent un rôle crucial dans le développement et la différenciation du système nerveux central en agissant principalement *via* leurs récepteurs spécifiques nucléaires (ERα, ERβ) et membranaire (GPR30) (Couse et al., 1997, Brailoiu et al., 2007) pendant les phases clés du développement de l'individu (Pour revue, voir Lenz and McCarthy, 2010). Chez le mâle, l'aromatisation de la testostérone en œstradiol par l'aromatase (CYP19) exprimée dans différents tissus du cerveau pendant la période périnatale a été identifiée comme le mécanisme principal permettant la différenciation sexuelle du cerveau, conduisant ainsi, à l'âge adulte, à exprimer les comportements sexuels et sociaux adéquats aboutissant au succès reproducteur (George and Ojeda, 1982). Chez la femelle, le rôle de l'aromatase, donc de son produit catalytique principal l'œstradiol à faible dose, n'a été mis en évidence que récemment. Ainsi plusieurs équipes ont montré l'effet délétère de l'inactivation de l'aromatase sur l'expression des comportements adultes typiques de la femelle (Bakker et al., 2002, 2003). Nugent et al.

(2015) ont montré l'importance de certains mécanismes comme la méthylation de l'ADN dans la suppression de la masculinisation du cerveau chez les femelles, suggérant ainsi que la féminisation requiert des mécanismes actifs, contrairement à ce qui a été longtemps considéré comme un mécanisme par défaut d'absence de stéroïdes sexuels pendant le développement chez la femelle. Ces données mettent en évidence l'importance du maintien de l'équilibre hormonal pendant le développement pour permettre la différenciation sexuelle du cerveau chez les mâles et chez les femelles.

La présence des œstrogènes dans l'environnement pendant le développement peut constituer un facteur de risque considérable qui pourrait interagir avec l'équilibre hormonal endogène et induire une perturbation de la différenciation sexuelle avec, comme conséquence, une perturbation voire une altération des comportements sexuellement dimorphiques des individus adultes en âge de se reproduire. En effet, plusieurs études ont décrit les effets des œstrogénomimétiques sur les comportements sexuels et les structures sexuellement dimorphiques du cerveau des adultes exposés pendant leur développement. Dans notre étude menée *in vivo* chez la souris, nous avons pu montrer que le 17α-éthinylestradiol (EE2) est capable d'induire des modifications du comportement sexuel des mâles et des femelles exposés pendant le développement. L'EE2 à des concentrations de 10µg/kg est capable de modifier la structure de certaines régions comme le noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique (NSD-APO) des rats exposés (He et al., 2012). *In vivo*, nous avons mis en évidence un effet sur l'APOm à des concentrations bien plus faibles chez les souris mâles. Ces données suggèrent que les œstrogènes pendant le développement peuvent modifier le développement des cellules souches neurales et des progéniteurs embryonnaires des neurones et induire ainsi une modification des réseaux neuronaux à l'âge adulte.

Le rôle des récepteurs des œstrogènes dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales a déjà été mis en évidence (Brannvall et al., 2002). Les œstrogènes sont capables de moduler la mitose et l'apoptose des neurones immatures dans le cortex cérébral (Wong et al., 2003). Chez l'adulte, le rôle neuroprotecteur et anti-inflammatoire de l'E2 synthétisé dans le cerveau est bien établi (Zhang et al., 2014). Un traitement à l'E2 sur des cultures hypothalamiques de fœtus de rat induit un effet neurotrophique dans l'APO-NSD (Chowen et al., 1992). L'œstradiol périnatal joue aussi un rôle clé en modulant l'apoptose par la voie des caspases dans différentes régions du

cerveau chez les mâles et les femelles, induisant ainsi un dimorphisme sexuel à l'âge adulte (Tsukahara et al., 2006b). *In vitro,* l'EE2 est capable de prévenir la neurotoxicité induite par le glutamate sur des neurones adultes en culture primaire (Behl et al., 1997). L'ensemble de ces études met en évidence le rôle neuroprotecteur et neurotrophique des œstrogènes pendant le développement qui pourraient contribuer à la mise en place des dimorphismes sexuels fonctionnels chez l'adulte.

La présence de l'EE2 dans l'environnement implique une exposition continue, pendant de longues périodes à cette molécule. Le but de cette étude est de tester *in vitro* l'effet d'un traitement chronique à l'EE2 sur le développement des cellules souches neurales d'embryons de souris. L'EE2 étant un agoniste 100 fois plus puissant des récepteurs des œstrogènes que l'E2 (Dickson and Eisenfeld, 1981cité dans Stanczyk et al, 2013), il serait capable d'induire des effets similaires à ceux induits par l'E2. Nous suggérons que l'EE2 serait capable de moduler la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires, et pourrait être à l'origine des modifications neuroanatomiques observées chez les animaux traités *in vivo*. De plus, la complexité anatomique et fonctionnelle des différentes régions du cerveau suggère que la sensibilité des différentes régions du cerveau ne se serait pas identique à une même molécule. Pour tester ces hypothèses, nous avons utilisé des cellules souches neurales en culture, la « culture de neurosphères », issues d'embryons de souris à 14 jours de développement, prélevées à partir de deux régions, le striatum et le diencéphale, et sélectionnées selon la méthode décrite par Reynolds et al. (1992). Nous avons comparé les effets de l'EE2 et de l'E2 sur la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la division cellulaires pour déterminer le potentiel effet perturbateur voire neurotoxique de l'EE2 pendant le développement sur ces deux différentes régions du cerveau.

B- Matériel et méthodes

1- Cultures

Vingt embryons (mâles et femelles) de souris SWISS au stade 14,5 jours de développement embryonnaire (E14,5) ont été obtenus à partir de deux mères gestantes. Les embryons ont été disséqués dans du HBSS (Ham's Buffer Saline Solution), les striata ou les diencéphales de chaque embryon ont été prélevés séparément, poolés (pools de striata ou pools de diencéphales) puis dissociés à l'aide d'une micropipette puis d'une seringue et aiguille 25 G jusqu'à obtention d'une suspension de cellules individualisées.

Les cellules issues de pools de striata ou de pools de diencéphales ont été mises en culture dans du milieu *M* composé de DMEM/F12 + L-glutamine (Dulbecco's modified Eagle Medium) (GIBCO-21041-025), supplémenté par du B-27 (GIBCO-12587-010) 1:50, de Streptomycine/Pénicilline (GIBCO-15070) 1:100, d'insuline (SIGMA-1882) 1:100, de glucose 1:100 et du facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) (INVITROGEN-S3003-018) à 20 ng/mL. Les cellules ont été ensemencées en conditions de prolifération pendant 4 jours à une densité de 5000 cellules/cm^3 dans des boîtes 24 puits à faible pouvoir adhésif et incubées à 37°C et 95% de CO_2.

Après 4 jours de prolifération, des neurosphères flottantes étaient observées dans le milieu. Les cellules ont été dissociées par un traitement au Triple Express (incubation 20 minutes à 37°C) puis par trituration mécanique pour compléter la dissociation. Les cellules ont été centrifugées à 75g puis resuspendues dans du milieu *M* et le nombre de cellules vivantes a été estimé par une coloration au bleu de Trypan (GIBCO) et un comptage sous microscope (NIKON). Les cellules ont été remises en culture en condition de prolifération (Milieu *M* + EGF 20 ng/ml) pour générer des neurosphères secondaires **(Figure 25)**.

Cette opération a été répétée pour générer les neurosphères des passages suivants jusqu'au 12ème passage (Neurosphères 13).

Différenciation des cellules : Après 4 jours de prolifération, une partie des cellules a été mise en culture sur des lamelles en verre stériles traitées à la poly-L-ornithine (SIGMA-P4957) et à la laminine (SIGMA-L2020) dans des boîtes de 24 puits, dans le milieu de culture *M* sans supplémentation par le facteur de croissance EGF. Dans ces conditions, les cellules adhèrent au support de verre et se différencient en lignage neuronal ou glial. Elles ont été maintenues en différenciation pendant 21 jours (21DIV). La moitié du milieu était renouvelée tous les trois jours **(Figure 25)**. Différentes analyses ont été effectuées sur des cellules en différenciation après fixation à 7, 14 ou 21 jours de différenciation (7, 14 ou 21 DIV).

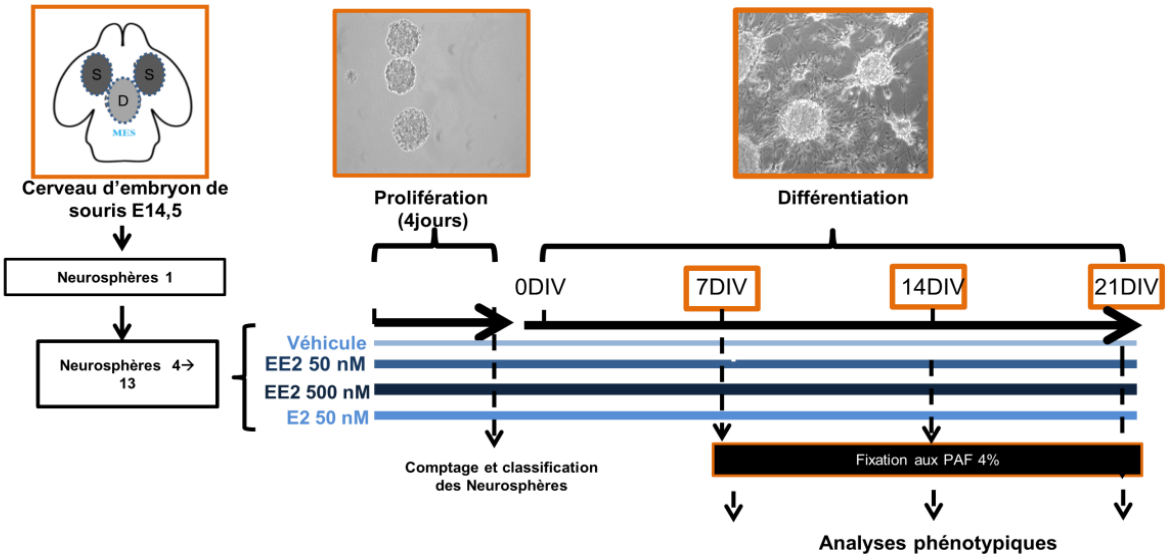


Figure 25: Protocole expérimental de culture de cellules souches embryonnaires de souris :

Les striata ou les diencéphales ont été disséqués à partir de cerveaux embryonnaires (20 embryons mâles et femelles) au stade 14,5 de développement et mis en culture en présence de facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) pendant 4 jours. Les neurosphères 1 (primaires) ont été dissociées et remises en cultures pour générer les neurosphères secondaires puis tertiaires, etc. A partir des neurosphères 4, les cellules ont été mises en différenciation pendant 21 jours. Les analyses phénotypiques ont été réalisées après fixation des cellules au paraformaldéhyde (PFA 4%) à 7, 14 ou 21 jours de développement *in vitro* (DIV), 0 DIV étant le premier jour de mise en culture. Les deux types de de cellules souches (striata et diencéphales) ont été générés et analysés parallèlement et comparés dans les différentes conditions de traitement. S : striatum, D : diencéphale, E : stade embryonnaire, EE2 : 17α-éthinylœstradiol, E2 : 17β-œstradiol, DIV : différenciation *in vitro*. PAF : paraformaldéhyde.

2- Traitements

Quatre conditions de traitement ont été mises en place : deux doses de traitement au 17α-éthinylœstradiol (EE2) (SIGMA-E4876) à 50 ou 500 nM (dilué dans l'éthanol pur en concentration 0.1% finale dans le milieu de culture) dans le milieu *M* + EGF ; une condition de traitement au 17β–œstradiol (E2) (SIGMA-E2758) à 50 nM dans le milieu *M* + EGF ; enfin, une condition contrôle où le milieu *M* + EGF était supplémenté de 0.1% d'éthanol. Les traitements ont été appliqués sur des cellules en prolifération à partir du passage 3 dès le premier jour de la mise en culture. Pour mimer une exposition

chronique, les cellules ont été maintenues en continu, pendant toutes les phases de développement en condition contrôle ou en présence de l'EE2 ou l'E2 **(Figure 25)**

3- *Analyse de la prolifération des neurosphères*

Pour chaque condition, trois puits de cultures issus du passage 4 jusqu'au passage 10 ont été analysés. Après quatre jours de culture en conditions de prolifération, le contenu de chaque puits a été pris en photo (microscope NIKON, équipé d'une caméra CCD (Qimaging). Les neurosphères formées ont été comptées, le diamètre a été mesuré et une classification des neurosphères a été réalisée pour chaque condition expérimentale. Les neurosphères ont été classées en fonction du diamètre : petites (diamètre entre 10 et 50 µm), moyennes (entre 50 et 100 µm) et grosses (diamètre supérieur à 100 µm). Le nombre de neurosphères pour chaque classe ainsi que le nombre total (somme de toutes les classes de tailles) ont été comparés entre les différentes conditions de cultures pour les deux types cellulaires (striata et diencéphales).

4- *Evaluation de l'apoptose*

L'apoptose a été évaluée sur des cultures fixées à 7 DIV par la méthode TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase (**T**dT)-mediated biotin-16-d**U**TP **N**ick-end **L**abelling). Cette méthode permet de marquer les cassures d'ADN dans les cellules qui s'engagent dans une voie d'apoptose. Pour fixer les cellules, le milieu de culture a été retiré, les cellules ont été rincées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixées avec du PBS et 4% paraformaldéhyde pendant 20 minutes. Les cellules ont été rincées par 3 bains de PBS puis marquées en TUNEL. Les marquages ont été réalisés avec un kit commercial « *In situ Cell Death Detection Kit 12 156 792 910*» (Roche Diagnostics USA), en suivant les instructions du fabricant pour les marquages en culture cellulaire. Brièvement, les cellules ont été incubées dans la solution de blocage pendant 10 minutes puis rincées au PBS (2X 5minutes), puis incubées dans la solution de marquage préparée extemporanément à 37°C pendant une heure en milieu humide. A la fin de l'incubation, les cellules ont été rincées 3X 5 minutes en PBS et incubées dans une solution de DAPI pour marquer les noyaux. Les cellules ont été montées entre lame et lamelle avec du Fluoromount-G® (SouthernBiotech). Une condition de témoin positif a été réalisée sur trois puits incubés avec de la DNase (Roche-N°04536282001) pendant 10 minutes avant la réaction de marquage. Pour vérifier la spécificité de la réaction, trois

puits de cellules ont été incubés dans la solution 1 du kit, non mélangée à la solution 2 (témoin négatif).

5- *Caractérisation phénotypique par immunohistochimie*

Les cellules en différenciation ont été fixées à 7, 14 ou 21 DIV. Le milieu de culture a été retiré, les cellules ont été rincées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et fixées avec du PBS et 4% paraformaldéhyde pendant 20 minutes. Les cellules ont été rincées par 3 bains de PBS et stockées à 4°C dans un milieu cryoprotecteur jusqu'à procéder à l'immunohistochimie.

L'immunomarquage a été réalisé sur les cultures pour détecter les antigènes βIII-tubuline (marqueur neuronal), GFAP (marqueur des cellules gliales et glie) et Ki-67 (marqueur de prolifération cellulaire). Le milieu cryoprotecteur a été aspiré, les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS. Le marquage Ki-67 nucléaire nécessite un démasquage de l'antigène pour une détection optimale. Les cellules ont été incubées dans un tampon de démasquage Sodium Citrate 10 mM, 0,1% triton 100X pH 6,0 pendant 10 minutes à 55°C. Les cellules ont été rincées dans du PBS puis incubées dans du PBS supplémenté de 5% de sérum normal de mouton (SNM) pendant une heure à température ambiante (20°C), puis dans la solution d'anticorps primaires **(Tableau 6)** dilués dans du PBS-SNM (10%) pendant la nuit à 4°C sous agitation. Les cultures ont été rincées dans du PBS puis incubées dans la solution d'anticorps secondaires dilués dans du PBS-SNM (10%). Enfin les noyaux ont été colorés au DAPI (2 minutes), les lames ont été rincées dans l'H_2O et montées sur une lame avec du Fluoromount G® (SouthernBiotech).

Tableau 6: Anticorps utilisés pour la caractérisation phénotypique des cellules.

Anticorps primaire	**Dilution (Référence)**	**Anticorps secondaire**	**Dilution (Référence)**
IgY (poulet) polyclonal anti BIII-tubulin	1/500ème (MILLIPORE-AB9354)	IgG chèvre anti IgY poulet couplé à un Alexa Fluor 546	1/500ème (Molecular probes)
IgG lapin polyclonal anti GFAP (Glial fibrillary acid Protein)	1/500ème (DAKO-Z0334)	IgG chèvre anti IgG lapin couplé à un Alexa Fluor 633	1/500ème Molecular probes)

IgG1 souris anti Ki-67 humain)	1/50ème (BD PHARMINGEN™ 550609)	IgG chèvre anti IgG souris couplé à un Alexa Fluor 488	1/500ème Molecular probes)

6- Analyse des marquages :

Les marquages TUNEL et Ki-67 ont été quantifiés sur des images prises au microscope Confocal LSM 700 (Zeiss) piloté par le logiciel d'acquisition d'images Zen®. Des acquisitions au grossissement X20 en *tile scan* (4 images adjacentes montées automatiquement en mosaïque par le logiciel) (1024x1024 pixels) et en Z stack (résolution en Z =1µm) ont été réalisées sur chaque culture.

La quantification a été réalisée sur ces images à l'aide du logiciel d'analyse Image J (NIH-USA). Pour chaque image, le marquage DAPI a été soumis à un seuillage X permettant de visualiser clairement les noyaux colorés au DAPI et d'éliminer le bruit de fond. L'image a ensuite été transformée en matrice binaire **(Figure 26)**. L'analyse quantitative des marquages TUNEL et Ki-67 a été effectuée à l'aide de la fonction « *Cell counter* » du logiciel ImageJ qui permet de compter le nombre de cellules dans chaque champs analysé. Pour chaque puits, deux mosaïques de quatre images contenant au moins 400 noyaux DAPI chacune ont été analysées. Les cellules analysées sont issues de sept passages différents (N=7, passages 4 à 10) pour le Ki-67 et de trois passages pour le TUNEL (N=3, passages 11 à 13) par condition de culture. Pour chaque passage, 3 puits x 2 mosaïques de 4 images par puits ont été analysés. Un pourcentage de marquage TUNEL ou Ki-67 rapporté au nombre de noyaux par champs analysé et par puits a été obtenu pour chacun des marqueurs.

Les analyses des marquages βIII-tubuline et GFAP ont été effectuées sur des images prises par la même méthode que celle décrite ci-dessus. La quantification a été réalisée par la mesure de surface de marquage à l'aide du logiciel ImageJ. Brièvement, après avoir appliqué un seuil de détection permettant de visualiser clairement le marquage DAPI des cellules analysées, ce même seuil a été appliqué pour les marquages βIII-tubuline et GFAP quantifiés. Ce seuil était défini pour chaque image en fonction de l'intensité du marquage DAPI. L'image était ensuite transformée en matrice binaire et la surface du marquage a été calculée automatiquement à l'aide de la fonction « analyse Particle » du logiciel ImageJ. Le rapport surface du marquage sur surface du

DAPI a été calculé pour les deux marqueurs. Le rapport surface βIII-tubuline sur surface GFAP a été comparé entre les différentes conditions de culture.

7- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad 5 (GraphPad Software, Inc. CA). La normalité des distributions et l'homogénéité des variances ont été vérifiées par le test de Shapiro-Wilk et par le test Bartlett respectivement. Si les conditions de normalité et d'homologie des variances étaient vérifiées, une One-way ANOVA était appliquée pour comparer les conditions. Dans ce cas-là, les comparaisons deux à deux étaient réalisées par un test de Tukey. Si une des deux conditions n'était pas vérifiée, un test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn pour les comparaisons deux à deux étaient appliqués. Une ANOVA à deux facteurs (Two-way ANOVA) avec un post-test de Bonferroni ont été appliqués pour comparer l'effet traitement en interaction avec un autre facteur (catégorie de taille, stade de développement). Les résultats sont présentés en histogrammes des moyennes ± écart standard à la moyenne (SEM).

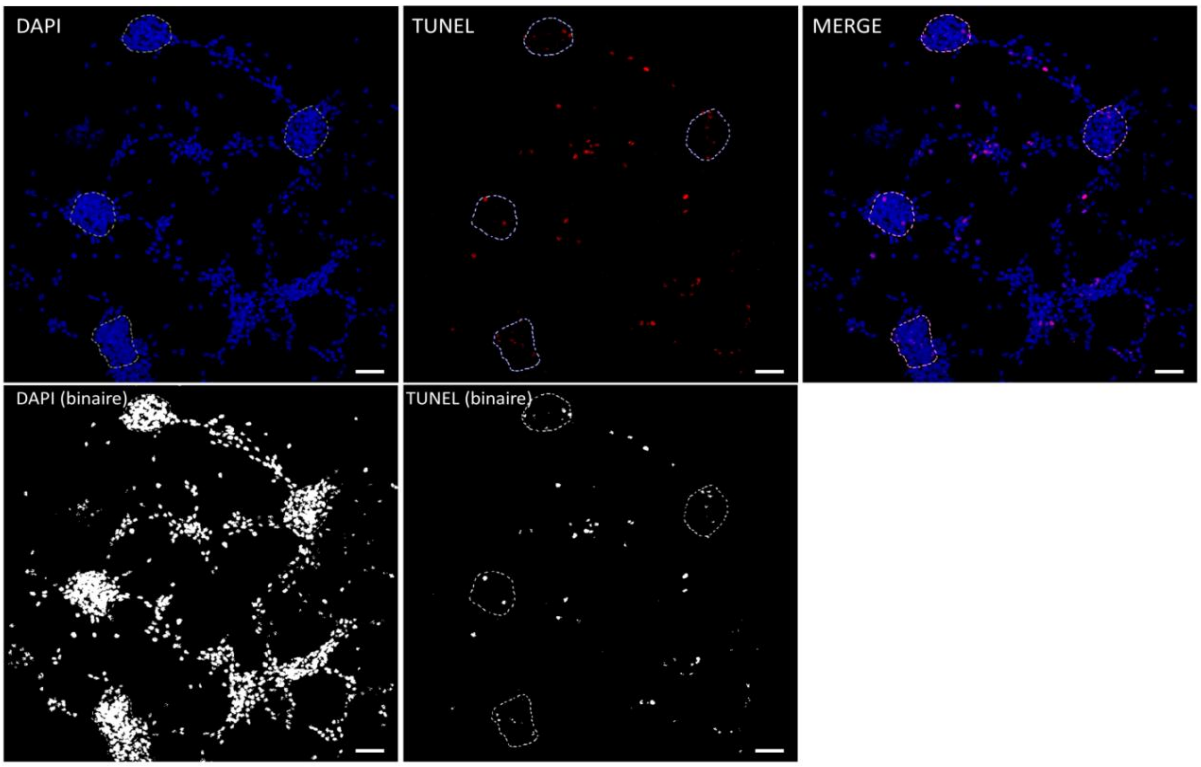


Figure 26 : Photographies en microscopie confocale d'un marquage TUNEL (vert) colocalisé avec un marquage DAPI (bleu).

En MERGE, les deux marquages sont superposés et montrent la localisation nucléaire du marquage TUNEL. Les délimitations en pointillés désignent la limite des neurosphères autour desquelles les comptages ont été réalisés. Le panel du bas montre les images du haut transformées en matrices binaires obtenues à partir des photographies confocales présentées dans le premier panel. Chaque point blanc est compté comme noyau sur les images DAPI et comme un noyau TUNEL positif sur les images TUNEL. Barre d'échelle = 50 µm.

C- Résultats

1- Prolifération des neurosphères

La comparaison du nombre de neurosphères formées après quatre jours de cultures entre les différentes conditions de cultures, issues de striata ou de diencéphales, ne montre aucune différence significative ni sur le nombre en fonction de la classe de taille **(Figure 27A)**, ni sur le nombre total **(Figure 27B)** entre les cultures contrôles et les

cultures traitées à l'EE2 et à l'E2. Le traitement semble ne pas agir sur la prolifération des cellules souches neurales quelle que soit leur origine (striatum ou diencéphale).

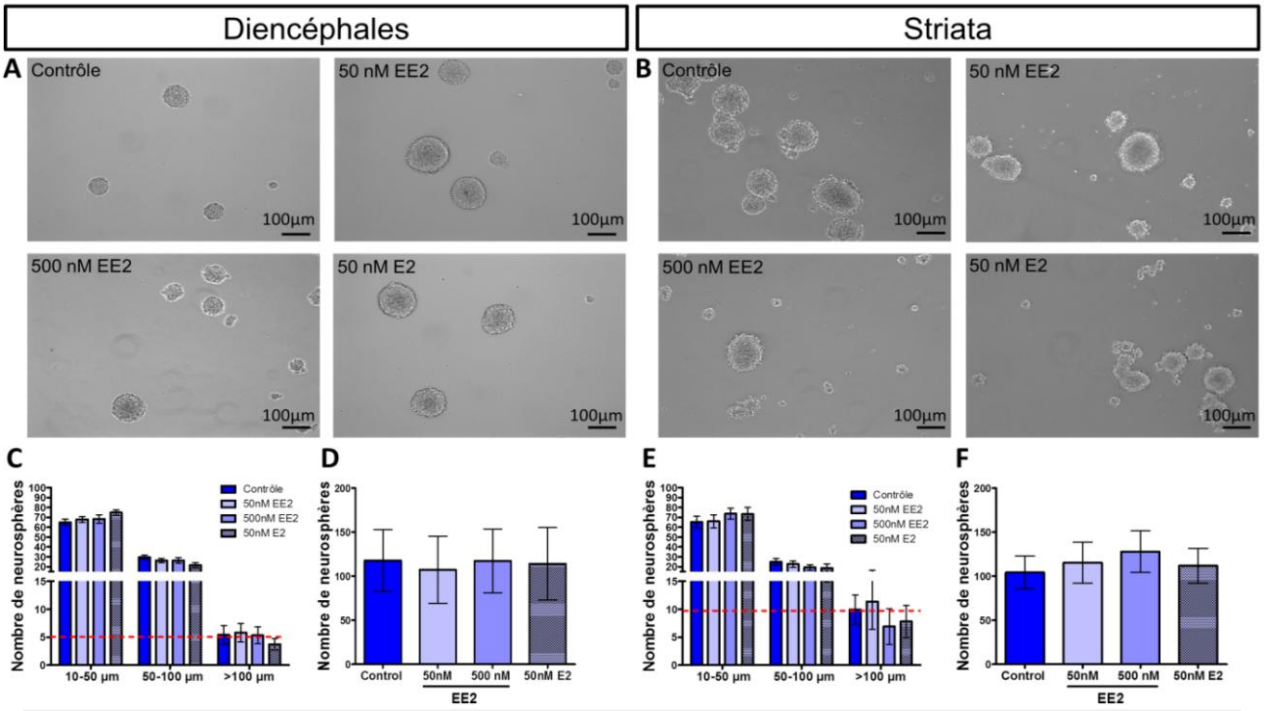


Figure 27 Comptage et classification des neurosphères après quatre jours de croissance en présence d'EGF

A, B) Photographies prises en microscopie optique des neurosphères formées à partir de cellules issues de diencéphales **(A)** ou de striata **(B)** dans les différentes conditions de cultures. **C-E)** Classification et comptage des neurosphères. Les comparaisons par Two-way ANOVA **(C,E)** ou One-way ANOVA ne montrent aucune différence significative entre les lots dans les deux types cellulaires. **D-F)** Le nombre total de neurosphères formées ne varie pas en fonction du traitement.

2- *Apoptose des cellules en différenciation*

Le taux d'apoptose a été évalué à 7DIV de différenciation sur les progéniteurs issus de diencéphales et de striata **(Figure 28)**. Sur les progéniteurs diencéphaliques, le taux d'apoptose a été significativement augmenté de 10,62±1,33% en condition contrôle à 22,19±1,56% à la condition traitée à 500nM à l'EE2 (Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn, *p-value* <0,05). Ce taux reste sensiblement identique en condition traitée à 50nM d'EE2 et d'E2. Les progéniteurs issus de striata semblent être plus sensibles au traitement à l'EE2, puisque dès la dose de 50nM on constate une

augmentation significative de l'apoptose à un taux qui se situe autour de 12% alors qu'en condition contrôle ce taux était inférieur à 5%. Cet effet s'accentue à la dose de 500nM pour atteindre un taux autour de 19% qui représentant quatre fois plus d'apoptose par rapport au contrôle (Kruskal-Wallis, *p-value*=0.0003). L'E2 n'induit pas de variation significative du taux d'apoptose à 50nM.

Par ailleurs, en condition contrôle, si on compare le taux d'apoptose des progéniteurs issus de diencéphales et de striata, on constate que ce taux est deux fois plus élevé dans les progéniteurs diencéphaliques (10,62±1,33%) comparés aux progéniteurs du striatum (4,45±0,50%). Cette observation suggère une différence de comportement entre les progéniteurs de ces deux régions du cerveau et témoigne de l'importance de ce paramètre qu'il faudrait prendre en compte lors de l'interprétation des résultats.

3- Division des cellules en différenciation

Pour évaluer l'effet de l'EE2 dans le temps sur la division cellulaire des progéniteurs neuronaux ou gliaux, différents temps de différenciation ont été analysés (7, 14 et 21DIV), pour la présence la protéine nucléaire Ki-67 qui est exprimée par toutes les cellules pré-mitotiques, qui sont capables de se diviser pour donner des cellules filles **(Figure 29)**. En condition contrôle, 13,11±2,12% en moyenne des cellules issues de diencéphales étaient prémitotiques à 7DIV.

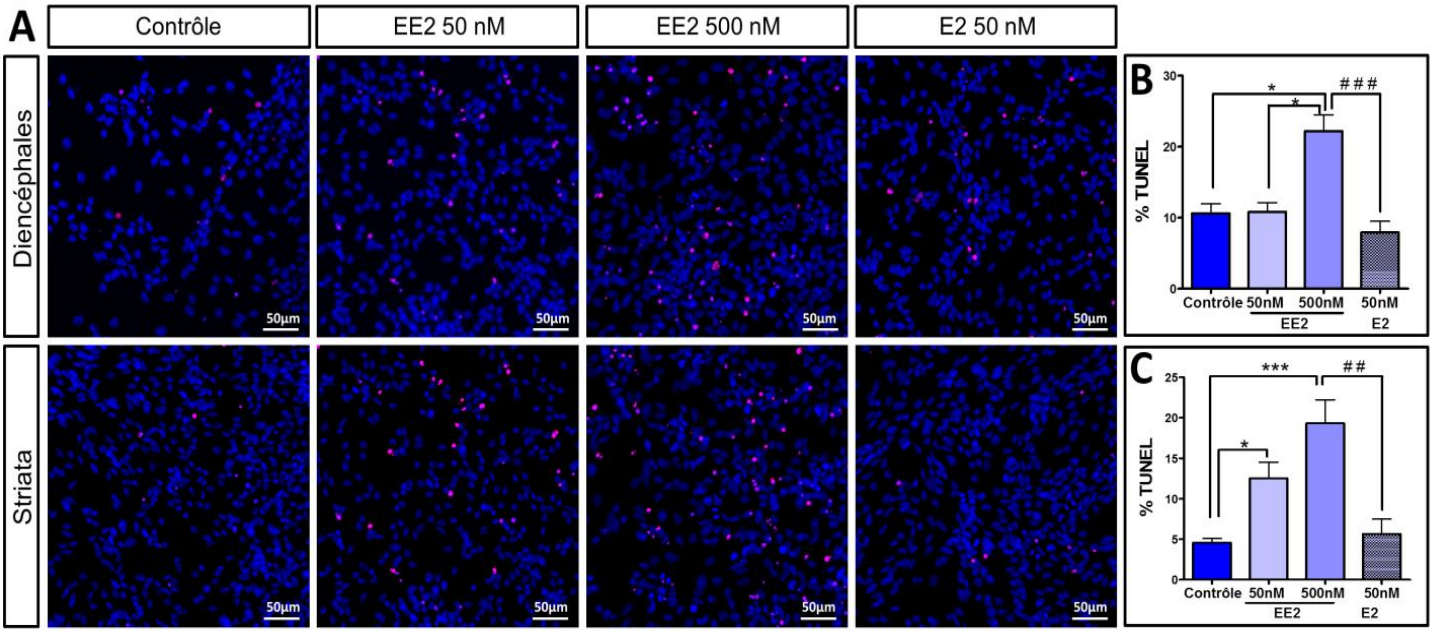


Figure 28 : Effet de l'EE2 sur l'apoptose pendant la différenciation des progéniteurs neuraux de diencéphale et de striata.

A) Illustration des marquages TUNEL (rouge) colocalisés avec les noyaux (rouge) dans les quatre conditions de culture. **B-C)** Les comptages du nombre de noyaux TUNEL positifs sont exprimés en pourcentages de noyaux marqués par rapport au nombre total de noyaux par champs analysé. Test de Kruskal-Wallis suivi d'une analyse par le test de Dunn pour les comparaisons multiples, **p-value<0,05,* ****p-value<0,001,* ###*p-value<0,001.*

Ce taux ne varie pas significativement en condition de traitement à l'E2 et à l'EE2 à la dose de 50nM mais augmente d'une manière significative à 500nM d'EE2 (25,16±3,49%) (Bonferroni posttest, *p-value* <0,001). Au-delà de 7 DIV, le taux de cellules en division descend en dessous de 1% sauf à 14DIV en condition EE2 à 500nM où le pourcentage de noyaux Ki-67 positifs était autour de 4,34±2,96%, mais ne varie pas significativement par rapport au contrôle (Bonferroni post-test, *p-value* > 0,05). Le pourcentage de cellules Ki-67 positives est de 20,32±3,58 en condition contrôle et augmente significativement et de manière dose dépendante par le traitement à l'EE2 aux doses de 50 et 500nM à 27,41 ±1,8% et à 37,49 ±3,51% respectivement (One-way ANOVA, *p-value*=0,03) **(Figure 29A, 29C)**. L'E2 à 50nM induit une augmentation significative (29,1±5,4%) (*p-value* <0.05).

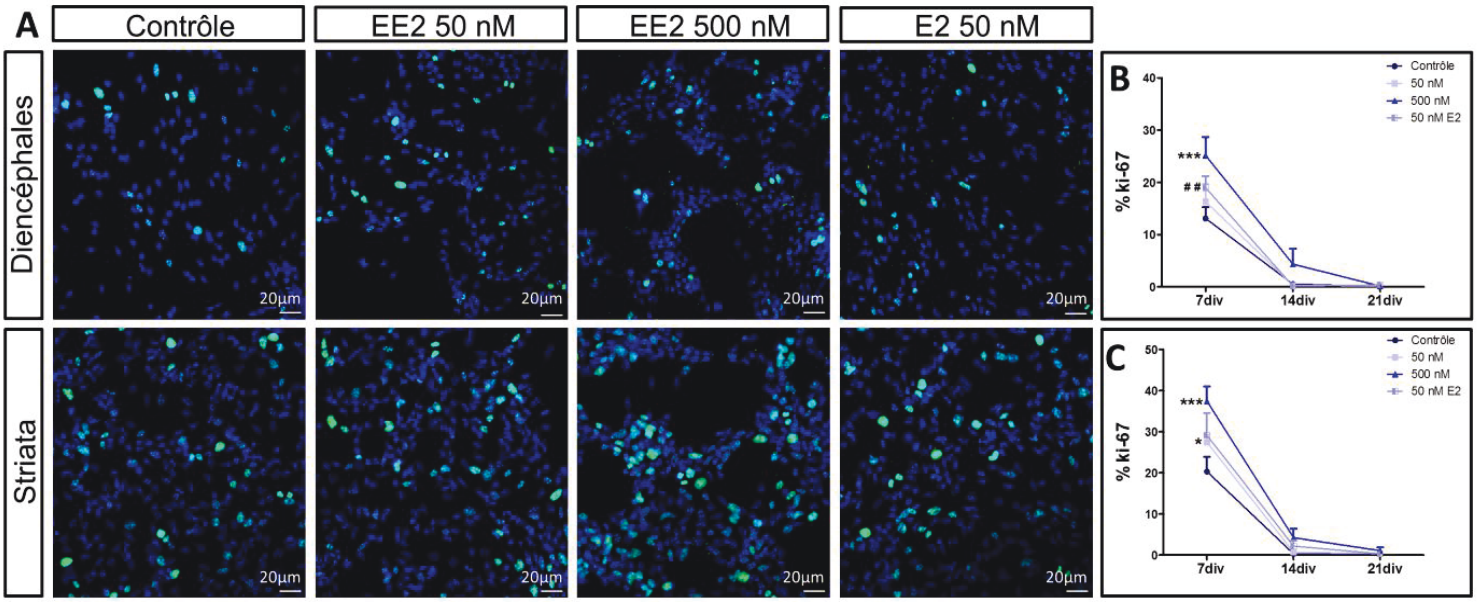


Figure 29 : Effet de l'EE2 sur la division cellulaire pendant la différenciation des progéniteurs neuraux de diencéphale et de striata.

A) Illustration des marquages Ki-67 (vert) colocalisés avec les noyaux (bleu) dans les quatre conditions de culture. **B-C)** Les comptages du nombre de noyaux Ki-67 positifs sont exprimés en pourcentages de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux total par champs analysé pour chaque stade de développement. Test de Kruskal-Wallis suivi d'une analyse par le test de Dunn pour les comparaisons multiples, *p-value<0,05*, ***p-value<0,001*, ##p-value<0,01*. 7,14 et 21DIV : Nombre de jours après la mise en différenciation.

4- Phénotypes des cellules différenciées

La quantification de la surface des marquages neuronal et glial, sur les cellules différenciées à différents stades de différenciation a été réalisée sur les cellules qui tapissent la surface de migration autour des neurosphères qui ont adhéré au support de migration. En condition contrôle, à 7DIV, les cellules issues de diencéphales et de striata sont immunoréactives pour le marqueur βIII-tubuline spécifique aux progéniteurs neuronaux et aux neurones matures. Très peu de marquage GFAP a été détecté à ce stade de différenciation **(Figure 30)**. Le marquage GFAP à 7DIV est essentiellement localisé dans les sphères et se caractérise par un marquage filamenteux en forme radiale qui se prolonge vers l'extérieur de la sphère (**Figure 31)**. A 14DIV le marquage GFAP

est détecté fortement dans toute la surface de migration autour des neurosphères, il marque de longs prolongements filamenteux et quelques cellules ont une forme stellaire caractéristique des astrocytes. A 21DIV, la majorité des cellules GFAP positives se sont individualisées et la surface du marquage devient majoritaire dans les cultures des deux types cellulaires **(Figure 30)**.

Le marquage βIII-tubuline semble diminuer au cours du temps **(Figure 30)**, la forme des cellules devient plus caractéristique des interneurones (forme bipolaire) **(Figure 32)**.

Dans nos conditions de culture, la dynamique de différenciation des progéniteurs issus de diencéphales et de striata en lignage neuronal (βIII-tubuline) et en lignage glial (GFAP) ne varie pas significativement entre les deux types de progéniteurs. Les courbes de différenciation en fonction du stade ne varient pas significativement **(Figure 30)**. En effet, dans les deux types cellulaires, la surface du marquage βIII-tubuline diminue dans le temps et la surface du marquage GFAP augmente suivant des courbes inversement proportionnelles.

5- *Effet du traitement à l'EE2 sur la différenciation cellulaire*

Dans les cultures de diencéphales, la surface de marquage βIII-tubuline à la plus forte dose d'EE2 était nettement plus importante après 7 jours de différenciation, comparée à la surface de ce marquage en condition contrôle (**Figure 33, 34**). L'EE2 et l'E2 à 50nM n'ont pas d'effet significatif **(Figure 34)** (Bonferroni posttest, *p-value* >0,05). A 14 et 21DIV de différenciation, la surface du marquage immunoréactif pour la βIII-tubuline ne varie pas significativement en fonction du traitement (*p-value* >0,05). Le marquage βIII-tubuline dans les cultures issues de striata ne présente pas de différence significative à 7 DIV mais diminue significativement à 14DIV dans le lot de cultures traitées à 50nM d'EE2 (Bonferroni posttest, *p-value* < 0,05) mais pas à 500nM. A 21DIV, comme pour les cultures de diencéphale, aucune différence de surface βIII-tubuline immunoréactive n'a été observée.

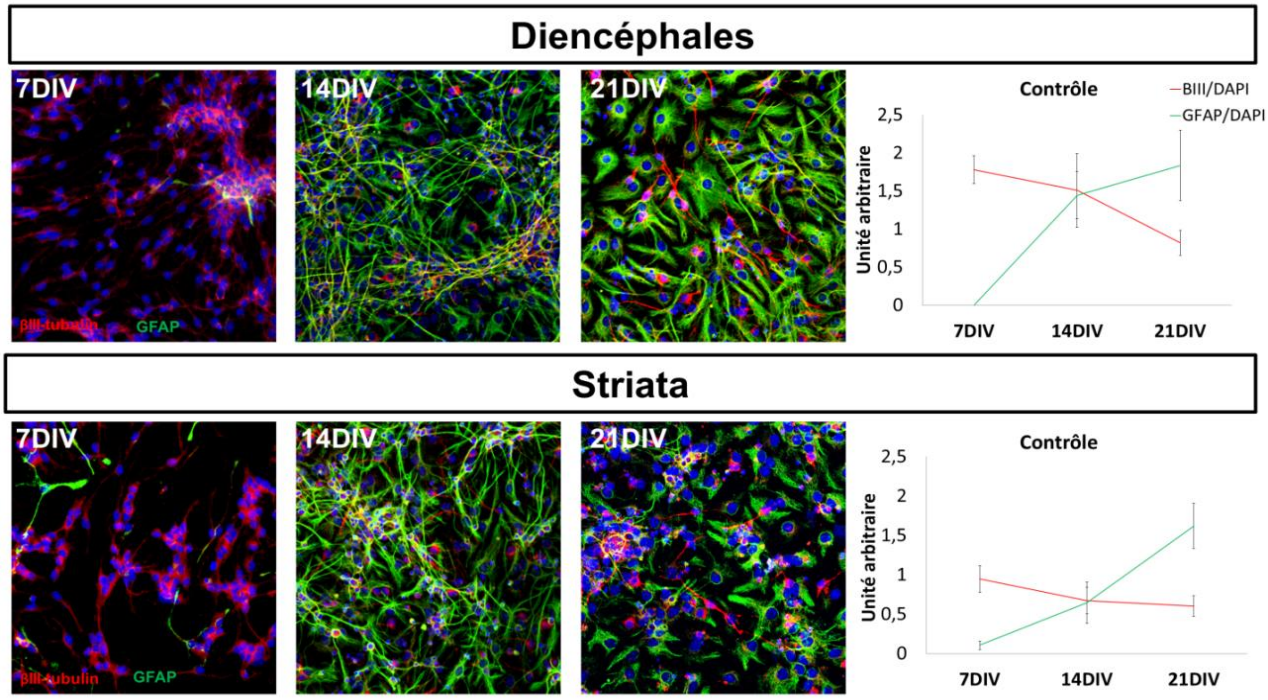


Figure 30 : Phénotype des cellules en différenciation à 7, 14 et 21DIV

Les photographies montrent les résultats des marquages par immunocytochimie βIII-tubuline (lignage neuronal-rouge) et GFAP (lignage glial-vert) sur des cultures issues de diencéphales ou de striata en condition contrôle. Les marquages ont été quantifiés (représentations graphiques) par la mesure des surfaces de chaque marqueur, rapportée à la surface du marqueur nucléaire DAPI (bleu).

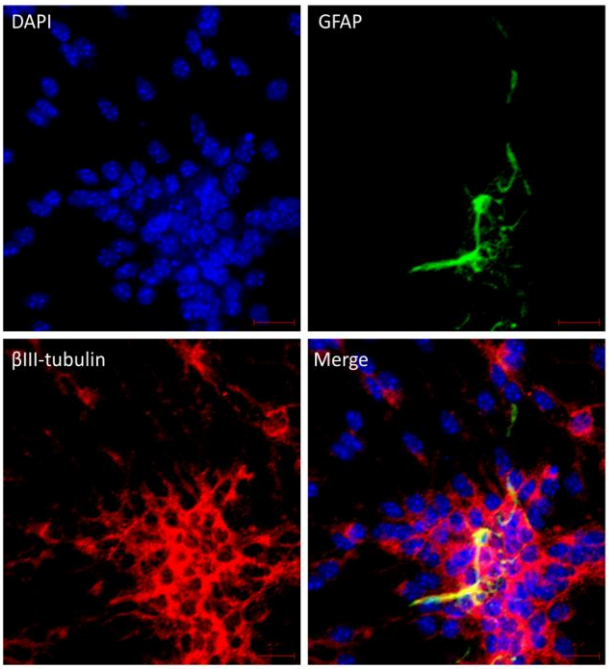


Figure 31 : Double marquage βIII-tubuline, GFAP à 7DIV en condition contrôle

A ce stade le marquage GFAP (vert) est localisé essentiellement dans la neurosphère et émet quelques prolongements filamenteux à l'extérieur de la masse sphérique. Le marquage βIII-tubuline est très intense dans la neuroshère et plusieurs cellules sont βIII-tubuline positives en dehors de la sphère. Barre d'échelle = 20 µm.

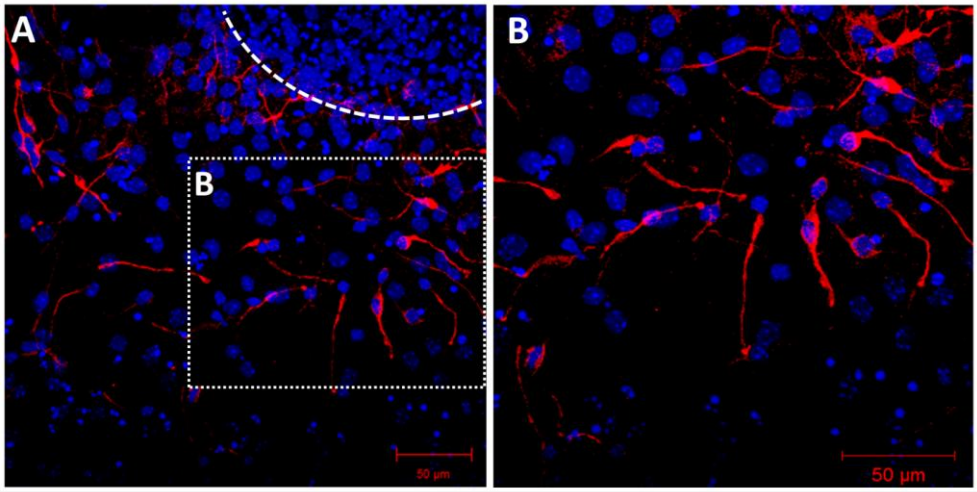


Figure 32 : Photographies confocales montrant la morphologie des cellules βIII-tubuline immunoréactives à 21DIV en condition contrôle

A) Les pointillés en demi-cercle désignent la limite de la neurosphère marquée au DAPI (bleu). Les cellules βIII-tubuline (rouge) présentent des prolongements uni ou bipolaires. L'encadré en pointillés **(B)** est zoomé dans l'image de droite.

Le marquage GFAP est très faiblement détecté à 7DIV dans toutes les conditions de culture. À 14DIV, les cellules issues de diencéphales traitées à l'E2 et aux deux doses d'EE2 présentent une augmentation significative de l'immunoréactivité GFAP (**Figure 34-35**). À 21DIV cette différence n'a pas été détectée. Dans les cellules du striata, la GFAP ne varie pas significativement entre les différents traitements, quel que soit le stade d'analyse.

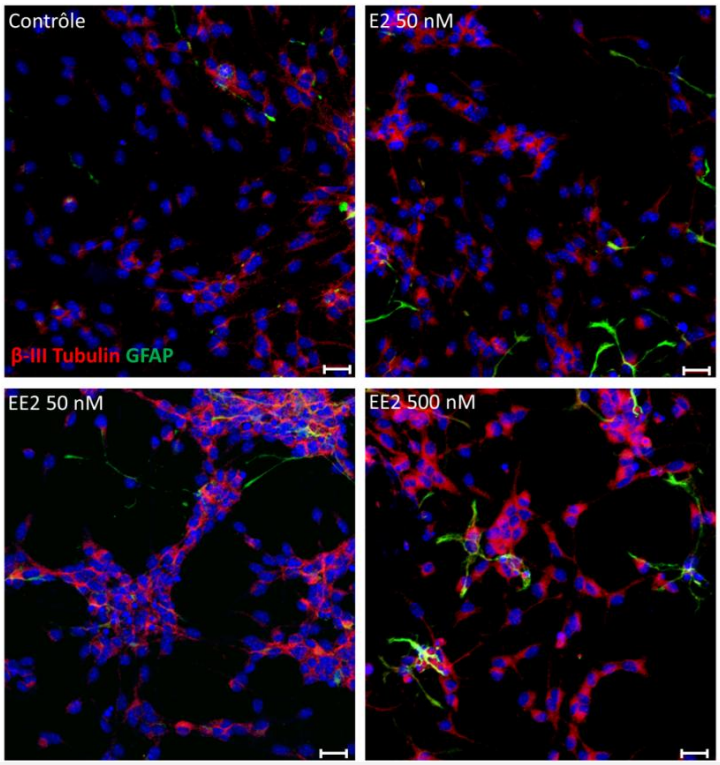


Figure 33: Photographies confocales de cultures de diencéphale à 7DIV dans les différentes conditions de culture.

La majorité des cellules expriment le marqueur βIII-tubuline (rouge) à 7DIV. A 500 nM d'EE2 le marquage semble plus étendu et occupe une surface plus importante dans le cytoplasme des cellules. Le marquage GFAP (vert) est faiblement exprimé à 7DIV dans toutes les conditions. Barre d'échelle=20µm.

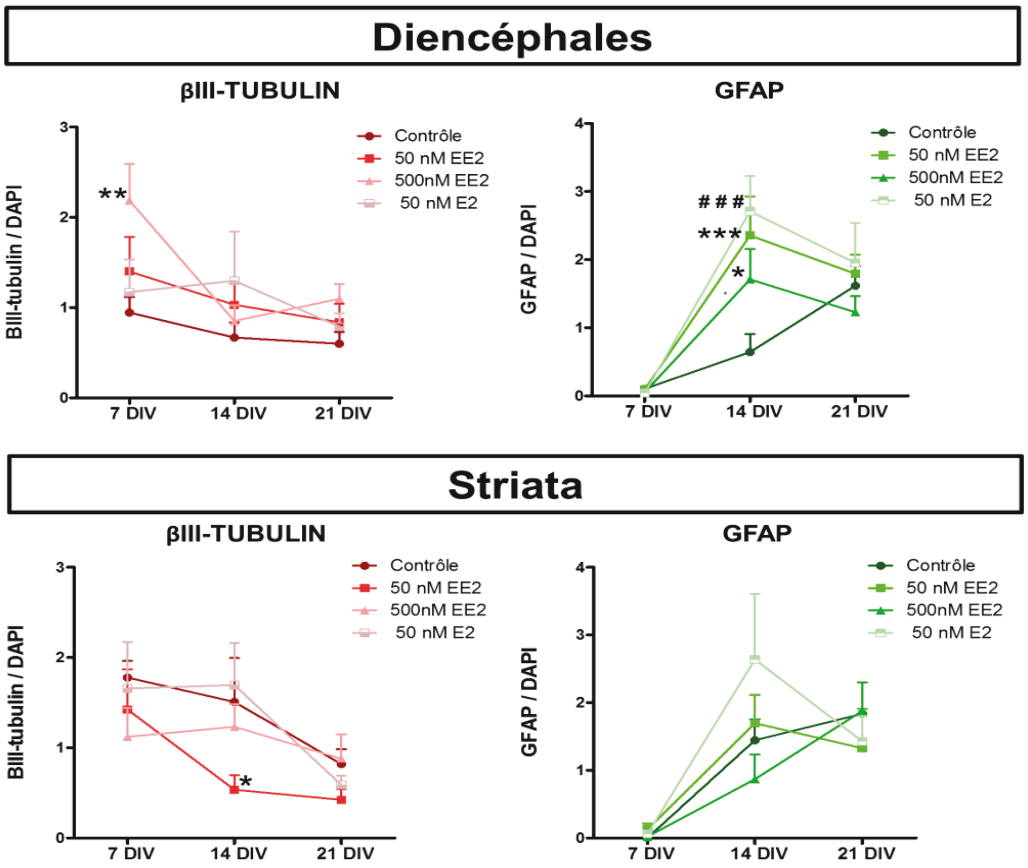


Figure 34 Effet de l'EE2 sur la différenciation cellulaire à différents stades de développement.

Les surfaces des marqueurs βIII-tubuline ou GFAP ont été rapportées à la surface du marqueur DAPI. Les analyses statistiques : two-way ANOVA suivie d'une analyse par le test de Bonferroni pour les comparaisons multiples, *p-value<0,05, ***p-value<0,001, ##p-value<0,01.* 7,14 et 21DIV : Nombre de jours après la mise en différenciation.

D- Discussion

Dans cette étude nous, avons généré des cellules souches à partir de tissu de diencéphale ou de striata d'embryons de souris à 14,5 jours de développement (20 embryons issus de 2 portées). Les cellules souches obtenues, lorsqu'elles sont maintenues en conditions clonales, sur un support peu adhésif et en présence du facteur de croissance EGF, sont capables de se diviser de manière continue et former des neurosphères flottantes qui se développent et génèrent des neurosphères de différentes tailles. La dissociation des neurosphères entretenues en condition contrôle nous a permis de purifier et de générer une lignée de cellules souches sur laquelle nous avons appliqué les traitements. Les différentes conditions de culture, contrôle, traitement à l'EE2 (50 et 500nM) et traitement à l'E2 (50nM) appliqués sur des cellules obtenues à partir du troisième passage. Les deux premiers passages ont servi à éliminer les progéniteurs et les cellules différenciées afin d'isoler uniquement les cellules souches.

Nos résultats montrent que le traitement chronique à l'EE2 (50 et 500nM) des cultures de cellules souches embryonnaires de souris de 14,5 n'a pas d'effet sur la prolifération et la croissance des neurosphères formées après quatre jours de culture en condition clonale.

Nous avons évalué le taux d'apoptose après 7 jours de mise en différenciation. Une augmentation du taux d'apoptose à la forte dose d'EE2 (500nM) dans les cultures issues de striata et de diencéphale et une augmentation significative de l'apoptose dès la dose faible d'EE2 dans les cellules issues de striata ont été observées. L'E2 (50nM) n'induit aucun effet pro-apoptotique, quelle que soit l'origine des cellules souches (striata ou diencéphale). L'évaluation du taux de division cellulaire à différents stades de différenciation montre que le pourcentage de cellules pré-mitotiques (Ki-67 positives) issues du diencéphale est significativement plus élevé à la dose forte (500nM) mais pas à la dose faible d'EE2 (50nM), après 7 jours de différenciation. Les cellules de striata montrent un taux de cellules pré-mitotiques significativement plus élevé par rapport au contrôle dès la dose faible et augmente de manière dose dépendante. À 14 et 21 jours de différenciation, le nombre de cellules qui exprimaient Ki-67 avait diminué drastiquement, ce qui signifierait que la grande majorité des cellules se seraient

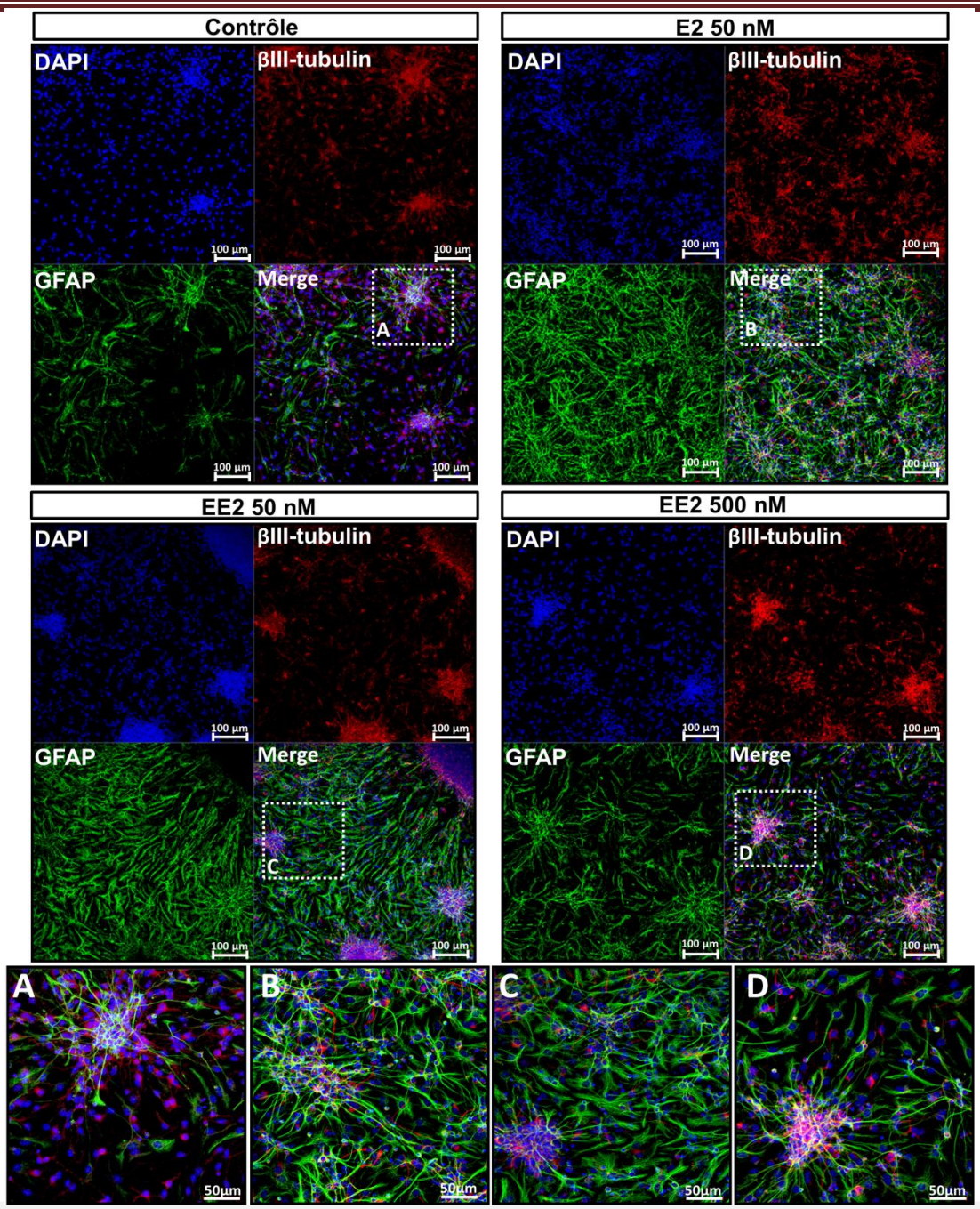


Figure 35 : Photographies confocales de culutres issues de striata à 14DIV dans différentes conditions de culture

A ce stade le marquage GFAP (vert) est filamenteux et occupe une surface plus importante en condition de traitement à l'E2 et à l'EE2 comparés aux contrôles. Le marquage βIII-tubuline est plus faible à la dose de 50nM et ne varie pas dans les autres conditions. Le panel d'images du bas correspond aux zooms des inserts A, B, C et D en pointillés sur les merges des quatre conditions.

engagées dans une voie de différenciation avancée. Ce taux ne varie pas en fonction des traitements, ce qui signifie que la phase de multiplication n'a pas été prolongée dans le temps par le traitement à l'E2 et à l'EE2 (du moins jusqu'à 14 jours de différenciation). La différenciation des cellules souches en neurones et en astrocytes a été perturbée puisque, à 7DIV et 14 DIV, nous avons détecté une modification (variable selon la dose et les deux types de cultures) de la surface du marquage βIII-tubuline, et à 14 jours une augmentation de l'immunoréactivité GFAP des cellules de diencéphale. Cette perturbation semble être transitoire puisque, à 21 DIV, aucune différence d'immunoréactivité n'a été observée dans les deux types cellulaires. Les effets observés sur la différenciation n'ont pas été détectés dans les deux types cellulaires au même stade de développement, ce qui suggère une différence de sensibilité des cellules aux traitements œstrogéniques.

1- EE2 et apoptose des cellules en différenciation

Le rôle neuroprotecteur de l'œstradiol sur le cerveau des mammifères a été largement établi. Dans plusieurs régions sexuellement dimorphiques, il a été démontré que les stéroïdes sexuels, en activant les récepteurs intracellulaires des stéroïdes, favorisent la survie neuronale en inhibant le processus de l'apoptose (Forger, 2006, 2009). Nos résultats montent ici que, contrairement à ce que est connu pour l'œstradiol ou ses agonistes, le traitement à l'EE2 induit une augmentation du taux d'apoptose des progéniteurs en différenciation. *In vivo*, pendant le développement, la mise en place des différences sexuelles dans le système nerveux implique le rôle neuroprotecteur de l'œstradiol périnatal qui favorise la survie neurale dans certaines régions du cerveau mâle (pour revue, voir McCarthy, 2008). Cependant, chez le mâle, dans certaines régions du cerveau, le nombre de neurones est plus faible que chez la femelle, ce qui suggère que le rôle neuroprotecteur de l'œstradiol dans ces régions n'est pas impliqué (Forger, 2006). Il a été démontré que le pic périnatal de testostérone chez le mâle est corrélé avec une surexpression de la protéine pro-apoptotique Bax et une sous-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le noyau péri-ventriculaire para-ventriculaire (AVPV) (Tsukahara et al., 2006a). Cette étude a montré également une suractivation de la voie des caspase-3 dans les cellules immunoréactives au marqueur neuronal NeuN, suggérant ainsi le rôle de l'œstradiol synthétisé à partir de l'aromatisation de la testostérone périnatale dans l'induction de l'apoptose, permettant la différenciation sexuelle de l'AVPV. L'effet pro-apoptotique de l'œstradiol benzoate

(EB) dans le noyau AVPV a été mis en évidence pendant la période périnatale chez des rats mâles. Un traitement de 10µM d'EB sur des explants hypothalamiques de nouveau-nés induit une réduction significative du nombre de neurones exprimant la Tyrosine Hydroxylase (TH) dans l'AVPV, une augmentation du nombre de noyaux apoptotiques (Waters and Simerly, 2009). Ces effets ont été contrecarrés par un traitement concomitant avec un inhibiteur de caspase (Waters and Simerly, 2009). En accord avec ces données, nos résultats observés sur les cultures suggèrent l'implication des œstrogènes dans l'induction de l'apoptose pendant le développement et la différenciation des circuits neuronaux. Le rôle de ERα a été évoqué dans l'induction de l'apoptose pendant le développement de l'AVPV *in vivo* (Waters and Simerly, 2009), il serait donc intéressant de déterminer si l'induction de l'apoptose par l'EE2 dans nos cultures implique les récepteurs nucléaires des œstrogènes ou d'autres voies de signalisation indépendantes de ces récepteurs.

2- *EE2 et prolifération cellulaire*

Nous avons détecté un nombre de cellules Ki-67 positives plus important dans les cultures traitées comparées aux cultures contrôles. L'effet stimulateur sur la prolifération des cellules souches neurales par l'œstradiol a déjà été rapporté par plusieurs études *in vitro* (Tanapat et al., 1999, Brannvall et al., 2002, Tanapat et al., 2005, Wang et al., 2008, Okada et al., 2010). Chez la femelle adulte, en conditions physiologiques, le nombre de cellules en prolifération dans le Gyrus dente de l'hippocampe est significativement plus élevé en prœstrus lorsque les concentrations en œstrogènes sont élevées par rapport à la phase de diestrus où les concentrations en œstrogènes sont très basses (Tanapat et al., 1999). *In vitro*, l'œstradiol induit une augmentation de la prolifération des neurones hippocampiques embryonnaires (Pan and Zhang, 2013). Nos résultats ont mis en évidence une augmentation du taux de prolifération. Cependant, à 21DIV nous n'avons pas pu détecter de différences significatives d'immunoréactivité pour βIII-tubuline ou la GFAP, suggérant l'absence de différence du nombre de cellules à ce stade de développement. Une absence de différence dans le nombre de cellules, malgré une augmentation du nombre de cellules en division, est cohérente avec les résultats observés sur le taux d'apoptose qui est également augmenté par le traitement. L'augmentation de l'apoptose pourrait être une conséquence d'une stimulation accrue de la division cellulaire induite par le traitement. Pour identifier quel type cellulaire rentre en apoptose, il serait intéressant de réaliser

des doubles marquages TUNEL-βIII-tubuline, TUNEL-GFAP et TUNEL-Ki-67 et comparer les différentes conditions. L'incorporation de La **Br**omo**d**ésoxy**U**ridine (BrdU) à différents stades de développement (pendant la division clonale ou à différents stade de différenciation) associée à un triple marquage TUNEL-βIII-tubuline-BrdU ou TUNEL-GFAP-BrdU, nous permettrait d'identifier quelles cellules (pré-mitotiques *versus* post-mitotiques, progéniteur *versus* différenciées) rentrent en apoptose lors d'un traitement à l'EE2.

3- EE2 et différenciation cellulaire

Le déterminisme cellulaire pendant la différenciation d'une cellule souche neurale est contrôlé par des facteurs intrinsèques et extrinsèques à la cellule. Ces facteurs vont orienter la cellule vers la voie neuronale ou gliale. Les facteurs extrinsèques sont essentiellement des facteurs de croissance qui, selon leur distribution dans la cellule progénitrice lors de la division cellulaire, vont déterminer si la cellule fille issue de la division sera orientée vers une voie neurale ou gliale (Edlund and Jessell, 1999). Les signaux extrinsèques peuvent être des facteurs paracrines libérés par deux cellules voisines qui vont agir directement sur des voies de signalisations des cellules en différenciation et modifier ainsi leur devenir (Edlund and Jessell, 1999). Nos résultats ont montré que la proportion des cellules neurales et gliales a été modifiée par l'EE2 à certains moments pendant leur processus de différenciation, notamment à 14DIV dans les cellules issues de diencéphale. A 21DIV, les proportions de cellules βIII-tubuline positives et GFAP positive ne varient pas significativement.

Cette différence observée sur les cellules gliales pourrait s'expliquer par une modification de la morphologie des cellules, connue pour être régulée par les œstrogènes pendant le développement (McCarthy et al., 2003). Une autre hypothèse qui pourrait expliquer ces observations serait que cette variation pourrait être liée à l'état de différenciation des cellules gliales qui peut être influencé par le traitement aux œstrogènes (Torres-Aleman et al., 1992). La modification de la vitesse de différenciation des progéniteurs traités à l'E2 et à l'EE2, aurait abouti à une différence de maturité à 14DIV entre les cellules traitées et les cellules contrôles, et se serait manifestée par une différence dans la surface et la répartition de la GFAP exprimée par les cellules gliales dans nos cultures.

Les cellules gliales pendant leur maturation subissent un réarrangement structural en passant d'une forme radiale qui occupe une surface réduite à une forme stellaire caractéristique d'une cellule gliale mature (Abney et al., 1981, Gasser and Hatten, 1990). Cette hypothèse peut expliquer l'augmentation de la surface du marquage GFAP par le traitement aux œstrogènes. A 21DIV, les cellules seraient arrivées au même stade de maturité, ce qui pourrait expliquer le fait que la différence observée à 14DIV se serait estompée. Cette modification de l'équilibre cellulaire pendant le développement pourrait être à l'origine de modifications des interactions cellulaires neuro-gliales et donc modifier la neuroanatomie et la neurophysiologie dans certaines régions du cerveau *in vivo.* L'hypothèse d'une différence dans le stade de maturation des cellules gliales pourrait être vérifiée par la mesure du taux d'expression d'autres marqueurs spécifiques qui s'expriment dans les cellules gliales plus tardivement, tels que S100β qui est corrélé à la maturation spatiotemporelle des cellules gliales (Deloulme et al., 2004) et ayant complètement perdu leur caractéristiques de progéniteur multipotentiel (Raponi et al., 2007).

Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer les voies intracellulaires d'induction des effets de l'EE2 sur la différenciation. Le rôle de la voie des protéines kinase (MAPK) activée par une transduction du signal par un récepteur membranaire activé par l'E2, sur l'orientation de la différenciation des cellules souches a déjà été évoqué (Okada et al., 2010). Cette voie pourrait être induite par l'EE2 en activant le récepteur membranaire couplé aux protéines G GPR30.

L'augmentation de l'immunoréactivité βIII-tubuline dans les cultures de diencéphale traitées à 500 nM pourrait être expliquée par une augmentation du nombre de cellules βIII-tubuline à 7 DIV. Cette hypothèse est corroborée par le fait que, dans nos cultures, le marquage Ki-67 qui est augmenté par le traitement à l'EE2 est observé dans les cellules βIII-tubuline positives **(Figure 36)**. Cette hypothèse est en adéquation avec des données précédentes qui ont montré que le traitement de cultures de cellules souches embryonnaires avec l'E2 induit une augmentation du nombre de neurones βIII-tubuline positifs (Diaz et al., 2009) et du nombre de motoneurones (Lopez-Gonzalez et al., 2011).

E- Conclusion

Le système de culture de neurosphères, contrairement aux cultures de lignées cellulaires sur un support à deux dimensions, offre la possibilité d'une culture dans un

système à trois dimensions qui se rapproche le mieux du développement du système nerveux *in vivo* et qui permet d'analyser les cellules souches et leur capacité à se diviser, à former des réseaux mixtes neuro-gliaux fonctionnels relativement proches (comparés aux systèmes de lignées) des réseaux *in vivo*. Ce système de culture nous a permis ici de décrire les conséquences d'une exposition chronique à un œstrogène de synthèse, l'EE2, sur le développement des cellules souches neurales embryonnaires. En perspective à ces résultats, il serait intéressant de tester l'effet de l'EE2 ou d'autres molécules potentielles perturbateurs endocriniens à des doses plus faibles en ciblant spécifiquement les différents stades de développement de ces cellules et décrire les conséquences cellulaires et moléculaires sur les cellules différenciées. La comparaison des effets d'une exposition chronique aux effets d'une exposition sur des périodes plus courtes ciblant une fenêtre de développement spécifique s'avère également intéressante pour comprendre les mécanismes d'actions des PEs.

Ce modèle permet d'obtenir un réseau neuro-glial différencié à partir de cultures de cellules souches et offre une perspective très intéressante pour mener des expériences ciblant les aspects fonctionnels à long terme sur un réseau exposé pendant sa mise en place à différentes molécules exogènes. Des expériences d'électrophysiologie ou d'imagerie calcique sur ces réseaux nous permettraient d'évaluer le potentiel effet perturbateur endocrinien de la fonction neurophysiologique à long terme, décrits *in vivo* sur les animaux exposés pendant le développement et dont les conséquences n'ont été observées qu'à l'âge adulte.

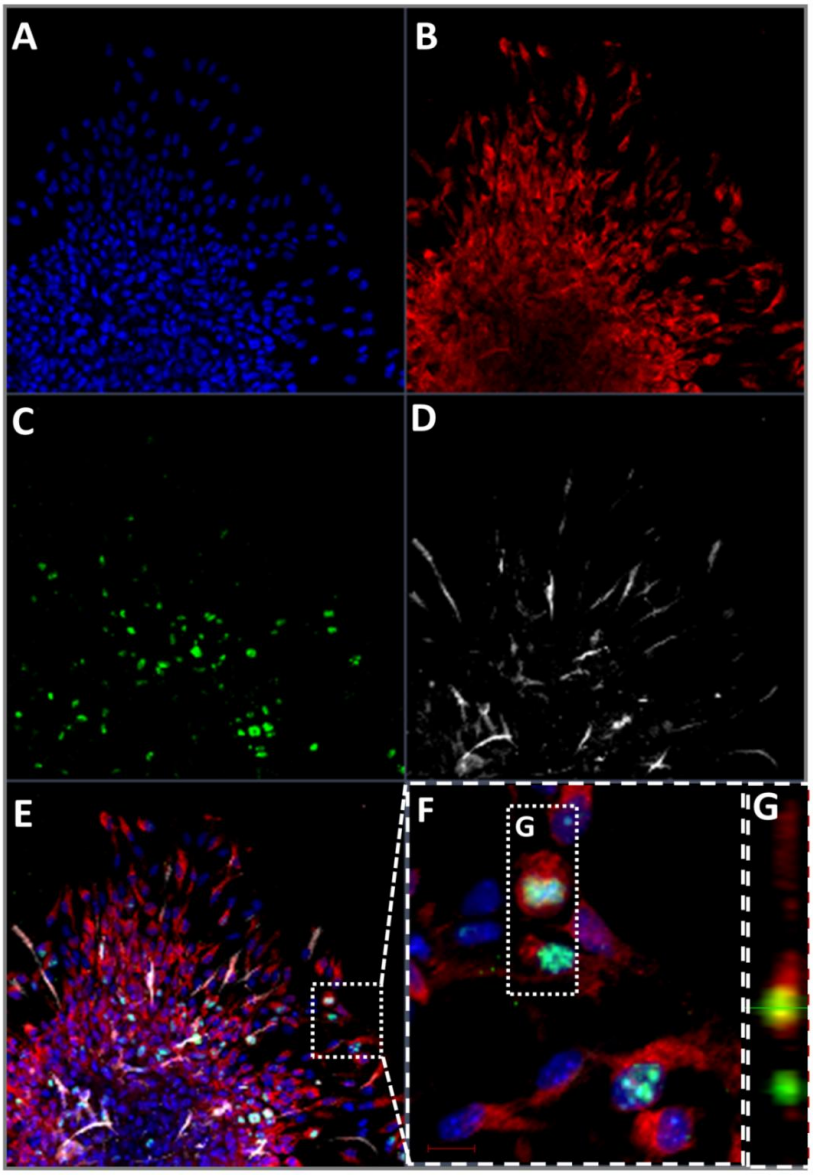


Figure 36 : Photogphies confocales d'un triple marquage βIII-tubulin, GFAP et Ki-67 à 7DIV en condition contrôle

Le marquage Ki-67 (C) est colocalisé avec les noyaux (A). Tous les noyaux Ki-67 positifs sont βIII-tubulin (B) positifs et jamais GFAP (D) positifs. E) La superposition des quatre couleurs montre la présence du marquage βIII-tubulin autour des noyaux Ki-67 positifs (F). G) vue orthogonale de l'encadré en F.

Dans le but de comprendre les conséquences des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine, l'utilisation du système de culture de neurosphères murines en parallèle avec un système de cultures de neurosphères humaines (Chaichana et al., 2009) de mêmes conditions de culture, offre une possibilité de comparer efficacement les effets *in vitro*, d'apporter des éléments de réponse sur le taux de similitude ou de divergence de ces deux types cellulaires à différents traitements. Ainsi, ce système permettrait de prédire l'efficacité et la pertinence des modèles *in vivo* largement utilisés et dont les résultats sont souvent extrapolés à l'humain, principalement sur la base du fait de la proximité dans l'arbre évolutif de l'Homme et des rongeurs en tant que mammifères. Enfin, une meilleure compréhension et une maîtrise approfondie de ce système de culture, associé à des techniques de génie génétique et de biologie moléculaire telles que la RTqPCR ou l'étude des profils de méthylation des gènes, offre une possibilité d'un modèle alternatif à l'expérimentation animale dans l'étude du neurodéveloppement et dans la compréhension des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens sur les fonctions neuroendocrines et neurophysiologiques.

III- EFFET DE L'EE2 SUR LE DEVELOPPEMENT DES NEURONES A GNRH *IN VITRO*

A- Introduction

La sensibilité des neurones à GnRH aux PEs a été démontrée par plusieurs études menées *in vivo* chez plusieurs espèces. Chez la souris, l'EE2 pendant le développement induit une augmentation du nombre de neurones à GnRH chez l'embryons et l'âge adulte (Pillon et al., 2012, Derouiche et al., 2015a, Derouiche et al., 2015b). Cette augmentation du nombre de neurones à GnRH a également été observée chez le poisson zèbre (Vosges et al., 2012). Chez le lapin le nombre de neurones à GnRH est diminué par une exposition développementale à la vinclozoline à la naissance et chez l'adulte (Wadas et al., 2010). Ces études mettent en évidence la vulnérabilité des neurones à GnRH pendant le développement à l'EE2.

Dans l'étude de Pillon et al (2012), il a été montré qu'une exposition à l'EE2 pendant leur migration intra-nasale (E11 et E13) suffit pour induire une augmentation du nombre de neurone à GnRH chez les embryons à E13. Or, pendant les premiers stades de développement, les neurones à GnRH n'exprimeraient pas les récepteurs nucléaires aux œstrogènes (Sharifi et al., 2002). Cela suggère que l'effet de l'EE2 implique d'autres populations cellulaires qui communiquent avec les neurones à GnRH. Pendant cette phase de migration le microenvironnement constitué de cellules gliales qui migrent avec les neurones à GnRH (Geller et al 2013) pourraient constituer une des cibles de l'EE2 et induire par ce biais la perturbation du développement des neurones à GnRH.

L'environnement des neurones à GnRH embryonnaires en cours de migration montre la présence de PSA-NCAM (NCAM, cell adhesion molecule et sa forme polysialylée PSA-NCAM) en étroite association avec les corps cellulaires et les prolongements neuronaux (Franceschini et al., 2010). Chez l'embryon de poulet la coupure de la PSA par l'endoneuraminidase (EndoN) perturbe la migration intra-nasale des neurones à GnRH (Murakami et al., 2000). Le microenvironnement de ces mêmes neurones dans la région pré-optique présente une forte immunoréactivité pour PSA-NCAM (NCAM, cell adhesion molecule et sa forme polysialylée PSA-NCAM), suggérant que cette zone est soumise à des mécanismes de plasticité neuro-gliale

(Miragall et al., 1989, Bonfanti et al., 1992). Ce microenvironnement pourrait donc être la cible par laquelle l'EE2 induit ces effets sur la modification de la neuroanatomie des neurones à GnRH pendant les différentes phases de leur migration et de leur maturation dans l'hypothalamus.

Les mécanismes impliqués dans la modification de la neuroanatomie des neurones à GnRH par les traitements oestrogéniques ne sont toujours pas connus. Pour essayer de comprendre ces mécanismes, nous avons utilisé le modèle de culture de placodes olfactives embryonnaires de souris (Fueshko and Wray, 1994). Ce modèle de culture permet de reproduire *in vitro* le processus de développement des neurones à GnRH qui migrent à partir de la placode olfactive pour former un réseau de neurones fonctionnel capable de synthétiser et de sécréter de manière pulsatile le GnRH (*pour revue*, Constantin et al., 2009).

B- Méthode

1- Cultures primaires

Des embryons de souris SWISS à E11,5 de développement ont utilisés. Les placodes olfactives ont été prélevés à partir des têtes d'embryons puis disséqués selon la méthode décrite par (Fueshko and Wray, 1994, Klenke and Taylor-Burds, 2012) (**Figure 37)**. Les placodes sont mises en culture dans le milieu SFM (*Serum Free Medium*) (composition du milieu, **Annexe 1**). Les placodes ont été maintenues en culture pendant 7 jours, la moitié du milieu a été remplacée au troisième jour.

Trois conditions de traitement ont été réalisées, deux doses de traitement au 17α-éthinylœstradiol (EE2) (SIGMA-E4876) à 50 ou 500 nM (dilué dans l'éthanol pur en concentration 0.1% finale dans le milieu de culture) dans le milieu *SFM*, et une condition contrôle supplémenté de 0.1% d'éthanol dans le milieu. Les placodes issues de chaque dissection ont été réparties selon le schéma expérimental décrit dans le **tableau 7**.

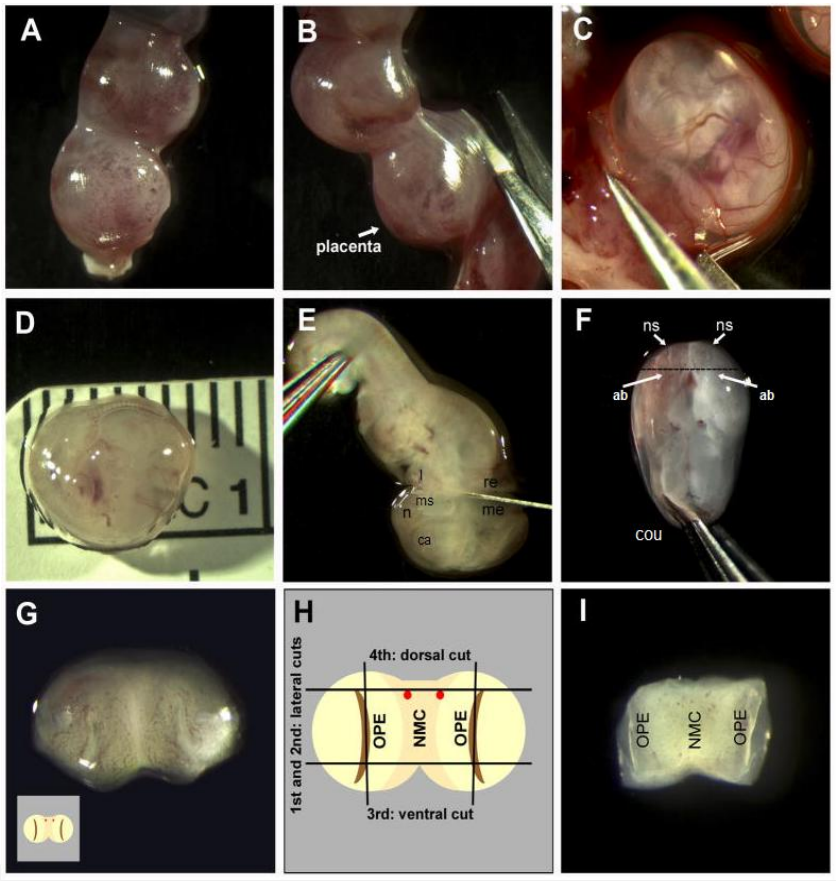


Figure 37 : Etapes de dissections d'explants d'embryons de souris

Les embryons à E11,5 sont prélevés des poches utérines **(A, B)** et sortis de leurs sacs amniotiques **(C)**. A ce stade les embryons mesurent entre 6,2 et 7,2 mm selon un plan cranio-caudal). Les têtes d'embryons sont coupées au niveau du cou et de la mâchoire supérieure **(ms)** d'un côté et du mésencéphale **(me)** et rhombencéphale **(re)** de l'autre côté, à l'aide de pinces fines. Le cerveau antérieur (ca) et l'aire nasale sont facilement identifiables **(E).** En plaçant la tête sur le côté dorsal, les narines sont visibles face à l'observateur. Les arcs branchiaux **(ab)** sont également visibles et permettent de situer la placode, la tête est maintenue avec des pinces au niveau du cou et la placode est découpée au niveau de la ligne indiquée en pointillés **(F)**. Une vue de l'extérieur de la placode découpée est présentée en figure G. L'épithélium olfactif est schématisé en figure H, la placode est redécoupé selon deux plans ventral et dorsal (au-dessus des points rouges qui représentent les vaisseaux sanguins) et deux plans latéraux à la limite des narines schématisées par les entailles marrons qui bordent le mésenchyme nasal **(NMC) (H)** ***(d'après* Klenke and Taylor-Burds, 2012)**.

Tableau 7 : Protocole de répartition des effectifs pour chaque dissection de placodes

	Dissection 1	Dissection 2	Dissection 3	Dissection 4	Moyenne par lot
CONTRÔLE (n=4)	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	**Moyenne par lot**
EE2 50 nM (n=4)	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	**Moyenne par lot**
EE2 500 nM (n=4)	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	E1 E2 E3 Moyenne	**Moyenne par lot**

E= embryon

2- *Immunofluorescence et analyse des marquages*

A 7 jours de développement *in vitro* (7DIV) les placodes ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pour réaliser les marquages immunohistochimiques. Un double marquage GnRH/PSA-NCAM a été réalisé sur les cultures fixées. La méthode détaillée de fixation et de marquage est décrite par (Franceschini et al., 2010).

Les comptages des neurones immunoréactifs ont été réalisés sur des images confocales (LSM 700, Zeiss). Pour chaque placode, une acquisition en *tile scan* a été réalisée à l'objectif X20 centré sur la surface de migration **(Figure 38).** 5 plans focaux à 10µm d'intervalle ont été analysés par placode pour compter tous des neurones répartis sur plusieurs plans.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad prism 5. Un test en ANOVA simple (one-way ANOVA) a été utilisé pour comparer l'effet traitement sur le nombre de cellules immunoréactives à la GnRH ou à la PSA-NCAM.

C- Résultats

1- Effet de l'EE2 sur le nombre de neurones à GnRH

Le premier objectif de cette expérience était de savoir si le traitement à l'EE2 induit une augmentation du nombre de neurones à GnRH *in vitro.* Pour cela nous avons compté le nombre de neurones GnRH-immunoreactifs et comparé les trois conditions expérimentales. Nos résultats montrent qu'il n y a pas de différence significative en fonction du traitement, du nombre de neurones à GnRH-immunoréactifs détectés à l'expéditeur de l'explant (**Tableau 8**).

Parallèlement, sur ces mêmes cultures nous avons détecté deux populations de neurones à GnRH, une population proximale située à 200µm autour de limite de l'explant et une population distale qui a migré au-delà de 200µm après la limite de l'explant **(Figure 39)**. La distinction de ces deux populations nous a permis d'évaluer l'effet potentiel de l'EE2 sur la répartition des neurones à GnRH et donc de l'effet sur la migration neuronale. Les résultats ne montrent pas de différences significatives dans la répartition des neurones en fonction de ce paramètre (proximité de l'explant), puisque le nombre de neurones proximaux ou distaux ne varie pas en fonction des conditions. Les pourcentages de répartition distal/proximal ne varient pas en fonction du traitement (**Tableau 8**).

2- Effet de l'EE2 sur l'expression de la PSA-NCAM

Les marquages par double immunofluorescence mettent en évidence une proximité entre le marquage PSA-NCAM et le marquage GnRH **(Figure 40)**. Par la même méthode que pour le marquage GnRH, nous avons compté les cellules PSA-NCAM-ir distinguées en deux populations, proximale et distale. Les résultats de ces comptages ne mettent pas évidence une différence du nombre total, ni de la répartition des cellules en fonction du traitement (**Tableau 8).**

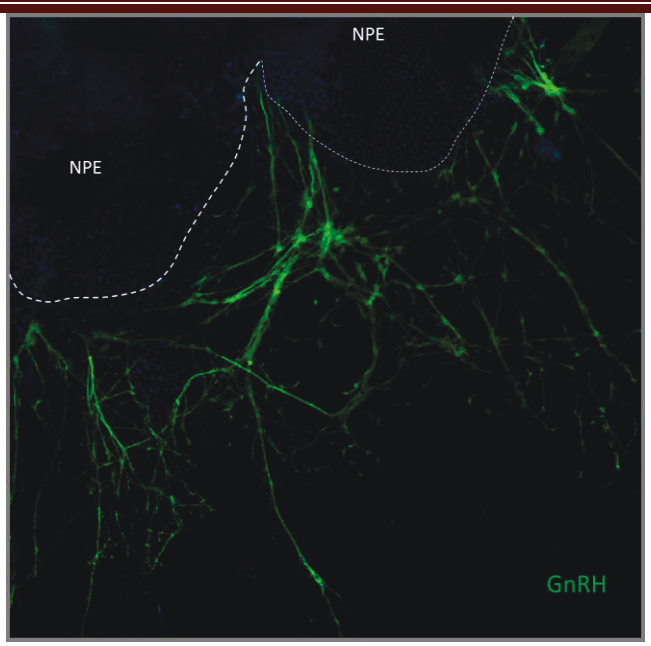


Figure 38 : Réseau de neurones immunoréactifs à la GnRH à 7DIV.

NPE : épithélium nasal. Les limites de l'explant sont désignées par la ligne en pointillés.

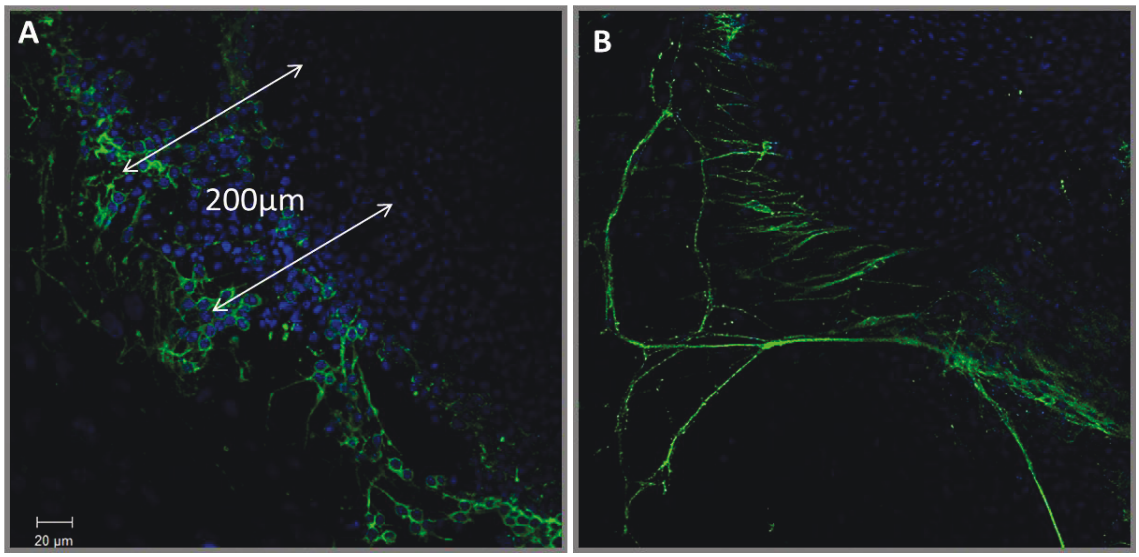


Figure 39 : Marquage GnRH sur deux plans focaux situé à proximité de la limite de l'explant

On remarque à limite de l'explant des neurones en « grappes » avec de cours prolongements et à l'extérieur de l'explant des prolongements plus longs et des neurones individuels, témoignant d'une différence de maturation de ces deux populations.

Tableau 8 : Comptages des cellules GnRH et PSA-NCAM immunoréactives (ir).

	Moyenne GnRH_ir		GnRH_ir total/explant	Moyenne PSA-NCAM_ir		PSA-NCAM_ir total/explant
	Limite de l'explant	extérieur de l'explant		Limite de l'explant	extérieur de l'explant	
Contrôle	218,50± 50,26	113,94± 33,39	332,44± 106,32	239,31± 55,06	116,72± 7,98	356,03± 49,95
EE2 50nM	215,78± 33,39	124,56±11,96	340,33± 53,56	214,00± 18,88	123,00± 11,95	337,00± 13,67
EE2 500nM	272,67± 47,70	113,17±15,55	385,33± 36,85	283,22± 41,40	109,64± 16,73	392,86± 49,95

Les résultats sont les moyennes ±SEM par lot. N= 4 dissections par condition.

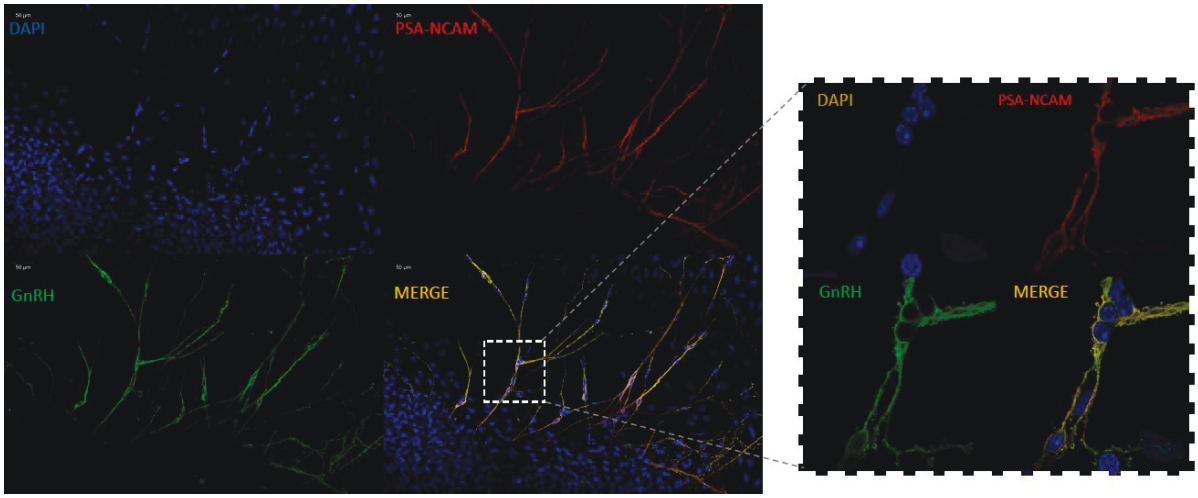


Figure 40 : Double marquage GnRH-PSA-NCAM sur une placode fixée à 7DIV.

On remarque une superposition (Merge) du marquage GnRH (vert) avec le marquage PSA-NCAM (rouge).

C- Discussion

Ces résultats ne mettent pas en évidence un effet de l'EE2 sur le nombre de neurones à GnRH, ni sur l'immunoréactivité PSA-NCAM. Dans ces conditions, le traitement à l'EE2 ne semble pas affecter la plasticité neuronale des neurones à GnRH *in vitro*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats, les doses appliquées sur les cultures ou le mode de traitement chronique pourraient être à l'origine d'une absence d'effets. Les limites du système de culture de placodes comme la forte variabilité remarquée entre les placodes d'un même lot expérimental ou encore de la variabilité du stade de développement des embryons pourraient masquer un effet éventuel de l'EE2.

L'importance du microenvironnent des neurones à GnRH pendant leur développement a été mise en évidence par plusieurs études. Ces cellules gliales d'origine olfactives (Olfactory Encheathing Cells, OEC) sont nécessaires au développement normal des neurones à GnRH (Barraud et al., 2013). Une étude menée par Gudino-Cabrera et Nieto-Sampedro (1999) a mis en évidence par immunohistochimie la présence de ERβ et citent également la présence de ERα dans les OEC. Des travaux au sein de notre laboratoire ont mis en évidence l'expression de ERα, ERβ et GPR30 par les cellules gliales triés par FACS (Thèse de Sarah Geller, 2013). Dans ces mêmes travaux un traitement chronique à 17nM d'EE2 (pendant toute la période de culture) n'induit pas d'effet sur le transcriptôme des cellules gliales triées à partir de ces cultures. Cependant un traitement aigue (48 heures, de 8 à 10 DIV) induit une différence d'expression de gènes de ces cellules analysés par la méthode des puces à ADN. Ces résultats ainsi que ceux présentés ici suggèrent que le traitement chronique à l'EE2 n'aurait pas d'effet sur le développement des neurones à GnRH.

In vivo, les neurones à GnRH pendant le développement n'expriment pas ERα (Herbison and Pape, 2001) mais les neurones à GnRH dérivées de placodes olfactives expriment l'ARNm *Esr2* (gène codant ERβ) (Sharifi et al., 2002) et GPR30 (ARNm et protéine) (Noel et al., 2009). L'expression de ERβ semble être transitoire et dépend du stade de développement des neurones à GnRH. A 7 jours de différenciation *in vitro* (div), 40 à 60 % des neurones à GnRH exprimeraient les l'ARNm *Esr2* contre 10% des neurones à 28 div. Suggérant ainsi que la sensibilité au traitement pourrait dépendre de la phase de développement. 7 div correspondrait *in vivo* à E18 (Sharifi et al., 2002), la

période qui correspond au pic prénatal de testostérone lors de laquelle la différenciation du cerveau se met en place. La surexpression de *Esr2* à cette période dans les neurones à GnRH suggère son implication dans la différenciation fonctionnelle du réseau de neurones à GnRH. Les neurones à GnRH présenteraient une sensibilité plus importante aux œstrogènes pendant la période autour de 7div. Il serait intéressant d'exposer les neurones à GnRH autour de cette période et d'évaluer l'effet à des stades de développement *in vitro* plus tardifs.

D- Conclusion et perspectives

Le traitement chronique à l'EE2 (50 et 500nM) sur des placodes olfactives d'embryons de souris ne perturbe pas le nombre et la répartition des neurones à GnRH à 7 jours de différenciation. Dans ces conditions l'EE2 semble ne pas agir directement sur le développement de ces neurones et impliquerait *in vivo* d'autres populations cellulaires. La période et la durée d'exposition semblent critiques, puisque l'expression des récepteurs aux œstrogènes varie en fonction du stade de développement des neurones à GnRH.

Plusieurs autres paramètres pourraient également interférer avec l'interprétation ces résultats décrits *in vitro*. Néanmoins, ce système de culture présente un intérêt dans l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de développement des neurones à GnRH. Dans le laboratoire, nous disposons d'une lignée C57BL6 transgénique de souris exprimant la protéine GFP sous le promoteur de la GnRH qui permet de visualiser les neurones à GnRH fluorescent (Spergel et al., 1999). Des cultures de placodes issues d'embryons GnRH-GFP nous permettraient de suivre le développement de ces neurones. L'imagerie en temps réel permet de visualiser les neurones en cours de migration à partir de la placode olfactive et de suivre la trajectoire, la poussée neuritique et leur organisation en réseau *in vitro*. Une « supplémentation » du milieu de culture en condition contrôle par différentes concentrations en EE2 à différentes intervalles de temps permettra de mesurer paramètres comme la vitesse de migration, la croissance des neurites ou trajectoire de migration au sein d'une même placode et ainsi remédier à la variation due à la dissection ou au stade de développement de la placode.

IV- CONCLUSION CHAPITRE III

Les différents modèles *in vitro* présentés dans ce chapitre offrent une possibilité d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'EE2 ainsi que d'autres PEs qui pourraient être une cible de ces molécules pendant neurodéveloppement. Nos résultats mettent en évidence que les cellules neurales constituent une cible potentielle de l'EE2 pendant différents stades de développement. Les effets de ces molécules sont observés à des stades bien précis, suggérant ainsi que la sensibilité des cellules souches serait différente en fonction du stade mais également du mode de traitement ou de l'origine neuroanatomique des cellules.

Certains effets observés *in vivo* n'ont pas été reproduits *in vitro*, c'est le cas pour les neurones à GnRH analysés sur le système de culture placodes olfactives. L'utilisation des modèles de culture *in vitro* pour prédire l'effet *in vivo* implique d'avantages de recherches pour comprendre les effets des PEs au niveau cellulaire et moléculaire. Ce n'est qu'une fois tous ces mécanismes sont bien maitrisés qu'un modèle alternatif à l'expérimentation animale sera envisageable.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif principal de décrire les effets à long terme d'une exposition développementale à des doses faibles d'EE2 décrites dans la littérature comme n'ayant pas d'effets adverses sur la santé. A notre connaissance, les effets neuroendocrines de doses aussi faibles que celles utilisées dans cette étude n'ont jamais été décrits auparavant sur un modèle mammifère. L'ensemble des résultats décrits sur l'action de l'EE2 ont mis en évidence une multitude d'effets sur les différentes composantes de la fonction reproductrice chez le mâle et chez la femelle. L'approche intégrative que nous avons menée suggère des corrélations entre les effets neuroanatomiques et neuroendocrines d'une part et les conséquences physiologiques et comportementales d'autre part. De plus, l'étude dans sa globalité met en évidence des effets à long terme qui sont détectés chez des individus à l'âge adulte après une exposition développementale. Ceci met l'accent sur le caractère persistant et irréversible même après le retrait de la molécule. De manière surprenante, l'étude transgénérationnelle a montré que certains effets de l'EE2 sont capables de se transmettre sur plusieurs générations après une exposition parentale. Nous remarquons également que si, certains effets de l'EE2 tels que la modification des comportements sexuels mâle et femelle, l'avancée de l'âge de l'ouverture vaginale et les perturbations de la cyclicité œstrale sont induits de manière dose d'EE2 dépendante, la sévérité de certains autres effets comme le comportement maternel chez les femelles et l'anatomie du réseau de neurones à GnRH chez les mâles ne dépend pas systématiquement de la dose administrée d'EE2. En effet, la faible dose, contrairement à la forte dose, induit la perturbation de ces deux paramètres. Cette différence suggère une diversité dans les mécanismes d'action par lesquels agit l'EE2 à différents niveaux chez le mâle et chez la femelle.

Dans l'étude *in vitro* menée sur des cultures cellulaires illustrant différents modèles de développement neural, nous avons voulu mettre en évidence par une approche comparative les effets de l'EE2 à différents stades du développement neural, incluant les étapes de prolifération de cellules souches neurales, de leur différenciation et de leur organisation cellulaire en réseau. Ces expériences ont mis en évidence que l'origine des cellules souches neurales pouvait entrainer une sensibilité différente au traitement, ainsi qu'une courbe réponse-dose différente selon le type cellulaire et la région cérébrale.

Ces observations suggèrent implicitement, que les conséquences comportementales et physiologiques d'une exposition à une dose donnée pourraient avoir des effets différents selon le paramètre étudié. Les expériences *in vitro* ont montré

aussi que le traitement à l'EE2 n'a pas d'impact significatif sur la phase de prolifération des cellules souches neurales, contrairement à la phase de différenciation. Cela pourrait s'expliquer par une différence de sensibilité durant chaque étape du développement des cellules souches neurales. Ces données sont en adéquation avec la notion de période de sensibilité développementale à l'origine de l'apparition des troubles de la santé chez l'adulte, décrite *in vivo* et pendant laquelle les effets des perturbateurs endocriniens sont particulièrement puissants et irréversibles (*Pour revue, voir* Fudvoye et al., 2014).

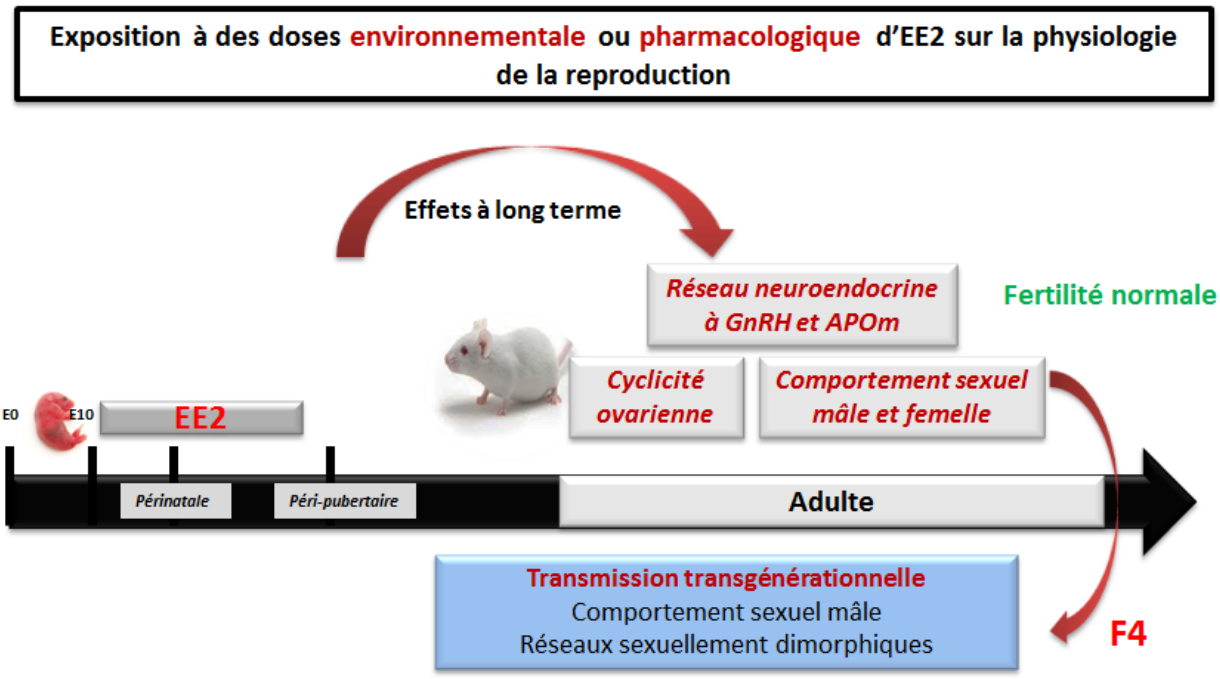


Figure 41 : Schéma récapitulatif des résultats des expériences menées *in vivo*

L'exposition chronique à l'EE2 pendant le développement intra-utérin, périnatal et jusqu'à la puberté induit des perturbations du réseau neuroendocrine à GnRH (mâles et femelles), du réseau sexuellement dimorphique de l'APOm (mâles), une perturbation de la cyclicité et des comportements sexuels. La fertilité des animaux n'a pas été affectée. Cependant, chez les mâles, certains effets ont été retrouvés chez les individus F4 n'ayant jamais reçu de traitement direct à l'EE2.

Aux vues de nos résultats, plusieurs points de discussion seront abordés et détaillés dans deux parties. La première partie concernera les notions de fenêtres de sensibilité développementale et les mécanismes impliqués dans la régulation de l'organisation des réseaux neuroendocrines. Les mécanismes qui seraient impliqués dans l'apparition tardive et la persistance de certains effets bien au-delà de la période d'exposition seront discutés. Dans la seconde partie, seront abordés les mécanismes de transmission transgénérationnelle des effets de l'EE2 à la descendance des animaux exposés.

I- Fenêtre de sensibilité développementale et conséquences à long terme

A- La période périnatale

L'interaction des molécules exogènes qui sont capables de moduler l'action des hormones par différents mécanismes (mimétisme, antagonisme, transport, dégradation, etc.) est capable d'altérer le développement normal de ces structures et d'induire des modifications à long terme et des conséquences importantes sur la fonction de reproduction adulte. Ces molécules agissent à différents niveaux, anatomique, cellulaire, moléculaire et génique. Au niveau anatomique, les PEs comme l'EE2 sont capables d'induire une réorganisation neuroanatomique des noyaux hypothalamiques tels qu'une augmentation du nombre de neurones comme le montrent nos résultats sur le réseau de neurones à GnRH et les neurones à calbindine. A l'échelle cellulaire, les œstrogènes et les œstrogéno-mimétiques sont capables de modifier la morphologie des cellules gliales ou neuronales (McCarthy, 2008, Lenz et al., 2012) ou la structure des synapses permettant d'établir les réseaux fonctionnels (Xu et al., 2013), et par conséquent induire des modifications dans les fonctions physiologiques et les comportements sous-jacents.

Les PEs sont capables de modifier l'expression de gènes tels que les *Esr1* et *Esr2* et ainsi modifier la signalisation cellulaire induite par les œstrogènes endogènes pendant le développement. Etant donné le rôle organisationnel de cette signalisation, les modifications engendrées auront des conséquences fonctionnelles à long terme (Kundakovic et al., 2013). Ces modifications organisationnelles surviennent pendant la phase d'organisation développementale où le cerveau est doté d'une grande plasticité structurelle. A la puberté, deviennent fonctionnels et perdent progressivement leur

plasticité. Les modifications induites lors d'une exposition aux PEs deviennent alors irréversibles et persistent pendant toute la vie de l'individu.

L'un des mécanismes identifié en lien avec des variations d'expression de gènes chez un individu adulte suite à une exposition développementale aux PEs est la modification des marques épigénétiques de ces gènes cibles (Dolinoy et al., 2007). Pendant le développement, l'un des premiers facteurs épigénétique cible des stéroïdes sexuels identifié dans l'hypothalamus est la protéine histone H1 qui présente un dimorphisme sexuel dans le noyau arqué (femelles > mâles). Ce dimorphisme sexuel a été inversé par un traitement néonatal à la testostérone (Garcia-Segura et al., 1993). La méthylation de l'ADN est l'un des mécanismes clés qui module le taux de transcription de gènes. Pendant le développement, ce processus de méthylation permet de programmer les profils d'expression des gènes chez l'adulte. La différenciation sexuelle du cerveau implique la programmation de gènes cibles qui vont avoir un profil d'expression sexuellement dimorphique (McCarthy and Nugent, 2013). L'impact des PEs, via des modifications des marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN sur la différenciation sexuelle et le développement de l'hypothalamus comme *Esr1* a été récemment montré (Kundakovic et al., 2013). Cette étude a examiné les conséquences d'une exposition gestationnelle au bisphénol A (BPA) et a pu corréler ses effets moléculaires à des dérégulations des comportements socio-sexuels ainsi que l'anxiété des animaux exposés à l'âge adulte. Ces auteurs concluent que l'exposition au BPA induit des modifications de l'empreinte épigénétique de gènes cibles hypothalamiques qui seraient possiblement à l'origine des effets irréversibles sur le fonctionnement du cerveau et des comportements sexuellement dimorphiques.

Les résultats de notre étude *in vivo* ont pu mettre en évidence des effets notables de l'exposition développementale à l'EE2 sur les comportements des mâles et des femelles adultes. Ces effets comportementaux et fonctionnels pourraient être aussi le résultat d'une modification des marques épigénétiques dans les gènes cibles qui contrôlent ces comportements. En perspective à ces résultats, il serait intéressant d'identifier par une approche transcriptomique à haut débit (RNAseq) ou par une approche de gènes candidats, les gènes cibles dans l'hypothalamus et d'autres structures du cerveau sensibles aux œstrogènes pendant le développement et impliquées dans la régulation des comportements de reproduction à l'âge adulte. L'APOm, le noyau de l'amygdale médiane, les noyaux du lit de la strie terminale ou

encore du noyau spinal bulbocaverneux chez le mâle (Veening and Coolen, 2014), le VMN (noyau ventro-médian), le septum latéral et l'APO chez les femelles (Veening et al., 2014), sont des structures impliquées dans le comportement sexuel et sensibles aux œstrogènes. Ces structures pourraient être parmi les cibles potentielles de l'EE2. Sur les gènes différentiellement exprimés, la caractérisation de l'empreinte épigénétique dans les régions promotrices permettrait d'identifier si ces gènes sont une cible potentielle directe de l'EE2 dans le système nerveux pendant le développement.

Les conséquences de l'exposition périnatale à des événements environnementaux inappropriés ne concernent pas uniquement les fonctions neuroendocrines de la reproduction. Chez les femelles F1 exposées à l'EE2, nous avons détecté une augmentation de l'anxiété à l'âge adulte. Cela suggère une modification de l'axe corticotrope qui module ce paramètre. Des études précédentes ont montré le même effet sur l'anxiété chez des rates (Arabo et al., 2005) et des souris femelles (Ryan and Vandenbergh, 2006) exposées pendant le développement à l'EE2. Cette modification de l'état d'anxiété de ces femelles pourrait interférer avec d'autres comportements liés à la reproduction, aux interactions sociales avec leurs congénères et avec leurs descendances (van der Kooij et al., 2015). Une modification du comportement maternel a été observée chez les femelles F1 traitées à l'EE2. La conséquence de cette modification du comportement maternel sur le comportement de la descendance n'a pas été mesurée dans notre étude. Il est tout à fait imaginable qu'une exposition périnatale à un état de stress engendré par un comportement maternel modifié puisse avoir des conséquences sur le comportement sexuel à l'âge adulte (Korosi et al., 2010, Perez-Laso et al., 2013). L'effet du comportement maternel des mères exposées pendant leur gestation à l'EE2 sur le comportement sexuel de leurs descendances pourrait être évalué par des expériences d'adoptions croisées (cross-fostering) d'individus nouveau-nés descendants de mères traitées à l'EE2 par des mères non exposées et inversement, d'individus non exposés adoptés à des mères traitées. Cette expérience permettrait d'identifier la part du traitement à l'EE2 sur le cerveau des fœtus et la part de l'effet d'un comportement maternel modifié sur les comportements des individus à l'âge adulte.

Il est donc évident que la période périnatale soit hautement sensible aux variations des paramètres de l'environnement et que les conséquences d'une exposition développementale pendant cette période, induisent des effets à long terme et irréversibles retrouvés à l'âge adulte. D'autres événements que l'exposition aux PEs,

tels que la restriction alimentaire, le stress ou les infections, survenues pendant cette phase critique de la vie ont été liés à l'apparition de troubles métaboliques (obésité, diabète), de maladies nerveuses (schizophrénie, hyperactivité) ou de différents cancers. Ces études supportent la théorie de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD) (Hanson and Gluckman, 2014).

B- La période péri-pubertaire

Certaines études menées sur les aspects fondamentaux de la différenciation sexuelle du cerveau ont suggéré une plasticité cérébrale de certaines régions du cerveau sexuellement dimorphiques pendant la phase juvénile et jusqu'à la période pré-pubertaire (Arnold and Breedlove, 1985, Sisk and Zehr, 2005). Chez la rate, l'AVPV présente une sensibilité aux œstrogènes périnataux mais poursuit sa maturation pendant toutes la phase juvénile (Davis et al., 1996b). Au niveau moléculaire, l'expression du gène kisspeptine subit une maturation progressive pendant la période péri-pubertaire (Choe et al., 2013). Chez le hamster, une étude a démontré que de nouveaux neurones et cellules gliales, nés pendant la période péri-pubertaire, sont intégrés dans des réseaux limbiques et hypothalamiques fonctionnels impliqués dans le comportement social chez l'adulte (Mohr and Sisk, 2013). Ces études mettent en évidence une plasticité cérébrale évidente pendant le développement postnatal et péri-pubertaire. Il est donc probable que le l'ensemble ou certains effets de l'EE2 que nous avons observés chez les animaux adultes soient induits par une perturbation des processus de maturation et d'organisation postnatales. Pour vérifier cette hypothèse, une exposition à l'EE2 restreinte à une courte période (juvénile ou péri-pubertaire) permettrait d'identifier si l'EE2 induit une réorganisation de certaines structures du cerveau pendant ces périodes.

II- Transmission multigénérationnelle et transgénérationnelle des effets de l'EE2

Les effets de l'EE2 transmis au travers des quatre générations dont uniquement la première génération a été exposée à la molécule, suggèrent que les modifications comportementales et neuroanatomiques observées à l'âge adulte sont inscrites dans le patrimoine héritable qui se transmet par les cellules germinales lors de la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde. Plusieurs études ont mis en évidence que des événements spécifiques au cours de la vie tels que le stress ou la malnutrition, qui n'ont

pas de pouvoir mutagène sont capables d'affecter la descendance de ces individus (Toth, 2015).

Ce principe de transmission des caractères acquis pendant la vie de l'individu ne correspond pas aux principes de génétique classique qui stipulent que l'émergence d'un nouveau phénotype implique une mutation qui survient par hasard dans le génome. Dans notre étude, les mâles exposés à l'EE2 présentent un phénotype reproductible chez la majorité des animaux. Il est donc peu probable sur une échelle de temps aussi courte, qu'une mutation ait touché un nombre aussi important d'animaux, si l'on se réfère au principe d'apparition au hasard de ce phénomène. De plus, le pouvoir mutagène de l'EE2 à des doses aussi faibles est très peu probable et n'a jamais été rapporté dans la littérature. L'explication la plus rationnelle à ce phénotype apparu chez nos mâles s'apparente à la théorie adaptative de Lamarck (1744-1829), développée dans le domaine de la biologie évolutive. Cette théorie prône que l'évolution phénotypique se fait grâce à l'environnement et propose que les organismes vivants seraient capables de s'adapter à leur environnement en acquérant de nouveaux phénotypes comportementaux, physiologiques et structurels. Cette théorie est confirmée actuellement par plusieurs études grâces aux techniques de biologie moléculaire qui ont identifié les marques épigénétiques comme le support de l'adaptation des organismes et des populations à l'environnement qui les entourent (Burggren, 2014). L'exposition aux PEs constituerait une variation brutale d'un facteur environnemental auquel les individus doivent s'adapter. Cette adaptation implique des variations moléculaires d'ordre épigénétique qui sont à l'origine de variations comportementales et physiologiques, capables d'influencer les trajectoires évolutives (Skinner et al., 2014, Heindel et al., 2015)

La transmission aux générations suivantes de ces caractères acquis au cours de la vie ne serait pas liée à la séquence modifiée d'un gène donné, mais plutôt à des facteurs moléculaires épigénétiques. Ces derniers seraient capables de transmettre l'information d'un changement adaptatif ou physiologique dans les cellules somatiques suite à une modification environnementale (stress, exposition aux polluants) aux cellules germinales qui sont responsables de la transmission du patrimoine héréditaire aux générations futures. Une étude récente a pu montrer que le stress chronique subit pendant la vie adulte chez des mâles induit l'expression de neuf microARN isolés dans leurs spermatozoïdes (Rodgers et al., 2013). Les auteurs ont suggéré que ces microARN

induits suite au stress subi seraient responsables de la transmission de l'information de cet état stress au niveau cérébral, aux cellules germinales des mâles. Ce mécanisme serait potentiellement responsable de la transmission de ce caractère acquis à leur descendance. Dans une deuxième étude, ces même auteurs ont vérifié cette hypothèse en injectant les neufs microARN isolés à partir de sperme d'animaux stressés dans le cytoplasme d'un zygote issu de gamètes d'animaux non stressés (Rodgers et al., 2015). A l'âge adulte, les animaux qui se sont développés à partir de ces zygotes injectés, présentaient des signes d'hyperactivation de l'axe corticotrope comparables à ceux d'animaux ayant directement subit ce stress pendant leur vie. Ces observations suggèrent fortement que les informations portées par ces microRNA ont pu transmettre l'événement de stress subi pendant la vie des animaux. Les auteurs ont également examiné le transcriptome de cellules issues du noyau paraventriculaire (PVN) hypothalamique connu pour son implication dans la régulation de l'axe corticotrope. Les résultats de cette analyse mettent en évidence 298 gènes différentiellement exprimés dont 288 sous-exprimés (Rodgers et al., 2015). Ces résultats mettent en évidence la capacité de ces facteurs spermatiques à reprogrammer de manière irréversible le cerveau de ces animaux. Par ailleurs, la sous-expression induite par ces microARN de ces gènes, suggère une reprogrammation en amont des marques épigénétiques propres à ses gènes telles que la méthylation de l'ADN ou de la chromatine associée (*Pour revue, voir* Bale, 2015)

Dans notre étude, chez les mâles exposés à l'EE2, un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans la reprogrammation du comportement sexuel et la transmission de ce caractère sur plusieurs générations *via* des facteurs épigénétiques tels que les microARN circulants. Ces microARN auraient préprogrammé les cellules germinales des mâles et, par ce biais, transmis ce phénotype à la génération suivante. L'étude préliminaire de croisements de mâles F1 exposés à l'EE2 avec des femelles contrôles suggère une transmission *via* la lignée germinale paternelle. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience avec des effectifs plus importants, mettant en jeux des mâles exposés à l'EE2 avec des femelles contrôles et inversement, permettrait de confirmer cette hypothèse. Par la suite, des expériences similaires à celles de Rodgers et al (2011) de recherche de facteurs épigénétiques tels que des microARN paternels ou maternels (si la transmission s'est avérée par la lignée maternelle) dans leurs cellules germinales pourraient être entreprise. L'isolation de tels facteurs et leur injection sur des zygotes issus d'animaux non exposés à l'EE2, si elle est capable de reproduire les mêmes effets

comportementaux sur ces animaux, confirmerait l'hypothèse d'une transmission et d'une reprogrammation du développement neural *via* ces mécanismes épigénétiques.

III- Conclusions

Au regard du rôle important des œstrogènes dans la différenciation sexuelle des circuits neuronaux et neuroendocrines contrôlant la fonction de reproduction et à partir de la puberté dans leur activation et leur régulation, les PEs œstrogéno-mimétiques tels que l'EE2 dont a fait l'objet cette étude sont parmi les molécules qui pourraient poser le plus de risques pour la fertilité humaine et animale. Le rôle primordial en tant qu'intégrateur des signaux environnementaux et physiologiques de ces réseaux neuroendocrines, place ce système parmi les cibles privilégiées des xénœstrogènes. Par conséquent les effets d'une perturbation neuroendocrine pourraient être à l'origine d'une altération des fonctions de l'appareil reproducteur telles que la production de gamètes ou la synthèse des hormones sexuelles chez le mâle et la femelle. Ces altérations pourraient entraîner des problèmes de fertilité dont la recrudescence ces dernières décennies a été largement documentée (Oliva et al., 2001, Buck Louis et al., 2013).

Grâce aux différentes études menées depuis les deux dernières décennies, plusieurs avancées ont été réalisées dans l'étude de l'impact des PEs. Ces études ont permis d'identifier deux points essentiels : d'une part la période développementale comme une cible privilégiée de ces molécules et d'autre part la persistance des effets de l'exposition développementale au-delà de la période d'exposition, voire sur plusieurs générations après une exposition parentale. Les résultats présentés dans cette thèse rajoutent un élément de preuve à ces conclusions et mettent clairement en évidence par une approche intégrative l'effet « perturbateur endocrinien » de l'EE2 pendant le développement sur les comportements, la neuroendocrinologie et la physiologie de la reproduction.

Nos connaissances actuelles sur le mode d'action de l'EE2 ne permettent pas d'envisager une autre solution pour éviter les effets perturbateurs endocriniens que celle de la prévention. En effet, éviter l'exposition à l'EE2 et à d'autres potentiels PEs pendant les phases critiques s'avère être la solution la plus rationnelle à court et à moyen terme. Néanmoins, cette prévention implique des connaissances

supplémentaires sur les modes de filtration et d'élimination de cette molécule par les stations d'épuration pour éviter de les répandre dans l'environnement.

Les enjeux actuels dans l'étude des effets des PEs sur la santé sont d'une part de mettre en place une méthode efficace et prédictive pour identifier les effets des différentes molécules retrouvées dans l'environnement et d'autre part de comprendre les mécanismes d'actions de ces molécules au niveau cellulaire et moléculaire. Le modèle d'une approche intégrative qui prend en compte les différents niveaux de perturbation (moléculaire, cellulaire, physiologique et comportementale) permettrait de construire un modèle de fonctionnement global et d'évaluer ainsi l'impact réel sur la santé humaine et animale. Parallèlement, le développement de modèles *in vitro* efficaces, permettrait de répondre à l'enjeu de la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires d'actions des PEs.

Références bibliographiques

Abney ER, Bartlett PP, Raff MC (1981) Astrocytes, ependymal cells, and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. Developmental Biology 83:301-310.

Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K (2007) Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. J Reprod Dev 53:367-378.

Agca E, Batailler M, Tillet Y, Chemineau P, Duittoz AH (2008) Modulation of estrogen receptors during development inhibits neurogenesis of precursors to GnRH-1 neurones: in vitro studies with explants of ovine olfactory placode. Brain Res 1223:34-41.

Allieri F, Spigolon G, Melcangi RC, Collado P, Guillamon A, Gotti S, Panzica GC (2013) Androgen receptor deficiency alters the arginine-vasopressin sexually dimorphic system in Tfm rats. Neuroscience 253:67-77.

Amateau SK, McCarthy MM (2002) A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. J Neurosci 22:8586-8596.

Amateau SK, McCarthy MM (2004) Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. Nat Neurosci 7:643-650.

Anderson RH, Fleming DE, Rhees RW, Kinghorn E (1986) Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. Brain Res 370:1-10.

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science 308:1466-1469.

Anway MD, Rekow SS, Skinner MK (2008) Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. Genomics 91:30-40.

Arabo A, Lefebvre M, Fermanel M, Caston J (2005) Administration of 17alpha-ethinylestradiol during pregnancy elicits modifications of maternal behavior and emotional alteration of the offspring in the rat. Brain Res Dev Brain Res 156:93-103.

Arai Y, Sekine Y, Murakami S (1996) Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. Neurosci Res 25:403-407.

Arditsoglou A, Voutsa D (2012) Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. Mar Pollut Bull 64:2443-2452.

Aris AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM (2014) Occurrence of 17alpha-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. Environ Int 69:104-119.

Arnold AP, Breedlove SM (1985) Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. Horm Behav 19:469-498.

Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C (2006) Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. Nat Neurosci 9:220-226.

Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2002) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. J Neurosci 22:9104-9112.

Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2003) The aromatase knockout (ArKO) mouse provides new evidence that estrogens are required for the development of the female brain. Ann N Y Acad Sci 1007:251-262.

Bale TL (2015) Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. Nat Rev Neurosci 16:332-344.

Balsiger HA, de la Torre R, Lee WY, Cox MB (2010) A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. Sci Total Environ 408:1422-1429.

Barraud P, St John JA, Stolt CC, Wegner M, Baker CV (2013) Olfactory ensheathing glia are required for embryonic olfactory axon targeting and the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. Biol Open 2:750-759.

Beardmore; JA, Mair; GC, Lewis; RI (2001) Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. Aquaculture 197(1):283-301

Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. Mol Pharmacol 51:535-541.

Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypopthalamic gonadotropin-releasing hormone. Science 202:631-633.

Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schafer AJ, Rijs GB, Wegener J, Cofino WP (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Sci Total Environ 225:101-108.

Birnberg CH, Brandman LJ, Greenblat B (1952) The use of ethinyl estradiol in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 63:1151-1153.

Bisenius ES, Veeramachaneni DN, Sammonds GE, Tobet S (2006) Sex differences and the development of the rabbit brain: effects of vinclozolin. Biol Reprod 75:469-476.

Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM (2000) The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. Toxicol Sci 54:138-153.

Bodo C, Kudwa AE, Rissman EF (2006) Both estrogen receptor-alpha and -beta are required for sexual differentiation of the anteroventral periventricular area in mice. Endocrinology 147:415-420.

Bolt HM (1979) Metabolism of estrogens--natural and synthetic. Pharmacol Ther 4:155-181.

Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM (2007) Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. Environmental Health Perspectives 115 Suppl 1:69-76.

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 49:419-436.

Bourguignon JP, Franssen D, Gerard A, Janssen S, Pinson A, Naveau E, Parent AS (2013) Early neuroendocrine disruption in hypothalamus and hippocampus: developmental effects including female sexual maturation and implications for endocrine disrupting chemical screening. J Neuroendocrinol 25:1079-1087.

Bourguignon JP, Jaeken J, Gerard A, de Zegher F (1997) Amino acid neurotransmission and initiation of puberty: evidence from nonketotic hyperglycinemia in a female infant and gonadotropin-releasing hormone secretion by rat hypothalamic explants. J Clin Endocrinol Metab 82:1899-1903.

Braga O, Smythe GA, Schafer AI, Feitz AJ (2005) Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. Environmental science & technology 39:3351-3358.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ (2007) Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. J Endocrinol 193:311-321.

Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Molecular and cellular neurosciences 21:512-520.

Brock O, Baum MJ, Bakker J (2011) The development of female sexual behavior requires prepubertal estradiol. J Neurosci 31:5574-5578.

Buck Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, Sweeney AM, Lynch CD, Gore-Langton RE, Maisog J, Kim S, Chen Z, Barr DB (2013) Persistent environmental pollutants and couple fecundity: the LIFE study. Environmental Health Perspectives 121:231-236.

Burggren WW (2014) Epigenetics as a source of variation in comparative animal physiology - or - Lamarck is lookin' pretty good these days. J Exp Biol 217:682-689.

Cao J, Rebuli ME, Rogers J, Todd KL, Leyrer SM, Ferguson SA, Patisaul HB (2013) Prenatal bisphenol A exposure alters sex-specific estrogen receptor expression in the neonatal rat hypothalamus and amygdala. Toxicol Sci 133:157-173.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Bmj 305:609-613.

Carlson DB, Perdew GH (2002) A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. J Biochem Mol Toxicol 16:317-325.

Casoni F, Hutchins BI, Donohue D, Fornaro M, Condie BG, Wray S (2012) SDF and GABA interact to regulate axophilic migration of GnRH neurons. J Cell Sci 125:5015-5025.

Chaichana KL, Guerrero-Cazares H, Capilla-Gonzalez V, Zamora-Berridi G, Achanta P, Gonzalez-Perez O, Jallo GI, Garcia-Verdugo JM, Quinones-Hinojosa A (2009) Intra-operatively obtained human tissue: protocols and techniques for the study of neural stem cells. J Neurosci Methods 180:116-125.

Chappell PE, Schneider JS, Kim P, Xu M, Lydon JP, O'Malley BW, Levine JE (1999) Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice. Endocrinology 140:3653-3658.

Choe HK, Kim HD, Park SH, Lee HW, Park JY, Seong JY, Lightman SL, Son GH, Kim K (2013) Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A 110:5677-5682.

Chowen JA, Torresaleman I, Garciasegura LM (1992) Trophic Effects of Estradiol on Fetal-Rat Hypothalamic Neurons. Neuroendocrinology 56:895-901.

Christian CA, Moenter SM (2010) The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. Endocr Rev 31:544-577.

Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE (2009a) Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. Endocrinology 150:3214-3220.

Clarkson J, Busby ER, Kirilov M, Schutz G, Sherwood NM, Herbison AE (2014) Sexual differentiation of the brain requires perinatal kisspeptin-GnRH neuron signaling. J Neurosci 34:15297-15305.

Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE (2009b) Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. J Neuroendocrinol 21:673-682.

Clarkson J, Herbison AE (2006) Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 147:5817-5825.

Clement R, Guilbaud E, Barrios L, Rouge-Maillart C, Jousset N, Rodat O (2014) DES daughters in France: experts' points of view on the various genital, uterine and obstetric pathologies, and in utero DES exposure. Med Sci Law 54:219-229.

Colbert NK, Pelletier NC, Cote JM, Concannon JB, Jurdak NA, Minott SB, Markowski VP (2005) Perinatal exposure to low levels of the environmental antiandrogen vinclozolin alters sex-differentiated social play and sexual behaviors in the rat. Environmental Health Perspectives 113:700-707.

Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental Health Perspectives 101:378-384.

Constantin S (2011) Physiology of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurone: studies from embryonic GnRH neurones. J Neuroendocrinol 23:542-553.

Constantin S, Caraty A, Wray S, Duittoz AH (2009) Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants. Endocrinology 150:3221-3227.

Cook R, Calabrese EJ (2006) The importance of hormesis to public health. Environmental Health Perspectives 114:1631-1635.

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. Endocrinology 138:4613-4621.

Daniels G, Jha R, Shen Y, Logan SK, Lee P (2014) Androgen receptor coactivators that inhibit prostate cancer growth. Am J Clin Exp Urol 2:62-70.

Davidson JM (1966) Characteristics of sex behaviour in male rats following castration. Anim Behav 14:266-272.

Davis EC, Popper P, Gorski RA (1996a) The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. Brain Res 734:10-18.

Davis EC, Shryne JE, Gorski RA (1996b) Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. Neuroendocrinology 63:142-148.

de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, 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.

Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J (2004) Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. Molecular and cellular neurosciences 27:453-465.

Derouiche L, Keller M, Duittoz AH, Pillon D (2015a) Developmental exposure to Ethinylestradiol affects transgenerationally sexual behavior and neuroendocrine networks in male mice. Sci Rep 5:17457.

Derouiche L, Keller M, Martini M, Duittoz A, Pillon D (2015b) Developmental exposure to ethinylestradiol affects reproductive physiology, the GnRH neuroendocrine network and behaviors in female mouse

Front Neurosci in presse.

Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Camacho-Arroyo I, Velasco I (2009) Estradiol promotes proliferation of dopaminergic precursors resulting in a higher proportion of dopamine neurons derived from mouse embryonic stem cells. Int J Dev Neurosci 27:493-500.

Dickerson SM, Cunningham SL, Gore AC (2011) Prenatal PCBs disrupt early neuroendocrine development of the rat hypothalamus. Toxicol Appl Pharmacol 252:36-46.

Dickson RB, Eisenfeld AJ (1981) 17 Alpha-ethinyl estradiol is more potent than estradiol in receptor interactions with isolated hepatic parenchymal cells. Endocrinology 108:1511-1518.

Dohler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE, Gorski RA (1984) Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. Brain Res 302:291-295.

Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL (2007) Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. Reprod Toxicol 23:297-307.

DonCarlos LL (1996) Developmental profile and regulation of estrogen receptor (ER) mRNA expression in the preoptic area of prenatal rats. Brain Res Dev Brain Res 94:224-233.

DonCarlos LL, Handa RJ (1994) Developmental profile of estrogen receptor mRNA in the preoptic area of male and female neonatal rats. Brain Res Dev Brain Res 79:283-289.

Duittoz A, Prévot V (2014) développement, Neuroanatomie et fonction des neurones *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH). In: La reproduction animale et humaine(Saint-Dizier, M. and Chastant-Maillard, S., eds), pp 149-183: Quae.

Dussault EB, Balakrishnan VK, Borgmann U, Solomon KR, Sibley PK (2009) Bioaccumulation of the synthetic hormone 17alpha-ethinylestradiol in the

benthic invertebrates Chironomus tentans and Hyalella azteca. Ecotoxicol Environ Saf 72:1635-1641.

Edlund T, Jessell TM (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. Cell 96:211-224.

Eriksson P, Talts U (2000) Neonatal exposure to neurotoxic pesticides increases adult susceptibility: a review of current findings. Neurotoxicology 21:37-47.

Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavailles V, Balaguer P (2006) Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. Biochem Pharmacol 71:1459-1469.

Ezzat A, Pereira A, Clarke IJ (2015) Kisspeptin is a component of the pulse generator for GnRH secretion in female sheep but not the pulse generator. Endocrinology 156:1828-1837.

Fenichel P, Brucker-Davis F, Chevalier N (2015) The history of Distilbene((R)) (Diethylstilbestrol) told to grandchildren - the transgenerational effect. Ann Endocrinol (Paris) 76:253-259.

Fentress JC, Stanfield BB, Cowan WM (1981) Observation on the development of the striatum in mice and rats. Anat Embryol (Berl) 163:275-298.

Forger NG (2006) Cell death and sexual differentiation of the nervous system. Neuroscience 138:929-938.

Forger NG (2009) Control of cell number in the sexually dimorphic brain and spinal cord. J Neuroendocrinol 21:393-399.

Forger NG, Rosen GJ, Waters EM, Jacob D, Simerly RB, de Vries GJ (2004) Deletion of Bax eliminates sex differences in the mouse forebrain. Proc Natl Acad Sci U S A 101:13666-13671.

Fotherby K (1996) Bioavailability of orally administered sex steroids used in oral contraception and hormone replacement therapy. Contraception 54:59-69.

Franceschini I, Desroziers E, Caraty A, Duittoz A (2010) The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity. Eur J Neurosci 32:2031-2041.

Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. Neurosci Lett 401:225-230.

Froehner S, Machado KS, Stefan E, Bleninger T, da Rosa EC, de Castro Martins C (2012) Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. Mar Pollut Bull 64:75-79.

Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC (2012) Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms

of actions on behaviour and neuroendocrine systems. J Neuroendocrinol 24:144-159.

Fudvoye J, Bourguignon JP, Parent AS (2014) Endocrine-disrupting chemicals and human growth and maturation: a focus on early critical windows of exposure. Vitam Horm 94:1-25.

Fueshko S, Wray S (1994) LHRH cells migrate on peripherin fibers in embryonic olfactory explant cultures: an in vitro model for neurophilic neuronal migration. Developmental Biology 166:331-348.

Gabant P, Forrester L, Nichols J, Van Reeth T, De Mees C, Pajack B, Watt A, Smitz J, Alexandre H, Szpirer C, Szpirer J (2002) Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. Proc Natl Acad Sci U S A 99:12865-12870.

Garcia-Segura LM, Luquin S, Martinez P, Casas MT, Suau P (1993) Differential expression and gonadal hormone regulation of histone H1(0) in the developing and adult rat brain. Brain Res Dev Brain Res 73:63-70.

Gasser UE, Hatten ME (1990) Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells in vitro: glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation. J Neurosci 10:1276-1285.

Geller S, Kolasa E, Tillet Y, Duittoz A, Vaudin P (2013) Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development. Glia 61:550-566.

George FW, Ojeda SR (1982) Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. Endocrinology 111:522-529.

Gibson MJ, Ingraham L, Dobrjansky A (2000) Soluble factors guide gonadotropin-releasing hormone axonal targeting to the median eminence. Endocrinology 141:3065-3071.

Gilmore RF, Varnum MM, Forger NG (2012) Effects of blocking developmental cell death on sexually dimorphic calbindin cell groups in the preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis. Biol Sex Differ 3:5.

Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P (2007) Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. Horm Behav 52:307-316.

Gogan F, Slama A, Bizzini-Koutznetzova B, Dray F, Kordon C (1981) Importance of perinatal testosterone in sexual differentiation in the male rat. J Endocrinol 91:75-79.

Gore AC (2002) Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. Mol Cell Endocrinol 192:157-170.

Gore AC, Wu TJ, Oung T, Lee JB, Woller MJ (2002) A novel mechanism for endocrine-disrupting effects of polychlorinated biphenyls: direct effects on gonadotropin-releasing hormone neurones. J Neuroendocrinol 14:814-823.

Gorski RA (1978) Sexual differentiation of the brain. Hosp Pract 13:55-62.

Gudino-Cabrera G, Nieto-Sampedro M (1999) Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann-like brain macroglia. J Neurobiol 40:458-470.

Guerrero-Bosagna C, Jensen P (2015) Globalization, climate change, and transgenerational epigenetic inheritance: will our descendants be at risk? Clin Epigenetics 7:8.

Guo Q, Christakos S, Robinson N, Mattson MP (1998) Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A 95:3227-3232.

Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, Parkash J, Espy C, Fouveaut C, Leroy C, Baron S, Campagne C, Vanacker C, Collier F, Cruaud C, Meyer V, Garcia-Pinero A, Dewailly D, Cortet-Rudelli C, Gersak K, Metz C, Chabrier G, Pugeat M, Young J, Hardelin JP, Prevot V, Dode C (2012) SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. PLoS Genet 8:e1002896.

Hanson MA, Gluckman PD (2014) Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? Physiol Rev 94:1027-1076.

Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, Eskenazi B (2013) Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. Environ Res 126:43-50.

Hauser R, Sokol R (2008) Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. Fertil Steril 89:e59-65.

Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R, Kpodzo D (2006) Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (Xenopus laevis) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. Environmental Health Perspectives 114 Suppl 1:134-141.

Hays LE, Carpenter CD, Petersen SL (2002) Evidence that GABAergic neurons in the preoptic area of the rat brain are targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during development. Environmental Health Perspectives 110 Suppl 3:369-376.

He Z, Ferguson SA, Cui L, Greenfield LJ, Paule MG (2013) Development of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and the influence of estrogen-like compounds. Neural Regen Res 8:2763-2774.

He Z, Paule MG, Ferguson SA (2012) Low oral doses of bisphenol A increase volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male, but not female, rats at postnatal day 21. Neurotoxicol Teratol 34:331-337.

Heindel JJ, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, Grandjean P, Gray K, Landrigan PJ, Sly PD, Suk W, Cory Slechta D, Thompson C, Hanson M (2015) Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. Endocrinology 156:3416-3421.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev 87:905-931.

Helena CV, Toporikova N, Kalil B, Stathopoulos AM, Pogrebna VV, Carolino RO, Anselmo-Franci JA, Bertram R (2015) KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats. Endocrinology 156:4200-4213.

Henderson RG, Brown AE, Tobet SA (1999) Sex differences in cell migration in the preoptic area/anterior hypothalamus of mice. J Neurobiol 41:252-266.

Hernandez-Tristan R, Arevalo C, Canals S (1999) Effect of prenatal uterine position on male and female rats sexual behavior. Physiol Behav 67:401-408.

Hernandez-Tristan R, Leret ML, Almeida D (2006) Effect of intrauterine position on sex differences in the gabaergic system and behavior of rats. Physiol Behav 87:625-633.

Hlinak Z (1985) Oestradiol and progesterone treatment and precopulatory behaviour in female rats ovariectomized at different ages. Physiol Bohemoslov 34:373-380.

Holmes L, Jr., Escalante C, Garrison O, Foldi BX, Ogungbade GO, Essien EJ, Ward D (2008) Testicular cancer incidence trends in the USA (1975-2004): plateau or shifting racial paradigm? Public Health 122:862-872.

Hull EM, Dominguez JM (2007) Sexual behavior in male rodents. Horm Behav 52:45-55.

Jasoni CL, Porteous RW, Herbison AE (2009) Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. Dev Dyn 238:524-531.

Johnston RE (1998) Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition. Ann N Y Acad Sci 855:333-348.

Karsch FJ, Evans NP (1996) Feedback actions of estradiol on GnRH secretion during the follicular phase of the estrous cycle. Acta Neurobiol Exp (Wars) 56:715-725.

Karsch FJ, Malpaux B, Wayne NL, Robinson JE (1988) Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. Reprod Nutr Dev 28:459-472.

Kato Y, Nakashima S, Maekawa F, Tsukahara S (2012) Involvement of postnatal apoptosis on sex difference in number of cells generated during late fetal period in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in rats. Neurosci Lett 516:290-295.

Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M (2007a) Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. Endocrinology 148:1774-1783.

Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG, Pavlova MN, Rohde AD, Clifton DK, Steiner RA, Rissman EF (2007b) The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. J Neurosci 27:8826-8835.

Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environmental Health Perspectives 104 Suppl 4:715-740.

Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E (2008) An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. Endocrinology 149:4151-4157.

King OC, van de Merwe JP, McDonald JA, Leusch FD (2015) Concentrations of levonorgestrel and ethinylestradiol in wastewater effluents: is the progestin also cause for concern? Environ Toxicol Chem.

Klenke U, Taylor-Burds C (2012) Culturing embryonic nasal explants for developmental and physiological study. Curr Protoc Neurosci Chapter 3:Unit 3 25 21-16.

Knobil E (1990) The GnRH pulse generator. Am J Obstet Gynecol 163:1721-1727.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environ Sci Technol 36:1202-1211.

Korenbrot CC, Paup DC, Gorski RA (1975) Effects of testosterone propionate or dihydrotestosterone propionate on plasma FSH and LH levels in neonatal rats and on sexual differentiation of the brain. Endocrinology 97:709-717.

Korosi A, Shanabrough M, McClelland S, Liu ZW, Borok E, Gao XB, Horvath TL, Baram TZ (2010) Early-life experience reduces excitation to stress-responsive hypothalamic neurons and reprograms the expression of corticotropin-releasing hormone. J Neurosci 30:703-713.

Krishnan S, Intlekofer KA, Aggison LK, Petersen SL (2009) Central role of TRAF-interacting protein in a new model of brain sexual differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 106:16692-16697.

Kriszt R, Winkler Z, Polyak A, Kuti D, Molnar C, Hrabovszky E, Kallo I, Szoke Z, Ferenczi S, Kovacs KJ (2015) Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rats via Central Kisspeptin Signaling. Endocrinology 156:3996-4007.

Kudwa AE, Bodo C, Gustafsson JA, Rissman EF (2005) A previously uncharacterized role for estrogen receptor beta: defeminization of male brain and behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 102:4608-4612.

Kundakovic M, Gudsnuk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, Champagne FA (2013) Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. Proc Natl Acad Sci U S A 110:9956-9961.

Kurian JR, Terasawa E (2013) Epigenetic control of gonadotropin releasing hormone neurons. Front Endocrinol (Lausanne) 4:61.

Kusano K, Fueshko S, Gainer H, Wray S (1995) Electrical and synaptic properties of embryonic luteinizing hormone-releasing hormone neurons in explant cultures. Proc Natl Acad Sci U S A 92:3918-3922.

Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN (2002a) Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by Chlorella vulgaris. Appl Environ Microbiol 68:859-864.

Lai KM, Scrimshaw MD, Lester JN (2002b) Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. Sci Total Environ 289:159-168.

Lei B, Huang S, Zhou Y, Wang D, Wang Z (2009) Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. Chemosphere 76:36-42.

Lemmen JG, Broekhof JL, Kuiper GG, Gustafsson JA, van der Saag PT, van der Burg B (1999) Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis. Mech Dev 81:163-167.

Lenz KM, McCarthy MM (2010) Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. Eur J Neurosci 32:2096-2104.

Lenz KM, Nugent BM, McCarthy MM (2012) Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. Front Neurosci 6:26.

Lephart ED, Call SB, Rhees RW, Jacobson NA, Weber KS, Bledsoe J, Teuscher C (2001) Neuroendocrine regulation of sexually dimorphic brain structure and associated sexual behavior in male rats is genetically controlled. Biol Reprod 64:571-578.

Leranth C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ (2008) Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. Proc Natl Acad Sci U S A 105:14187-14191.

Lindzey J, Crews D (1992) Interactions between progesterone and androgens in the stimulation of sex behaviors in male little striped whiptail lizards, Cnemidophorus inornatus. Gen Comp Endocrinol 86:52-58.

Livne I, Gibson MJ, Silverman AJ (1993) Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse. Developmental Biology 159:643-656.

Lopez-Gonzalez R, Camacho-Arroyo I, Velasco I (2011) Progesterone and 17beta-estradiol increase differentiation of mouse embryonic stem cells to motor neurons. IUBMB Life 63:930-939.

Lopez B, Ollivier P, Togola A, Baran N, Ghestem JP (2015) Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants. Sci Total Environ 518-519:562-573.

MacLusky NJ, Hajszan T, Leranth C (2005) The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. Environmental Health Perspectives 113:675-679.

MacLusky NJ, Naftolin F (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. Science 211:1294-1302.

Maffucci JA, Gore AC (2009) Chapter 2: hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. Int Rev Cell Mol Biol 274:69-127.

Maggi A, Villa A (2014) In vivo dynamics of estrogen receptor activity: the ERE-Luc model. J Steroid Biochem Mol Biol 139:262-269.

Martini M, Di Sante G, Collado P, Pinos H, Guillamon A, Panzica GC (2008) Androgen receptors are required for full masculinization of nitric oxide synthase system in rat limbic-hypothalamic region. Horm Behav 54:557-564.

Marty MS, Carney EW, Rowlands JC (2011) Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. Toxicol Sci 120 Suppl 1:S93-108.

Matsumoto A, Arai Y (1986) Development of sexual dimorphism in synaptic organization in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rats. Neurosci Lett 68:165-168.

Matthews J, Gustafsson JA (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. Nucl Recept Signal 4:e016.

McCarthy MM (2008) Estradiol and the developing brain. Physiol Rev 88:91-124.

McCarthy MM, Nugent BM (2013) Epigenetic contributions to hormonally-mediated sexual differentiation of the brain. J Neuroendocrinol 25:1133-1140.

McCarthy MM, Todd BJ, Amateau SK (2003) Estradiol modulation of astrocytes and the establishment of sex differences in the brain. Ann N Y Acad Sci 1007:283-297.

McEwen BS, Lieberburg I, Chaptal C, Krey LC (1977) Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. Horm Behav 9:249-263.

McGarvey C, Cates PA, Brooks A, Swanson IA, Milligan SR, Coen CW, O'Byrne KT (2001) Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. Endocrinology 142:1202-1208.

McLachlan JA, Newbold RR, Bullock B (1975) Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. Science 190:991-992.

Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. Neuron 5:1-10.

Mendola P, Messer LC, Rappazzo K (2008) Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. Fertil Steril 89:e81-94.

Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proc Natl Acad Sci U S A 102:1761-1766.

Messina A, Giacobini P (2013) Semaphorin signaling in the development and function of the gonadotropin hormone-releasing hormone system. Front Endocrinol (Lausanne) 4:133.

Millen RS, Schenck K (1947) Case reports covering the usage of diethylstilbestrol for the treatment and prevention of accidents of pregnancy. Med Times 75:252-255.

Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, Calafat AM, Wolff MS (2011) Endocrine disruptors and childhood social impairment. Neurotoxicology 32:261-267.

Miragall F, Kadmon G, Schachner M (1989) Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. Developmental Biology 135:272-286.

Mittelman-Smith MA, Williams H, Krajewski-Hall SJ, Lai J, Ciofi P, McMullen NT, Rance NE (2012) Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. Endocrinology 153:2800-2812.

Mohr MA, Sisk CL (2013) Pubertally born neurons and glia are functionally integrated into limbic and hypothalamic circuits of the male Syrian hamster. Proc Natl Acad Sci U S A 110:4792-4797.

Moore JP, Jr., Shang E, Wray S (2002) In situ GABAergic modulation of synchronous gonadotropin releasing hormone-1 neuronal activity. J Neurosci 22:8932-8941.

Murakami S, Arai Y (1989) Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. Neurosci Lett 102:185-190.

Murakami S, Seki T, Rutishauser U, Arai Y (2000) Enzymatic removal of polysialic acid from neural cell adhesion molecule perturbs the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing chick forebrain. J Comp Neurol 420:171-181.

Myers JP, Zoeller RT, vom Saal FS (2009) A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. Environmental Health Perspectives 117:1652-1655.

Nikolics K, Mason AJ, Szonyi E, Ramachandran J, Seeburg PH (1985) A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. Nature 316:511-517.

Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E (2009) Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. Mol Endocrinol 23:349-359.

Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, Hodes GE, Lenz KM, Mahurkar A, Russo SJ, Devine SE, McCarthy MM (2015) Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. Nat Neurosci 18:690-697.

Nunemaker CS, DeFazio RA, Geusz ME, Herzog ED, Pitts GR, Moenter SM (2001) Long-term recordings of networks of immortalized GnRH neurons reveal episodic patterns of electrical activity. J Neurophysiol 86:86-93.

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S (2007) Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. Nature 446:562-566.

Okada M, Makino A, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S, Furukawa Y (2010) Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. Int J Mol Sci 11:4114-4123.

Okamoto I, Heard E (2009) Lessons from comparative analysis of X-chromosome inactivation in mammals. Chromosome Res 17:659-669.

Oliva A, Spira A, Multigner L (2001) Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. Hum Reprod 16:1768-1776.

Orikasa C, Kondo Y, Usui S, Sakuma Y (2010) Similar numbers of neurons are generated in the male and female rat preoptic area in utero. Neurosci Res 68:9-14.

Orikasa C, Sakuma Y (2010) Estrogen configures sexual dimorphism in the preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice. J Comp Neurol 518:3618-3629.

Ottem EN, Godwin JG, Krishnan S, Petersen SL (2004) Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. J Neurosci 24:8097-8105.

Overgaard A, Holst K, Mandrup KR, Boberg J, Christiansen S, Jacobsen PR, Hass U, Mikkelsen JD (2013) The effect of perinatal exposure to ethinyl oestradiol or a mixture of endocrine disrupting pesticides on kisspeptin neurons in the rat hypothalamus. Neurotoxicology 37:154-162.

Owens W, Koeter HB (2003) The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. Environmental Health Perspectives 111:1527-1529.

Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S (2008) Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. Environ Res 108:150-157.

Pan M, Zhang C (2013) Stimulatory effect of gonadal hormones on fetal rat hippocampal neural proliferation requires neurotrophin receptor activation in vitro. Neurosci Lett 546:1-5.

Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn MJ, Jr., Lavoie E, Palanza P, Ottinger MA (2007) Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. Front Neuroendocrinol 28:179-200.

Patisaul HB, Polston EK (2008) Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. Brain Res Rev 57:352-362.

Pauwels B, Wille K, Noppe H, De Brabander H, Van de Wiele T, Verstraete W, Boon N (2008) 17alpha-ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17beta-estradiol and estriol. Biodegradation 19:683-693.

Perez-Laso C, Ortega E, Martin JL, Perez-Izquierdo MA, Gomez F, Segovia S, Del Cerro MC (2013) Maternal care interacts with prenatal stress in altering sexual dimorphism in male rats. Horm Behav 64:624-633.

Pfaff DW, Sakuma Y (1979) Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. J Physiol 288:203-210.

Phoenix CH (2009) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Horm Behav 55:566.

Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Endocrinology 65:369-382.

Pillon D, Cadiou V, Angulo L, Duittoz AH (2012) Maternal exposure to 17-alpha-ethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. Brain Res 1433:29-37.

Pojana G, Bonfa A, Busetti F, Collarin A, Marcomini A (2004) Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. Environ Toxicol Chem 23:1874-1880.

Polston EK, Simerly RB (2006) Ontogeny of the projections from the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus in the female rat. J Comp Neurol 495:122-132.

Program. NT (2010) Multigenerational reproductive toxicology study of ethinyl estradiol (CAS No. 57-63-6) in Sprague-Dawley rats. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 1-312.

Puelles L, Rubenstein JL (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. Trends Neurosci 16:472-479.

Purnelle G, Gerard A, Czajkowski V, Bourguignon JP (1997) Pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone by rat hypothalamic explants without cell bodies of GnRH neurons [corrected]. Neuroendocrinology 66:305-312.

Rangaraju NS, Xu JF, Harris RB (1991) Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. Neuroendocrinology 53:20-28.

Rao K, Lei B, Li N, Ma M, Wang Z (2013) Determination of estrogens and estrogenic activities in water from three rivers in Tianjin, China. J Environ Sci (China) 25:1164-1171.

Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC (2007) S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. Glia 55:165-177.

Rasier G, Parent AS, Gerard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP (2007) Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. Biol Reprod 77:734-742.

Raskin K, de Gendt K, Duittoz A, Liere P, Verhoeven G, Tronche F, Mhaouty-Kodja S (2009) Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. J Neurosci 29:4461-4470.

Raynaud JP (1973) Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. Steroids 21:249-258.

Rebuli ME, Cao J, Sluzas E, Delclos KB, Camacho L, Lewis SM, Vanlandingham MM, Patisaul HB (2014) Investigation of the effects of subchronic low dose oral exposure to bisphenol A (BPA) and ethinyl estradiol (EE) on estrogen receptor expression in the juvenile and adult female rat hypothalamus. Toxicol Sci 140:190-203.

Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. J Neurosci 12:4565-4574.

Rhees RW, Al-Saleh HN, Kinghorn EW, Fleming DE, Lephart ED (1999) Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. Brain Res Bull 50:193-199.

Robitaille CN, Rivest P, Sanderson JT (2015) Antiandrogenic mechanisms of pesticides in human LNCaP prostate and H295R adrenocortical carcinoma cells. Toxicol Sci 143:126-135.

Rocha S, Domingues VF, Pinho C, Fernandes VC, Delerue-Matos C, Gameiro P, Mansilha C (2013) Occurrence of Bisphenol A, Estrone, 17 beta-Estradiol and 17 alpha-Ethinylestradiol in Portuguese Rivers. Bull Environ Contam Toxicol 90:73-78.

Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, Revello S, Bale TL (2013) Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. J Neurosci 33:9003-9012.

Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL (2015) Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. Proc Natl Acad Sci U S A 112:13699-13704.

Rogers MC, Silverman AJ, Gibson MJ (1997) Gonadotropin-releasing hormone axons target the median eminence: in vitro evidence for diffusible chemoattractive signals from the mediobasal hypothalamus. Endocrinology 138:3956-3966.

Roselli CE, Liu M, Hurn PD (2009) Brain aromatization: classic roles and new perspectives. Semin Reprod Med 27:207-217.

Ryan BC, Vandenbergh JG (2006) Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. Horm Behav 50:85-93.

Sakuma Y (1995) Differential control of proceptive and receptive components of female rat sexual behavior by the preoptic area. Jpn J Physiol 45:211-228.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. Nature 338:161-164.

Scott CJ, Tilbrook AJ, Rawson JA, Clarke IJ (2000) Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. Anim Reprod Sci 60-61:313-326.

Semaan SJ, Kauffman AS (2015) Daily successive changes in reproductive gene expression and neuronal activation in the brains of pubertal female mice. Mol Cell Endocrinol 401:84-97.

Semaan SJ, Murray EK, Poling MC, Dhamija S, Forger NG, Kauffman AS (2010) BAX-dependent and BAX-independent regulation of Kiss1 neuron development in mice. Endocrinology 151:5807-5817.

Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proc Natl Acad Sci U S A 102:2129-2134.

Sharifi N, Reuss AE, Wray S (2002) Prenatal LHRH neurons in nasal explant cultures express estrogen receptor beta transcript. Endocrinology 143:2503-2507.

Sheehan DM, Willingham E, Gaylor D, Bergeron JM, Crews D (1999) No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? Environmental Health Perspectives 107:155-159.

Sickel MJ, McCarthy MM (2000) Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation. J Neuroendocrinol 12:397-402.

Simerly RB (1998) Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. Behav Brain Res 92:195-203.

Simerly RB, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA (1985) Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. Neuroendocrinology 40:501-510.

Sisk CL, Zehr JL (2005) Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. Front Neuroendocrinol 26:163-174.

Skinner MK (2014) Environment, epigenetics and reproduction. Mol Cell Endocrinol 398:1-3.

Skinner MK, Savenkova MI, Zhang B, Gore AC, Crews D (2014) Gene bionetworks involved in the epigenetic transgenerational inheritance of altered mate preference: environmental epigenetics and evolutionary biology. BMC Genomics 15:377.

Smith JT (2008) Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. Brain Res Rev 57:288-298.

Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA (2005) Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology 146:2976-2984.

Sodersten P, Hansen S (1977) Effects of oestradiol and progesterone on the induction and duration of sexual receptivity in cyclic female rats. J Endocrinol 74:477-485.

Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH (1999) GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. J Neurosci 19:2037-2050.

Stanczyk FZ, Archer DF, Bhavnani BR (2013) Ethinyl estradiol and 17beta-estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. Contraception 87:706-727.

Suter KJ, Song WJ, Sampson TL, Wuarin JP, Saunders JT, Dudek FE, Moenter SM (2000a) Genetic targeting of green fluorescent protein to gonadotropin-releasing hormone neurons: characterization of whole-cell electrophysiological properties and morphology. Endocrinology 141:412-419.

Suter KJ, Wuarin JP, Smith BN, Dudek FE, Moenter SM (2000b) Whole-cell recordings from preoptic/hypothalamic slices reveal burst firing in gonadotropin-releasing hormone neurons identified with green fluorescent protein in transgenic mice. Endocrinology 141:3731-3736.

Swaab DF, Fliers E (1985) A sexually dimorphic nucleus in the human brain. Science 228:1112-1115.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L (2000) The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. Environmental Health Perspectives 108:961-966.

Sweatt JD (2013) The emerging field of neuroepigenetics. Neuron 80:624-632.

Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M (2014) Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. J Toxicol Sci 39:775-784.

Takeo T, Chiba Y, Sakuma Y (1993) Suppression of the lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. Physiol Behav 53:831-838.

Tanapat P, Hastings NB, Gould E (2005) Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. J Comp Neurol 481:252-265.

Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. J Neurosci 19:5792-5801.

Taziaux M, Bakker J (2015) Absence of Female-Typical Pheromone-Induced Hypothalamic Neural Responses and Kisspeptin Neuronal Activity in alpha-Fetoprotein Knockout Female Mice. Endocrinology 156:2595-2607.

Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P (1999a) Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. Endocrinology 140:1432-1441.

Terasawa E, Quanbeck CD, Schulz CA, Burich AJ, Luchansky LL, Claude P (1993) A primary cell culture system of luteinizing hormone releasing hormone neurons derived from embryonic olfactory placode in the rhesus monkey. Endocrinology 133:2379-2390.

Terasawa E, Schanhofer WK, Keen KL, Luchansky L (1999b) Intracellular Ca(2+) oscillations in luteinizing hormone-releasing hormone neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. J Neurosci 19:5898-5909.

Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Hyer M, Wise LA, Palmer JR, Kaufman R, Adam E, Noller K, Herbst AL, Strohsnitter W, Cole BF, Hartge P, Hoover RN (2008) Offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES): a preliminary report of benign and malignant pathology in the third generation. Epidemiology 19:251-257.

Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Palmer JR, Hyer M, Kaufman R, Adam E, Noller K, Hoover RN (2010) Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). Int J Androl 33:377-384.

Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, Jr., Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environmental Health Perspectives 104 Suppl 4:741-803.

Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Jr., Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. J Neurosci 22:8391-8401.

Torres-Aleman I, Rejas MT, Pons S, Garcia-Segura LM (1992) Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes in vitro: a neuronal-mediated effect. Glia 6:180-187.

Toth M (2015) Mechanisms of non-genetic inheritance and psychiatric disorders. Neuropsychopharmacology 40:129-140.

Trudeau VL, Kah O, Bourguignon JP (2011) Neuroendocrine disruption: the emerging concept. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 14:267-269.

Tsukahara S, Kakeyama M, Toyofuku Y (2006a) Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. J Neurobiol 66:1411-1419.

Tsukahara S, Kakeyama M, Toyofuku Y (2006b) Sex differences in the level of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activation in the sexually dimorphic nuclei of the preoptic area in postnatal rats. J Neurobiol 66:1411-1419.

Vaiserman A (2014) Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge? Aging Dis 5:419-429.

van der Kooij MA, Grosse J, Zanoletti O, Papilloud A, Sandi C (2015) The effects of stress during early postnatal periods on behavior and hippocampal neuroplasticity markers in adult male mice. Neuroscience 311:508-518.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev 33:378-455.

Veening JG, Coolen LM (2014) Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. Pharmacol Biochem Behav 121:170-183.

Veening JG, Coolen LM, Gerrits PO (2014) Neural mechanisms of female sexual behavior in the rat; comparison with male ejaculatory control. Pharmacol Biochem Behav 121:16-30.

Vosges M, Kah O, Hinfray N, Chadili E, Le Page Y, Combarnous Y, Porcher JM, Brion F (2012) 17alpha-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. Reprod Toxicol 33:198-204.

Wadas BC, Hartshorn CA, Aurand ER, Palmer JS, Roselli CE, Noel ML, Gore AC, Veeramachaneni DN, Tobet SA (2010) Prenatal exposure to vinclozolin disrupts selective aspects of the gonadotrophin-releasing hormone neuronal system of the rabbit. J Neuroendocrinol 22:518-526.

Walker DM, Gore AC (2011) Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. Nat Rev Endocrinol 7:197-207.

Walker R (1964) The Control of Ovulation by Oestrogens. Aust N Z J Obstet Gynaecol 4:83-84.

Wang JM, Liu L, Brinton RD (2008) Estradiol-17beta-induced human neural progenitor cell proliferation is mediated by an estrogen receptor beta-phosphorylated extracellularly regulated kinase pathway. Endocrinology 149:208-218.

Wang Y, Wang Q, Hu L, Lu G, Li Y (2015) Occurrence of estrogens in water, sediment and biota and their ecological risk in Northern Taihu Lake in China. Environ Geochem Health 37:147-156.

Waters EM, Simerly RB (2009) Estrogen induces caspase-dependent cell death during hypothalamic development. J Neurosci 29:9714-9718.

White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998) Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 95:305-309.

Whitney JF (1986) Effect of medial preoptic lesions on sexual behavior of female rats is determined by test situation. Behav Neurosci 100:230-235.

Wierman ME, Kiseljak-Vassiliades K, Tobet S (2011) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. Front Neuroendocrinol 32:43-52.

Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E (1981) Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. Endocrinology 109:376-385.

Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE (2006) Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. Neuron 52:271-280.

Wolstenholme JT, Goldsby JA, Rissman EF (2013) Transgenerational effects of prenatal bisphenol A on social recognition. Horm Behav 64:833-839.

Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A, Belcher SM (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. J Neurosci 23:4984-4995.

Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R, Safe S (2003) The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. Mol Cell Biol 23:1843-1855.

Wray S, Gainer H (1987) Effect of neonatal gonadectomy on the postnatal development of LHRH cell subtypes in male and female rats. Neuroendocrinology 45:413-419.

Wray S, Grant P, Gainer H (1989) Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. Proc Natl Acad Sci U S A 86:8132-8136.

Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, McCarthy MM (2010) Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. Trends Endocrinol Metab 21:553-561.

Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, Honda S, Harada N, Shah NM (2009) Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. Cell 139:61-72.

Xiong X, You C, Feng QC, Yin T, Chen ZB, Ball P, Wang LX (2011) Pulse width modulation electro-acupuncture on cardiovascular remodeling and plasma nitric oxide in spontaneously hypertensive rats. Evid Based Complement Alternat Med 2011:812160.

Xu C, Xu XZ, Nunemaker CS, Moenter SM (2004) Dose-dependent switch in response of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons to GnRH mediated through the type I GnRH receptor. Endocrinology 145:728-735.

Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR (2005) Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. Toxicology 216:197-203.

Xu X, Xie L, Hong X, Ruan Q, Lu H, Zhang Q, Zhang G, Liu X (2013) Perinatal exposure to bisphenol-A inhibits synaptogenesis and affects the synaptic morphological development in offspring male mice. Chemosphere 91:1073-1081.

Zhang QG, Wang RM, Tang H, Dong Y, Chan A, Sareddy GR, Vadlamudi RK, Brann DW (2014) Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. Mol Cell Endocrinol 389:84-91.

Zhou Y, Zha J, Xu Y, Lei B, Wang Z (2012) Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. Environ Monit Assess 184:1719-1729.

Ziabreva I, Poeggel G, Schnabel R, Braun K (2003) Separation-induced receptor changes in the hippocampus and amygdala of Octodon degus: influence of maternal vocalizations. J Neurosci 23:5329-5336.

Annexe 1 : Composition du milieu SFM.

Ingrédient	Fournisseur	Réf	Quantité / 200ml	Conservation	Concentration finale
BSA	Sigma	A-9430 A-8806		A préparer extemp. dans le BME	1%
Putrescine	Sigma	P-7505	2ml	-20°C	0,1mM
Insuline	Sigma	I-5500	100µl	-20°C	5µg/ml
Transferine	Sigma	T-0178	4ml	-20°C	100µg/ml
Sélénium	Sigma	S-1382		-20°C	10mM
			60µl	+4°C	3 10^{-8}M
Glutamine	Invitrogen	25030-081	2ml	-20°C	2mM
Glucose	Sigma	G-7021	2ml	+4°C	5mg/ml
Vitamine C	Sigma	A-4034	50µl	-20°C	38µM
PSN Antibiotics	Invitrogen	15640-055		+4°C	
BME	Invitrogen	41010-026	100ml	+4°C	
F12	Invitrogen	11765-054	100ml	+4°C	

In vitro exposure to 17alpha-Ethinylestradiol alters mouse embryonic neural stem cells development

Derouiche L., Duittoz AH., Pillon D.

UMR 0085 INRA / CNRS / Université de Tours / IFCE, 37380 NOUZILLY, France

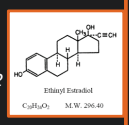
I- Background

The vulnerability of the developing mammalian neuroendocrine systems to endocrine disrupting chemicals (EDCs) has been well documented. Some studies showed that exposure to the estrogenic compound 17α-Ethinylestradiol (EE2*) altered behavioral, neural and neuroendocrine functions. Considering the increasing use of chemicals and pharmacological molecules, it becomes obvious to understand the cellular and molecular mechanisms involved in these disorders.

II- Purpose

This study was conducted to describe the cellular mechanisms through which EE2 induces deleterious effects *in vivo*.

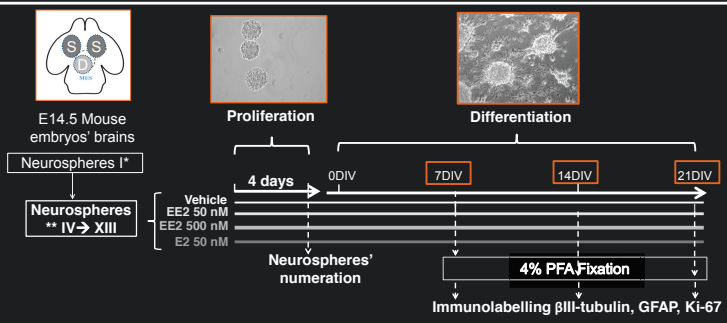
* *EE2 is a pharmaceutical estrogen used in oral contraceptives and hormone replacement therapy. Recently, the European Union added EE2 to the priority list of pollutants that may pose a risk to surface water.*



III- Experimental design

We established *in vitro* neurospheres' cultures obtained from diencephalons (D) and striata (S) of E14.5 mouse embryos to evaluate the effects of EE2 on neural stem cells and progenitors (NSCPs) proliferation, survival, cell cycle and differentiation into neurons and astrocytes.

- **Proliferation: numeration and classification of floating neurospheres.**
- **Survival: TUNEL labelling for apoptotic cells on 7DIV NSCPs.**
- **Cell cycle: Ki-67 immunolabelling on 7, 14, 21DIV NSCPs.**
- **Differentiation: neurons' marker βIII-tubulin and astrocytes' marker GFAP immunolabelling on 7, 14, 21DIV NSCPs.**



18 embryos from two pregnant dams were dissected.

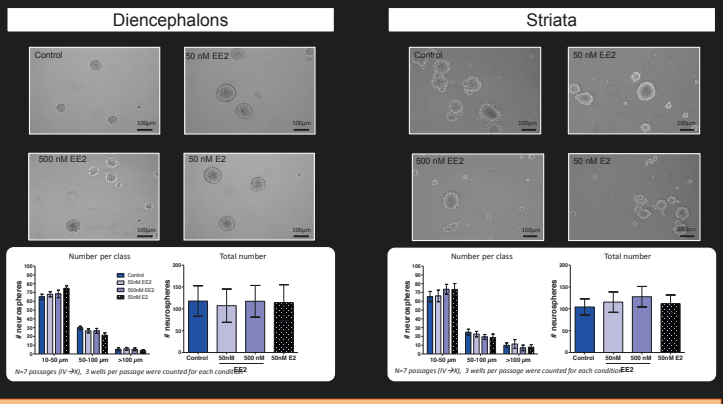
* Cells grown at 5000 cells /cm^2 in proliferation medium supplemented with 20 ng/ml EGF.

** Neurospheres were dissociated and resuspended in proliferation medium with 20ng/ml EGF until passage IV. EE2 and estradiol (E2; positive control) treatments were tested on neurospheres IV to XIII, obtained from untreated cells. For each passage, EE2, E2 or vehicle was added chronically from day0 until 21DIV. Differentiation was performed on polyornithine–laminin coated cover glasses in medium without EGF supplementation.

S: Striatum. D: Diencephalon. E: Embryonic day. DIV: Day in Vitro of differentiation.

IV- Results

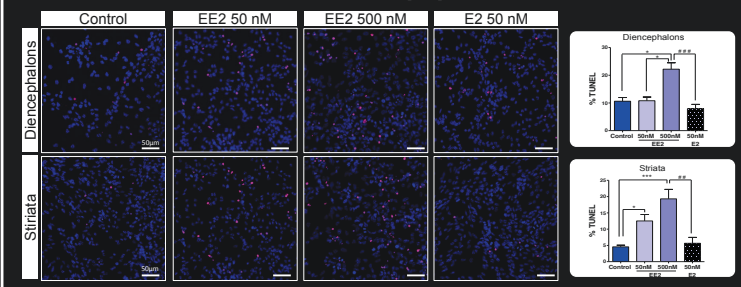
1- EE2 did not affect proliferation



EE2 treatment did not affect the number and the size of floating neurospheres after 4 days of proliferation.

→ EE2 did not affect stem cells' self renewal and proliferation.

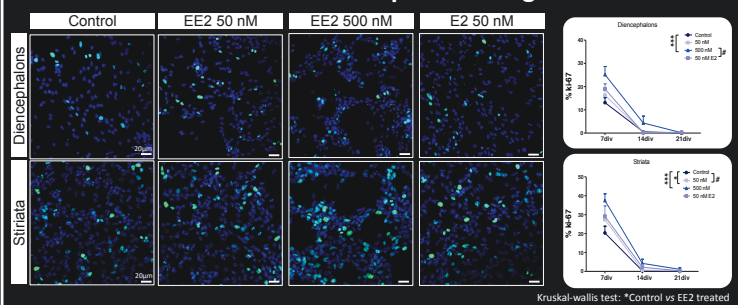
2- EE2 increased the number of apoptotic cells



Kruskal-wallis test: *Control *vs* EE2 treated
E2 treated *vs* EE2 treated. N=3 passages

EE2 increased cell death in differentiating progenitors in a dose dependent manner in striata derived cells. Low dose of EE2 did not affect diencephalons derived progenitors apoptosis.

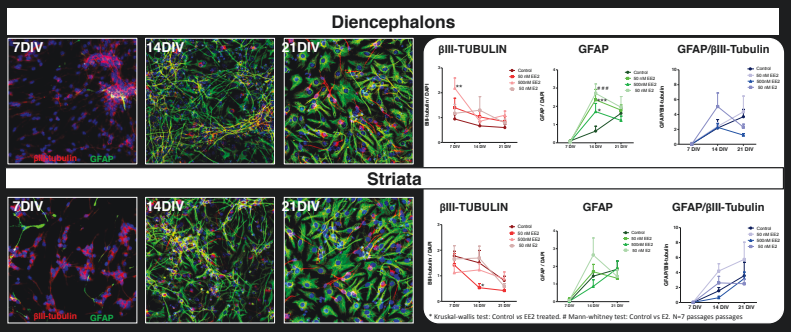
3- EE2 increased the number of proliferating cells



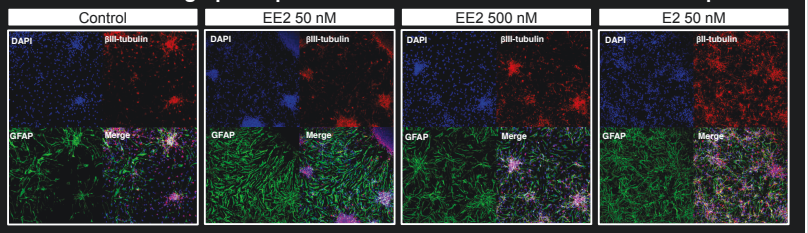
Kruskal-wallis test: *Control *vs* EE2 treated
E2 treated *vs* EE2 treated. N=7 passages

High dose of EE2 increased ki-67-positive cells number in 7DIV striata and diencephalons derived progenitors. Low dose of EE2 increased Ki-67-positive cells in D but not S derived progenitors. EE2 had no significant effect on cell division beyond 7DIV.

4- EE2 modified the immunoreactivity of neural lineage markers during the differentiation



Confocal micrographs represent Control D and S differentiated neurospheres



Confocal micrographs of 14DIV differentiated neurospheres from diencephalons

- ❑ βIII-tubulin labelling was increased at 7DIV in S derived cells treated with EE2 (high dose) and decreased at 14DIV in D derived cells. At 21DIV, EE2 and E2 had no significant effect on βIII-tubulin and GFAP immunolabelling in both S and D derived progenitors.
- ❑ GFAP labelling was increased at 14DIV in D derived in E2 and EE2 treated cells. At 21DIV, in both D and S derived progenitors, no significant differences were observed.
- ❑ The ratio GFAP/βIII-tubulin did not change significantly.

V- Conclusion

Our results show that embryonic neural stem cells can be a target of EE2 and the sensitivity of these cells may differ according to their neuroanatomical origin, developmental stage (self-renewing or differentiating cells) and treatment dose. Therefore the *in vitro* effects should be cautiously interpreted taking account these parameters in order to understand and adequately predict *in vivo* mechanisms of action of endocrine disruptors.

Acknowledgments: We thank SFR FD4226 for their financial support to meeting fees of the French Society for Neuroscience.

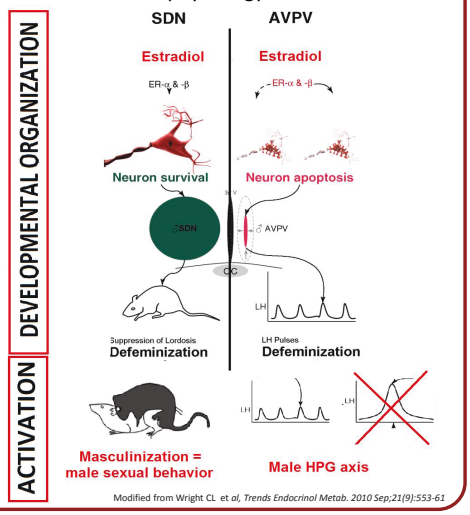
Developmental exposure to ethinylestradiol (EE2) alters behavioral and neural outputs controlling reproduction in adult male mice

Derouiche L., Keller M., Duittoz AH., Pillon D.

UMR 0085 INRA - CNRS - Université de Tours - IFCE, 37380 NOUZILLY, France

1- State of the art :

During development, estradiol induced sexual differentiation of the neuroendocrine circuits controlling sexual behaviors and reproductive physiology

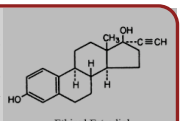


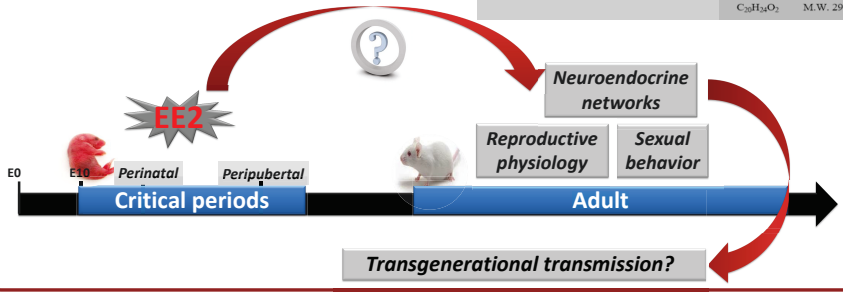
Modified from Wright CL et al, *Trends Endocrinol Metab. 2010 Sep;21(9):553-61*

2- Hypothesis

Ethinylestradiol (EE2*) exposure during critical periods of development may have enduring effects on reproductive function of adult animals and their progeny?

**EE2 is a pharmaceutical estrogen used in oral contraception and hormone replacement therapy. Recently, The European Union added EE2 to priority list of pollutants that may pose a risk to surface water.*



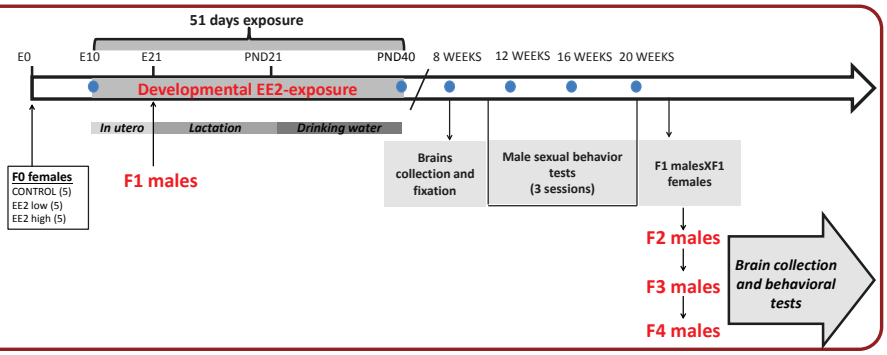


3- Objectives

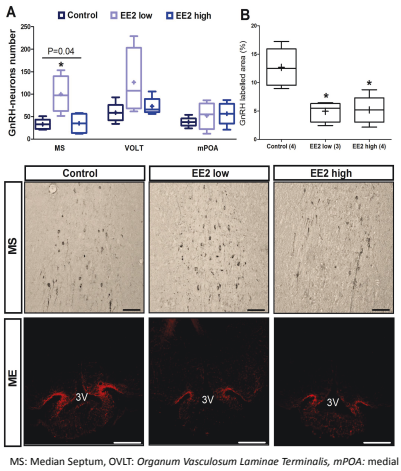
- ❑ Investigate whether a chronic exposure to EE2 at low doses (0.1 and 1 microg/kg/day) during the whole period of mammals' development (EE2) alters neuroendocrine and behavioral components of the reproductive function in adult male mice.
- ❑ Investigate a possible transgenerational transmission of EE2 effects.

4- Experimental methods

Swiss mice (F1 generation) were chronically exposed from prenatal up to peripubertal periods to 0.1µg/kg/d or 1µg/kg/d of EE2 in drinking water from embryonic day (E) 10 up to post natal day (PND) 40.

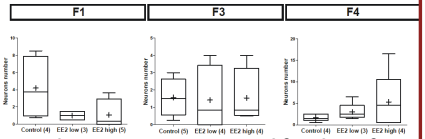


5- Results (1): EE2 disturbed GnRH neurons network in F1 males



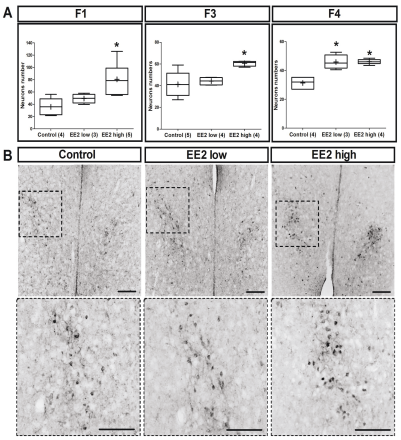
MS: Median Septum, OVLT: *Organum Vasculosum Laminae Terminalis, mPOA:* medial PreOptic Area, ME: median eminence.

Results (2): Kisspetin neurons in the AVPV were not disturbed by EE2



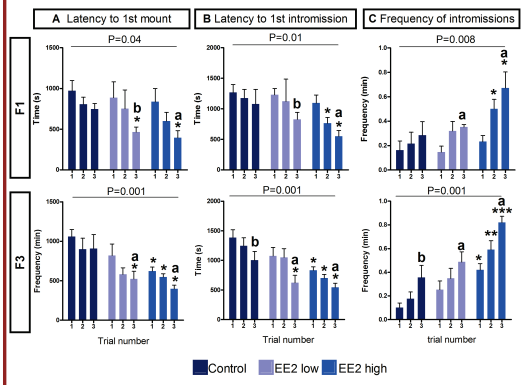
Plasma testosterone and fertility of animal were not affected by EE2

Results (3): EE2 increased calbindin-ir cell number in the NSD-POA



EE2 disturbed sexual differentiation of the NSD in a transgenerational manner (up to F4)

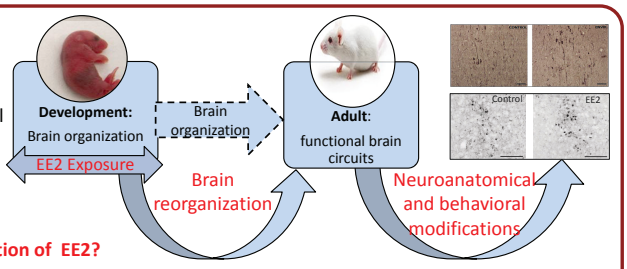
Results (4): EE2 disturbed sexual behavior in a transgenerational manner



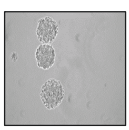
EE2 induced an exacerbated sexual behavior in F1 males and their progenies until F4 generation

6- Conclusions/ Perspectives

Hypothesis: impairment in development of neural stem cells during development could be at the origin of neuroanatomical and functional modifications in adulthood.



What are the potential mechanisms of action of EE2?



***In vitro* screening → Embryonic stem cell cultures**

Ongoing analysis: Effects on proliferation, cell survival/apoptosis, neurogenesis and differentiation (neuronal and glial).

Acknowledgments: We thank the BSN, *Fondation Obélisque* and SFR FD4226 for their financial support to travel, accommodation and meeting fees.

Lyes DEROUICHE

Exposition développementale à l'éthinylœstradiol et fonction de reproduction chez la souris : *effets neuroendocrines et comportementaux*

Résumé

Les réseaux neuroendocrines qui contrôlent la reproduction sont mis en place pendant le développement sous l'action des stéroïdes sexuels endogènes. Toute perturbation de l'équilibre hormonal pendant ces phases critiques pourrait être à l'origine de troubles de la fonction de reproduction chez l'adulte. Ce travail vise à identifier l'impact d'une exposition développementale à un œstrogène de synthèse, l'éthinylœstradiol (EE2), sur les réseaux neuroendocrines et les conséquences physiologiques et comportementales chez l'adulte et sa descendance. Nos résultats ont montré que l'EE2 induit des perturbations des comportements sexuels chez les mâles et chez les femelles et une modification des réseaux hypothalamiques à GnRH et des neurones à calbindine qui contrôlent la physiologie et les comportements reproducteurs. Nous avons également montré que certains effets de l'EE2 sont transmis jusqu'à la quatrième génération, mettant ainsi en évidence le caractère transgénérationnel de ces perturbations. Ces résultats mettent en évidence la sensibilité des réseaux neuroendocrines aux perturbateurs endocriniens et la nécessité de prendre en compte ces paramètres dans l'évaluation de leurs effets sur la santé et la reproduction.

Mots-clés : Ethinylœstradiol, neuroendocrine, reproduction, perturbateurs endocriniens, dimorphisme sexuel

Abstract

Neuroendocrine networks controlling reproductive function are established during development by the action of endogenous sex steroids. Any disturbance in the hormone balance during these critical phases may cause several disorders in reproductive function in adulthood. This work aims at identifing the consequences of a developmental exposure to the synthetic pharmaceutical estrogen ethinylestradiol (EE2) on the neuroendocrine and behavioral outcomes of the reproductive function in adult individuals and their offspring. Our findings showed that EE2 induced disturbances of sexual behaviors in males and females and modified the GnRH and the calbindin hypothalamic networks of exposed animals. We also showed that some effects of EE2 were transmitted up to the fourth generation, pointing out the transgenerational character of certain effects. All these results highlight the sensitivity of neuroendocrine networks to endocrine disruptors and the need to consider these parameters in assessing their effects on health and reproduction.

Keywords : Ethinylestradiol, neuroendocrine, reproduction, endocrine disruptors, sexual dimorphism