

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD**

*Mention Neurosciences*

**Etude du système dopaminergique  
inhibiteur de la fonction gonadotrope chez  
le poisson-zèbre**

Soutenue le 18 décembre 2014 par

**Romain FONTAINE**

**Directrice de Thèse :** Dr Catherine Pasqualini-Lâm  
*Chargée de recherche au CNRS, Gif sur Yvette*

**Co-encadrants :** Dr Kei Yamamoto et Dr Pierre Affaticati

---

**COMPOSITION DU JURY**

**Président :**

Michael Schumacher

Directeur de recherche (INSERM, Paris)

**Rapporteurs :**

Paolo Giacobini  
Yonathan Zohar

Chargé de recherche (INSERM, Lille)  
Professeur (Université du Maryland, Baltimore)

**Examineurs :**

Sylvie Dufour  
Olivier Kah

Directrice de recherche (CNRS-MNHN, Paris)  
Directeur de recherche (CNRS, Rennes)

**Directrice de thèse:**

Catherine Pasqualini-Lâm

Chargée de recherche (CNRS, Gif sur Yvette)





*“La théorie, c’est quand on sait tout mais que rien ne fonctionne.  
La pratique c’est quand tout fonctionne mais que personne ne sait pourquoi.  
En science on allie la théorie à la pratique : rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi.”*

Albert Einstein



## AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée dans l'équipe « Développement et Evolution de la Neurotransmission » au sein du Laboratoire dirigé par Philippe Vernier « Neurobiologie et Développement » (UPR3294), du CNRS de Gif sur Yvette, sous la direction du Dr Catherine Pasqualini.

Ces travaux ont fait l'objet d'une étroite collaboration avec l'équipe « Evolution des Régulations et Ecophysiologie » au sein du laboratoire « Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes » (UMR CNRS 5178), du Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris, où une partie des dosages ont été réalisés.

Cette thèse a donné lieu aux communications suivantes :

### Article publié:

**R. Fontaine**, P. Affaticati, K. Yamamoto, C. Jolly, C. Bureau, S. Baloché, F. Gonnet, P. Vernier, S. Dufour, and C. Pasqualini, 2013. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Endocrinology* 154(2) :807-818

### Article soumis pour publication :

**R. Fontaine**, K. Yamamoto, P. Affaticati, C. Bureau, I. Colin, M. Demarque, P. Vernier, S. Dufour, and C. Pasqualini. The dopaminergic neurons controlling anterior pituitary function: anatomical and developmental characterization in zebrafish.

### Communications orales :

**Fontaine, R.**, Yamamoto, K., Affaticati, P., Bureau, C., Colin, I., Dufour, S., Vernier, P., and Pasqualini, C., 2014. Origin and development of the dopaminergic neurons innervating the pituitary in zebrafish. 11<sup>th</sup> Congress on the Biology of Fish, Edimbourg, Ecosse.

**Fontaine, R.**, Yamamoto, K., Affaticati, P., Bureau, C., Colin, I., Dufour, S., Vernier, P., and Pasqualini, C., 2014. Neuroanatomical and genetic bases for the dopaminergic inhibition of the gonadotrope function in zebrafish. 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Olhao, Portugal.

**R. Fontaine**, K. Yamamoto, P. Affaticati, P. Vernier, S. Dufour and C. Pasqualini, 2014. Dopamine and reproduction, Zebrafish as a model. INAF Lab meeting, Gif Sur Yvette, France.

**R. Fontaine**, P. Affaticati, K. Yamamoto, P. Vernier, S. Dufour and C. Pasqualini, 2013. Dopamine and zebrafish reproduction. Zebrafish Workshop ; 4ème Séminaire EFOR, Paris, France. P11

**R. Fontaine**, P. Affaticati, K. Yamamoto, P. Vernier, S. Dufour and C. Pasqualini, 2013. Development of preoptico-hypophysial dopaminergic neurons. N&D Retreat, Courcelle Sur Yvette, France.

**R. Fontaine**, P. Affaticati, K. Yamamoto, P. Vernier, S. Dufour and C. Pasqualini, 2013. The dopaminergic control of zebrafish reproduction. INAF Lab meeting, Gif Sur Yvette, France.

**R. Fontaine**, P. Affaticati, K. Yamamoto, F. Gonnet, S. Baloché, P. Vernier, S. Dufour and C. Pasqualini, 2012. Dopamine and reproduction in zebrafish. 38ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Banyuls Sur Mer, France. P46

#### Communications affichées :

**Fontaine, R.**, Yamamoto, K., Affaticati, P., Bureau, C., Colin, I., Dufour, S., Vernier, P., and Pasqualini, C., 2014. The zebrafish preoptico-hypophyseal dopaminergic neurons: origin and development of the inhibitory pathway controlling the gonadotrope function. 8<sup>th</sup> International Congress of Neuroendocrinology 2014, Sydney, Australie.

**Fontaine R.**, Affaticati, P., Yamamoto, K., Vernier, P., Baloché, S., Gonnet, F., Jolly, C., Dufour, S., Pasqualini, C., 2013. Dopamine and zebrafish reproduction. 11e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, France. P92

**Fontaine R.**, Affaticati, P., Yamamoto, K., Vernier, P., Baloché, S., Gonnet, F., Jolly, C., Dufour, S., Pasqualini, C., 2013. Dopamine and zebrafish reproduction. Journée de l'école doctorale Paris, France.

#### Autres communications :

S. Dufour, J. Pasquier, A.-G. Lafont, G. Maugars, M. Morini, C. Jolly, **R. Fontaine**, K. Rousseau, C. Pasqualini, 2012. Impact of genome duplication on fish neuroendocrine functions. Communication orale lors du 38ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Banyuls Sur Mer, France. P20

Yamamoto, K., Affaticati, P., **Fontaine, R.**, Bureau, C., Vernier, P., Demarque, M., 2013. Characterization of paraventricular monoaminergic cells : evolutionary and developmental perspectives. Communication affichée lors du 11<sup>e</sup> Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, France. P77

M. Demarque, P. Affaticati, K. Yamamoto, I. Colin, **R. Fontaine**, E. Tine, C. Bureau, P. Vernier. 2014. Development and plasticity of the dopaminergic phenotype in zebrafish diencephalic clusters. Optical imaging of brain structure and function on multiple scales, Roscoff, France

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier les membres du jury pour leur participation à ma soutenance de thèse, et plus particulièrement les rapporteurs Yonathan Zohar et Paolo Giacobini pour le temps qu'ils ont consacré à lire et à analyser le manuscrit.

Un grand merci à Catherine Pasqualini, ma directrice de thèse, qui, malgré tous ses soucis de santé, a toujours répondu présente lorsque j'en avais besoin. Grâce à elle et sa gentillesse, j'ai passé trois années formidables, fort de son soutien lorsque je travaillais sans compter mes heures, des nuits d'acharnement pour faire fonctionner certaines expériences. Je ne listerai pas ici tout ce qu'elle m'a apporté, mais je souhaite surtout la remercier pour son aide irremplaçable dans l'écriture des papiers et de la thèse, ainsi que pour la préparation des différentes présentations orales. Enfin, je tiens particulièrement à la remercier de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse et de surcroît sur un sujet aussi passionnant.

Je remercie aussi Philippe Vernier, directeur de l'équipe DEN, qui m'a accueilli dans son laboratoire, et qui, lors de nos échanges, m'a permis de bénéficier d'une partie de sa grande culture scientifique.

Un grand merci à Sylvie Dufour, responsable de l'unité « Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes », pour toutes nos discussions scientifiques, ses encouragements et son intérêt pour ma carrière scientifique à venir. Je remercie aussi toute son équipe dont Françoise Gonnet et Sylvie Baloché pour leurs aides techniques et leurs encouragements avant mes présentations orales.

Je remercie Laure Bally-Cuif, directrice de l'équipe ZEN, pour son expertise scientifique lors de nos nombreuses discussions en réunions d'équipes, et ses conseils avisés qui ont permis de rendre ces travaux toujours plus convaincants, et toujours plus consistants. Je remercie aussi toute son équipe, avec une pensée particulière pour Marion Coolen et Alessandro Alunni qui m'ont beaucoup aidé techniquement, notamment dans mes manipulations de marquage avec le BrdU qui ont fini par donner des résultats grâce à eux.

Je remercie Sébastien Bedu, que je considère comme faisant partie de notre équipe, pour son humour parfois borderline, pour son humeur toujours joyeuse (après la clope et le café du matin bien sûr) et pour ses vieilles femelles (poisson-zèbre j'entends) grâce auxquelles j'ai bien souvent gagné du temps. Et je m'excuse auprès de lui pour tous les désagréments que je lui ai causés avec mes nombreuses lignées et mes nombreuses vieilles carnes dans l'animalerie ainsi que mes nombreuses reproductions au moment des fêtes.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe DEN avec laquelle j'ai passé plus de trois ans, sans jamais me sentir seul, et dont certains ne sont plus avec nous aujourd'hui. Notamment, Pierre Affaticati pour son expertise technique, ses conseils et sa rigueur. Il m'a appris à toujours chercher à faire mieux techniquement quitte à développer moi-même ou à adapter des techniques existantes. Je n'oublie pas Charlotte Bureau pour ses discussions tranquilles lors de nos dissections qui permettaient de ne pas voir le temps passer, et qui m'a beaucoup manqué lorsqu'elle nous a quitté pour le soleil de Montpellier. Je remercie aussi Maryline Blin pour son aide et ses conseils lors de mon arrivée.

Je remercie aussi plusieurs nouveaux arrivants dans l'équipe dont Michaël Demarque, pour m'avoir ouvert les yeux sur de nombreuses choses de la vie quotidienne et m'avoir ouvert l'esprit. Il m'a appris à penser d'une autre façon, à ne pas m'arrêter à ce que je crois savoir, et à toujours aller rechercher un peu plus le détail des choses. Je le remercie aussi pour le temps qu'il a pris pour corriger mes papiers et ma thèse ainsi que ses nombreux conseils et explications qui, je l'espère, feront de moi un bon scientifique. Je remercie Ingrid Colin pour sa bonne humeur et sa délicatesse de bon matin. Je la remercie plus sérieusement pour ses précieux coups de mains lorsque mes deux bras ne me suffisaient plus. Je remercie aussi Anna Xavier pour sa joie et sa bonne humeur ainsi que nos discussions et tests pour faire fonctionner le BrdU.

Je remercie tous les organisateurs de la fête de la science et de SciencesenMarche avec qui j'ai beaucoup appris, partagé et débattu d'idée et qui m'ont permis de rencontrer beaucoup de monde.

Enfin, mais loin d'être la dernière (last but not the least), je remercie Kei Yamamoto, qui m'a supporté tous les jours pendant trois ans, qui a suivi mon projet à chaque succès ou échec. Je la remercie pour la patience et la détermination dont elle a fait preuve pour que je sois rigoureux dans mes présentations écrites et orales. J'espère qu'elle ne changera pas car même si elle peut se montrer un peu dure parfois, ses connaissances, sa rigueur et son intellect feront d'elle un excellent directeur de thèse pour Solal.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. LES GONADES: GAMETOGENESE ET STEROIDOGENESE</b> .....	<b>9</b>
2.1 La gamétogenèse .....	9
2.1.1 <i>Vitellogenèse : le développement ovocytaire en deux principales étapes : la pré-vitellogenèse et la vitellogenèse exogène</i> .....	10
2.1.2 <i>Dynamique du développement ovocytaire dans les ovaires</i> .....	14
2.2 La stéroïdogénèse .....	14
<b>3. L'HYPOPHYSE ET LES GONADOTROPINES</b> .....	<b>16</b>
3.1 L'hypophyse : lieu de synthèse et de sécrétion des gonadotropines.....	16
3.2 Rôles des gonadotropines .....	18
<b>4. LE CERVEAU ET LE CONTROLE DES GONADOTROPINES</b> .....	<b>20</b>
4.1 Le système GnRH, principal stimulateur des gonadotropines .....	20
4.1.1 <i>Les différentes formes de GnRH et leurs distribution</i> .....	20
4.1.2 <i>Origine et rôle de la GnRH hypophysiotrope</i> .....	23
4.1.3 <i>Le contrôle de la synthèse et de la sécrétion de la GnRH</i> .....	26
4.1.4 <i>Les récepteurs de la GnRH</i> .....	32
4.2 La dopamine, neuromédiateur inhibiteur de la sécrétion des gonadotropines.....	33
4.2.1 <i>La dopamine : voie de biosynthèse et transport</i> .....	34
4.2.2 <i>Distribution et développement des neurones dopaminergiques</i> .....	37
4.2.3 <i>Rôle de la dopamine dans le contrôle de la reproduction chez les téléostéens</i> .....	44
4.2.4 <i>Le support anatomique du contrôle dopaminergique inhibiteur de la reproduction</i> .....	46
4.2.5 <i>Régulation de l'inhibition dopaminergique préoptico-hypophysaire</i> .....	50
<b>5. LE POISSON-ZEBRE, UN ORGANISME MODELE</b> .....	<b>53</b>
5.1 Données de systématique du poisson-zèbre .....	53
5.2 Cycle biologique du poisson-zèbre .....	56
5.3 Formation du système nerveux central du poisson-zèbre.....	58
5.3.1 <i>Développement du cerveau</i> .....	58
5.3.2 <i>Neurogenèse dans le cerveau adulte</i> .....	61
<b>6. LE PROJET DE THESE</b> .....	<b>63</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>65</b>
<b>1. ARTICLE 1 : LA DOPAMINE INHIBE LA REPRODUCTION CHEZ LES FEMELLES POISSON-ZEBRE (DANIO RERIO) VIA TROIS RECEPTEURS HYPOPHYSAIRES DE TYPE D2.</b> .....	<b>67</b>
<b>2. ARTICLE 2. LES NEURONES DOPAMINERGIQUES INHIBITEURS DE LA FONCTION GONADOTROPE : ETUDES ANATOMIQUES ET DEVELOPPEMENTALES</b> .....	<b>83</b>
<b>DISCUSSION &amp; CONCLUSIONS</b> .....	<b>131</b>
<b>1. EXISTENCE D'UN CONTROLE DOPAMINERGIQUE INHIBITEUR DE LA FONCTION GONADOTROPE CHEZ LE POISSON-ZEBRE</b> .....	<b>134</b>
<b>2. BASES ANATOMIQUES DU CONTROLE DOPAMINERGIQUE INHIBITEUR DE LA FONCTION DE REPRODUCTION CHEZ LE POISSON-ZEBRE</b> .....	<b>137</b>

2.1	Implication des récepteurs dopaminergiques de la famille D2 dans le contrôle de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre.....	137
2.2	Identification des neurones dopaminergiques hypophysiotropes.....	141
2.3	Les neurones dopaminergiques neuroendocrines comme cibles de la rétroaction des stéroïdes sexuels .....	143
<b>3.</b>	<b>DEVELOPPEMENT DES NEURONES DOPAMINERGIQUES PREOPTICO-HYPOPHYSAIRES</b>	<b>145</b>
3.1	Ontogenèse des neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires et de leurs projections .....	146
3.2	Régionalisation et caractéristiques développementales des neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires.....	148
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>151</b>



## Listes des figures

Figure 1 : Schéma du contrôle neuroendocrine de la reproduction : l'axe cerveau-hypophyse-gonades. ....	8
Figure 2 : Schéma de la régulation hormonale de la croissance ovocytaire (Sebert, 2007).....	11
Figure 3 : Maturation ovocytaire chez le poisson-zèbre d'après (Çakıcı and Üçüncü, 2007) .....	13
Figure 4 : Stéroïdogénèse: la voie de synthèse des stéroïdes sexuels.....	15
Figure 5 : Schémas d'une hypophyse de mammifère (a) et de poisson (b), mettant en évidence les principales différences morphologiques. ....	17
Figure 6 : Organisation schématique des systèmes à GnRH chez les téléostéens, (d'après (Lethimonier et al., 2004). ....	22
Figure 7 : Schémas du contrôle de la synthèse et de la libération de l'hormone lutéinisante (LH) par les neurones à gonadolibérine (GnRH) via le système porte chez les mammifères (A) ou directement chez les téléostéens (B) (Sebert, 2007). ....	23
Figure 8 : Schémas de la distribution des systèmes kiss dans le cerveau d'un téléostéen: le poisson-zèbre (Servili et al., 2011).....	27
Figure 9 : Voie de biosynthèse de la dopamine et des autres catécholamines .....	35
Figure 10 : Libération de la DA dans la fente synaptique [(adapté de (Youdim et al., 2006) et (Yamamoto and Vernier, 2011)]......	36
Figure 11 : Distribution des neurones DA dans le cerveau de rat (Bjorklund and Dunnett, 2007).....	39
Figure 12 : Résumé des phénotypes cellulaires des noyaux cérébraux TH positifs, sur une vue sagittale du cerveau adulte de poisson zèbre. ....	40
Figure 13 : Corrélations temporelles entre la sortie du cycle cellulaire, la neurogenèse, et la différenciation des groupes dopaminergiques et noradrénergiques (Mahler et al., 2010). ....	43
Figure 14 : Schéma de la distribution des neurones catécholaminergiques chez l'anguille européenne ( <i>Anguilla anguilla</i> ) et représentation (en rouge) des neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires (d'après (Sébert et al., 2008)). ....	47
Figure 15 : Analyse phylogénétique des récepteurs D2 et D3 chez les vertébrés (Boehmler et al., 2004).....	49
Figure 16 : Arbre phylogénétique des vertébrés (Lecointre and Le Guyader, 2001). ....	54
Figure 17 : Stades principaux de développement du poisson-zèbre d'après (Porcher et al., 2003) .....	57
Figure 18 : Principales subdivisions du cerveau embryonnaire des Vertébrés. D'après (Medina, 2009).....	59
Figure 19: Représentation schématique des zones de prolifération et de neurogenèse dans le cerveau du poisson-zèbre adulte. D'après Kaslin et al. (2008).....	61
Figure 20 : Arbre phylogénétique des protéines codant les récepteurs dopaminergiques de la famille D2.....	139
Figure 21: Schéma de la distribution des trois récepteurs des oestrogènes zfERA, zfERb1 zfERb2 dans le cerveau du poisson-zèbre (Zohar et al., 2010). ....	144

## Liste des espèces de téléostéens citées:

### Nom scientifique

*Anguilla anguilla*  
*Anguilla japonica*  
*Callorhinchus milii*  
*Carassius auratus*  
*Chaetodipterus faber*  
*Cichlasomas dimerus*  
*Clarias garipinus*  
*Coho salmon*  
*Coregonus clupeaformis*  
*Cyprinus carpio*  
*Danio rerio*  
*Dicentrarchus labrax*  
*Fundulus heteroclitus*  
*Heteropneustes fossilis*  
*Ictalurus punctatus*  
*Latimeria chalumnae*  
*Micropogonias undulatus*  
*Misgurnus anguillicaudatus*  
*Morone saxatilis*  
*Mugil cephalus*  
*Oncorhynchus keta*  
*Oncorhynchus mykiss*  
*Oncorhynchus nerku*  
*Oncorhynchus tsawytscha*  
*Oreochromis niloticus*  
*Oryzias latipes*  
*Pagellus centrodontus*  
*Pagrus major*  
*Salmo salar*  
*Solea senegalensis*  
*Sparus Aurata*

### Nom commun français

Anguille européenne  
Anguille japonaise  
Chimère éléphant  
Poisson rouge  
Platax Atlantique  
*inconnu*  
Poisson chat africain  
Saumon argenté ou de rivière  
Grand corégone  
Carpe commune  
Poisson-zèbre  
Bar commun  
Choquemort  
Poisson-chat fossile  
Barbue de rivière  
Coelacanthe  
Tambour brésilien  
Loche d'eau douce  
Bar rayé  
Mulet Cabot  
Saumon keta  
Truite arc-en-ciel  
Saumon rouge  
Saumon royal  
Tilapia  
Médaka  
Daurade rose  
Daurade japonaise  
Saumon de l'Atlantique  
Sole  
Daurade royale

## Abbréviations

5-HT : Sérotonine  
AAAH : Hydroxylase des acides aminés aromatiques  
AADC : Décarboxylase spécifique des acides aminés aromatiques  
ACTH : Corticotropine  
AH : Adénohypophyse  
CAs : Catécholamines  
CHG : Axe cerveau-hypophyse-gonades  
COMT : catéchol-O-méthyle transférase  
D2-R : Récepteurs dopaminergiques de la classe D2  
DA : Dopamine  
DAT : Transporteur de la dopamine  
DBH : Dopamine beta-hydroxylase  
DC : Groupe de cellules dopaminergiques  
dpf : jours après fécondation  
FSH : Hormone Folliculo-stimulante  
GAP : Peptide associé au GnRH  
GFP : Proteine fluorescente verte  
GH : Hormone de croissance  
GnIH : Hormone inhibitrice des gonadotropines hypophysaires  
GnRH : Gonadolibérine  
GnRH-R : Récepteurs de la GnRH  
GP $\alpha$  : Glycoprotéine  $\alpha$   
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G  
GTHs : Gonadotropines hypophysaires  
hCG : Choriogonadotropine humaine  
hpf : heures après fécondation  
LH : Hormone lutéinisante  
LHRH : Hormone de libération des gonadotropines hypophysaires  
MAO : Oxydase spécifique des monoamines  
MSH : Hormone mélanotrope  
NH : Neurohypophyse  
OB : Bulbes olfactifs  
OR : Récessus optique  
PD : *Pars distalis*  
PI : *Pars intermedia*  
PN : *Pars nervosa*  
PNMT : Phenyléthanolamine-N-méthyl transférase  
POA : Aire préoptique  
POHDA : Neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires  
PPD : *Proximalis pars distalis*  
Prl : Prolactine  
RPD : *Rostral pars distalis*  
Slmt : Somatolactine  
SNC : Système nerveux central  
TH : Tyrosine hydroxylase  
TSH : Thyrotropine  
Vtg : Vitellogénine  
vMAT2 : Transporteur vésiculaire des monoamines



# INTRODUCTION

---



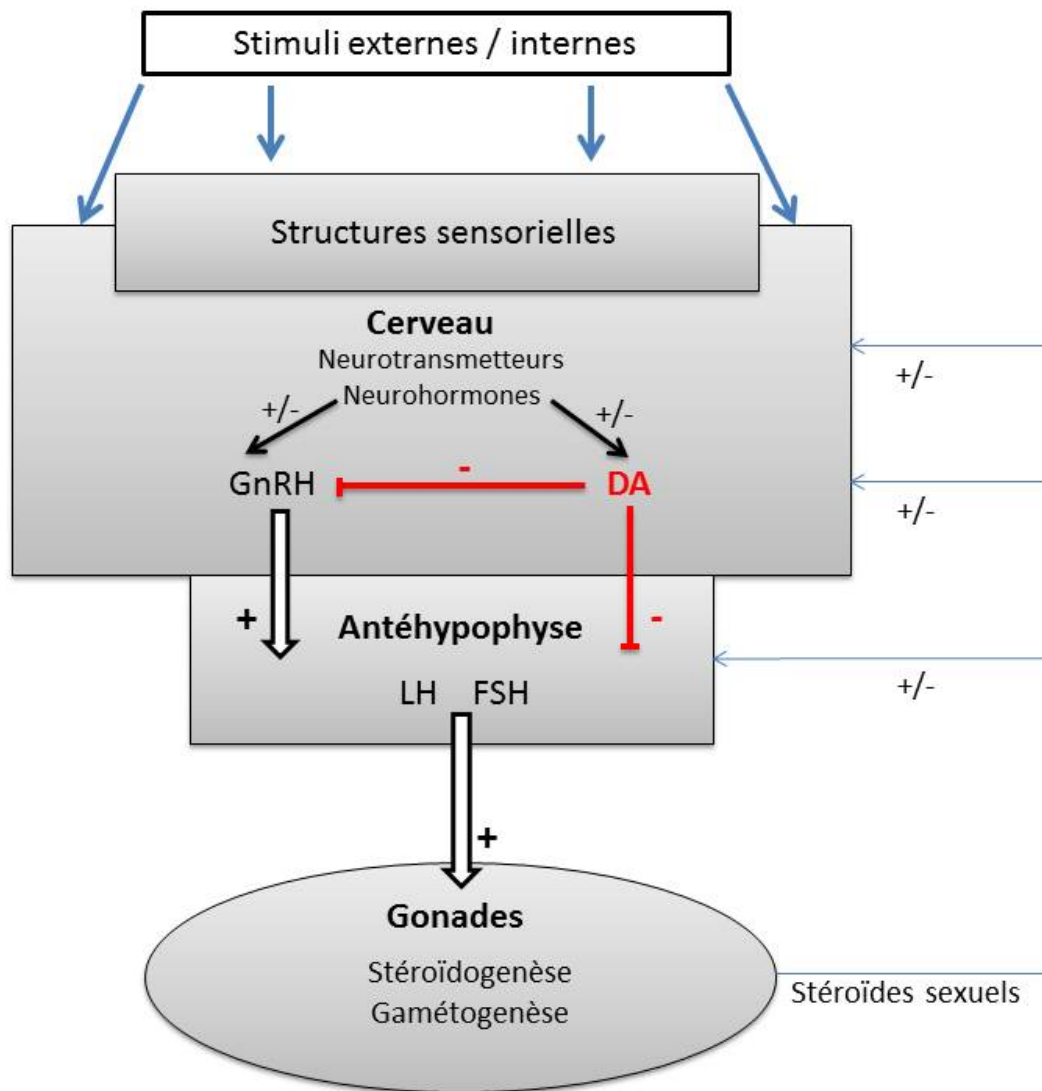
## 1. INTRODUCTION GENERALE

La reproduction représente l'ensemble des processus par lesquels une espèce se perpétue, en suscitant la naissance de nouveaux individus. C'est une activité fondamentale partagée par toutes les espèces vivantes. Pour assurer son succès, il existe une grande variété de stratégies reproductives chez les vertébrés, notamment chez les poissons. Par exemple l'anguille doit parcourir plusieurs milliers de kilomètres pour rejoindre son lieu de reproduction, tandis que le poisson-clown est un hermaphrodite successif protandre : lorsque la femelle disparaît, le mâle dominant se transforme en femelle et l'un des autres mâles devient le nouveau dominant.

Malgré la diversité de ces comportements, les mécanismes généraux de contrôle de la reproduction sont conservés chez les vertébrés, avec un rôle central de l'axe cerveau-hypophyse-gonade (*figure 1*). La gonadolibérine, produite dans le cerveau, stimule la production, par l'hypophyse, des gonadotropines qui, libérées dans la circulation générale, vont agir sur les gonades pour contrôler la gamétogénèse et la stéroïdogénèse. Le rôle inhibiteur joué parallèlement par la dopamine dans ce contrôle neuroendocrine de la reproduction semble moins universel. Il n'a été recherché et mis en évidence pour le moment que chez certains vertébrés et son intensité varie selon les espèces. Néanmoins il est apparu particulièrement puissant chez certains téléostéens.

Afin de mieux caractériser le système dopaminergique responsable de ce contrôle inhibiteur, nous avons choisi le poisson-zèbre comme organisme modèle. En effet, des outils moléculaires de plus en plus nombreux sont disponibles dans cette espèce pour l'identification des cellules (lignées rapportrices), ou pour l'étude des pertes de fonction (mutants, morpholinos, CRISPR) ce qui en fait un modèle privilégié pour l'étude du développement, mais aussi des fonctions physiologiques. Les résultats obtenus fournissent des informations clés sur l'identité du système dopaminergique responsable de cette inhibition, sur sa mise en place tardive au cours du développement, confortant ainsi la position de modèle du poisson-zèbre.

Ce manuscrit est divisé en trois parties. La première est un bref résumé des connaissances bibliographiques sur la physiologie de la reproduction des vertébrés, la seconde présente, sous forme d'articles, les résultats de mon travail de thèse, et la troisième est une discussion générale portant sur l'ensemble de ce travail et sur les perspectives qu'il suscite.



**Figure 1 : Schéma du contrôle neuroendocrin de la reproduction : l'axe cerveau-hypophyse-gonades.** Les différents stimuli environnementaux internes et externes sont intégrés au niveau du cerveau et modulent l'activité des neurones à gonadolibérine (GnRH) et à dopamine (DA). Alors que la GnRH stimule la synthèse et la libération des gonadotropines hypophysaires (LH, hormone lutéinisante et FSH, hormone folliculo-stimulante), qui elles-même stimulent l'activité des gonades (gamétogénèse et stéroïdogénèse), la dopamine (DA) peut exercer un contrôle supplémentaire, en inhibant la synthèse et la libération des gonadotropines chez certains vertébrés. Les stéroïdes sexuels produits par les gonades exercent quant à eux, des rétro-contrôles positifs et négatifs aux différents niveaux de l'axe gonadotrope.



## 2. LES GONADES: GAMETOGENESE ET STEROIDOGENESE

La reproduction est en relation directe avec l'activité des organes reproducteurs que sont les gonades. Les gonades sont des organes pairs chez la plupart des vertébrés : les testicules chez les mâles et les ovaires chez les femelles. Ils assurent la production des gamètes (gamétogenèse) et des stéroïdes sexuels (stéroïdogénèse).

### 2.1 La gamétogenèse

La gamétogenèse (spermatogenèse et ovogenèse) correspond au processus qui aboutit, au cours de la vie d'un organisme, à la formation des cellules reproductrices, les gamètes. Ces gamètes sont des cellules haploïdes (contenant chacune un seul exemplaire des chromosomes ;  $n$  chromosomes). Le passage de cellules diploïdes ( $2n$  chromosomes) à des cellules haploïdes est réalisé dans les gonades, lors d'une division cellulaire particulière, la méiose. Ce processus ainsi que les cellules en résultant sont différents selon le sexe de l'organisme. Nous ne parlerons pas ici de la spermatogenèse.

L'ovogenèse a lieu dans l'ovaire et consiste en différentes modifications cytologiques aboutissant, à partir de cellules indifférenciées, les ovogonies ( $2n$  chromosomes), à la formation d'ovocytes matures ( $n$  chromosomes) qui pourront être fécondés (Selman and Wallace, 1989; Mellinger, 2002; Patiño and Sullivan, 2002).

Les gonades sont composées principalement de deux types de cellules : les cellules germinales qui vont produire les gamètes et les cellules somatiques qui supportent, nourrissent et régulent le développement des cellules germinales (Patiño, 1995). L'ovogenèse débute par la division par mitose des ovogonies, des cellules indifférenciées à  $2n$  chromosomes issues des cellules germinales primordiales ou gonocytes, pendant l'embryogenèse. Alors qu'elles sont en nombre restreint chez la plupart des classes de vertébrés, ce qui est un facteur limitant de la durée de reproduction chez ces espèces, chez les amphibiens et les téléostéens, l'ovaire contient un stock d'ovogonies pouvant se renouveler par divisions mitotiques dans l'ovaire adulte (Wallace and Selman, 1990; Tyler and Sumpter, 1996; Jalabert, 2005). En effet, lors de leur division, certaines cellules filles maintiennent la population dans l'épithélium germinale et d'autres entrent en méiose pour devenir des ovocytes qui vont migrer dans la lumière de l'ovaire (Hisaoaka and Firlit, 1962; Jones, 1978).

Dans l'ovaire, les ovogonies peuvent être isolées ou, plus fréquemment, elles sont regroupées en cystes (Selman and Wallace, 1989; Tyler and Sumpter, 1996; Ravaglia and Maggese, 2003), entourés de cellules somatiques (Higashino et al., 2002). Les ovogonies vont donc se développer dans les nombreux replis que forment les tissus ovariens, et certaines d'entre elles vont entrer en prophase de première division méiotique. La méiose est alors bloquée jusqu'à la fin de la vitellogenèse, qui consiste en l'accumulation de réserves nutritives pour le futur embryon.

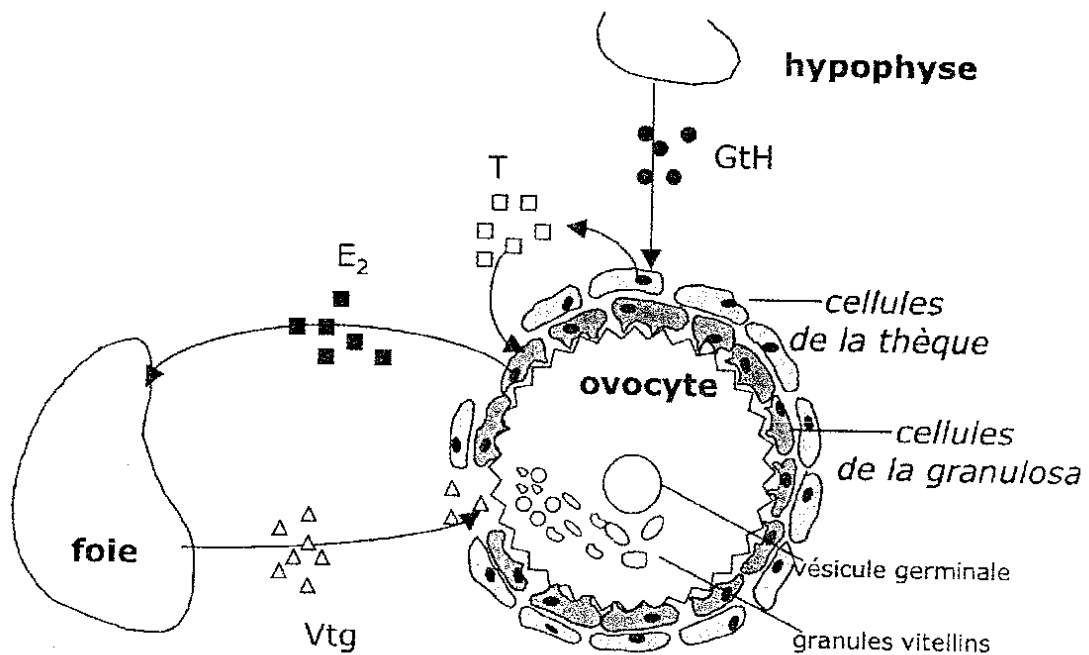
Pendant cette phase, l'ovocyte s'entoure aussi de cellules somatiques qui se différencient pour former les différents feuilletts cellulaires (thèque et granulosa). Cette enveloppe folliculaire va entièrement entourer l'ovocyte en croissance, le nourrissant et le protégeant au cours de son développement. Cette dernière est séparée de l'ovocyte par une couche acellulaire : la *zona radiata*. L'ovocyte et ses enveloppes forment alors un follicule ovarien.

### **2.1.1 Vitellogenèse : le développement ovocytaire en deux principales étapes : la pré-vitellogenèse et la vitellogenèse exogène**

Les processus de folliculogénèse regroupent l'ensemble des processus par lesquels un follicule primordial se développe pour atteindre l'ovulation ou régresse par apoptose. Chez les vertébrés ovipares, la croissance ovocytaire est essentiellement due au processus de vitellogenèse qui consiste en l'accumulation de réserves nutritives pour le futur embryon.

Les ovocytes primaires ainsi formés subissent alors une phase d'accroissement cytoplasmique et de différenciation sans division (Wallace and Selman, 1990). La vitellogenèse qui peut être découpée en deux phases : une pré-vitellogenèse (ou vitellogenèse endogène) et la vitellogenèse proprement dite (ou vitellogenèse exogène ; (Legendre and Jalabert, 1988; Polzonetti-Magni et al., 2004)).

Durant la première partie de cette phase d'accroissement qu'est la pré-vitellogenèse, l'équipement métabolique nécessaire à l'accumulation de réserves et à la croissance de l'ovocyte se met en place. Le noyau de l'ovocyte, localisé centralement, est alors gros et les nucléoles sont localisés à sa périphérie. Dans le cytoplasme, on peut distinguer de nombreuses gouttelettes lipidiques (vitellogenèse précoce).



**Figure 2 : Schéma de la régulation hormonale de la croissance ovocytaire (Sebert, 2007).**  
 Abréviations : GtH : gonadotropine, T : Testostérone, E2 : Oestradiol, Vtg : Vitellogénine

Après ces premières modifications, la synthèse par le foie sous l'action de l'œstradiol, d'une lipoglycophosphoprotéine, la vitellogénine (Vtg), marque le début de la seconde partie de cette phase d'accroissement : la vitellogenèse proprement dite. Une fois synthétisée, la Vtg rejoint la circulation sanguine, traverse la paroi folliculaire et est incorporée par l'ovocyte en croissance par un mécanisme d'endocytose faisant suite à sa fixation à un récepteur. La Vtg est alors stockée comme nutriment pour l'embryon (*figure 2*). Des granules de vitellus vont commencer à être visibles dans l'ooplasme (mi-vitellogenèse) puis vont peu à peu repousser les gouttelettes lipidiques, observables durant la pré-vitellogenèse, vers la périphérie de la cellule (vitellogenèse tardive). Selon les espèces, il y a ou non formation d'un globule de vitellus homogène formé par la fusion des granules vitellins, laissant un fin espace ooplasmique en périphérie. Lors de ce processus, le nombre de cellules folliculaires augmente et la zona radiata s'épaissit. La durée et l'amplitude du processus de vitellogenèse varient fortement en fonction des espèces (Legendre and Jalabert, 1988; Polzonetti-Magni et al., 2004).

A la fin de cette longue période d'accroissement, la vitellogenèse ralentit, l'ovocyte est alors mature, le noyau migre vers le micropyle (orifice percé dans la membrane ovocytaire permettant la pénétration du spermatozoïde), et sa membrane se désintègre.

Un signal hormonal provoque la reprise de la méiose (maturation ovocytaire). Le noyau se brise alors et la moitié du matériel chromosomique est perdu lors de l'expulsion du premier globule polaire (Patiño and Sullivan, 2002). L'ovocyte secondaire ainsi formé est bloqué en métaphase de seconde division. Chez certaines espèces, on observe alors un phénomène d'hydratation qui entraîne une importante augmentation du volume cellulaire assurant la flottaison des œufs pélagiques. Enfin, sous l'action d'enzymes, l'ovocyte se détache du follicule (ovulation) et, après un délai variable selon les espèces, la ponte se produit et l'œuf peut être fécondé, c'est alors que la méiose s'achèvera (Legendre and Jalabert, 1988).

Si cette description générale de l'ovogenèse s'applique à l'ensemble des téléostéens ovipares, la dynamique de développement des follicules ovariens présente néanmoins une extrême diversité. La dynamique du développement ovocytaire ainsi que le nombre et les caractéristiques (forme, taille) des ovocytes produits varient fortement selon les espèces.

Classiquement, ce développement est découpé en stades, définis par différents événements de l'ovogenèse. Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) femelle par exemple, cinq stades de croissance ovocytaire sont définis (*figure 3*), basés sur des critères morphologiques, des événements physiologiques et biochimiques (Selman et al., 1993).

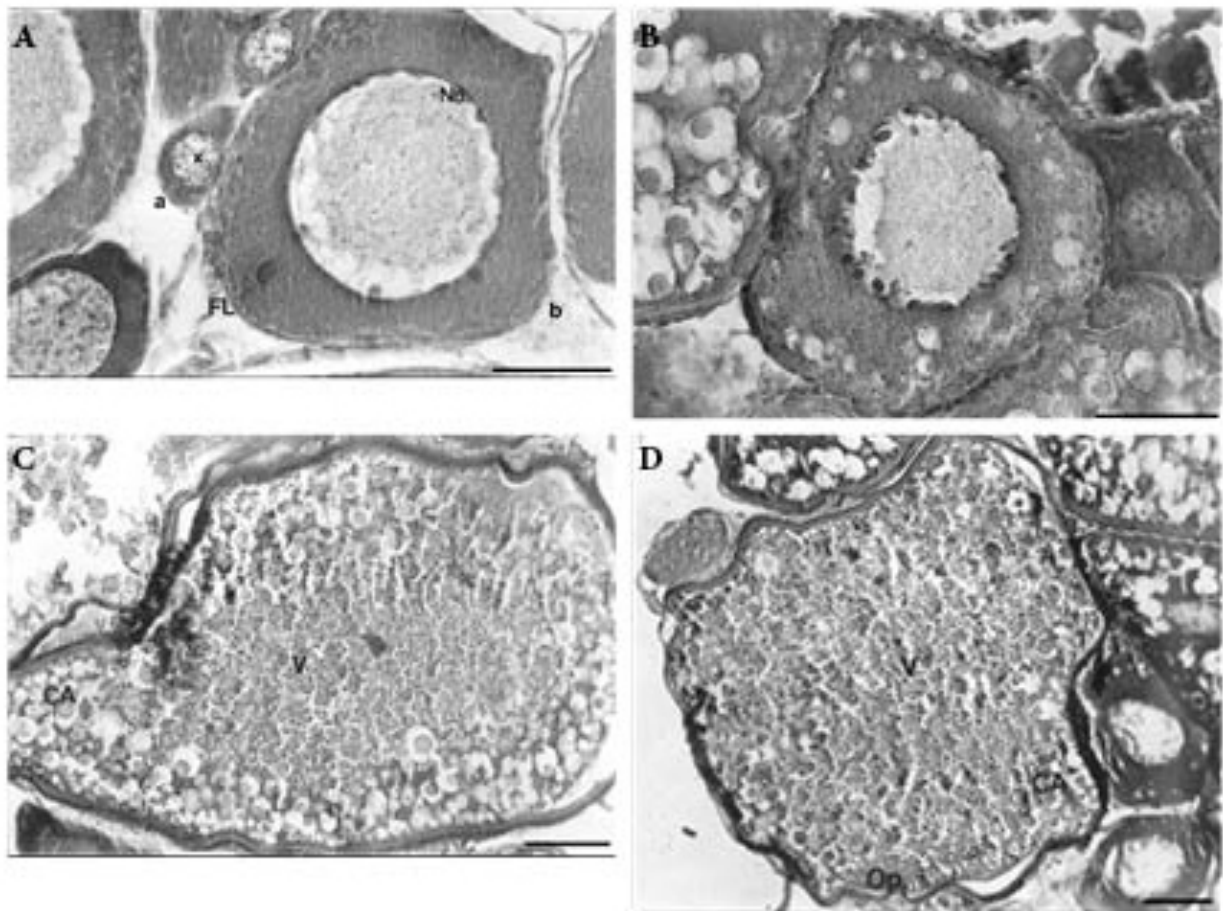
Durant le stade I (oocytes primaires en croissance), les ovocytes primaires, sont relativement petits et rond (Hisaoaka and Firlit, 1962)). Au stade II (stade alvéolaire cortical), les oocytes se distinguent par l'apparition d'alvéoles corticales (vésicules membranaires contenant des protéines et des carbohydrates) de taille variables et d'une enveloppe vitelline (*zona radiata*) qui devient proéminente.

Les jeunes follicules deviennent de plus en plus opaques et de plus en plus gros lors de l'étape III (vitellogenèse), et la vésicule germinale est obscurcie. Durant cette phase de croissance importante, la taille de l'ovocyte augmente, principalement due à l'accumulation par endocytose de la vitellogénine (Selman and Wallace, 1989; Patiño and Sullivan, 2002; Jalabert, 2005), qui est transformée en protéine du jaune, et accumulée dans les granules vitellins.

Le stade IV (maturation oocytaire) correspond à la phase où la taille des oocytes augmente peu, et ils deviennent transparents, Cette maturation doit se produire immédiatement avant l'ovulation pendant la nuit chez le poisson-zèbre, qui fraie normalement en tout début de journée. Avant l'ovulation, les cellules folliculaires se rétractent de l'ovocyte. Les ovocytes de stade V (œufs matures), translucides et d'environ

0,75mm de diamètre, sont ovulés dans la lumière de l'ovaire et sont capables d'être fertilisés.

Cependant, même si la maturation ovocytaire suit un modèle similaire chez la plupart des téléostéens, le nombre de stades et de sous-stades ovocytaires peut varier considérablement selon les espèces mais également en fonction de différents critères de classification utilisés par les auteurs.



**Figure 3 : Maturation ovocytaire chez le poisson-zèbre d'après (Çakıcı and Üçüncü, 2007).** Chez le poisson-zèbre, la maturation ovocytaire se divise en cinq stades basés sur des critères morphologiques, des événements physiologiques et biochimiques (Selman et al., 1993). (A) Stade I, oocytes primaires en croissance (barre d'échelle :30  $\mu\text{m}$ ); (B) Stade II, stade alvéolaire cortical (barre d'échelle :50  $\mu\text{m}$ ); (C) Stade III, vitellogénèse (barre d'échelle :50  $\mu\text{m}$ ) ; (D) Stade IV, maturation oocytaire (barre d'échelle :50  $\mu\text{m}$ ); Stade V, œufs matures (non représenté).

### 2.1.2 Dynamique du développement ovocytaire dans les ovaires

En s'appuyant à la fois sur le schéma de développement des follicules ovariens et sur le comportement de ponte des poissons, trois types d'ovaires ont été définis (Wallace and Selman, 1981; Nagahama, 1983) :

Les ovaires totalement synchrones se caractérisent par la présence d'ovocytes tous au même stade de développement. On les trouve chez les téléostéens qui ne pondent qu'une fois avant de mourir.

Les ovaires synchrones par groupe possèdent deux populations d'ovocytes. Une première population de gros ovocytes relativement synchrones, et une autre plus hétérogène de petits ovocytes, parmi lesquels, les premiers sont recrutés. Ce schéma est généralement caractéristique des téléostéens n'ayant qu'une ponte annuelle, totale, avec une saison de reproduction relativement courte.

Enfin, les ovaires asynchrones se caractérisent par la présence d'ovocytes à tous les stades, sans population dominante. Ce schéma se trouve chez les espèces qui pratiquent des pontes fractionnées pendant une saison de reproduction longue (Thomé et al., 2005), ce qui est le cas pour le poisson-zèbre (Kimmel et al., 1995).

## 2.2 La stéroïdogénèse

Bien que le cerveau et les glandes surrénales en sécrètent de petites quantités d'hormones sexuelles, les gonades en sont la source principale. Fabriqués à partir du cholestérol par les testicules des mâles et les ovaires des femelles, ces stéroïdes gonadiques contrôlent les cycles et les comportements reproducteurs.

Les gonades produisent et sécrètent trois grandes catégories d'hormones stéroïdes (*figure 4*) : les androgènes, les œstrogènes et les progestines. Ces trois catégories se trouvent chez les mâles et les femelles en différentes proportions.

Les androgènes déclenchent la formation et la maturation du système reproducteur mâle et en assurent le fonctionnement (Nagahama, 1994).

Les œstrogènes, dont le plus important est l'œstradiol, sont responsables du fonctionnement du système reproducteur femelle et de l'apparition des caractères sexuels secondaires femelles.

Chez les mammifères, les fonctions de progestines, dont fait partie la progestérone, ont surtout trait à la mise en place de la phase sécrétoire du cycle utérin et à l'adaptation de l'utérus, qui assure la croissance et le développement de l'embryon (Nagahama, 1994).

Les stéroïdes sexuels jouent un rôle déterminant dans le développement gonadique en agissant localement ou en effectuant des rétrocontrôles positifs ou négatifs sur le cerveau et l'hypophyse. Leur synthèse se trouve sous la dépendance des stimulines que sont les gonadotropines adénohypophysaires (GtHs).

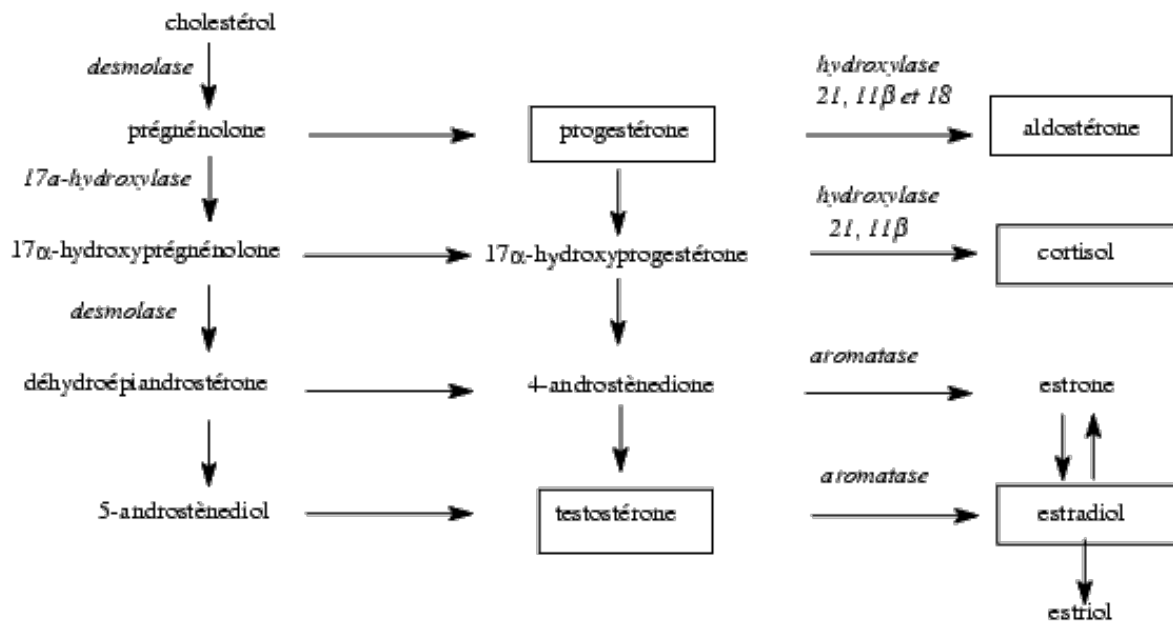


Figure 4 : Stéroïdogénèse: la voie de synthèse des stéroïdes sexuels. L'enzyme aromatasase est responsable de la conversion des androgènes en oestrogènes.



### 3. L'HYPOPHYSE ET LES GONADOTROPINES

Chez tous les vertébrés, l'activité et la fonction des gonades sont sous la stimulation directe des gonadotropines, ou hormones gonadotropes, que sont l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), synthétisées par l'hypophyse. Ce sont elles qui, en période de maturation sexuelle, stimulent les gonades pour la production de gamètes et de stéroïdes sexuels (Gharib et al., 1990; Swanson et al., 2003).

#### 3.1 L'hypophyse : lieu de synthèse et de sécrétion des gonadotropines

Initialement caractérisées chez les mammifères, les gonadotropines appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques. Cette famille comprend trois hormones hypophysaires : l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH), la thyrotropine (TSH) et pour certaines espèces (primates, équidés) une hormone placentaire, la choriogonadotropine (hCG). Ces hormones sont constituées de deux sous-unité distinctes : une sous-unité  $\alpha$  commune (glycoprotéine  $\alpha$ , GP $\alpha$ ) et une sous-unité  $\beta$  conférant la spécificité hormonale (Combarous et al., 2001).

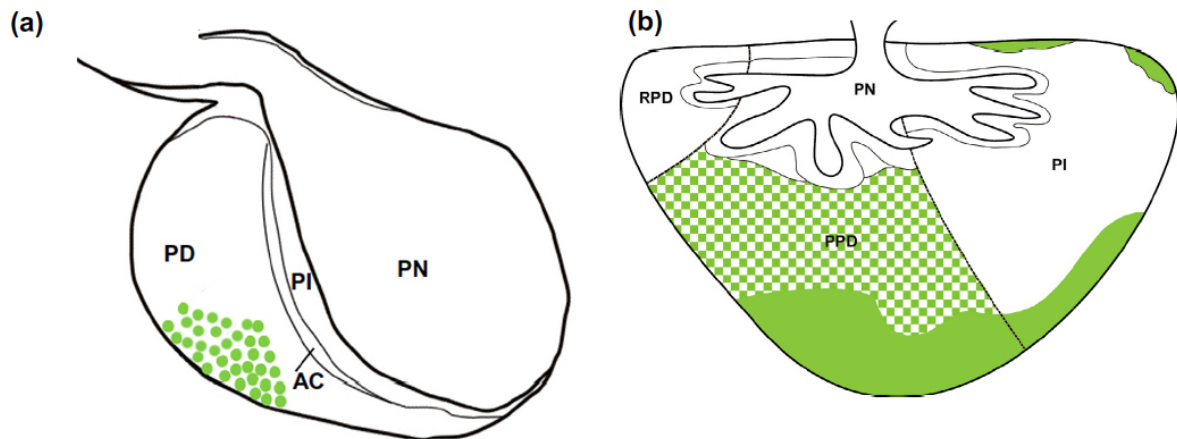
La synthèse des gonadotropines a lieu dans l'hypophyse, aussi appelée glande pituitaire. L'hypophyse est une invention des vertébrés. C'est un organe endocrine clé situé dans une logette osseuse sous l'hypothalamus, juste derrière le chiasma optique et produisant huit à dix hormones qui contrôlent l'homéostasie de toute une panoplie de processus physiologiques, dont la reproduction. Elle est principalement constituée d'un tissu nerveux : la neurohypophyse (NH ou pars nervosa : PN) et d'un tissu glandulaire : l'adénohypophyse (AH), qui forment chez les tétrapodes deux lobes séparés.

La neurohypophyse, se compose essentiellement de faisceaux de fibres neurosécrétrices originaires de différentes parties du cerveau, notamment l'hypothalamus, sécrétant, dans la circulation générale, différents peptides tels la vasopressine et l'ocytocine (appelée parfois isotocine chez les poissons téléostéens).

L'adénohypophyse, représente la partie glandulaire de l'hypophyse. Elle contient différents types cellulaires qui synthétisent et sécrètent les deux gonadotropines, ainsi que six autres hormones : la prolactine (PRL), la corticotropine (ACTH), la thyrotropine (TSH), l'hormone de croissance (GH), l'hormone mélanotrope (MSH) et la somatolactine (Slmt) (Yeung et al., 2006). Chez les poissons téléostéens, comme chez les mammifères, l'adénohypophyse est souvent divisée en deux : la *pars distalis* (PD) et la *pars intermedia*



(PI). Chez les téléostéens la PD est elle-même souvent divisée en deux parties : la *rostralis pars distalis* (RPD) et la *proximalis pars distalis* (PPD) qui contient les cellules gonadotropes (Olivereau and Ball, 1964) (*figure 5*).



**Figure 5 : Schémas d'une hypophyse de mammifère (a) et de poisson (b), mettant en évidence les principales différences morphologiques: les mammifères ont une PN et une PD bien développées, alors que la PI est petite ou absente au stade adulte. Chez les téléostéens, la PI constitue une grande partie de l'hypophyse, tandis que la PN est moins prononcée, avec des protubérances en forme de doigts. Une répartition cloisonnée des différents types cellulaires endocrines est maintenue dans le stade adulte chez les poissons, alors que ceci est limité au stade embryonnaire chez les mammifères. En raison de la formation de la poche de Rathke, la PI et la PD sont séparées par une fente (AC), par opposition aux poissons chez lesquels la séparation des deux parties est plus diffuse. Chez la plupart des mammifères on retrouve un type de cellule gonadotrope situé tout au long de la partie ventrale de la PD. Les téléostéens ont deux types de cellules gonadotropes, chacun produisant principalement soit la FSH soit la LH (dans les régions en vert plein, la LH est prédominante, les espaces en damier vert sont les zones où les deux types de cellules sont trouvés, mais avec une prédominance de la FSH). Adapté de (Weltzien et al., 2004) et (Weltzien et al., 2014).**

Alors que chez les mammifères, la neurohypophyse et l'adénohypophyse représentent respectivement les lobes postérieur et antérieur de l'hypophyse, chez les poissons téléostéens, la neurohypophyse est positionnée dorsalement par rapport à l'adénohypophyse (Pogoda and Hammerschmidt, 2007). Et contrairement aux mammifères chez lesquels les cellules ne forment pas des masses spécialisées, chez les téléostéens, les cellules d'un type cellulaire donné sont souvent regroupées dans une région spécifique de la glande, avec une grande variabilité dans l'espace et dans le temps selon les étapes physiologiques. Il y a en effet un certain niveau de plasticité dans la localisation d'un type cellulaire donné en fonction du stade physiologique. Par exemple, les

cellules gonadotropes chez les perciformes et les salmonidés ont tendance à envahir la périphérie de la *pars intermedia* au cours de la maturation sexuelle.

Parmi les cellules endocrines de l'hypophyse, les cellules gonadotropes sont les dernières à se développer et à devenir fonctionnelles (pour revue (Weltzien et al., 2014) Chez les mammifères, ces cellules sont généralement dites « bihormonales » car elles produisent à la fois la LH et la FSH, mais des cellules « monohormonales », sécrétant l'une des deux GtHs, peuvent parfois être identifiées (Counis et al., 2001).

Chez les téléostéens, il a été démontré que les deux GtHs étaient produites par des cellules différentes dans la *proximalis pars distalis* (Kanda et al., 2011) (salmonidés : truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Nozaki et al., 1990a; Nozaki et al., 1990b), saumon atlantique, *Salmo salar* (Olivereau, 1976); fondulidés : Choquemort, *Fundulus heteroclitus* (Shimizu et al., 2003); l'Anguille, *Anguilla anguilla* (Schmitz et al., 2005); *Danio rerio* (So et al., 2005)). même s'il est parfois signalé chez des téléostéens des cellules gonadotropes synthétisant les deux hormones (Pilar Garcia Hernandez et al., 2002; Weltzien et al., 2014) et chez des mammifères des cellules gonadotropes qui ne synthétisent qu'une seule hormone (Pope et al., 2006). Aussi, contrairement aux mammifères chez lesquels la distribution compartimentée des types de cellules endocrines, qui reflète la structuration initiale de l'ébauche de l'adénohypophyse, est limitée à la phase embryonnaire, chez la plupart des espèces de poissons, cette organisation est maintenue au stade adulte (Weltzien et al., 2004; Pogoda and Hammerschmidt, 2007).

### 3.2 Rôles des gonadotropines

Chez les mammifères, la LH et la FSH régulent des processus différents. La LH stimule la production de stéroïdes sexuels (androgènes chez le mâle, et androgènes et progestagènes chez la femelle) ainsi que l'induction de l'ovulation et le maintien du corps jaune chez la femelle. La FSH, elle, stimule, chez la femelle, la croissance du follicule ovarien et l'activité aromatase (enzyme catalysant la conversion de la testostérone en œstradiol) et, chez le mâle, la spermatogenèse.

Chez les poissons téléostéens, des études récentes ont suggéré que les fonctions attribuées à la LH et la FSH ne sont pas aussi bien définies que chez les mammifères et semblent dépendre de l'espèce considérée.

Chez le poisson-rouge, *Carassius auratus*, il a été rapporté que les sous-unités  $\beta$  de la LH et de la FSH sont exprimées de façon similaire durant l'ovogenèse, et qu'elles seraient toutes deux impliquées dans le contrôle du développement ovarien (Yoshiura et al., 1997). Chez la daurade royale (*Sparus aurata* (Gothilf et al., 1997)) et la truite, *Oncorhynchus mykiss* (Sambroni et al., 2013), l'expression de LH $\beta$  et FSH $\beta$  augmente parallèlement au moment de la saison de reproduction, suggérant que les deux hormones joueraient un rôle similaire (Gothilf et al., 1997).

En revanche chez la truite, *Oncorhynchus mykiss* (Prat et al., 1996), il a aussi été rapporté que la LH et la FSH sont sécrétées selon des profils différents au cours de la gamétogenèse, suggérant des fonctions différentes comme chez les mammifères. Dans la même ligne, chez deux poissons-chat (*Clarias gariepinus* (Bogerd et al., 2001) ; *Ictalurus punctatus* (Liu et al., 2001)) et chez l'anguille (*Anguilla japonica* (Yoshiura et al., 1999) et *Anguilla anguilla* (Schmitz et al., 2005)), il a été observé que la LH et la FSH étaient exprimées de façon différente durant le cycle reproducteur (Kumar and Trant, 2004). De même, chez le poisson-zèbre, il apparaît que la FSH et la LH jouent bien des rôles différents dans l'ovogenèse : la phase de croissance de l'ovocyte étant sous contrôle de la FSH et les dernières étapes de la maturation ovocytaire essentiellement sous le contrôle de la LH (Clelland and Peng, 2009). Le fait que l'expression des récepteurs de la FSH augmente dans le follicule en croissance contrairement à celle du récepteur de la LH qui n'augmente que peu de temps avant la maturation de l'ovocyte (Kwok et al., 2005), soutient cette affirmation.

## 4. LE CERVEAU ET LE CONTROLE DES GONADOTROPINES

### 4.1 Le système GnRH, principal stimulateur des gonadotropines

Chez les téléostéens, comme chez les autres vertébrés, l'expression et la sécrétion des gonadotropines hypophysaires sont régulées par une grande variété de facteurs neuroendocrines. Même si la synthèse et la sécrétion des gonadotropines sont soumises à des boucles de rétrocontrôles positifs et négatifs par les stéroïdes gonadiques (Shupnik, 1996; Breton et al., 1997; Dickey and Swanson, 1998), ou bien sont influencées par certains facteurs paracrines au sein de l'hypophyse elle-même (Denef, 2008; Levavi-Sivan et al., 2010; Clarke, 2011; Aroua et al., 2012), cette régulation se fait en majeure partie sous le contrôle de facteurs cérébraux (Zohar et al., 2010), dont la gonadolibérine (GnRH) se trouve être le principal.

#### 4.1.1 Les différentes formes de GnRH et leurs distribution

Dans les années soixante-dix, deux groupes de recherche rapportaient simultanément l'isolement d'un facteur hypothalamique porcin et ovin de sécrétion de la LH (Amoss et al., 1971; Matsuo et al., 1971). Ce décapeptide a d'abord été nommé LHRH (pour Luteinizing Hormone Releasing Hormone) et sa structure primaire a été identifiée comme étant : pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (Burgus et al., 1972). Il est issu d'un long précurseur : le pré-proGnRH, composé d'un peptide signal, du peptide biologiquement actif, d'un tripeptide de clivage et d'un peptide associé (GnRH-associated Peptide, GAP).

Plus tard, il est devenu évident que ce décapeptide stimulait également la libération de la FSH et donc le nom de LHRH a été remplacé par GnRH (pour hormone de libération des gonadotropines, de l'anglais gonadotropin-releasing hormone), qui est maintenant largement utilisé. Après des études montrant que ce facteur hypothalamique stimulait la libération des hormones gonadotropes hypophysaires chez la carpe, *Cyprinus carpio* (Breton et al., 1971), la première GnRH de poisson, la sGnRH (saumon) fut alors découverte chez un salmonidé : le saumon keta, *Oncorhynchus keta* (Sherwood et al., 1983).

Depuis lors, les recherches portant sur la GnRH chez les poissons téléostéens n'ont cessé d'augmenter, poussées par la possibilité de découvrir de potentielles applications importantes pour l'aquaculture (Zohar and Mylonas, 2001).

Chez les vertébrés, quinze variantes de la GnRH ont été identifiées. Il apparaît maintenant que chaque espèce de vertébré exprime deux ou trois formes de la GnRH dans de multiples tissus et que les GnRHs exercent des actions pléiotropes par l'intermédiaire de plusieurs classes de récepteurs (Morgan and Millar, 2004; Kah et al., 2007). Ces différentes variantes sont rassemblées en trois groupes de GnRH, codées par des gènes différents mais de structure conservée (4 exons, 3 introns ; (Alestrom et al., 1992; Chow et al., 1998) :

- Le type 1 : GnRH-1 comprenant : mGnRH, gpGnRH, efGnRH, frGnRH, sbGnRH, mdGnRH, hgGnRH, wfGnRH, pjGnRH\*)
- Le type 2 : GnRH-2 (cGnRH-H\*) est exprimée chez les tétrapodes et tous les téléostéens étudiés à ce jour.
- Le type 3 : GnRH-3 (sGnRH\*) est présente uniquement chez certains téléostéens.

\*Note :

Type 1 : mGnRH : mammalian GnRH, pjGnRH : pejerrey GnRH, sbGnRH : sea bream GnRH, cfGnRH : catfish GnRH, hgGnRH : herring GnRH, wfGnRH : whitefish GnRH ; mdGnRH : médaka GnRH

Type 2 : cGnRH-II : chicken GnRH-II ;

Type 3 :sGnRH : salmon GnRH

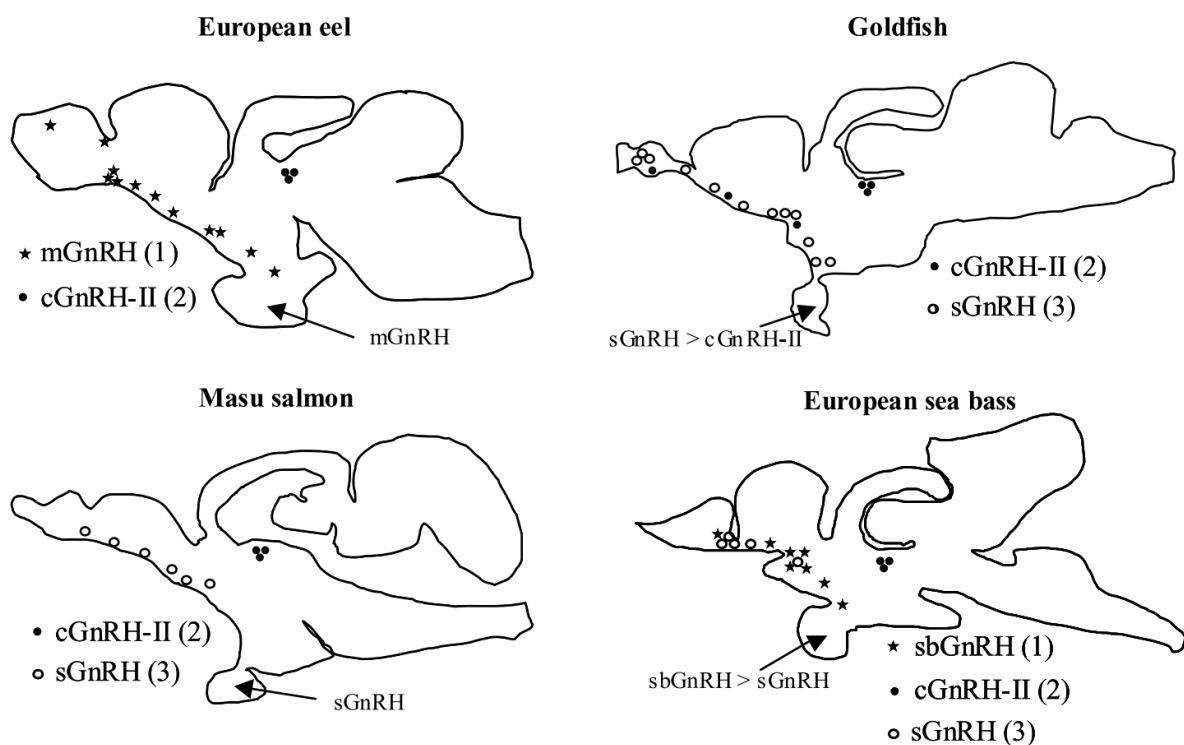
Bien d'autres GnRH ont été décrites et nommées sans toujours savoir vraiment à quel groupe elles appartiennent : frGnRH : frog GnRH, gpGnRH : guinea pig GnRH, dogfish GnRH, lamprey GnRH-I, lamprey GnRH-III, cGnRH-I : chicken GnRH-I

Alors que la présence de la GnRH a été démontrée dans des tissus périphériques comme les gonades (Lin and Peter, 1996; Yu et al., 1998; von Schalburg et al., 1999) où elle stimulerait la maturation ovocytaire (Pati and Habibi, 2000), c'est dans le cerveau qu'elle a été initialement mise en évidence. Depuis, une quantité considérable de travail a été consacrée à l'identification et la localisation des neurones exprimant la GnRH dans le cerveau des poissons (*figure 6*) par immunohistochimie ou, plus récemment, par

hybridation *in situ* et par transgénèse (Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Abraham et al., 2008; Okubo and Nagahama, 2008).

Selon les espèces, deux ou trois de ces formes sont exprimées dans des régions cérébrales différentes (Lethimonier et al., 2004) :

- La GnRH-1 est exprimé par des neurones localisés dans le cerveau antérieur (bulbes olfactifs, télencéphale et diencephale).
- La GnRH-2 est exprimé dans des neurones localisés dans le mésencéphale rostral.
- La GnRH-3 n'est quant à lui présent que chez certains téléostéens, et il est exprimé dans le cerveau antérieur (Gonzalez-Martinez et al., 2001; Gonzalez-Martinez et al., 2002b; Gonzalez-Martinez et al., 2002a).



**Figure 6 : Organisation schématique des systèmes à GnRH chez les téléostéens, (d'après (Lethimonier et al., 2004) xGnRH >yGnRH indique l'abondance relative des fibres à GnRH innervant l'hypophyse.**

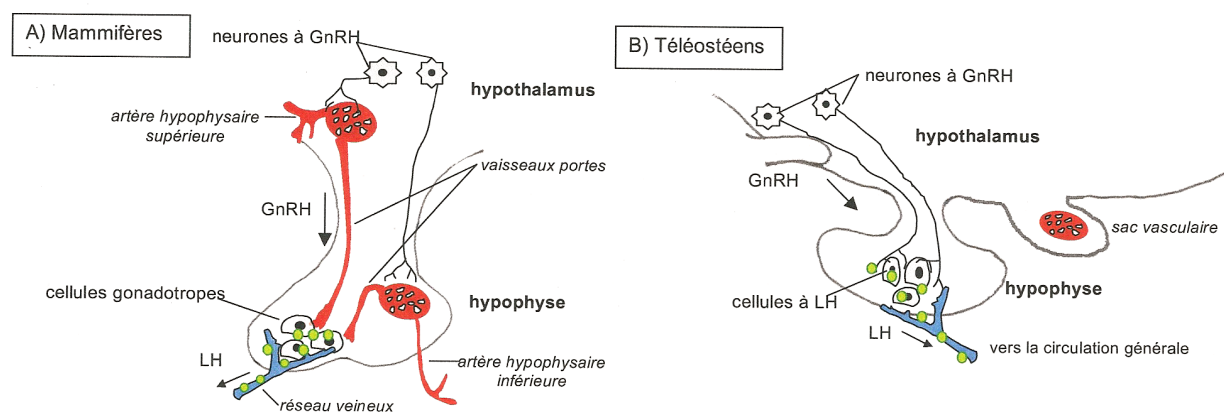
Lorsqu'ils sont tous deux présents, l'expression de la GnRH-3 recouvre celle de la GnRH-I dans les bulbes olfactifs, le télencéphale ventral et l'aire préoptique (White et al., 1995; Gothilf et al., 1996). Cette observation a été faite chez différentes espèces de téléostéens, y compris chez le grand corégone, *Coregonus dupeaformis* (Vickers et al.,

2004), *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi et al., 2005), le tambour brésilien, *Micropogonias undulatus* (Mohamed et al., 2005) et le médaka, *Oryzias latipes* (Okubo et al., 2006), suggérant que ce chevauchement était la règle et non l'exception. Et lorsque seul la GnRH-3 et la GnRH-2 sont exprimés comme c'est le cas chez le poisson-zèbre (Torgersen et al., 2002; Steven et al., 2003), ces deux formes sont sécrétées par des neurones dont la distribution est similaire à celle qui peut être observée chez les autres téléostéens (Montero et al., 1994).

#### 4.1.2 Origine et rôle de la GnRH hypophysiotrope

Les neurones à GnRH impliqués dans la régulation des GtHs projettent, soit directement dans l'hypophyse antérieure chez les poissons téléostéens, soit vers l'éminence médiane, organe neurohémal des mammifères (figure 7). En effet, chez les poissons, l'hypophyse est reliée à l'hypothalamus par une courte tige constituée de fibres neuro-sécrétrices provenant du cerveau. Ce sont en fait les axones originaires des neurones localisés dans le cerveau, et qui envoient leurs projections à l'hypophyse. Les différentes cellules de l'adénohypophyse reçoivent donc une innervation qui est plus ou moins directe en fonction des espèces de poissons (Pogoda and Hammerschmidt, 2007).

Chez certaines espèces, de vrais contacts synaptiques neuroendocrines peuvent être observés. Ainsi, l'innervation hypophysaire des téléostéens doit être considérée comme l'équivalent fonctionnel de l'innervation de l'éminence médiane chez les vertébrés terrestres.



**Figure 7 : Schémas du contrôle de la synthèse et de la libération de l'hormone lutéinisante (LH) par les neurones à gonadolibérine (GnRH) via le système porte chez les mammifères (A) ou directement chez les téléostéens (B) (Sebert, 2007).**



Chez les téléostéens, les premières tentatives pour caractériser les cellules du cerveau envoyant des axones sur l'hypophyse ont utilisé des approches pharmacologiques (Kah et al., 1983) ou des lésions électrolytiques (Kah et al., 1987a). Plus récemment, la distribution des cellules projetant directement dans l'hypophyse (neurones hypophysiotropes) a été étudiée en utilisant des techniques de marquage par transport rétrograde d'un fluorophore (Fryer and Maler, 1981; Rao et al., 1993). En particulier, l'introduction de colorants fluorescents, comme le DiI (1-10-dioctadécyl-3, 3,30, 30 tétraméthylin-docarbocyanine), qui sont transportés le long des membranes des cellules, a permis d'effectuer de tels traçages rétrogrades dans différentes espèces (Johnston and Maler, 1992; Anglade et al., 1993; Rao et al., 1993; Holmqvist and Ekstrom, 1995; Weltzien et al., 2006).

Chez certaines espèces, telles que les salmonidés ou les anguilles, la neurohypophyse est anatomiquement séparée de l'adénohypophyse par une double membrane basale sur laquelle les terminaisons neurosécrétrices sont apposées (Abraham, 1974; Kaul and Vollrath, 1974). L'hypothèse est que les produits neurosécrétés sont libérés et diffusent au sein des espaces inter-cellulaires pour atteindre leurs récepteurs sur leurs cellules cibles. Chez d'autres espèces, telles que les cyprinidés, la membrane basale est interrompue à certains endroits et les fibres nerveuses envahissent l'adénohypophyse. En général, il y a une bonne correspondance entre la distribution des fibres nerveuses impliquées dans le contrôle d'un type cellulaire donné et la distribution de ce type de cellules au sein de l'hypophyse. Chez le poisson rouge (Anglade et al., 1993) ainsi que chez le poisson-chat (Dubois et al., 2000), les fibres des neurones GnRH sont surtout présentes dans la PPD où sont situées les cellules gonadotropes.

Alors qu'une seule forme de GnRH existe chez les mammifères, plusieurs formes de ce peptide existent chez les téléostéens. L'étude des projections axonales menée chez certains d'entre eux qui possèdent les 3 formes de GnRH, tels que le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, a fourni des informations sans ambiguïté et détaillées sur la répartition des fibres immuno-réactives pour les différentes formes exprimées dans le cerveau (Gonzalez-Martinez et al., 2002b). Ainsi, dans cette espèce, il a été démontré que les neurones à GnRH-1, représentent la principale source de GnRH innervant l'hypophyse (Montero et al., 1996), en projetant sur la PPD, ainsi qu'à la frontière de la PI, où les cellules gonadotropes et des récepteurs de la GnRH ont également été trouvés (Gonzalez-Martinez et al., 2004). Il convient de noter que les formes de la GnRH-1 chez les poissons



sont orthologues au gène GnRH-1 des tétrapodes, lequel est exprimé dans les neurones hypophysiotropes (Lethimonier et al., 2004; Kah et al., 2007).

Ces résultats physiologiques corroborent l'idée que la GnRH-1 joue un rôle majeur dans la stimulation de la sécrétion des gonadotropines chez des espèces exprimant les trois formes de GnRH (comme les perciformes). Cependant, il a été observé que les axones des cellules exprimant la GnRH-3 atteignent également l'hypophyse chez cette espèce, cette innervation étant cependant plus faible comparée aux projections de la GnRH-1. Lorsqu'il est exprimé, le type 3 (GnRH-3) remplirait, en association ou non avec la GnRH de type 1, la même fonction que la GnRH de type 1 exprimée seule (Oka, 2002).

Aujourd'hui, l'émergence de lignées transgéniques de médaka et de poisson-zèbre chez lesquels les neurones à GnRH expriment des protéines rapportrices fluorescentes fournissent un outil utile pour l'étude de l'endocrinologie de la reproduction et a apporté de nouvelles techniques hautement sensibles pour visualiser ces neurones hypophysiotropes et leur développement (Okubo et al., 2006; Abraham et al., 2008). Les données de ces études ont fourni une vision très précise de toute la population de neurones hypophysiotropes. Par exemple, chez le poisson rouge, l'anguille et le poisson-zèbre, les études ont établi que la majeure partie de l'innervation hypophysaire avait pour origine la région préoptique et l'hypothalamus médiobasal, qui sont chez les vertébrés, les principales régions de contrôle de la fonction de reproduction (Johnston and Maler, 1992; Anglade et al., 1993; Mananos et al., 1999). Toutefois, un certain nombre de neurones hypophysiotropes ont été également trouvés dans d'autres régions telles que les bulbes olfactifs, le télencéphale ventral, le noyau suprachiasmatique, le thalamus, ou le tegmentum mésencéphalique (Johnston and Maler, 1992; Anglade et al., 1993).

Grâce à ces techniques, il a récemment été mis en évidence que les neurones à GnRH de type 2 projettent aussi sur l'hypophyse chez le poisson-zèbre (Xia et al., 2014). Son rôle dans le contrôle des comportements sexuels (Maney et al., 1997; Temple et al., 2003; Barnett et al., 2006) ainsi que dans la prise alimentaire et les processus de régulation liés à la nutrition (Kauffman and Rissman, 2004; Bhatnagar et al., 2006; Lenard and Berthoud, 2008; Xia et al., 2014) ont été bien décrits. Les nouvelles données de (Xia et al., 2014), suggèrent que la GnRH2 pourrait également participer à la régulation de la synthèse ou de la sécrétion des gonadotropines.

La GnRH représente donc le facteur majeur de stimulation de la production des gonadotropines assurant ainsi l'initiation de la puberté et l'alternance, chez les espèces saisonnières, des périodes de repos et d'activité sexuelle. Il a été démontré chez certaines

espèces de poissons téléostéens que la sensibilité des cellules gonadotropes à la GnRH augmentait au cours du développement des gonades (*Oncorhynchus mykiss* (Weil and Marcuzzi, 1990a, b)). Cette modulation de l'action de la GnRH au cours du cycle reproducteur a été bien étudiée chez les salmonidés. Ainsi, durant les phases de maturation et de pré-ponte, la GnRH stimule la synthèse de la FSH et, en association avec de l'oestradiol, celle de la LH. En revanche, en période de ponte, la GnRH ne stimule que l'expression de  $GP\alpha$  et de  $LH\beta$  (Ando and Urano, 2005). L'importance de la GnRH dans la stimulation des gonadotropines (LH, FSH) a notamment été démontrée par l'étude d'individus atteints d'hypogonadisme (Seeburg et al., 1989; Cadman et al., 2007).

### 4.1.3 Le contrôle de la synthèse et de la sécrétion de la GnRH

Chez les mammifères, la GnRH est sécrétée de façon pulsatile grâce à la libération synchrone de quanta de GnRH par plusieurs neurones (Levine and Ramirez, 1982). La pulsatilité est un élément important du contrôle des gonadotropines. En effet, alors que la libération pulsatile de GnRH entraîne une libération de  $LH\beta$  (Crowley and McArthur; Belchetz), l'administration continue de GnRH provoque une rapide et forte diminution de l'expression de  $LH\beta$  et une diminution plus modérée de celle de  $FSH\beta$  tandis que l'expression de  $GP\alpha$  reste à peu près constante (Lalloz et al., 1988; Rodin et al., 1989). Il a de plus été démontré que la fréquence des pulses de GnRH était responsable de la régulation différentielle de LH et FSH. De faibles fréquences vont favoriser l'expression de  $FSH\beta$  et inversement, de fortes fréquences, comme durant la période pré-ovulatoire, vont stimuler l'expression de  $LH\beta$  (Dalkin et al., 1989; Haisenleder et al., 1991; Burger et al., 2002). Cette action différentielle résulterait partiellement du nombre de récepteurs à GnRH présents sur les cellules gonadotropes (Counis et al., 2001).

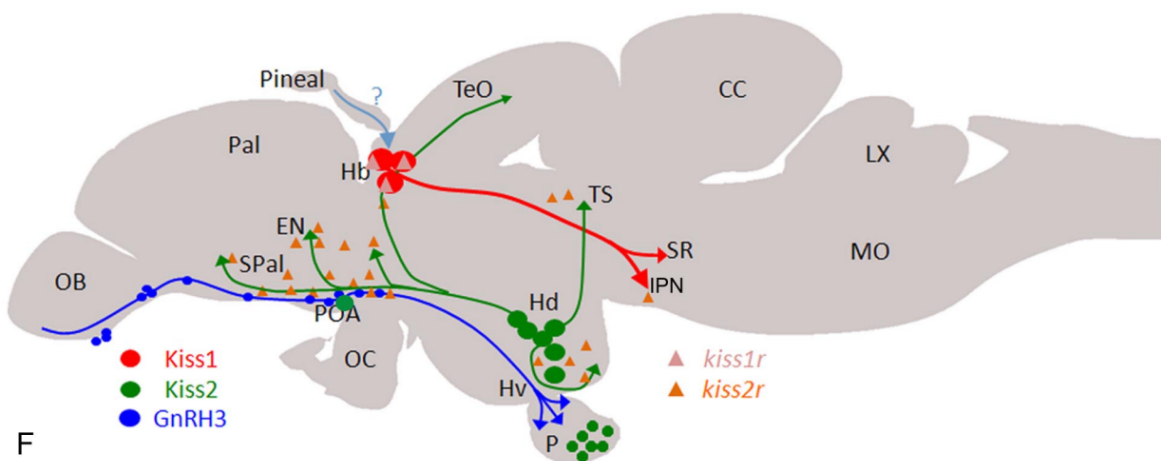
Chez les téléostéens, la question d'une libération pulsatile de la GnRH a été posée. En effet, chez le poisson-rouge, l'administration continue de GnRH n'entraîne pas de libération de LH (Khakoo et al., 1994), une situation également observée chez les mammifères, et qui suggère une activité pulsatile des neurones à GnRH. Cependant chez d'autres espèces de téléostéens, notamment aquacoles, un traitement continu à la GnRH peut être utilisé pour stimuler la production de LH et induire l'ovulation ou la spermiation (Zohar and Mylonas, 2001). Il est possible que, chez ces espèces, les cellules gonadotropes

répondent toutefois à la rythmicité de sécrétion de la GnRH, mais que, par rapport aux cellules gonadotropes des mammifères, elles y soient moins sensibles.

#### 4.1.3.1 Le système KISS/GPR54

Il est maintenant clairement établi que la voie de signalisation Kiss/GPR54 joue un rôle majeur dans l'initiation de la puberté et la fonction de reproduction en régulant la libération de la GnRH (Roa et al., 2008).

Des études phylogénétiques récentes ont identifié deux gènes codant des kisspeptines et des récepteurs kisspeptin chez différents groupes de vertébrés, dont les poissons, les amphibiens et les monotrèmes (Felip et al., 2009; Lee et al., 2009). C'est notamment le cas chez la lamproie, le poisson-zèbre, le médaka, le loup de mer, et le poisson rouge (Biran et al., 2008; Kanda et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; Lee et al., 2009; Li et al., 2009; Grone et al., 2010). Chez le poisson-zèbre, une étude récente décrit l'organisation des deux systèmes Kiss (kiss1 et kiss2) dans le cerveau, ainsi que la distribution des récepteurs correspondants (kiss1r et kiss2r), et les sites potentiels d'interactions avec les systèmes GnRH (*figure 8*). Dans cette espèce, il semblerait que ce soit le Kiss2 qui soit le plus impliqué dans le contrôle neuroendocrin de la reproduction (Parhar et al., 2004; Servili et al., 2011).



**Figure 8 : Schémas de la distribution des systèmes kiss dans le cerveau d'un téléostéen: le poisson-zèbre (Servili et al., 2011)**

Plusieurs populations de cellules exprimant kiss2 ont été trouvées dans l'hypothalamus du poisson-zèbre. Les travaux de l'équipe d'O. Kah (Servili et al., 2011) ont

mis en évidence que les neurones à GnRH qui sont situés le long d'un continuum qui s'étend des bulbes olfactifs à l'hypothalamus antérieur (Kah et al., 1986b; Steven et al., 2003; Abraham et al., 2009; Zohar et al., 2010), reçoivent des fibres des neurones Kiss2. De plus, chez un autre téléostéen, le bar européen, les récepteurs kiss2r ont été détectés sur les neurones GnRH1, homologue aux neurones à GnRH3 chez le poisson-zèbre (Servili et al., 2011). Ainsi, comme il a déjà été suggéré chez le tilapia, *Oreochromis niloticus* (Parhar et al., 2004), les neurones à GnRH sont susceptibles d'être la cible du kiss2 agissant par l'intermédiaire des récepteurs kiss2r.

### 4.1.3.2 Les autres facteurs contrôlant la GnRH

De nombreux autres facteurs excitateurs et inhibiteurs influencent la reproduction via la GnRH même si souvent les situations physiologiques dans lesquelles ils interviennent réellement ou les mécanismes mis en jeu ne sont toujours pas bien élucidés. Parmi eux, des neurotransmetteurs (Dudas and Merchenthaler, 2006), des neuropeptides dont la GnRH elle-même (DePaolo et al., 1987), des composés gazeux tel que le monoxyde d'azote (Prevot et al., 1999).

Chez les téléostéens, ces mécanismes de régulation sont loin d'être aussi bien élucidés que chez les mammifères, mais un certain nombre de facteurs ont été identifiés. Les régulations directes qui s'exercent sur les neurones à GnRH sont assurées principalement par des neuropeptides et des neurotransmetteurs comme c'est le cas chez les mammifères (Zohar et al., 2010).

#### Le neuropeptide Y

Le neuropeptide Y (NPY), un peptide constitué de 36 acides aminés de la famille des peptides pancréatiques, est fortement impliqué dans la régulation de la nutrition chez les mammifères et les poissons.

Le NPY est surtout efficace pour stimuler la GH chez *Carassius auratus* (Peng et al., 1993a). Toutefois, le NPY est également impliqué dans la régulation de la libération des gonadotropines (Breton et al., 1989; Kah et al., 1989; Breton et al., 1991; Peng et al., 1993b) et pourrait être l'un des facteurs qui relie croissance, alimentation et reproduction. En effet, de nombreuses espèces de poissons téléostéens réduisent leur consommation de nourriture pendant la période de reproduction, et il a été observé que

l'expression de NPY dans les zones hypophysiotropes préoptiques augmente pendant le jeûne (Silverstein et al., 1998).

Chez *Carassius auratus*, le NPY serait capable de libérer la GnRH à partir des terminaisons des neurones à GnRH dans l'hypophyse (Peng et al., 1993c; Trudeau, 1997).

### Le glutamate et le GABA

Le glutamate (un neurotransmetteur excitateur) et ses dérivés sont également connus pour leur action stimulatrice sur les neurones à GnRH chez *Oncorhynchus mykiss* par exemple (Flett et al., 1994).

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur inhibiteur dérivé du glutamate qui est très abondant dans le cerveau de tous les vertébrés. Après la découverte d'une importante innervation GABAergique de l'hypophyse chez *Carassius auratus* (Kah et al., 1987b), les effets du GABA ont été explorés principalement chez cette espèce (pour revue (Popesku et al., 2008)), et dans une moindre mesure chez *Oncorhynchus mykiss*. Initialement, il a été montré que le GABA stimulait la sécrétion de la LH chez *Carassius auratus* en stimulant la libération de la GnRH (Kah et al., 1992; Sloley et al., 1992), et aussi par une action hypophysaire directe. Chez *Oncorhynchus mykiss*, le GABA a une action stimulante sur la FSH et la LH, avec une intensité dépendante du sexe et du stade de reproduction des poissons. Dans cette espèce, l'action stimulatrice du GABA peut être exercée, au moins en partie, directement sur les cellules gonadotropes qui reçoivent une innervation lourde par des fibres GABAergiques (Mananos et al., 1999). Le GABA stimule de cette façon la sécrétion des gonadotropines à la fois basale et induite par la GnRH, (Mananos et al., 1999).

### Les catécholamines

Parmi les neurotransmetteurs principalement excitateurs, on retrouve de nombreuses catécholamines et leurs dérivés. La noradrénaline, en plus de stimuler directement la libération de LH par les cellules hypophysaires (Chang et al., 1991; Linard et al., 1995; Senthilkumaran and Joy, 1996), agit sur les neurones hypothalamiques à GnRH en stimulant sa libération (Yu et al., 1991; Yu and Peter, 1992). De la même façon, la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5HT) a un effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Yu et al., 1991; Senthilkumaran et al., 2001). La mélatonine pourrait, elle aussi, agir sur le système à GnRH hypophysiotrope en

l'activant (Khan and Thomas, 1996) ou l'inhibant (Amano et al., 2004), selon les espèces étudiées. Le rôle particulier de la dopamine sera évoqué dans un prochain paragraphe.

### La GnIH

L'hormone inhibitrice des gonadotropines (GnIH) est un dodécapeptide, récemment identifié chez les oiseaux, qui appartient à la famille des peptides LPXRF-amide (Tsutsui et al., 2007). Ce peptide est principalement exprimé dans les régions hypothalamique et septale de ces animaux et il inhibe la synthèse et la libération de gonadotropines agissant principalement au niveau de l'hypophyse (Yin et al., 2005; Tsutsui and Ukena, 2006; Tsutsui et al., 2007). Cependant, le GnIH semble aussi exercer des actions de neuromodulation sur les cellules de la GnRH grâce à une innervation des neurones GnRH préoptiques (Bentley et al., 2006; Bentley et al., 2008). La synthèse et la sécrétion de GnIH hypothalamique est modulée par la mélatonine, ce qui suggère que la GnIH pourrait être impliquée dans la transduction de l'information photopériodique à d'autres centres endocriniens impliqués dans le contrôle de la reproduction (Tsutsui et al., 2007).

La présence de cellules à GnIH dans l'hypothalamus semble être une caractéristique conservée durant l'évolution des vertébrés. L'existence d'un peptide de la famille LPXRF-amide a été récemment décrit chez les poissons téléostéens (Sawada et al., 2002; Osugi et al., 2006; Tsutsui et al., 2007). Cependant, même si des fibres ont été observées dans le télencéphale ventral et l'hypophyse chez *Carassius auratus* (Sawada et al., 2002), il n'a pas été retrouvé de récepteur pour ce peptide, ni dans la région contenant les neurones à GnRH hypophysiotropes ni dans les cellules gonadotropes, ce qui suggère chez cette espèce, une régulation indirecte des gonadotropines par la GnIH (Qi et al., 2013).

#### 4.1.3.3 Les stéroïdes gonadiques

Comme mentionné plus haut, il existe une communication permanente entre le complexe Cerveau-Hypophyse et la périphérie de l'organisme, notamment les gonades. Ce dialogue permet à l'activité des différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique d'être synchronisée lors de toutes les étapes du cycle de vie. D'une importance particulière, les stéroïdes sexuels produits par les gonades, sont utilisés par le cerveau et l'hypophyse comme indicateurs de l'état sexuel. Les stéroïdes sexuels modulent donc

l'activité des systèmes neuronaux qui influent l'axe de la reproduction. Ils affectent en particulier l'expression des neuropeptides et des neurotransmetteurs, ainsi que de leurs récepteurs correspondants dans le cerveau et l'hypophyse. Les neurones à GnRH sont en grande partie régulés par des rétrocontrôles exercés par les stéroïdes gonadiques.

En ce qui concerne le rétrocontrôle négatif, plusieurs études ont montré que l'oestradiol et la testostérone diminuaient l'expression des ARN messagers de la GnRH dans l'aire préoptique (Soga et al., 1998; Vacher et al., 2002; Vetillard et al., 2006). Chez plusieurs espèces de téléostéens, ces stéroïdes ont également un effet stimulateur sur l'expression de la GnRH (Amano et al., 1994; Breton and Sambroni, 1996; Trudeau, 1997; Dubois et al., 1998) supportant ainsi l'existence de rétrocontrôles positifs sur les neurones à GnRH.

Ces régulations par les hormones stéroïdes ne semblent pas s'exercer directement sur les neurones à GnRH. En effet, les récepteurs aux hormones stéroïdes, notamment les récepteurs nucléaires des oestrogènes, ne s'expriment pas dans les neurones à GnRH (Navas et al., 1995). Ainsi, les rétrocontrôles exercés par des stéroïdes gonadiques impliquent des niveaux de régulation intermédiaires, sensibles aux stéroïdes. Des neurones de types peptidergiques (KISS notamment), GABAergiques et surtout dopaminergiques ont été identifiés comme acteurs clés dans la transmission de l'information stéroïdienne aux neurones à GnRH (Trudeau et al., 1993b; Trudeau et al., 1993a; Peng et al., 1994).

#### 4.1.3.4 Régulation paracrine de la sécrétion de la GnRH

A côté des mécanismes de régulation transynaptiques, il existe chez les mammifères des interactions entre les cellules à GnRH et des cellules non-neuronales telles que des astrocytes et des cellules épendymogliales, les tanocytes, qui peuvent réguler la sécrétion de GnRH (Prevot et al., 2010). Ces cellules gliales, sensibles aux hormones stéroïdes, libèrent des facteurs (TGFs, FGF, IGF-I, prostaglandines) qui régulent l'activité des neurones à GnRH (Prevot, 2002; Garcia-Segura and McCarthy, 2004). Aussi, de récentes études menées chez la souris montrent que certains neurones à GnRH, de par leurs projections dendritiques (Barry et al., 1973; Gross, 1976), ont un accès direct aux informations périphériques (homéostasie), en étant exposés aux molécules transportées par le sang (Herde et al., 2011), leur permettant de moduler rapidement la sécrétion de



GnRH selon la composition du plasma. Chez les téléostéens, ce type de régulation n'a jamais été étudié.

### 4.1.4 Les récepteurs de la GnRH

La GnRH agit sur les cellules gonadotropes hypophysaires en se liant à des récepteurs spécifiques de haute affinité : les GnRH-Rs. Les récepteurs de la GnRH appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR, G protein-coupled receptor) et présentent une structure de base commune : un domaine N-terminal extracellulaire, sept domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$ , reliés par des boucles hydrophiles intra et extracellulaires et, pour certains d'entre eux, un domaine C-terminal cytoplasmique. L'interaction hormone-récepteur est assurée par le domaine extracellulaire et les régions transmembranaires.

Depuis la découverte chez la souris du premier GnRH-R sur une lignée cellulaire gonadotrope (Reinhart et al., 1992; Tsutsumi et al., 1992), ce récepteur a été identifié chez de nombreuses autres espèces de vertébrés. La présence de plusieurs formes de la GnRH laissait préfigurer l'existence de plusieurs formes de GnRH-Rs au sein d'une même espèce. Ainsi, chez les téléostéens, deux formes de récepteurs de la GnRH ont été identifiées chez *Carassius auratus* (Illing et al., 1999) et le poisson-chat africain, *Clarias gariepinus* (Bogerd et al., 2002), trois chez *Oryzias latipes* (Okubo et al., 2003) et *Oreochromis niloticus* (Parhar et al., 2005), quatre chez le poisson zèbre (Tello et al., 2008) et même cinq chez *Dicentrarchus labrax* (Moncaut et al., 2005).

Comme pour les variants de la GnRH, les GnRH-Rs ont été classés selon des critères phylogénétiques et structuraux. Ainsi, l'ensemble de ces récepteurs a été regroupé en deux principaux types : le type I correspondant aux récepteurs dépourvus de terminaison C-terminale intra-cytoplasmique et le type II regroupant les récepteurs dotés d'une queue C-terminale (Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007). Ces GnRH-Rs possèdent des affinités variables pour les ligands GnRHs avec, de manière surprenante, une plus forte affinité pour la GnRH de type 2, dont le rôle est le moins connu.

Chez les téléostéens, les GnRH-Rs s'expriment principalement dans le cerveau et l'hypophyse. Au niveau hypophysaire, ces récepteurs s'expriment dans les cellules gonadotropes mais ils ont également été mis en évidence dans les cellules lactotropes,



somatotropes, thyroïdiques, corticotropes, mélanotropes et somato-lactotropes (Illing et al., 1999; Pandolfi et al., 2005). De plus, la distribution tissulaire des GnRH-Rs ne se limite pas au système nerveux central et à l'hypophyse. Ainsi, ces récepteurs s'expriment également dans les gonades (Bogerd et al., 2002; Tello et al., 2008) mais aussi au niveau des branchies, des reins (Jodo et al., 2003; Moncaut et al., 2005) et des yeux (Madigou et al., 2000; Tello et al., 2008). Cette expression étendue des récepteurs à la GnRH laisse entrevoir un rôle plus large de la GnRH que sa seule implication dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.

### 4.2 La dopamine, neuromédiateur inhibiteur de la sécrétion des gonadotropines

Alors que chez tous les vertébrés le contrôle central des gonadotropines hypophysaires est essentiellement de type stimulateur et que la gonadolibérine (GnRH) est considérée comme l'acteur majeur de cette régulation, chez certains autres, les effets stimulants du GnRH sont contre-balançés par les effets inhibiteurs de la dopamine (DA), qui affectent la synthèse et la sécrétion des gonadotropines. C'est chez un poisson téléostéen, le poisson-rouge, que ce double contrôle (stimulateur-inhibiteur) de la reproduction par le GnRH et la DA a été mis en évidence pour la première fois (Peter and Paulencu, 1980; Chang and Peter, 1983). Il a été retrouvé ensuite chez de nombreux autres téléostéens et c'est chez eux qu'il a été le plus étudié (pour revue (Dufour et al., 2010; Zohar et al., 2010)).

L'action inhibitrice de la DA sur la reproduction n'est toutefois pas restreinte aux seuls téléostéens, puisqu'il a été mis en évidence chez des représentants de toutes les classes de vertébrés (amphibiens (Sotowska-Brochocka et al., 1994), oiseaux (Halawani and Burke, 1976; Sharp et al., 1989; Contijoch et al., 1992), et mammifères (Dailey et al., 1978; Huseman et al., 1980; Brango et al., 1990; Goodman et al., 1996; Lehman et al., 1996; Liu and Herbison, 2013) (pour revues (Pasqualini et al., 2004; Dufour et al., 2005)). Cependant cette voie inhibitrice a été mise en œuvre de façon différentielle au cours de l'évolution des vertébrés et son importance fonctionnelle varie beaucoup d'une espèce à l'autre.

#### 4.2.1 La dopamine : voie de biosynthèse et transport

La DA est le composé le plus simple de la famille des catécholamines (CAs). Elle est constituée d'un noyau catéchol (2-hydroxyphénol) et d'une chaîne latérale éthylamine. La DA est dérivée de la tyrosine (*figure 9*), un acide aminé aromatique capté dans le milieu extracellulaire par un système de transport actif. La biosynthèse de la dopamine est réalisée en deux étapes. La première étape, limitante, est catalysée par la tyrosine hydroxylase [TH; une hydroxylase d'acides aminés aromatiques (AAAH)] qui est codée chez tous les vertébrés, excepté les mammifères placentaires, par deux gènes paralogues, th1 et th2. Cette étape permet la transformation de la tyrosine en L-dopa (dihydroxyphénylalanine). La L-dopa est ensuite décarboxylée en DA par une décarboxylase spécifique des acides aminés aromatiques (AADC).

La dopamine est aussi un précurseur de deux autres catécholamines, la noradrénaline et l'adrénaline. La noradrénaline est produite par l'action de l'enzyme dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH). La synthèse de l'adrénaline nécessite une étape supplémentaire, catalysée par la phényléthanolamine-N-méthyl transférase (PNMT). Les catécholamines font partie d'une catégorie plus large de neurotransmetteurs, les monoamines, qui ont été initialement définis par leur propriété d'être dégradés par les oxydases spécifiques des monoamines (MAO). Les monoamines comprennent également les indolamines (par exemple, la sérotonine, la mélatonine) et les amines trace (tyramine, octopamine), ces derniers étant présents en faible quantité chez les vertébrés.

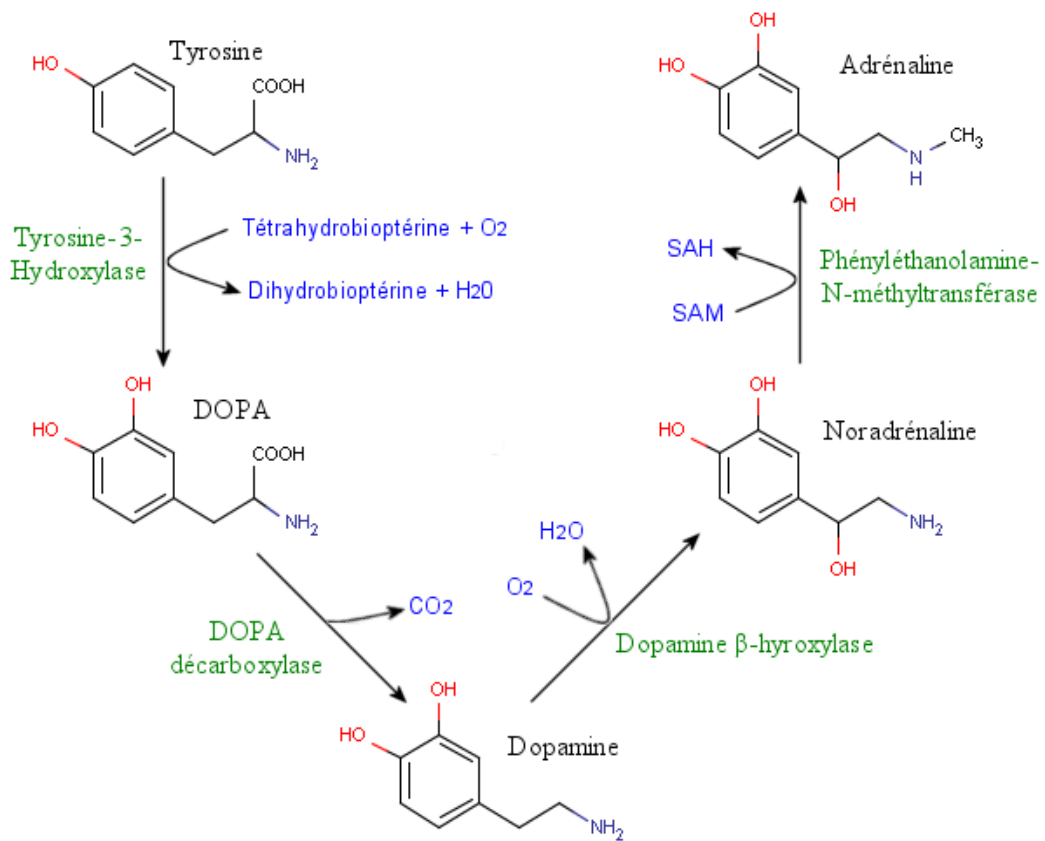
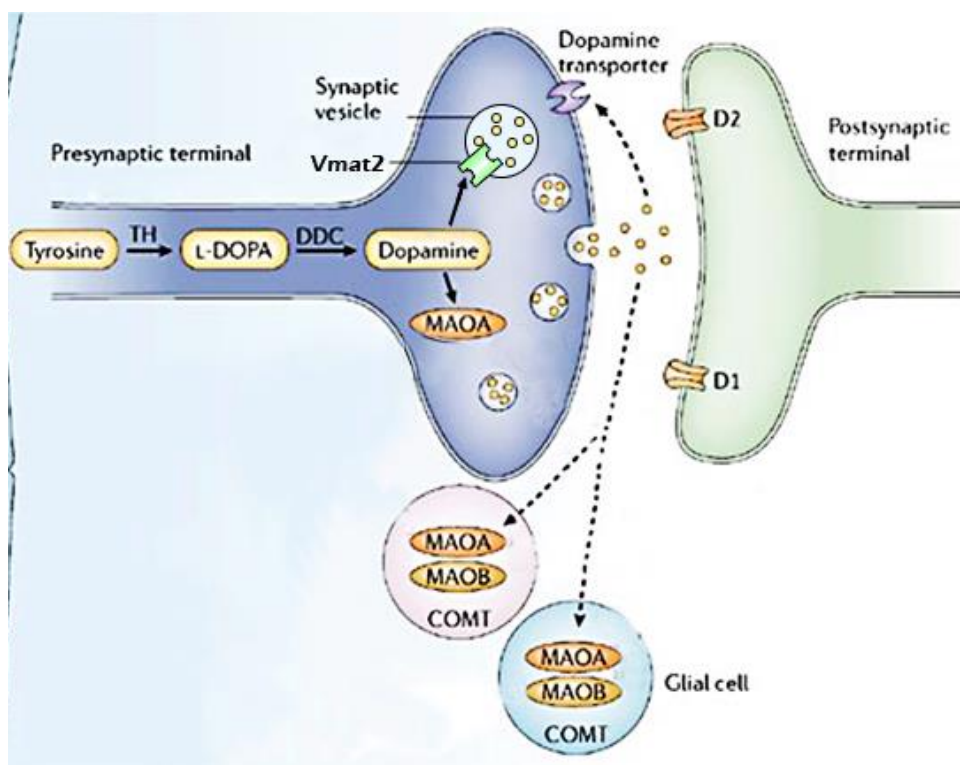


Figure 9 : Voie de biosynthèse de la dopamine et des autres catécholamines

La DA synthétisée est ensuite stockée dans des vésicules synaptiques par les transporteurs vésiculaires des monoamines (vMAT2). Elle est libérée par les terminaisons nerveuses ou les dendrites lors de la dépolarisation neuronale (*figure 10*). Sa libération extracellulaire est suivie par sa recapture par le transporteur de la dopamine : le DAT (ou slc6a3), situé dans la membrane plasmique des terminaisons nerveuses, afin de mettre fin à la neurotransmission. La DA est ensuite dégradée à l'intérieur des cellules par les MAO et des catéchol-O-méthyl transférases (COMT).



**Figure 10 : Libération de la DA dans la fente synaptique [(adapté de (Youdim et al., 2006) et (Yamamoto and Vernier, 2011)]**

La plupart des composants moléculaires du système dopaminergique, tels que les enzymes de biosynthèse, les transporteurs et les récepteurs, sont partagés avec ceux des autres systèmes monoaminergiques, suggérant l'origine commune de ces systèmes. Le transporteur DAT a par exemple, la capacité de transporter la DA et la noradrénaline, avec une affinité plus faible pour cette dernière. Mais le DAT n'est pas une exception, un grand nombre des composants moléculaires utilisés dans la neurotransmission de la dopamine sont partagés avec les autres neurones monoaminergiques. C'est le cas de l'AADC, VMAT2, et de la MAO, par exemple.

Les neurones dopaminergiques du système nerveux central sont donc définis comme des cellules utilisant la DA comme neurotransmetteur. Selon cette définition, l'expression conjointe de la TH, de la AADC, de VMAT2 et de DAT, ou au moins certains d'entre eux dans un même groupe de neurones, est considérée comme essentielle pour qu'une cellule DA soit fonctionnelle.

### 4.2.2 *Distribution et développement des neurones dopaminergiques*

#### 4.2.2.1 *Distribution des neurones dopaminergiques dans le cerveau*

Les systèmes dopaminergiques ont été initialement étudiés chez des organismes modèles mammifères, à cause de leur implication dans des maladies humaines telle que la maladie de Parkinson (Hornykiewicz, 1962). Aujourd'hui, la dopamine est connue pour être impliquée dans de nombreuses fonctions cérébrales, telles que la perception visuelle et olfactive (Hsia et al., 1999), la programmation sensori-motrice (Zigmond and Stricker, 1989), la motivation (Schultz, 2002) l'apprentissage et la mémoire (Goldman-Rakic, 1998), les processus affectifs et émotionnels (Cox et al., 1978; Cantello et al., 1989; Diehl and Gershon, 1992; Fochtmann and Fink, 1992), le contrôle de la température corporelle (Cox et al., 1978), ainsi que de la prise alimentaire (Heffner et al., 1977), pour ne citer que les principales. La DA agit aussi comme une neurohormone en contrôlant la sécrétion des hormones anté-hypophysaires (Tuomisto and Mannisto, 1985), La très large distribution des cellules DAergiques et leurs projections dans le système nerveux central illustre son implication dans ces fonctions centrales très variées. Certaines de ces fonctions sont conservées parmi les différents groupes de vertébrés. Chez les téléostéens par exemple, quelques études ont rapporté que la DA est aussi impliquée dans le contrôle de fonctions telles que la locomotion (Mok and Munro, 1998), les comportements agressif et dominant (pour revue, (Winberg et al., 1993), la reproduction (pour revues, (Dufour et al., 2005; Dufour et al., 2010). Cependant, d'autres ne le sont pas et cela se reflète dans les aspects anatomiques des systèmes dopaminergiques.

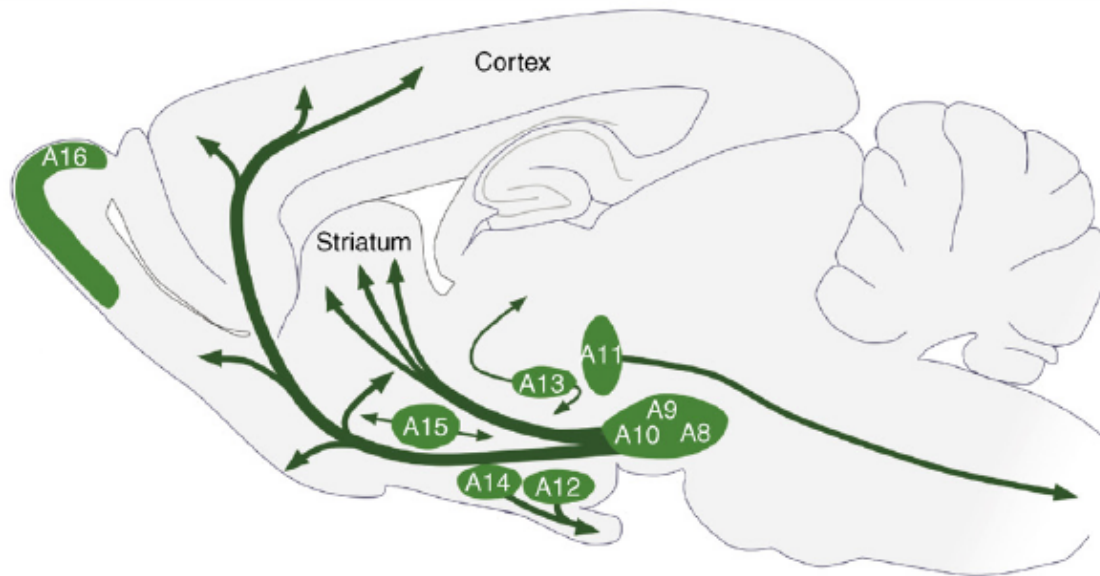
La localisation chez les vertébrés, des neurotransmetteurs monoaminergiques tel que la DA a d'abord été mise en évidence par détection histochimique de l'enzyme responsable de la dégradation des catécholamines : la MAO (Koelle and Valk Ade T, 1954) Il fut ensuite découvert une nouvelle méthode induisant la fluorescence grâce au formaldéhyde (formaldehyde-induced fluorescence:FIF (Eranko, 1955; Falck et al., 1982)). Cette méthode a révélé la présence de différentes populations catécholaminergiques et indolaminergiques dans le cerveau. Douze groupes de cellules catécholaminergiques ont ainsi pu être décrits chez le rat (Dahlstrom and Fuxe, 1964), et ont été nommés A1-A12, avec A1 le groupe localisé dans la région la plus caudale du cerveau.

La distinction entre les différents types de neurones catécholaminergique a ensuite été faite par la présence ou non, des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse. Les

cellules exprimant uniquement la tyrosine hydroxylase (TH) et non la décarboxylase d'acides aminés aromatiques (AADC) sont considérées comme dopaminergiques (Smeets and Reiner, 1994); les neurones coexprimant la TH, AADC et la dopamine beta-hydroxylase (DBH) sont par définition noradrénergiques, alors que les neurones adrénérgiques coexpriment la TH, AADC, la DBH et la phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT).

Depuis, les cellules dopaminergiques localisées dans le cerveau antérieur et moyen sont par convention identifiées par la présence de la TH, puisqu'il n'y a pas d'expression de la DBH ou de la PMNT dans le cerveau antérieur (jusqu'à la frontière cerveau moyen / cerveau postérieur). L'immunohistochimie de la TH a révélé de nouvelles populations de cellules catécholaminergiques (présumées dopaminergiques) qui n'avaient pas été observées avec la méthode FIF. Ces nouvelles populations ont été nommées A13-A17. Aujourd'hui, les populations catécholaminergiques du cerveau sont toujours désignées chez les mammifères par A1-A17 et C1-C3 (Smeets and Gonzalez, 2000; Bjorklund and Dunnett, 2007).

Alors que C1-C3 sont des noyaux adrénérgiques et A1-A7 des noyaux noradrénergiques, les noyaux A8-A17 sont dopaminergiques (*figure 11*). A8-A10 représentent en grande partie les populations mésencéphaliques (partiellement diencéphaliques) de cellules dopaminergiques projetant en avant dans le télencéphale. Un certain nombre de pathologies tels que la maladie de Parkinson, l'addiction aux drogues, ou des troubles psychiatriques sont associés au dysfonctionnement de ces populations. La voie diencéphalospinale A11 est cruciale pour l'intégration sensori-motrice et le contrôle de la douleur au niveau de la moelle épinière. Les noyaux A12, A14, et au moins une partie des cellules du noyau A15 sont impliqués dans la régulation des fonctions antéhypophysaires.



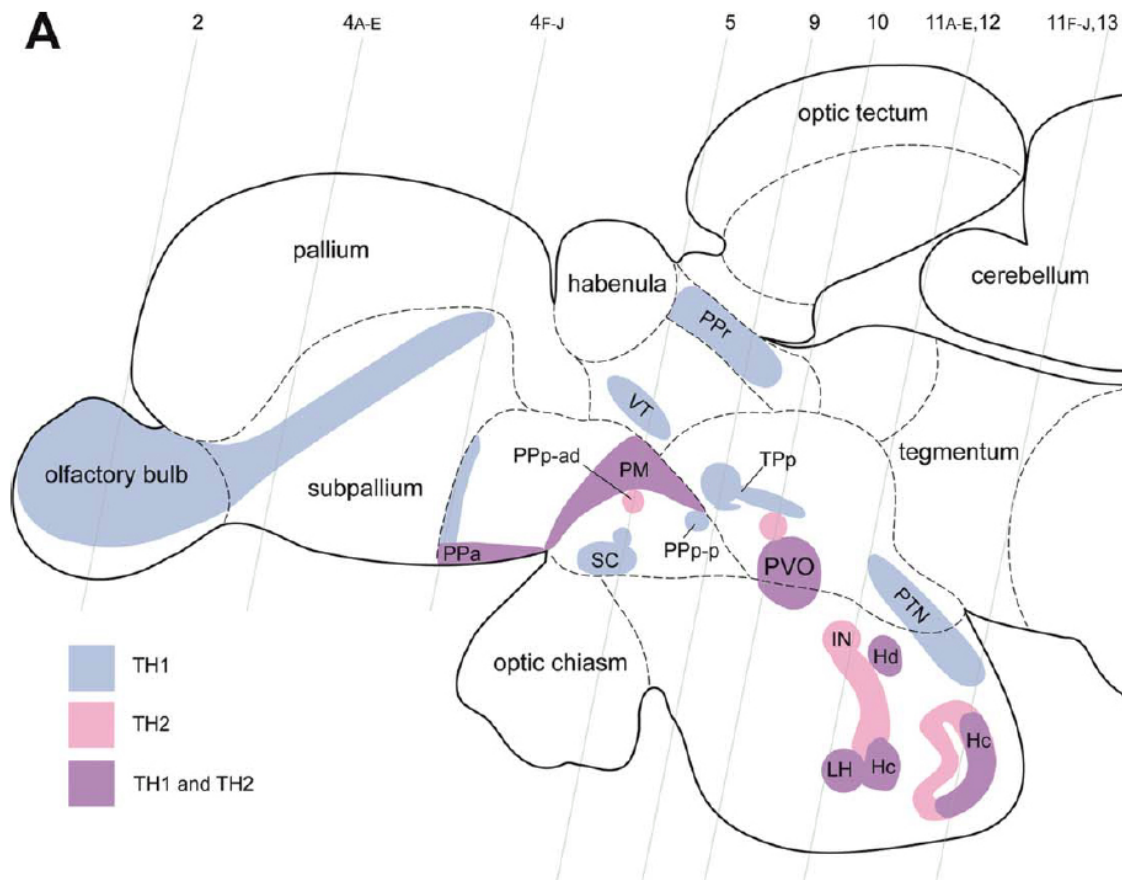
**Figure 11 : Distribution des neurones DA dans le cerveau de rat (Bjorklund and Dunnett, 2007)**

L'analyse détaillée des neurones dopaminergiques et de leurs projections, chez l'adulte et au cours de l'ontogenèse, a donc été réalisée chez différentes espèces issues des grands groupes de vertébrés (Smeets and Reiner, 1994; Smeets and Gonzalez, 2000; Yamamoto and Vernier, 2011). Chez les téléostéens, l'organisation et les projections des neurones dopaminergiques ont été analysées en détail, grâce aux techniques d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence (Nagatsu et al., 1964), dans le cerveau du poisson-zèbre adulte notamment (Ma, 1994b, a, 1997; Kaslin and Panula, 2001; Rink and Wullimann, 2001; Ma, 2003) et chez sa larve (Schweitzer et al., 2012). Cependant certaines différences peuvent être observées. Les cellules dopaminergiques mésencéphaliques qui sont par exemple abondantes chez les amniotes sont absentes chez les téléostéens (Hornby et al., 1987; Meek et al., 1989; Rink and Wullimann, 2001; Vernier and Wullimann, 2008).

Par ailleurs, chez ces animaux, il a été découvert un second gène codant la TH (th2) (Candy and Collet, 2005). L'étude de l'expression, chez le poisson-zèbre, de th1 et th2 a été réalisée à différents stades (Chen et al., 2009; Filippi et al., 2010; Yamamoto et al., 2010) (**figure 12**). L'hybridation *in situ*, a montré que la th1 était prédominante dans le cerveau durant l'embryogenèse et les premiers stades larvaires (Chen et al., 2009; Filippi et al., 2010). Il est à noter qu'une analyse par Western blot et la comparaison de l'expression de la th2 avec la distribution de la protéine TH, a révélé que les anticorps disponibles dans le



commerce reconnaissant la TH des mammifères, ne reconnaissent pas efficacement la protéine TH2 (Filippi et al., 2010; Yamamoto et al., 2010).



**Figure 12 : Résumé des phénotypes cellulaires des noyaux cérébraux TH positifs, sur une vue sagittale du cerveau adulte de poisson zèbre. Répartition des populations TH1 (ou TH; bleu), TH2 (rose) et co-localisation de TH1/TH2 (pourpre). Adapté de (Yamamoto et al., 2011).**

Comme le montre la *figure 12*, les cellules DAergiques chez le poisson zèbre sont largement distribuées dans le cerveau antérieur. En plus d'être retrouvées dans les bulbes olfactifs, de nombreuses cellules DA se trouvent dans le télencéphale (sous-pallium) (Kaslin and Panula, 2001; Rink and Wullimann, 2001). Dans l'aire préoptique, les cellules DA se trouvent dans la partie antérieure (PPa) et postérieure (PPp) du noyau préoptique parvocellulaire, dans le noyau préoptique magnocellulaire (PM) et dans le noyau suprachiasmatique (SC). Les populations de cellules DAergiques diencephaliques sont situées dans le noyau thalamique ventral, le prétegmentum périventriculaire, et dans le tubercule postérieur. Dans la région de l'hypothalamus, y compris l'organe



paraventriculaire (PVO), les cellules TH2 sont plus abondantes que les cellules TH1 (Kaslin and Panula, 2001; Rink and Wullimann, 2001; Ma, 2003).

### 4.2.2.2 Développement des neurones dopaminergiques dans le cerveau

Actuellement, nos connaissances sur les mécanismes de différenciation des neurones dopaminergiques proviennent principalement d'études portant sur les neurones dopaminergiques mesencéphalo–diencéphaliques (mdDA) du fait de leur importance dans la maladie de Parkinson, chez les mammifères. Certains travaux ont aussi été menés chez le poulet (revue dans (Ang, 2006; Prakash and Wurst, 2006; Smidt and Burbach, 2007; Schweitzer et al., 2012)). Beaucoup de molécules de signalisation (ex : Shh, Wnt1 et Fgf8) et de facteurs de transcription clés (eg. *FoxA2*, *Lmx1*, *Msx1*, *Ngn2*, *NR4A2/Nurr1*, *Mash1* et *Pitx3*) ont depuis été identifiés pour affecter le développement des neurones mdDA (Zetterstrom et al., 1997; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Smits et al., 2003; Andersson et al., 2006; Burbach and Smidt, 2006; Kele et al., 2006; Prakash et al., 2006; Smidt and Burbach, 2007).

Alors que des études menées chez *C. elegans* tendaient à montrer que les gènes qui codaient les marqueurs dopaminergiques (TH, AADC, VMAT2 et DAT) étaient transcrits sous l'action d'un facteur commun de transcription, supportant ainsi l'idée d'un programme génétique commun en matière de différenciation des cellules DA (Flames and Hobert, 2009), des études réalisées chez la souris ont démontré que ce n'était pas le cas (Cave et al., 2010). Des études détaillées de la distribution relative des marqueurs dopaminergiques dans le cerveau de plusieurs espèces de vertébrés ont notamment montré qu'ils ne sont pas toujours colocalisés dans les mêmes cellules et que leur abondance varie sensiblement d'un noyau à l'autre (Lorang et al., 1994; Mel'nikova et al., 2005; Weihe et al., 2006; Bjorklund and Dunnett, 2007; Yamamoto et al., 2011).

De plus, les mécanismes moléculaires et les réseaux de gènes régissant la différenciation des systèmes DAergiques sont également différents. Il est par exemple apparu que les neurones dopaminergiques de la substance noire dépendent de réseaux génétiques différents de ceux qui opèrent dans l'hypothalamus ou le diencéphale dorsal (Vernier et al., 2004; Ohyama et al., 2005; Jeong et al., 2006; McNay et al., 2006).

Ces mécanismes de différenciation varient en fonction de l'emplacement des progéniteurs DA dans le tube neural, ainsi que de la période du développement

embryonnaire dans laquelle ils se différencient (Mathis and Nicolas, 2002; Osorio et al., 2010). L'expression des gènes est ainsi contrôlée dans l'espace et dans le temps, et la combinaison de gènes exprimés dans chacune des sous-unités développementales influence sur le sort et la différenciation des progéniteurs neuronaux et des neurones nouveau-nés.

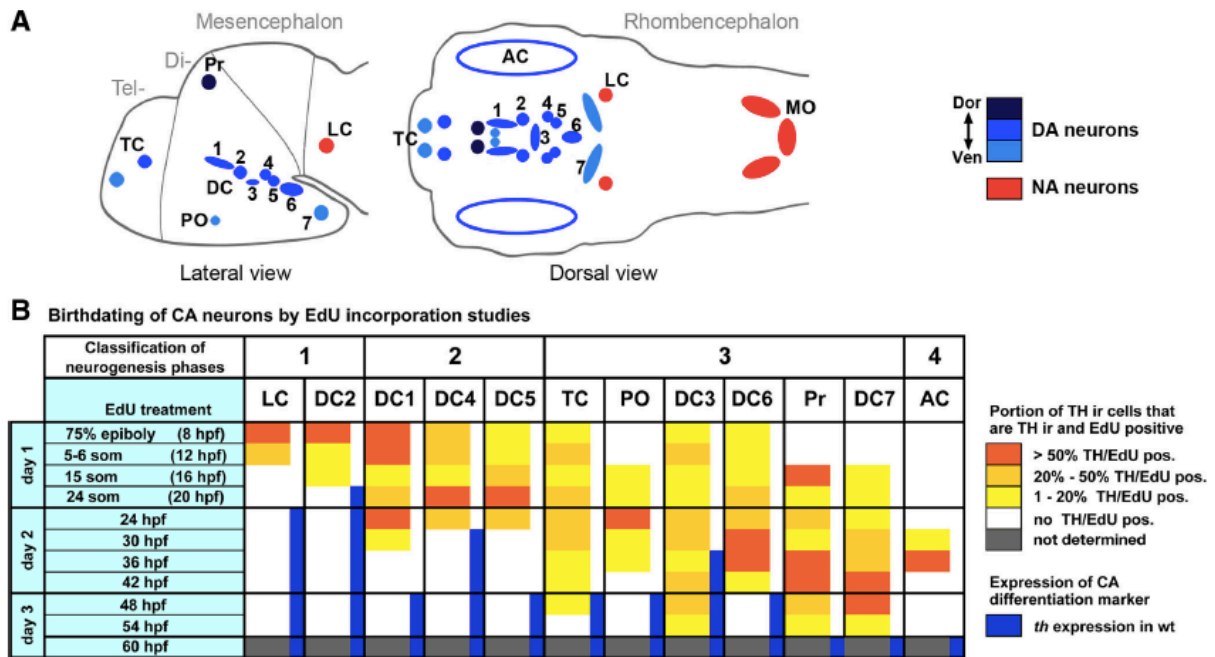
Chez les téléostéens, l'analyse des nombreux mutants de poissons-zèbre disponibles, chez lesquels des composants de voies de signalisation impliquées dans le développement du cerveau et la différenciation cellulaire sont altérés, a permis d'initier l'étude des mécanismes de signalisation et de spécification nécessaires pour la mise en place et la différenciation des neurones dopaminergiques (Schweitzer et al., 2012). Alors que chez les embryons de mammifères, de nombreuses mutations qui affectent les voies principales de signalisation sont léthales avant le développement du système DA, la plupart des embryons de poisson zèbre mutants survivent pendant au moins deux jours. En effet, dans cette espèce, un système cardio-vasculaire fonctionnel n'est pas nécessaire pour le développement des jeunes, les réserves protéiques d'origine maternelle permettent aux cellules de survivre quelques jours, et la duplication du génome propre aux téléostéens permet souvent le sauvetage du phénotype.

En raison des commodités qu'offre la transparence des embryons, (ainsi que l'efficacité des morpholinos), de nombreuses études ont été effectuées chez le poisson zèbre jusqu'à 3-4 jours post fécondation (jpf) (pour revue (Schweitzer et al., 2012)). Des facteurs de transcription déterminants pour la formation de certains groupes de neurones à DA ont été révélés. Il a ainsi été démontré que *lmx1b*, (Filippi et al., 2007), ainsi que *nr4a2/nurr1* (Filippi et al., 2007; Blin et al., 2008; Luo et al., 2008) *sim1a*, *arnt2* (Lohr et al., 2009), et *otpa/b* (Del Giacco et al., 2006; Blechman et al., 2007; Ryu et al., 2007) sont importants pour la différenciation du phénotype dopaminergique de certains groupes de neurones.

Chez l'embryon, la distinction des groupes n'est pas toujours évidente. Alors que certains groupes dopaminergiques ont été nommés en fonction de leur localisation anatomique (AC : cellules amacrines, OB : bulbes olfactifs, TC : groupe télencéphalique, Pr : groupe prétectal, et PO : groupe préoptique), les neurones dopaminergiques se développant dans le diencéphale ventral (DC ; groupe diencéphalique), incluant l'hypothalamus, se sont vu attribuer des numéros (de DC1 à DC7) sur la base de leur morphologie et leur position le long de l'axe rostro-caudal (Rink and Wullimann, 2002b).

A trois jours (3 dpf) déjà, la plupart des groupes de neurones DA décrits dans le cerveau adulte peuvent être détectés chez la larve (Rink and Wullimann, 2002a). Des

expériences de « birthdating » utilisant l'incorporation de BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) ou d'EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine) suivie d'une immunochimie contre la TH ont permis de déterminer le moment de la sortie du cycle cellulaire des cellules dopaminergiques dans le cerveau du poisson-zèbre (Russek-Blum et al., 2008; Mahler et al., 2010).



**Figure 13 : Corrélations temporelles entre la sortie du cycle cellulaire, la neurogenèse, et la différenciation des groupes dopaminergiques et noradrénergiques (Mahler et al., 2010).** A, Schéma représentant la distribution des neurones à DA (bleu) et à NA (rouge) dans le cerveau de larves de poisson-zèbre. Les groupes diencéphaliques ventraux sont numérotés de 1 à 7, selon (Rink and Wullmann, 2002a). Abréviations: AC, cellules amacrines; DC1-7, les groupes DA diencéphaliques 1-7; MO, *Médulla Oblongata*; PO, groupe préoptique; Pr, le groupe prétectal; TC, les groupes télencéphaliques. B, Résumé des résultats des études de birth-dating. Le pourcentage de cellules doublement marquées par THir et par l'incorporation d'EdU à un instant donné a été calculé pour chaque groupe de neurones CA. Le pourcentage de cellules THir et marquées par l'EdU dans chaque groupe est représenté par un code couleur. Sur la base du modèle d'incorporation de l'EdU, les groupes de neurones CA peuvent être classés en quatre types différents de neurogenèse, selon que les précurseurs DA proviennent (1) principalement de la neurogenèse de la plaque neurale, (2) à la fois de la neurogenèse de plaque neurale, et d'un pool de précurseurs prolifératifs, (3) de la libération continue de neurones dopaminergiques à partir de populations de précurseurs, (4) d'une vague de neurogenèse limitée à une fenêtre de temps distincte. Ces classes sont indiquées en haut du tableau.

Les premiers précurseurs catécholaminergiques qui deviennent post-mitotiques, déjà avant 16 hpf, sont les groupes de neurones DAergiques DC2. Le dernier groupe à apparaître est celui des neurones de la rétine dont les précurseurs deviennent post-mitotiques en un laps de temps bien délimité entre 36 et 42 hpf (Mahler et al., 2010). En revanche d'autres groupes tels que les précurseurs des neurones DC3/7, Pr, et PO affichent quant à eux une neurogenèse plus continue, sur un temps de développement plus long.

Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, la neurogenèse chez les téléostéens s'étend à de nombreuses zones du cerveau pendant le développement et même chez l'adulte (Adolf et al., 2006; Chapouton et al., 2006; Grandel et al., 2006). La réalisation d'expériences de marquage utilisant le BrdU chez le poisson zèbre adulte, a démontré que de nouveaux neurones exprimant la TH apparaissaient même chez l'adulte, et cela dans toutes les principales régions dopaminergiques du cerveau: bulbe olfactif, région préoptique, prétectum, tubercule postérieur et l'hypothalamus. Les systèmes DAergiques des poissons ont ainsi une capacité importante pour la croissance et la régénération (Diotel et al., 2013).

### 4.2.3 Rôle de la dopamine dans le contrôle de la reproduction chez les téléostéens

#### 4.2.3.1 Contrôle dopaminergique et gamétogenèse adultes

Après sa mise en évidence chez le poisson-rouge, le contrôle dopaminergique inhibiteur de la reproduction a été retrouvé chez un certain nombre de téléostéens adultes, incluant des cypriniformes (carpe, *Misgurnus anguillicaudatus* (Lin et al., 1988)), des siluriformes (poisson chat, *Clarias gariepinus* (de Leeuw et al., 1986)), des salmonidés (truite, *Oncorhynchus mykiss* (Saligaut et al., 1999) et saumon, *coho salmon* (Van Der Kraak et al., 1986)), des perciformes (tilapia, *Oreochromis niloticus* (Yaron et al., 2003) et mulot, *Mugil cephalus* (Aizen et al., 2005)) et chez un pleuronectiforme (la sole, *Solea senegalensis* (Guzman et al., 2011)).

Chez l'adulte, la DA est connue pour intervenir dans la régulation des dernières étapes de la gamétogénèse, où une forte diminution de l'activité de la DA induit la maturation ovocytaire et l'ovulation chez la femelle ou la spermiation chez le mâle. La mise en évidence de ce double contrôle a eu des applications majeures en aquaculture: la méthode de « LinPe » (contraction des noms H. R. Lin et R. E. Peter) qui consiste à déclencher l'ovulation ou la spermiation chez les poissons d'élevage par l'administration

combinée d'un agoniste du GnRH et d'un antagoniste des récepteurs dopaminergiques de type D2 (Peter et al., 1988).

Chez d'autres espèces de téléostéens ce contrôle des gonadotropines par la DA n'a pas été retrouvé (*Micropogonias undulatus* (Copeland and Thomas, 1989) ; daurade royale, *Sparus aurata* (Zohar et al., 1995)). L'observation ou non d'un tel contrôle ne semble pas dépendre de la position phylogénétique des espèces. De plus, lorsqu'il s'exerce, l'intensité même de ce contrôle varie en fonction des espèces (pour revue (Dufour et al., 2005)).

La DA inhibe la sécrétion des gonadotropines basale ou induite par la GnRH, en bloquant, chez le poisson rouge, la synthèse et la libération de GnRH (Chang et al., 1990). La dopamine module également la sensibilité hypophysaire à la GnRH en régulant négativement la synthèse des récepteurs à la GnRH (Levavi-Sivan et al., 2004) et la capacité de liaison de la GnRH à ses récepteurs (De Leeuw et al., 1989).

### 4.2.3.2 Contrôle dopaminergique et puberté chez les juvéniles

Le rôle inhibiteur de la DA dans les stades les plus précoces de la gamétogénèse, donc dans le contrôle de la puberté, est moins bien connu. Les travaux menés par S. Dufour et ses collègues sur le modèle de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), ont montré pour la première fois que ce contrôle inhibiteur de la fonction gonadotrope pouvait s'exercer chez les juvéniles de certaines espèces et participer aussi au contrôle de la puberté (Dufour et al., 1988; Vidal et al., 2004). Chez l'anguille, au stade argenté, la DA inhibe fortement la sécrétion des GtHs. Cette inhibition s'exerce, à la fois, directement sur les cellules gonadotropes et indirectement, en diminuant la sécrétion de GnRH.

Depuis, ce contrôle dopaminergique de la puberté n'a été mis en évidence que chez quelques autres espèces (pour revue : (Dufour et al., 2005)). Chez le Platex atlantique, *Chaetodipterus faber*, une diminution de l'activité dopaminergique en début de puberté suggère que la DA jouerait un rôle négatif dans le contrôle de cet évènement (Marcano et al., 1995). La DA aurait également un effet négatif dans le contrôle de la puberté chez *Mugil cephalus*, chez qui l'expression des récepteurs dopaminergiques dans le cerveau, l'hypophyse et les gonades diminue au fur et à mesure que progresse la puberté (Nocillado et al., 2007). Et alors que ce contrôle n'est pas retrouvé chez le bar rayé femelle, *Morone saxatilis* (Holland et al., 1998), chez les mâles immatures, un effet de la DA sur la synthèse

des gonadotropines a pu être observé (Hassin et al., 2000). En revanche, ce contrôle n'est pas présent chez la daurade rose (*Pagellus centrodontus* (Kumakura et al., 2003)).

### 4.2.4 Le support anatomique du contrôle dopaminergique inhibiteur de la reproduction

#### 4.2.4.1 Les neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires

Par des expériences de lésions cérébrales induisant une décharge ovulatoire de LH, alors même que la source de GnRH était détruite, R. Peter et ses collègues ont mis en évidence l'existence d'un facteur inhibiteur de la libération des gonadotropines d'abord nommé le GRIF (Gonadotropin Release-Inhibiting Factor), dans un territoire voisin des neurones à GnRH dans l'aire préoptique antéro-ventrale (Peter et al., 1978; Peter and Paulencu, 1980). Ce sont finalement des études pharmacologiques *in vivo* et *in vitro* sur des cellules hypophysaires de poisson rouge qui ont révélé que le GRIF n'était autre que la dopamine (Chang and Peter, 1983). Depuis, les téléostéens sont restés des organismes privilégiés pour l'étude de ce système.

Diverses études neuroanatomiques menées chez le poisson rouge par R. Peter, O. Kah et leurs collègues (Kah et al., 1987a; Anglade et al., 1993) ont montré que les corps cellulaires des neurones dopaminergiques responsables du contrôle inhibiteur de la reproduction se trouvaient précisément dans le noyau préoptique antéro-ventral (NPOav), qui appartient à la grande région du noyau préoptique (NPO) aussi appelé noyau préoptique parvocellulaire antérieur (PPa), qui lui même appartient à l'aire préoptique (PO). Ces neurones projettent sur la région centrale de l'hypophyse antérieure nommée *Proximal Pars Distalis* (PPD), laquelle contient les cellules gonadotropes (Kah et al., 1984b; Kah et al., 1987a). Les mêmes observations ont depuis été faites chez la truite par O. Kah et ses collègues (Linard et al., 1996) puis chez l'anguille européenne (*figure 14*) par S. Dufour et ses collègues (Vidal et al., 2004).

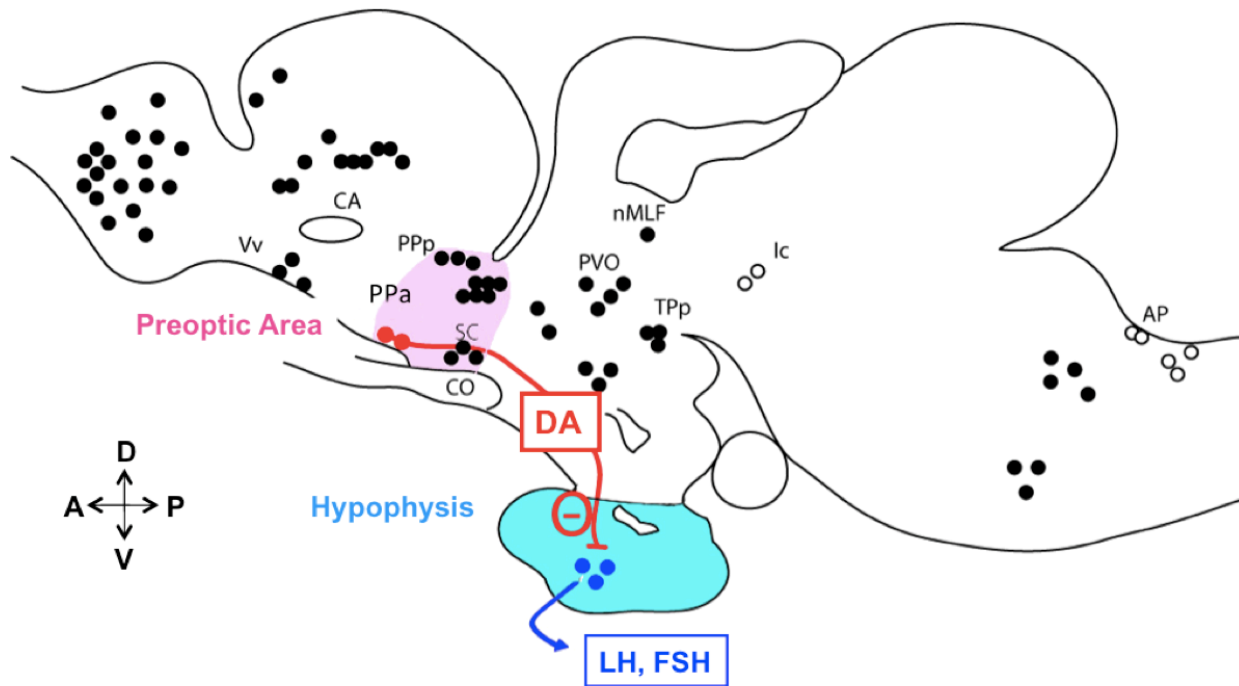


Figure 14 : Schéma de la distribution des neurones catécholaminergiques chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et représentation (en rouge) des neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires (d'après (Sébert et al., 2008)).

Chez les mammifères à reproduction saisonnière tels que la brebis, des études montrent que la DA affecte la sécrétion des gonadotropines et la reproduction en modulant l'activité des neurones à GnRH dont les axones reçoivent, au niveau de l'éminence médiane, des afférences dopaminergiques provenant du noyau A15 (Thiery et al., 1995).

#### 4.2.4.2 Les récepteurs dopaminergiques impliqués dans le contrôle de la fonction gonadotrope

Il existe deux classes de récepteurs pour la dopamine : les récepteurs de classe D1 et ceux de la classe D2 (pour revue : (Missale et al., 1998; Callier et al., 2003)). Ces récepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (Récepteurs couplés aux protéines G ou RCPG). Les RCPGs agissent comme des facteurs d'échanges pour les protéines G qui régulent de nombreux processus cellulaires et voies de signalisations (Neves et al., 2002).

Les membres de la classe D1 sont caractérisés structurellement par leur troisième boucle cytoplasmique qui est courte et une très longue terminaison C-terminale, ainsi que

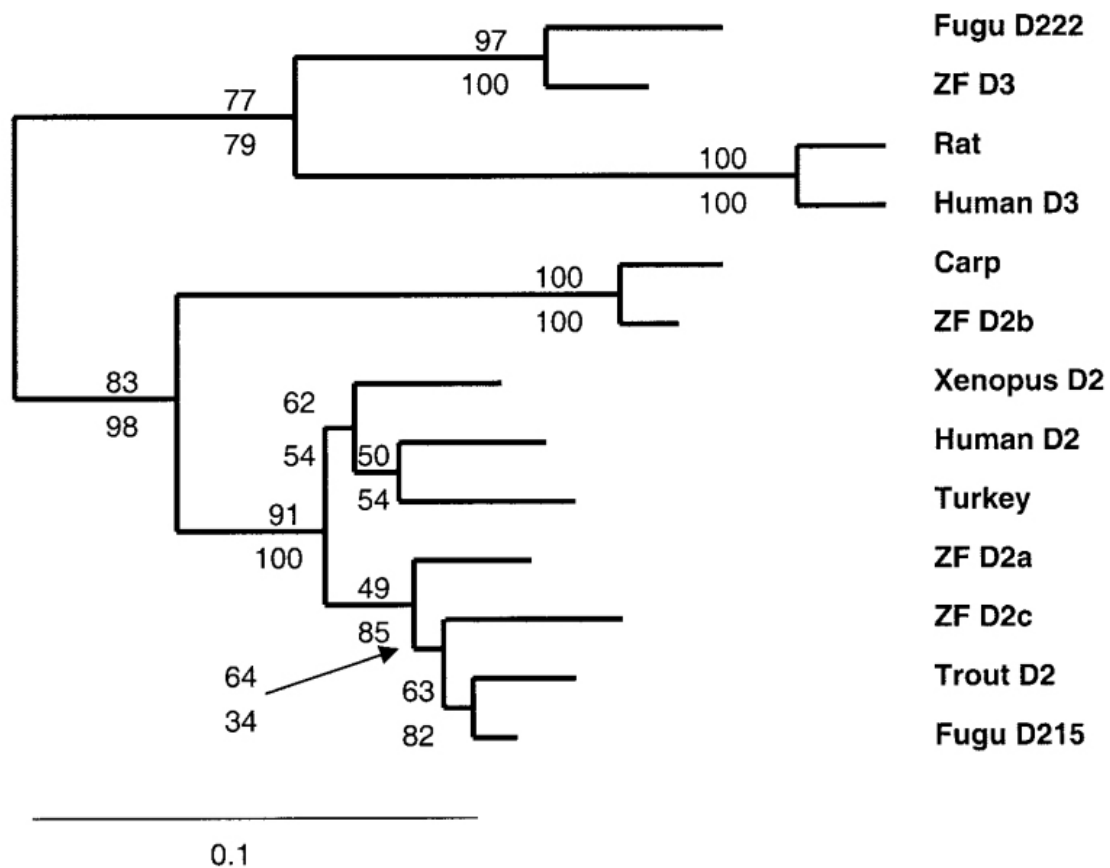


l'absence d'intron dans leur séquence ARN. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G de la classe Gs/Golf qui sont des activateurs des adénylates cyclases. Au contraire, les récepteurs de la classe D2 sont couplés aux protéines Gi/Go et ils possèdent une troisième boucle cytoplasmique longue, ainsi qu'une courte terminaison cytoplasmique C-terminal.

A l'origine un récepteur dopaminergique excitateur et un autre inhibiteur avaient été trouvés et ont été nommés respectivement D1 et D2. Des techniques de clonages moléculaires ont permis la découverte d'autres sous-types de récepteurs dopaminergiques qui ont été appelés D3, D4 et D5. Cependant, leur caractérisation a ensuite montré que le sous-type D5 était proche de D1 et ils ont été regroupés dans la classe D1. Les sous-types D3 et D4 étaient quant à eux proches de D2 et font partie de la classe D2.

C'est par l'intermédiaire de récepteurs de la classe D2 que la DA exerce ses effets inhibiteurs sur les cellules gonadotropes. C'est le cas chez tous les téléostéens étudiés : le poisson-rouge (Chang et al., 1990), la carpe (Lin et al., 1988), le poisson-chat (de Leeuw et al., 1986; De Leeuw et al., 1988), la truite (Saligaut et al., 1999), le tilapia (Levavi-Sivan et al., 2005), l'anguille (Dufour et al., 1988; Vidal et al., 2004) et le mulot (Aizen et al., 2005). Chez les mammifères étudiés, l'action inhibitrice de la DA sur la fonction gonadotrope est indirecte, puisqu'elle s'exerce principalement sur les neurones à GnRH, cependant elle met également en jeu des récepteurs hypophysaires de la classe D2 (Kuljis and Advis, 1989; Thiery et al., 1989; Chomicka, 1992; Viguie et al., 1996).





**Figure 15 : Analyse phylogénétique des récepteurs D2 et D3 chez les vertébrés (Boehmler et al., 2004).**

Les récepteurs de type D2, chez les mammifères et les oiseaux, sont codés par un seul gène qui peut subir un épissage alternatif et produire deux isoformes protéiques [D2l (long) et D2s (short)] (Giros et al., 1989). Chez certains téléostéens en revanche, il existe plusieurs gènes codant des sous-types de récepteurs D2 (*figure 15*) : deux chez l’anguille européenne (Pasqualini et al., 2009), trois chez le poisson-zèbre (Boehmler et al., 2004), et trois chez le poisson-rouge (Popesku et al., 2011). Le séquençage complet d’un certain nombre de génomes de téléostéens a fait augmenter progressivement la liste des espèces possédant plusieurs sous-types de récepteurs D2 (épinouche, médaka, tetraodon...), laissant supposer qu’une duplication des gènes D2 aurait eu lieu spécifiquement au sein de la lignée des téléostéens (Boehmler et al., 2004).

Chez le poisson rouge, la DA semble aussi inhiber la libération de la GnRH au niveau de l’hypothalamus en agissant sur les corps cellulaires des neurones à GnRH via les récepteurs D1 (Chang et al., 1990; Yu and Peter, 1992).

#### 4.2.5 Régulation de l'inhibition dopaminergique préoptico-hypophysaire

L'activité dopaminergique peut être régulée à différents niveaux (central ou hypophysaire) et à différentes étapes de la neurotransmission. Les facteurs de régulation peuvent agir au niveau des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de DA, de la libération de la DA ou de son transport (TH, DAT et VMAT2) ou encore au niveau des récepteurs de la DA en intervenant dans leur synthèse ou dans le couplage avec leurs seconds messagers (pour revue (Sanchez et al., 2010)).

Cette activité peut varier selon le stade de développement (Backman et al., 2006) et la saison (Senthilkumaran and Joy, 1995), ainsi qu'avec le sexe (Chaube and Joy, 2003). Chez certaines espèces de téléostéens, le pouvoir inhibiteur de la DA doit par exemple être maximal à la fin de la gamétogenèse, avant d'être levé, sous le contrôle de signaux endogènes (par exemple, une diminution des niveaux E2) et environnementaux (facteurs qui peuvent varier largement selon les espèces, le climat par exemple, le comportement ou les phéromones) pour permettre l'ovulation ou la spermiation.

##### 4.2.5.1 Rétrocontrôles par les stéroïdes sexuels

Les stéroïdes sexuels sont connus pour exercer des régulations positives et négatives sur l'axe cerveau-hypophyse-gonades. Alors qu'ils régulent de façon indirecte la sécrétion de la GnRH ou plus directement les récepteurs hypophysaires de la GnRH (Montero et al., 1995; Montero et al., 1996; Schmitz et al., 2005), ils régulent aussi les systèmes DAergiques de l'hypothalamus ainsi que d'autres régions du cerveau (Pasqualini et al., 1991; Pasqualini et al., 1993; Di Paolo, 1994; Pasqualini et al., 1996). Il par exemple été montré que les hormones stéroïdes régulent positivement l'activité dopaminergique, faisant de la DA un médiateur clé du rétrocontrôle négatif des hormones stéroïdes (Trudeau et al., 1993a).

Les œstrogènes modulent le système DA, produisant des effets pro- ou anti-dopaminergiques. Chez les espèces de téléostéens étudiées, l'oestradiol (E2) semble être le principal régulateur de l'activité DA, en stimulant l'effet inhibiteur des neurones dopaminergiques du NPOav, au moment de la maturation finale (femelle *O. mykiss* (Linard et al., 1995; Saligaut et al., 1999; Vacher et al., 2002); *C. auratus* (Dulka et al., 1992) ; *Heteropneustes silure fossilis* (Bloch) (Senthilkumaran and Joy, 1995)). Il a logiquement été retrouvé que, chez la truite *O. mykiss*, 60 à 70% de neurones TH-positifs situés dans le

NPOav expriment les récepteurs de l'E2 (Linard et al., 1996). Il a aussi été montré chez *H. fossilis* que l'E2 peut affecter la biosynthèse de la DA en régulant l'activité enzymatique de la TH, *in vivo* et *in vitro*, (Chaube and Joy, 2002a, 2005) et la dégradation de la DA en modulant l'activité de la monoamine oxydase (Senthilkumaran and Joy, 1995).

Lors d'essais chez certains téléostéens adultes, tel que le poisson rouge (Trudeau et al., 1993a), la testostérone (T) a produit les mêmes effets que l'E2 sur l'activité inhibitrice de la DA. Cependant, à ce jour, les effets particuliers des androgènes sur les systèmes à DA du cerveau n'ont reçu que peu d'attention, notamment parce que l'effet de la T sur le cerveau était censé n'être exercé qu'après aromatisation locale en E2 (Pellegrini et al., 2005). En revanche, de récentes études menées chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* ont montré que les androgènes sont impliqués dans la modulation de l'inhibition DA au cours du développement pubertaire de la femelle (Weltzien et al., 2006) en stimulant la transcription de la TH.

Les stéroïdes sexuels sont donc capables de moduler directement l'activité des systèmes dopaminergiques et participent ainsi à plusieurs événements physiologiques impliqués dans la reproduction.

#### 4.2.5.2 Contrôle par d'autres facteurs

Chez les vertébrés, la reproduction, souvent saisonnière, se produit durant une période où les facteurs du milieu sont les plus favorables à la survie des juvéniles et ainsi, participent au maintien de l'espèce. Le relais entre environnement et axe gonadotrope est donc primordial.

De nombreux facteurs environnementaux influencent la reproduction. Certains de ces signaux sont connus pour être intégrés par les neurones à GnRH. D'autres en revanche, comme la photopériode, sont médiés au moins en partie par la mélatonine, et semblent être intégrés par le système dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence que la mélatonine, une indoleamine, principalement produite par la glande pinéale, modifiait la libération des gonadotropines chez les téléostéens (tambour brésilien (Khan and Thomas, 1996) ; saumon du Danube (Amano et al., 2004) ; poisson-chat (Ghosh and Nath, 2005) pour revue (Falcon et al., 2007)), comme chez les mammifères (brebis (Bittman et al., 1985) ; hamster sibérien (Anand et al., 2002)). Comme c'est le cas chez certains mammifères (Viguie et al., 1995)

(Alexiuk et al., 1996), chez certains téléostéens, en plus d'agir sur les neurones à GnRH hypophysiotropes, la mélatonine agirait sur le système dopaminergique pour moduler la fonction gonadotrope. En effet, la mélatonine inhibe l'activité de la TH dans le télencéphale, le diencephale et la moelle épinière du poisson-chat (Chaube and Joy, 2002b) ; elle diminue le turn-over de la DA dans l'hypothalamus et l'hypophyse de la truite arc-en-ciel (Hernandez-Rauda and Aldegunde, 2002) et inhibe la libération de DA dans l'hypothalamus *in vivo* et *in vitro* chez la carpe (Popek et al., 2005; Popek et al., 2006). Chez l'anguille, en revanche, la mélatonine active le système dopaminergique préoptico-hypophysaire entraînant une inhibition de la fonction de reproduction (Sebert, 2007).

Parmi les autres facteurs impliqués dans la reproduction, la disponibilité alimentaire conditionne la stimulation de l'axe gonadotrope et la survie de la descendance. De plus chez les téléostéens, les femelles qui accumulent les réserves nécessaires au développement de l'embryon (vitellogenèse) ont d'importants besoins nutritionnels à la fois quantitatifs et qualitatifs (pour revue (Izquierdo et al., 2001)).

De nombreux autres paramètres du milieu semblent importants à prendre en compte comme la présence de phéromones dans l'eau qui seraient impliquées dans le comportement sexuel (pour revue (Sorensen and Stacey, 2004)), la lune et la pression hydrostatique qui informent les espèces intertidales sur les marées et le moment opportun pour pondre (pour revue (Taylor, 1984)) ou encore la pluie et les crues qui marquent le moment de la reproduction chez les espèces des régions tropicales et équatoriales (pour revue (Legendre and Jalabert, 1988)). Cependant le mode d'intégration de ces différents signaux n'est pas toujours bien connu.

## 5. LE POISSON-ZEBRE, UN ORGANISME MODELE

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un organisme téléostéen d'eau douce, communément utilisé pour l'étude du développement des vertébrés. Depuis son introduction en tant qu'organisme modèle il y a environ trente ans, la place attribuée à cet organisme dans la recherche n'a fait qu'augmenter. Les modèles animaux les plus utilisés pour les études biomédicales sont souvent des mammifères comme le rat et la souris, cependant, le poisson-zèbre (*Danio rerio*) peut offrir des outils puissants et des réponses complémentaires dans l'étude des maladies humaines (Lieschke and Currie, 2007; Lohr and Hammerschmidt, 2011). C'est pourquoi, il est aujourd'hui très étudié en laboratoire pour des recherches portant à la fois sur la physiologie (Jagadeeswaran, 2005), le cancer (Berghmans et al., 2005), la découverte de nouveaux médicaments (Rubinstein, 2003; Zon and Peterson, 2005), la toxicologie (Hill et al., 2005), l'écotoxicologie (Scholz et al., 2008), les perturbateurs endocriniens (Ankley and Johnson, 2004; Segner, 2009), l'endocrinologie (McGonnell and Fowkes, 2006), le comportement (Ninkovic and Bally-Cuif, 2006), le criblage de drogues (Rubinstein, 2006; Barros et al., 2008; Lessman, 2011), la reproduction (Menuet et al., 2002; Steven et al., 2003; Biran et al., 2008; Kah et al., 2009), l'évolution (Canestro et al., 2007), la génétique du développement (Grunwald and Eisen, 2002). On le retrouve aussi maintenant comme organisme modèle dans la recherche appliquée pour l'aquaculture (Ulloa et al., 2011; Lawrence et al., 2012).

### 5.1 Données de systématique du poisson-zèbre

Le poisson-zèbre, est aussi surnommé le poisson zébré, ou poisson pyjama. Le *Danio rerio* est un organisme vertébré appartenant au groupe des téléostéens, le groupe le plus diversifié en terme d'espèces avec près de vingt-cinq mille espèces vivantes, soit la moitié environ des vertébrés actuels (*Figure 16*).

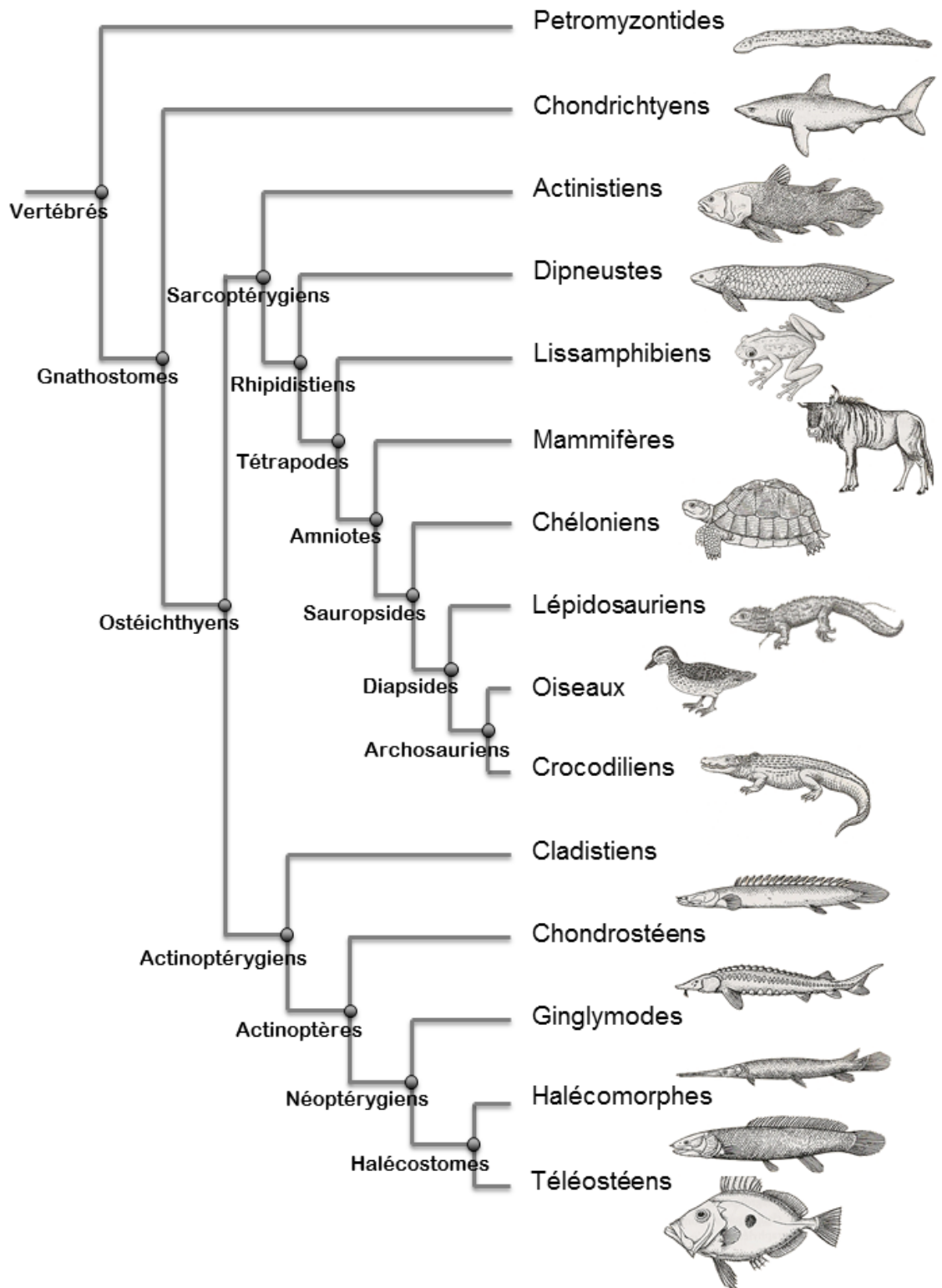


Figure 16 : Arbre phylogénétique des vertébrés (Lecointre and Le Guyader, 2001).

Il appartient à l'ordre des Cypriniformes (Sterba, 1962), groupe auquel appartient aussi le poisson-rouge. Sa place dans la classification phylogénétique animale est détaillée dans le tableau suivant (*tableau 1*) et la nomenclature originelle donnée à cette espèce, *Brachydanio rerio*, a été proposée par Buchanan-Hamilton en 1822.

**Tableau 1: Classification phylogénétique du *Danio rerio***

<b>Règne :</b>	Animal		
<b>Embranchement :</b>	Cordés	<b>Sous-embranchement :</b>	Vertébrés
<b>Superclasse :</b>	Ostéichtyens	<b>Classe :</b>	Actinoptérygiens
<b>Sous-classe :</b>	Néoptérygiens	<b>Infra-classe :</b>	Téléostéens
<b>Superordre :</b>	Ostariophysiens	<b>Ordre :</b>	Cypriniformes
<b>Superfamille :</b>	Cyprinoidés	<b>Famille :</b>	Cyprinidés
<b>Genre :</b>	<i>Danio</i>	<b>Espèce :</b>	<i>rerio</i>

Le genre *Danio* est originaire d'Inde, de Malaisie et de Sumatra (Barman, 1991). On trouve plus particulièrement l'espèce *Danio rerio* en Inde de l'Est (Sterba, 1962), où il peuple généralement les cours d'eau peu rapides et peu profonds. Son adaptation à différents milieux est grande puisqu'il est capable d'évoluer dans des eaux aux caractéristiques physico-chimiques très variées. En effet, on le rencontre dans des eaux dont la température varie de 10 à 40 °C, mais il est tolérant aussi quant à la qualité de l'eau ; il peut vivre dans de larges gammes de pH (6,5 à 8) et de dureté (12 à 21 °TH) ce qui rend sa maintenance et son élevage en laboratoire relativement aisés et peu onéreux.

Très apprécié par les aquariophiles pour son comportement sociable, le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un animal grégaire. Il vit donc de préférence en petit groupes d'au moins 8 à 10 individus, ce qui est aussi intéressant pour l'élevage en laboratoire, permettant ainsi la maintenance d'un grand nombre d'individus dans un espace relativement petit. De plus, il s'agit d'une espèce de petite taille, entre 3 et 5 cm au stade adulte, décrite comme étant omnivore et benthopélagique, c'est-à-dire qu'elle évolue préférentiellement dans la partie basse de la colonne d'eau même s'il n'est pas rare de le voir évoluer dans l'ensemble de la colonne d'eau et de venir chercher sa nourriture en surface (Abraham et al., 2009).

## 5.2 Cycle biologique du poisson-zèbre

Le poisson-zèbre se caractérise par un cycle de vie relativement court. La durée de vie moyenne des individus de cette espèce est de l'ordre de 3 ans et demi (Gerhard et al., 2002), lorsqu'il évolue dans son milieu naturel (où la température de l'eau est généralement comprise entre 18 et 24 °C).

Le poisson-zèbre est une espèce gonochorique et ovipare, impliquant donc deux catégories d'individus : les mâles et les femelles. Il existe un léger dimorphisme sexuel qui est accentué en période de reproduction, les mâles étant colorés en jaune au niveau du ventre et des nageoires et légèrement plus petits et plus élancés que les femelles. Les femelles, plus grises, présentent en effet un abdomen plus bombé qui semble blanc et nacré, très visible avant la ponte (dû au nombre important d'œufs) et sont dotées d'une papille urogénitale présente à l'arrière des nageoires pelviennes.

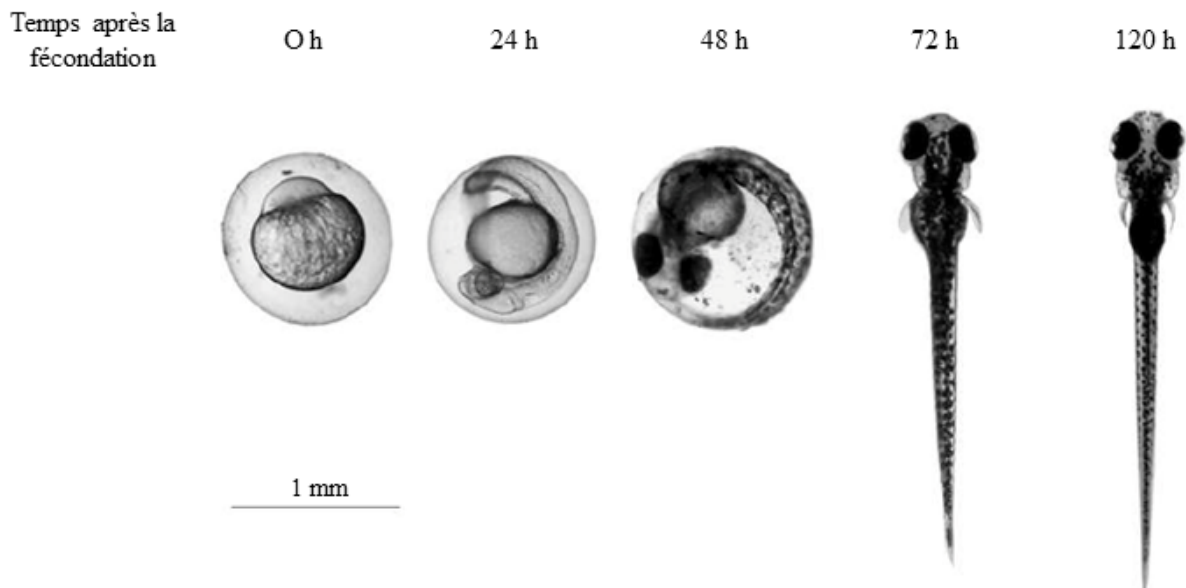
Dans la nature le poisson-zèbre semble être principalement une espèce annuelle. La saison de ponte, commence juste avant le début de la mousson (Spence et al., 2007), et des observations de terrain ont montré que la ponte est limitée à une courte période de l'aube (Spence et al., 2007). Ainsi, la longueur prolongée de la journée peut être un facteur contribuant au caractère saisonnier de la reproduction dans la nature. Il se peut aussi que, la baisse de la température ou une augmentation du niveau de l'eau, apportées par les fortes pluies de la saison, soient des modulateurs supplémentaires. La reproduction du poisson-zèbre semble aussi beaucoup dépendre de la disponibilité en nourriture. En effet, le poisson-zèbre fraye durant les périodes de fortes pluies qui apportent une quantité abondante de nourriture provenant des terres submergées (Spence et al., 2007).

Au contraire, en laboratoire, les poisson-zèbre domestiqués pondent toute l'année. Aussi, le contrôle du moment de la ponte se réalise plutôt bien en laboratoire. Il est bien connu que la ponte chez le poisson zèbre domestiqué est influencée par la photopériode (Breder and Rosen, 1966). En laboratoire, le contrôle du moment de la ponte se fait donc grâce au cycle lumière/obscurité et à la séparation des sexes par une cloison dans l'aquarium, les femelles ne pondant qu'au contact d'un mâle (Spence et al., 2008). Sans cette séparation des sexes, la ponte commence habituellement dans la première minute d'exposition à la lumière après l'obscurité, et dure environ une heure (Darrow and Harris, 2004).

Les femelles poisson-zèbre présentent un cycle reproducteur asynchrone et continu. Une femelle peut pondre de 50 à 200 œufs tous les 3 à 5 j (Eaton and Farley,



1974). Le cycle ovarien durant moins d'une semaine, permet l'obtention d'œufs en nombre conséquent rapidement. La reproduction est externe. Les œufs sont non adhésifs et démersaux avec un diamètre approximatif de 0.7mm. Ils sont libérés directement sur le substrat sans aucune préparation du substrat par les parents, ni soins parentaux (Spence et al., 2008). Les embryons ont l'avantage de posséder un chorion transparent, rendant ainsi les processus du développement embryonnaire précoce beaucoup plus accessibles que chez la souris, par exemple, dont le développement est intra-utérin. Le développement embryon-larvaire (*figure 17*) est très rapide et a fait l'objet de nombreuses études aboutissant à une description détaillée (Kimmel et al., 1995).



**Figure 17 : Stades principaux de développement du poisson-zèbre d'après (Porcher et al., 2003). Le temps entre chacun de ces stades varie selon la température dans laquelle se trouvent les embryons (habituellement à 28°C)**

Il y a tout d'abord, à  $t = 0h$ , la période " zygote " ou une cellule, correspondant au moment où l'œuf vient d'être fertilisé. Cette période est suivie de près par les premières divisions qui interviennent à  $t=3/4$  heures post-fertilisation (hpf). Ensuite, les divisions cellulaires continuent et des changements de forme interviennent. La période de la pharyngula ( $t = 24 h$ ) est marquée par le début de la pigmentation de la rétine et de la peau. La circulation du sang se met en place : le cœur commence à battre et on peut voir des cellules sanguines en mouvement. Les nageoires pectorales commencent à se développer. La période de l'éclosion commence à  $t = 48 hpf$  et dépend de l'épaisseur du

chorion et de l'activité musculaire de l'embryon à l'intérieur, qui peuvent tous deux varier dans un groupe d'embryons. Pendant cette période, la fin de la morphogénèse des organes primaires a lieu. La période " larve précoce " est atteinte à  $t = 120$  hpf. Trois jours après l'éclosion, la larve a pratiquement achevé sa morphogénèse et elle continue à grandir. La larve commence à nager activement et bouge ses mâchoires, ses nageoires pectorales et ses yeux. Ces développements permettent des réactions de fuite, et annoncent la respiration, et la prise d'alimentation autonomes.

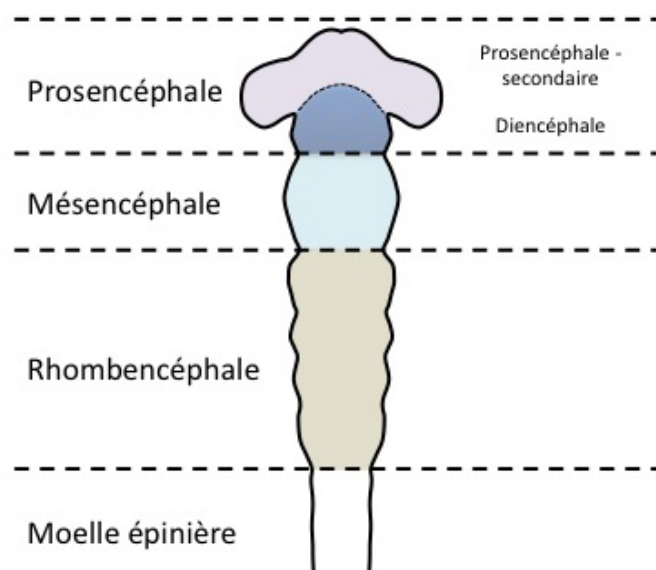
Pour ce qui est du développement des organes reproducteurs chez le poisson-zèbre, on parle de différenciation indirecte. Les individus développent tous à partir de gonades indifférenciées des ovaires dans un premier temps (Tong et al., 2010). Puis la différenciation sexuelle s'effectue autour de l'âge de 25-30 jours (Clelland and Peng, 2009; Chen and Ge, 2012), et la maturité sexuelle est ensuite atteinte à l'âge 75 jours environ (Spence et al., 2008). Une fois cette maturité acquise, il faut, pour voir apparaître les premières reproductions, attendre que les femelles et les mâles aient atteint une taille suffisante, d'environ 25mm (Spence et al., 2008), acquise à environ 90 jours. En effet, la maturation sexuelle semble être liée d'avantage à la taille plutôt qu'à l'âge des poissons, et les poissons sauvages et d'élevages semblent atteindre la maturation sexuelle pour des tailles similaires malgré la différence importante de vitesse de croissance (Spence et al., 2007).

### 5.3 Formation du système nerveux central du poisson-zèbre

#### 5.3.1 Développement du cerveau

Le développement embryonnaire du cerveau du poisson-zèbre, prend ses origines comme c'est le cas pour tous les autres vertébrés, durant la spécification du neuroectoderme. Ce processus est appelé « l'induction neurale » et est initié au moment de la gastrulation, lorsque la couche mésodermique en formation entre en contact avec l'ectoderme le recouvrant (Doniach and Musci, 1995; Lumsden and Krumlauf, 1996; Spemann and Mangold, 2001). Cette couche mésodermique présomptive sécrète localement des facteurs importants pour induire ou inhiber l'induction neurale dans la couche ectodermique. Une fois déterminé, l'ectoderme neural forme la plaque neurale, précurseur du système nerveux.

La plaque neurale se creuse ensuite, s'invagine de manière à former la gouttière neurale puis, les plis neuraux qui bordent la gouttière fusionnent pour fermer la gouttière qui devient le tube neural. Au cours de ce processus de neurulation, le poisson-zèbre diffère des autres vertébrés: au lieu de replier la plaque neurale immédiatement pour former un tube avec une lumière, il se forme d'abord une épaisse couche de cellules (neural keel). Cependant, la disposition topologique des cellules chez le poisson-zèbre pendant la formation de ce 'neural keel' à partir de la plaque neurale est similaire à celle d'autres vertébrés (Schmidt et al., 2013) (*Figure 18*). On observe alors une partie antérieure renflée, la vésicule céphalique primitive, qui se segmente en trois vésicules qui deviendront le prosencéphale, le mésencéphale, et le rhombencéphale qui est rattaché à la moëlle épinière. Chacune des trois vésicules se subdivise ensuite en différentes régions. Le prosencéphale, la plus antérieure des vésicules, se divise en deux régions, le diencephale pour sa partie caudale et le prosencéphale secondaire pour sa partie rostrale, cette dernière contenant entre autre l'aire préoptique et l'hypothalamus, qui sont impliqués dans les régulations endocrines.



**Figure 18 : Principales subdivisions du cerveau embryonnaire des Vertébrés. D'après (Medina, 2009)**

En ce qui concerne le modèle du poisson zèbre, la présence des trois vésicules ne devient évidente qu'après environ 12 heures de développement (Kimmel et al., 1995). La lumière du tube neural commence ensuite à se remplir de liquide cérébro-spinal entre 18

et 22 hpf pour initier l'ouverture des ventricules cérébraux. Les ventricules croissent alors en taille, jusqu' à 48hpf où la phase initiale de neurogenèse est terminée (Lowery and Sive, 2009). La neurogenèse prend ensuite place autour de la lumière des ventricules. Chacune de ces vésicules contient alors des zones prolifératives dans lesquelles les neurones et cellules gliales sont formés.

Le destin des neurones nouvellement formés, est fortement influencé par les morphogènes sécrétés par les différents centres de signalisations, ainsi que par l'expression d'un ensemble spécifique de gènes exprimés au sein de territoires distincts du tube neural (Vieira et al., 2010). Ainsi, comme les molécules de signalisation et les profils d'expression de nombreux facteurs de transcription au cours des différents stades de développement sont bien conservés, les mécanismes de base de la régionalisation sont considérés comme conservés.

Profitant des techniques de transgenèse ou d'ARN antisens de type morpholino, la connaissance des gènes impliqués dans le développement du cerveau ne cessent de s'améliorer. Certains gènes semblent avoir des fonctions similaires chez les mammifères et les téléostéens. Par exemple, comme chez les mammifères, *foxg1a* joue un rôle crucial dans le développement du télencéphale des téléostéens, et, *Rx3* est nécessaire pour la formation des yeux et du « eye field » (Stigloher et al., 2006; Danesin et al., 2009). De façon similaire, le patron d'expression de *shha* et *nkx2.1a* est conservé, suggérant un rôle important de ces deux facteurs de transcription dans le développement de l'hypothalamus (Rohr et al., 2001; van den Akker et al., 2008).

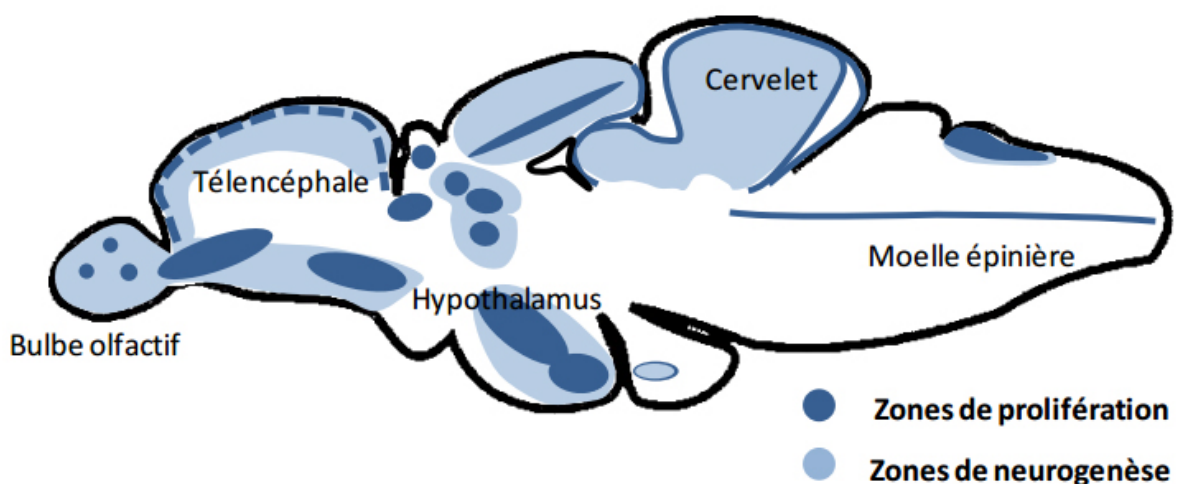
En revanche, alors même qu'elle occupe une grande partie du cerveau antérieur chez le poisson zèbre adulte, la région préoptique n'a pas été aussi clairement définie chez la larve. L'aire préoptique se trouve en fait située dans une région charnière, rostralement par rapport à l'hypothalamus et caudalement par rapport au télencéphale, et de fait, son origine embryonnaire (télencephalique ou hypothalamique) est toujours l'objet de débats. Si les études fonctionnelles ont coutume de relier l'aire préoptique à l'hypothalamus, des études génétiques plus récentes menées chez la souris et le poulet contredisent clairement ce dogme et montrent que cette région appartient au moins en partie au télencéphale (Flames et al., 2007) (Bardet et al., 2010).

### 5.3.2 Neurogenèse dans le cerveau adulte

En quelques années, plusieurs découvertes ont contribué à l'effondrement du dogme qui définissait le cerveau adulte comme incapable de générer de nouveaux neurones (Altman and Das, 1965; Kaplan, 1981; Reynolds and Weiss, 1992). L'émergence de nouvelles techniques pour étudier la prolifération cellulaire, telles que le marquage à la bromodéoxyuridine (BrdU) ou au 5-éthynyl-2'-deoxyuridine (EdU), ou encore l'immunohistochimie de la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen), a favorisé considérablement l'avancée des recherches sur la neurogenèse adulte.

Chez les mammifères, il est maintenant admis que dans le cerveau adulte il existe des territoires de prolifération neuronale (pour revue, (Lindsey and Tropepe, 2006)). A ce jour, deux aires de neurogenèse télencéphaliques ont été mises en évidence, la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux et la zone sous-granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe.

Le cerveau des poissons téléostéens contraste considérablement avec celui des mammifères puisque l'activité de prolifération à l'âge adulte ne se limite pas à deux régions mais elle s'étend à de nombreux territoires cérébraux (*Figure 19*) (Ekstrom et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Kuroyanagi et al., 2010).



**Figure 19: Représentation schématique des zones de prolifération et de neurogenèse dans le cerveau du poisson-zèbre adulte. D'après Kaslin et al. (2008)**

Chez le poisson zèbre, 16 régions distinctes de prolifération ont été mises en évidence (Grandel et al., 2006). Ces régions sont situées principalement dans des zones

périventriculaires du cerveau antérieur au niveau des bulbes olfactifs, du télencéphale, du diencephale, de la région préoptique et de l'hypothalamus. Des territoires de prolifération ont également été mis en évidence dans le cervelet, le rhombencéphale et la moelle épinière. Comme chez les mammifères (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Kempermann, 2002; Taupin and Gage, 2002; Goldman, 2003; Garcia et al., 2004; Merkle et al., 2004; Doetsch and Hen, 2005; Lledo and Saghatelian, 2005), les oiseaux (Goldman, 1998), et les reptiles (Garcia-Verdugo et al., 2002), la plupart des cellules générées dans ces zones prolifératives se différencient en neurones (Zupanc, 2001; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Zupanc et al., 2006).

L'utilisation de marqueurs neuronaux associés à des marqueurs de prolifération a permis de définir la nature des cellules progénitrices de ces neurones. Ainsi, ces cellules ont été identifiées comme étant des cellules gliales radiaires. Chez les mammifères, les cellules de la glie radiaire sont depuis longtemps connues pour leur rôle essentiel dans la neurogenèse embryonnaire. En effet, en plus de constituer un support de migration pour les nouveaux neurones, il est maintenant admis qu'elles peuvent être des cellules progénitrices neuronales (Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001; Gotz and Barde, 2005; Mori et al., 2005). Alors que chez les mammifères, ces cellules se différencient en astrocytes à la fin de la période de neurogenèse embryonnaire, dans le cerveau des oiseaux et des poissons, ces cellules gliales radiaires persistent à l'âge adulte et peuvent donner naissance à de nouveaux neurones (Onteniente et al., 1983; Alvarez-Buylla et al., 1987).

## 6. LE PROJET DE THESE

Comme exposé au cours de cette introduction, la fonction de reproduction a, chez certains vertébrés, en particulier chez de nombreux téléostéens, la particularité d'être placée sous un double contrôle cérébral, stimulateur par la gonadolibérine (GnRH), mais aussi inhibiteur par la DA.

Le but de cette thèse était d'approfondir nos connaissances sur le système dopaminergique impliqué dans ce contrôle inhibiteur. Pour ce faire, nous voulions tirer avantage du poisson-zèbre, un organisme modèle de plus en plus utilisé en laboratoire et pour lequel existent de nombreux outils moléculaires. Nos connaissances sur l'endocrinologie de la reproduction du poisson-zèbre ont considérablement augmenté notamment grâce au séquençage de son génome (Howe et al., 2013). L'étude comparative du génome du poisson-zèbre avec celui de l'être humain, de la souris ou d'autres organismes, a permis l'identification de gènes orthologues ou paralogues (qui résultent d'une duplication génique), et même de nouveaux gènes. Ces travaux ont notamment mis en évidence l'implication de nombreux gènes dans l'embryogenèse ou dans l'organogenèse. De plus, de par sa position dans l'arbre phylogénétique, cet animal apporte des informations relatives au développement et à l'évolution qui ne peuvent être obtenues en étudiant la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou le nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Dooley and Zon, 2000).

Néanmoins, de nombreuses lacunes concernant la physiologie de la reproduction subsistent chez le poisson-zèbre. Ainsi, le rôle de la DA dans le contrôle de la reproduction n'a jamais été exploré dans cette espèce. L'importance du contrôle dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope, variant d'une espèce de téléostéen à l'autre, notre premier objectif a donc été de rechercher s'il existait bien, chez le poisson-zèbre, un contrôle inhibiteur de la reproduction par la DA. L'objectif suivant fut d'étudier les bases anatomiques et morphologiques de ce contrôle dopaminergique de la fonction gonadotrope dans cette espèce, en recherchant les récepteurs hypophysaires de la DA et les neurones DAergiques impliqués dans cette régulation. Enfin, nous avons mis en évidence certaines caractéristiques développementales des neurones neuroendocrines impliqués dans ce contrôle chez le poisson-zèbre.





# RESULTATS

---



## 1. ARTICLE 1 : LA DOPAMINE INHIBE LA REPRODUCTION CHEZ LES FEMELLES POISSON-ZEBRE (DANIO RERIO) VIA TROIS RECEPTEURS HYPOPHYSAIRES DE TYPE D2.

Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloché S, Gonnet F, Vernier P, Dufour S, and Pasqualini C.

### Résumé :

Chez certains téléostéens, le contrôle stimulateur de l'axe gonadotrope assuré par la GnRH est contre-balancé par un contrôle inhibiteur assuré par la dopamine (DA). L'importance fonctionnelle de cette voie de régulation diffère beaucoup d'une espèce de téléostéens à l'autre. Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un vertébré modèle couramment utilisé, pourtant le rôle de la DA dans le contrôle neuroendocrine de sa reproduction n'a jamais été étudié.

Nous avons injecté à des femelles poisson-zèbre âgées ne cyclant plus, soit un agoniste de la GnRH (GnRHa), soit un antagoniste des récepteurs dopaminergiques de type D2 (Dompéridone), soit les deux ensemble et mesuré par qPCR l'expression de la LH $\beta$  et de la FSH $\beta$  dans leur hypophyse et, en parallèle, analysé l'état de maturation des ovocytes dans leurs ovaires. Nous avons ainsi pu montrer que seul le double traitement (GnRHa + Dompéridone), peut induire une augmentation significative de l'expression hypophysaire de la LH $\beta$  et une reprise de la vitellogenèse, démontrant que chez la femelle poisson-zèbre âgée une levée de l'inhibition DAergique est indispensable pour que s'exprime l'effet stimulant de la GnRH et qu'une réactivation de l'ovaire se produise. Nous avons ensuite montré par un double marquage immunofluorescent l'innervation dopaminergique directe des cellules hypophysaires productrices de LH. Nous avons enfin cherché à savoir si les trois sous-types de récepteurs D2 (R-D2) existant chez le poisson-zèbre étaient exprimés dans l'hypophyse. Par des techniques de doubles ou triples marquages combinant hybridation *in situ* et immunofluorescence, nous avons pu montrer que les cellules à LH expriment les trois R-D2, suggérant qu'ils pourraient être tous les trois impliqués dans la transduction du message inhibiteur aux cellules productrices de LH.

Ces résultats démontrent que, chez le poisson-zèbre, la DA exerce bien un effet inhibiteur puissant, capable de s'opposer à l'effet stimulant de la GnRH, dans le contrôle neuroendocrine de la reproduction.

## Chapitre 2 : Résultats

### Techniques utilisées :

- Injections *in vivo* de substances pharmacologiques chez des femelles de 4 et 24 mois
- qPCR pour quantifier les niveaux de transcrits de la *lh* et de la *fsh* dans l'hypophyse
- Histologie des gonades, pour apprécier l'effet stimulant des traitements.
- Immunofluorescence de la TH et de la LH $\beta$  pour observer l'innervation dopaminergique des cellules gonadotropes sécrétrices de LH
- *Hybridation in situ* fluorescente triple couleur des récepteurs dopaminegiques D2a, D2b et D2c pour étudier la localisation des transcrits dans l'hypophyse

## Dopamine Inhibits Reproduction in Female Zebrafish (*Danio rerio*) via Three Pituitary D2 Receptor Subtypes

Romain Fontaine, Pierre Affaticati, Kei Yamamoto, Cécile Jolly, Charlotte Bureau, Sylvie Baloche, Françoise Gonnet, Philippe Vernier, Sylvie Dufour, and Catherine Pasqualini

Centre National de la Recherche Scientifique (R.F., P.A., K.Y., C.B., P.V., C.P.), Unité Propre de Recherche 3294, Neurobiologie et Développement, Avenue de la Terrasse, bat 5E, Gif-sur-Yvette, 91198 Cedex; and Muséum National d'Histoire Naturelle (R.F., C.J., S.B., F.G., S.D.), Unité Mixte de Recherche Biology of Aquatic Organisms and Ecosystems, MNHN-CNRS7208-IRD207-UPMC, 7 rue Cuvier, CP 32, 75231 Paris Cedex 05, France

In many teleosts, the stimulatory control of gonadotrope axis by GnRH is opposed by an inhibitory control by dopamine (DA). The functional importance of this inhibitory pathway differs widely from one teleostean species to another. The zebrafish (*Danio rerio*) is a teleost fish that has become increasingly popular as an experimental vertebrate model. However, the role of DA in the neuroendocrine control of its reproduction has never been studied. Here the authors evaluated in sexually regressed female zebrafish the effects of *in vivo* treatments with a DA D2 receptor (D2-R) antagonist domperidone, or a GnRH agonist, alone and in combination, on the pituitary level of FSH $\beta$  and LH $\beta$  transcripts, the gonadosomatic index, and the ovarian histology. Only the double treatment with GnRH agonist and domperidone could induce an increase in the expression of LH $\beta$ , in the gonadosomatic index, and a stimulation of ovarian vitellogenesis, indicating that removal of dopaminergic inhibition is required for the stimulatory action of GnRH and reactivation of ovarian function to occur. Using double immunofluorescent staining on pituitary, the authors showed in this species the innervation of LH cells by tyrosine-hydroxylase immunoreactive fibers. Finally, using *in situ* hybridization and immunofluorescence, the authors showed that the three subtypes of zebrafish DA D2-R (D2a, D2b, and D2c) were expressed in LH-producing cells, suggesting that they all may be involved in mediating this inhibition. These results show for the first time that, in zebrafish, DA has a direct and potent inhibitory action capable of opposing the stimulatory effect of GnRH in the neuroendocrine control of reproduction. (*Endocrinology* 154: 807–818, 2013)

In fish, as in all vertebrates, the brain–pituitary–gonad axis regulates the reproductive function. External and internal signals are integrated in the brain primarily by preoptic-hypothalamic neurons producing the GnRHs that stimulate in the pituitary the synthesis and release of gonadotropins, FSH, and LH, which in turn stimulate gonadal activity (steroidogenesis and gametogenesis).

In teleost fish, in addition to the GnRH stimulatory system, neurons secreting dopamine (DA) have been identified as an inhibitory system over the reproductive axis

(1–3). Such a dual neuroendocrine control of reproduction by GnRH and DA has been demonstrated in several adult teleosts (for review, see Ref. 4). DA may inhibit both basal and GnRH-stimulated LH secretion and thereby regulate the final stages of gametogenesis (oocyte maturation, ovulation in the female, and spermiation in male). The intensity of the dopaminergic inhibitory tone at the time of spawning may vary according to teleost species, from a drastic barrier in the grey mullet (5) to a milder control in salmonids (6). In some species, for instance the Atlantic

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170  
Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2012-1759 Received July 19, 2012. Accepted November 19, 2012.

First Published Online January 7, 2013

Abbreviations: DA, dopamine; Domp, domperidone; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; GnRH $\alpha$ , GnRH agonist; GSI, gonadosomatic index; ir, immunoreactive; PBST, phosphate buffered saline with Tween; PI, pars intermedia; PPD, proximalis pars distalis; RPD, rostral pars distalis; SSC, saline sodium citrate buffer; TH, tyrosine hydroxylase.

croaker, no dopaminergic inhibition could be seen (7). The DA inhibitory control of gonadotrope function also could be active in juveniles of some species and thus participate in the control of puberty, such as in the European eel (8, 9) and grey mullet (5).

Neuroanatomical investigations in goldfish (3, 10–12), trout (13), and European eel (9, 14) have shown that the DA neurons responsible for the inhibitory control of reproduction originate in a specific nucleus of the preoptic area (the nucleus preopticus anteroventralis) and project directly to the pituitary region (proximalis pars distalis [PPD]), where gonadotrope cells are located (3, 10).

Pharmacological studies have demonstrated that the inhibitory effects of DA on gonadotropin production are exerted directly at the pituitary level (2, 15) and mediated by D2-type dopaminergic receptors (D2-Rs), in all studied teleosts (for review, see Ref. 4). In mammals and birds, D2-Rs are encoded by a single gene, and alternative splicing gives rise to two proteic isoforms D2l (long) and D2s (short) (16). By contrast, in some teleosts, the coexistence of several genes encoding D2-R subtypes has been demonstrated: two in European eel (17) and three in goldfish (18) and zebrafish (19).

The zebrafish (*Danio rerio*), a member of the Cyprinid group of teleosts, is a small tropical freshwater fish, native to India and Burma. It has become a very popular laboratory animal over the past 15 years. Its major application in scientific research has been initially in developmental biology. Rapidly, however, due to the availability of the genome sequence and of the many hundreds of mutants and transgenic lines, zebrafish appeared as a vertebrate model with an impressive range of possible applications. It is now extensively used for research in physiology (20), cancer (21), drug discovery (22), toxicology (23), ecotoxicology (24), endocrine disruption by chemicals (25, 26), endocrinology (27), behavioral studies (28), for high-throughput screening of drug libraries (29), and for reproduction studies (30–34).

Although the main components of the mammalian hypothalamo-pituitary-gonadal axis have been shown to be present in zebrafish, and GnRH is known to play a conserved stimulating role on the gonadotrope cells (35), the potential role of DA in the neuroendocrine control of zebrafish reproduction is still unknown.

The present study aimed at investigating, in zebrafish, the existence of a DA inhibitory tone on the endocrine reproductive axis. The effects of *in vivo* treatments with a D2-R antagonist domperidone (Domp), or a GnRH agonist (GnRHa), alone and in combination, were evaluated in old sexually regressed females, by analyzing the pituitary transcript levels of gonadotropins (FSH $\beta$ , and LH $\beta$ ), the gonadosomatic index (GSI), and the ovarian histology.

Along with the *in vivo* actions of DA, the morphological basis of this control was studied in sexually regressed and adult cycling females. We looked for dopaminergic fibers innervating gonadotrope cells in zebrafish pituitary. Subsequently, we sought to identify the pituitary D2-Rs potentially involved in the inhibitory control of gonadotrope function by DA. To this aim, we first investigated whether the three subtypes existing in the zebrafish (D2a, D2b, or D2c) were expressed in the pituitary of sexually regressed and adult cycling females. In addition, we searched which subtype(s) of D2-R was (were) expressed by LH cells.

## Materials and Methods

### Animals

AB strain zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 26 °C on a 13-hour light, 11-hour dark cycle and fed three times daily. Both 24-month-old sexually regressed females (ie, had ceased cycling) and 4-month-old cycling females were used. Animal manipulations were performed according to the recommendations of the French ethical committee and under the supervision of authorized investigators.

### In vivo experiments

A batch of 36 female 24-month-old zebrafish were randomly distributed into four experimental groups of nine fish, each receiving two perivisceral injections (1  $\mu$ l) at 30-h intervals with 1) a long-acting GnRHa ([des-Gly<sup>10</sup>, D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH ethylamide (Sigma, St. Louis, MO); GnRHa, 0.2 mg/kg), or 2) with a DA D2 receptor antagonist, Domp (Sigma, 10 mg/kg, according to the protocol of Refs. 36, 37) alone, 3) both in combination, or 4) diluent (NaCl 0.7% containing 0.1% sodium metabisulfite) for the control group. Fish were killed by rapid immersion in ice water 18 h after the second injection and weighed. The pituitary glands were collected under a dissecting microscope with fine forceps and immersed immediately in ice-cold Trizol (Invitrogen, Life Technologies, St. Aubin, France). The ovaries were removed, weighed for calculation of the GSI (gonad weight/body weight  $\times$  100), and immersed in Bouin's fixative.

### Quantification of fsh $\beta$ and lh $\beta$ mRNAs by real-time quantitative RT-PCR

#### RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from the zebrafish pituitaries using Trizol according to the manufacturer's instructions. Samples were then treated with deoxyribonuclease (DNase) I (DNase Free kit; Ambion Inc., Life Technologies), before being suspended in 20  $\mu$ l of RNA storage solution (Ambion Inc.) and stored at –80 °C. First strand cDNA synthesis was performed as described previously (in Ref. 38).

#### Primers and reference gene

Pituitary mRNA levels of FSH  $\beta$  subunit (Zf FSH $\beta$ ; GenBank accession no. AY424303), LH  $\beta$  subunit (Zf LH $\beta$ ; GenBank accession no. AY424304), and the house-keeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Zf Gapdh, accession

no. AY818346) used as a reference gene, were assayed by real-time quantitative PCR, using primers designed previously (see Ref. 39) and purchased from MWG-Biotech AG (Ebersburg, Germany).

### SYBR green assay

The quantitative assays of the pituitary expression of the various zebrafish genes were set up using the Light Cycler system with SYBR Green I-sequence unspecific detection (Roche Diagnostics, Meylan, France), as described previously (see Ref. 38). Serial dilutions of a pool from all individual pituitary cDNA samples were used as the standard curve for each gene (*gapdh*, *fsh $\beta$* , *lh $\beta$* ). Relative expression level of RNA for unknown target gene was quantified in duplicate, by comparing Ct (threshold cycles) values to the specific standard run. The levels of *lh $\beta$*  and *fsh $\beta$*  mRNA were normalized to those of *gapdh* in each corresponding sample and expressed as arbitrary units.

### Ovarian histology

Analysis of oocyte stage was conducted on histological paraffin sections (6–7  $\mu$ m thick) stained with hematoxylin and eosin and examined under a light microscope. Sections from at least three female fish from each treatment group were examined.

### Immunofluorescent staining of tyrosine hydroxylase (TH) and LH $\beta$

#### Tissue preparation

Female zebrafish were killed by rapid immersion in ice water. The skull was opened to facilitate fixation (48 h) of the brain and pituitary by paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) 4% in phosphate buffered saline with Tween (PBST: PBS, 0.1%; Tween-20, pH 7.3). Brains with attached pituitary were collected with a small piece of the underlying bone. They subsequently were incubated for 15 days at 4°C with EDTA (20%) in PBST, then embedded in 3% agarose and cut (60- $\mu$ m sagittal sections) with a VT1000S vibratome (Leica, Germany).

#### Double immunofluorescent staining

Sections were incubated for 2 hours at room temperature in a blocking solution (normal goat serum 4%, dimethylsulfoxide 1%, Triton 0.3% in PBST) and subsequently for 48 hours at 4°C with 1) a mouse monoclonal antibody raised against rat TH, previously validated in zebrafish (see Ref. 40); 1/500; from Eurobio/Abcys, les Ulis, France) and 2) a rabbit antibody directed against the  $\beta$  subunit of carp LH, that shares 74.3% amino acid identity with that of zebrafish (1/2,000; see Ref. 41, in the blocking solution). The secondary antibodies used were 1) a goat antimouse IgG coupled to Alexa-488 and 2) a goat antirabbit IgG coupled to Alexa-633 (Invitrogen). After the sections were washed in PBST, they were postfixed in 4% paraformaldehyde at 4°C, washed again, and mounted in Vectashield H-1000 (Vector, Eurobio/Abcys).

### Fluorescent in situ hybridization (FISH)

#### Tissue preparation

After fixation (as described above), the pituitary glands were collected under a dissecting microscope, dehydrated through an

ascending series of ethanol solutions, transferred to 100% methanol and stored at –20°C until use. In some females, the brain was removed, dehydrated, transferred to 100% methanol and stored at –20°C until use. Brains subsequently were rehydrated, embedded in 3% agarose, and cut (60- $\mu$ m frontal sections) with a VT1000S vibratome.

### cRNA probes synthesis

The three zebrafish D2-R genes have been cloned into pCR II Vector (Invitrogen) after PCR amplification of the transcripts, using specific primers according to Boehmler et al (19). Please see Supplemental Tables 1 and 2 published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>. Antisense and sense cRNA probes were synthesized by in vitro transcription by T7 or Sp6 RNA polymerase (Promega, Madison, Wisconsin) and labeled with fluorescein-12-UTP for D2a, digoxigenin-11-UTP for D2c (Roche Diagnostics), or dinitrophenol-11-UTP (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) for D2b. Probes were purified using Nucleospin RNA clean-UP kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France); their sizes were analyzed by gel electrophoresis.

### In situ hybridization

FISH was performed as described previously (see Ref. 42), with modifications. Briefly, fixed samples (whole-mount pituitaries or floating brain sections) were rehydrated through a descending series of ethanol solutions, permeabilized by a 8-minute treatment with proteinase K (10  $\mu$ g/ml; P6556, Sigma). Samples were prehybridized in hybridization buffer (42) for 4 hours at 65°C. Hybridization was performed at 65°C for 18 h in hybridization buffer containing a mixture of probes at a concentration of 2 ng/ $\mu$ l, each. Samples were washed (50% formamide/50% 2 $\times$  SSC [saline sodium citrate buffer]; 2 $\times$  SSC; 0.2 $\times$  SSC; PBST), treated for 30 minutes with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% to inactivate endogenous peroxidases, and washed again in PBST. Probe detection was carried out as follows: 1) incubation with hapten-specific antibodies conjugated to peroxidase, 2) incubation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% with the suitable fluorescent tyramide, and 3) peroxidase inactivation, by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2%. Fluorescein-labeled D2a probe was recognized by an antibody antifluorescein peroxidase conjugated (Roche Diagnostics) and revealed by a home-made fluorescein-conjugated tyramide (protocol available on Xenbase: <http://www.xenbase.org/other/static/methods/FISH.jsp>). For digoxigenin-labeled D2c probe, an anti-digoxigenin-peroxidase conjugated antibody (Roche Diagnostics), and a home-made Cy3-conjugated tyramide (protocol available on Xenbase) were used. For dinitrophenyl-labeled D2b probe, an anti-dinitrophenyl-peroxidase conjugated antibody (Perkin Elmer), and a Cy5-conjugated tyramide (Perkin Elmer) were used. After extensive washes, samples were postmounted on SuperfrostPlus slides (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France) in Vectashield H-1000 Mounting Medium (Vector, Eurobio/Abcys).

### Combined FISH and immunofluorescence

To determine which subtype of D2-R was expressed by LH-producing cells, single-color FISH for one subtype of D2-R transcript was followed by immunolabeling for LH $\beta$ . FISH was performed on pituitaries as described above, and revealed using fluorescein-conjugated tyramide. Pituitaries were then incubated for 48 hours at 4°C with the rabbit antibody directed



against the  $\beta$  subunit of carp LH (see above paragraph *Double immunofluorescent staining*), in a blocking solution (goat serum, 4% dimethylsulfoxide 0.5% Triton 0.3% in PBST 0.1%). The secondary antibody used was a goat antirabbit IgG coupled to DyLight 549 (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, Suffolk, England).

### Image acquisition and processing

Fluorescent images were acquired using a Zeiss LSM 700 laser scanning confocal microscope. For fluorescent tyramides used in three-color FISH and for fluorophore-coupled secondary antibodies used in immunofluorescence studies, lasers with a wavelength of 488 (FITC; Alexa-488), 555 (Cy3; DyLight 549) and 633 (Cy5; Alexa-633) nm, respectively, were used. Channels were acquired sequentially to avoid cross talk between the different filters. The focal planes were recorded with a  $20 \times 0.8$  Numerical Aperture Plan Apochromat lens or a  $63 \times 1.4$  Numerical Aperture Plan Apochromat lens (see Figure 3, A and B, bottom panels), and using the Zeiss ZEN 2009 software. Z-projections were obtained using Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Composites were assembled using Adobe Illustrator (Adobe Systems, San Francisco, California).

### Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical differences among experimental groups were analyzed using one-way ANOVA, followed by a Tukey's multiple comparison test (GraphPad Software Inc., San Diego, California). Differences were considered statistically significant at  $P < .05$ .

## Results

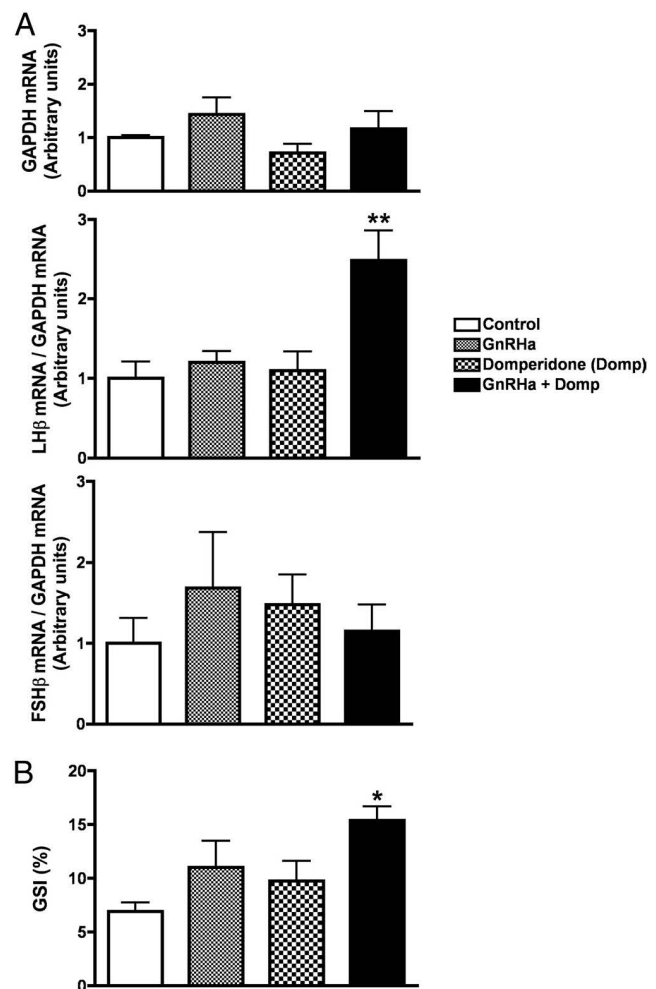
### 1. Effects of in vivo treatment with D2-R antagonist or GnRH agonist, alone and in combination

#### 1.1. Pituitary level of LH and FSH $\beta$ -subunit transcripts

The amounts of LH and FSH  $\beta$  subunit (*lh $\beta$* , *fsh $\beta$* ) transcripts were measured in the pituitary by real-time quantitative PCR, 18 h after the end of the different treatments. The amounts of gonadotropin subunits were normalized to the amount of transcripts of a reference gene, zebrafish *Gapdh*, the expression of which (Figure 1A) was not affected by treatments.

Treatment of sexually regressed female zebrafish with a GnRH agonist alone or Domp (a DA D2-R antagonist) alone did not significantly modify *lh $\beta$*  transcript levels compared with the control group. By contrast, the combined treatment (GnRH agonist + Domp) induced a 2.5-fold increase in the pituitary *lh $\beta$*  transcript levels as compared with controls ( $P < .01$ ; Figure 1A). On the other hand, *fsh $\beta$*  transcript levels were not significantly affected by any treatment (Figure 1A).

In an experiment performed on 4-month-old adult cycling females, we similarly observed a 4-fold increase in the level of *lh $\beta$*  transcripts ( $P < .001$ , as compared with con-



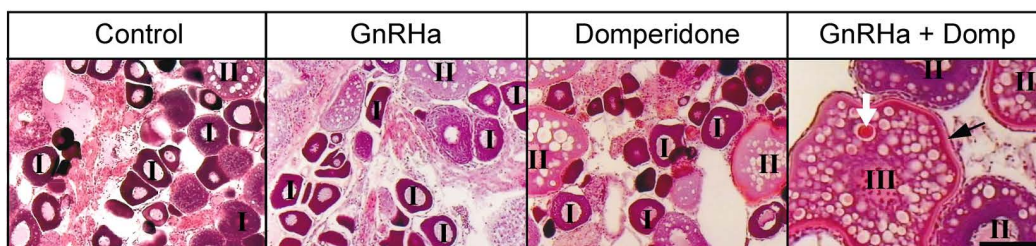
**Figure 1.** A, Pituitary transcript levels of gonadotropin  $\beta$ -subunits in sexually regressed females after in vivo treatment with diluent (control), a GnRH agonist, a DA D2-R antagonist Domp, or a combination of both (GnRH agonist + Domp). The amounts of *Lh $\beta$*  and *Fsh $\beta$*  mRNAs in each sample were quantified by real-time quantitative RT-PCR and normalized to the amount of *Gapdh* (reference gene) mRNAs contained in the same sample. The mean control values were set to 100% (or 1), and each treated animal value has been calculated as a percentage of the control value. B, GSI in sexually regressed females after in vivo treatment with diluent (control), GnRH agonist, Domp, or a combination of both (GnRH agonist + Domp). All data presented are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 7-9$ ). Asterisks indicate a significant difference from control group ( $*P < .05$ ;  $**P < .01$ , ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

controls), only in fish who received the same combined treatment (Supplemental Figure 1).

#### 1.2. The GSI

Treatment of sexually regressed female zebrafish with a GnRH agonist alone or Domp alone did not significantly affect the GSI, with respect to controls (Figure 1B). In contrast, the combined treatment (GnRH agonist + Domp) markedly increased the ovarian weight (from  $0.033 \pm 0.004$  g to  $0.083 \pm 0.004$  g), with no change in the body weight





**Figure 2.** State of oocyte maturation in sexually regressed females after in vivo treatment with diluent (control), a GnRH $\alpha$ , a DA D2-R antagonist Domp, or a combination of both (GnRH $\alpha$  + Domp). Representative ovary sections of control sexually regressed female zebrafish and ones treated with GnRH $\alpha$ , Domp, and GnRH $\alpha$  + Domp, observed with an optic microscope. The zebrafish oocyte development was divided into three stages according to Selman criteria (47) and numbered from I to III. In control sexually regressed females, but also in females treated with GnRH $\alpha$  or Domp, stage I and II oocytes were observed. By contrast, in the females treated with GnRH $\alpha$  + Domp, enlarged oocytes were found, exhibiting a thickened zona radiata (black arrow) and containing in addition to large lipid vesicles, deeply stained yolk granules (white arrow) resulting from the incorporation of vitellogenin, two features characteristic of exogenous vitellogenesis (stage III oocytes). Scale bar: 100  $\mu$ m.

( $0.52 \pm 0.03$  g for controls and  $0.497 \pm 0.01$  g for females treated with GnRH $\alpha$  + Domp), inducing a 2.57-fold increase in the GSI with respect to controls ( $P < .05$ ).

### 1.3. Ovarian histology

The effects of the various treatments were further assessed by histological observation of the ovaries (Figure 2). In ovary sections of control sexually regressed females, we observed primary oocytes (stage I: small oocytes with eosinophilic ooplasm and relatively large nucleus) and oocytes at the cortical alveolus stage (stage II: with basophilic ooplasm containing lipid droplets). Similarly, in ovary sections of GnRH $\alpha$ - or Domp-treated females, only stage I or II oocytes were observed (Figure 2). By contrast, in females treated by Domp and a GnRH $\alpha$ , many vitellogenic (stage III) oocytes were found, exhibiting a distinct zona radiata and containing dense yolk globules, two features characteristic of exogenous vitellogenesis (Figure 2).

## 2. Innervation of LH-producing cells by TH-immunopositive fibers

In teleosts there is no hypophyseal portal system and neurohormones are directly carried to the adenohypophysis by nerve fibers from the preoptico-hypothalamic region (43). To assess the anatomical support of DA actions on *lh* expression in zebrafish, we used a double immunofluorescence technique to label TH and LH $\beta$  on sections of pituitary attached to the brain. Both in sexually regressed (Figure 3A) and cycling females (Figure 3B), a bundle of TH-immunoreactive (ir) fibers directly entering the pituitary gland was clearly observed, with a subset of these fibers innervating the PPD, where LH $\beta$ -producing cells are located. At a higher magnification (Figure 3, bottom panels), the double-labeling highlighted a dense network of TH-ir fibers threading between or terminating near LH $\beta$ -producing gonadotrope cells. No stage-related difference in the dopaminergic innervation of the PPD could be observed between sexually regressed and cycling females.

## 3. Localization of the three DA D2-R subtypes

In zebrafish, D2 receptors are encoded by three separate genes, *D2a*, *D2b*, and *D2c* (19). To determine whether the three subtypes were expressed in the pituitary gland, their respective distribution was studied by means of FISH.

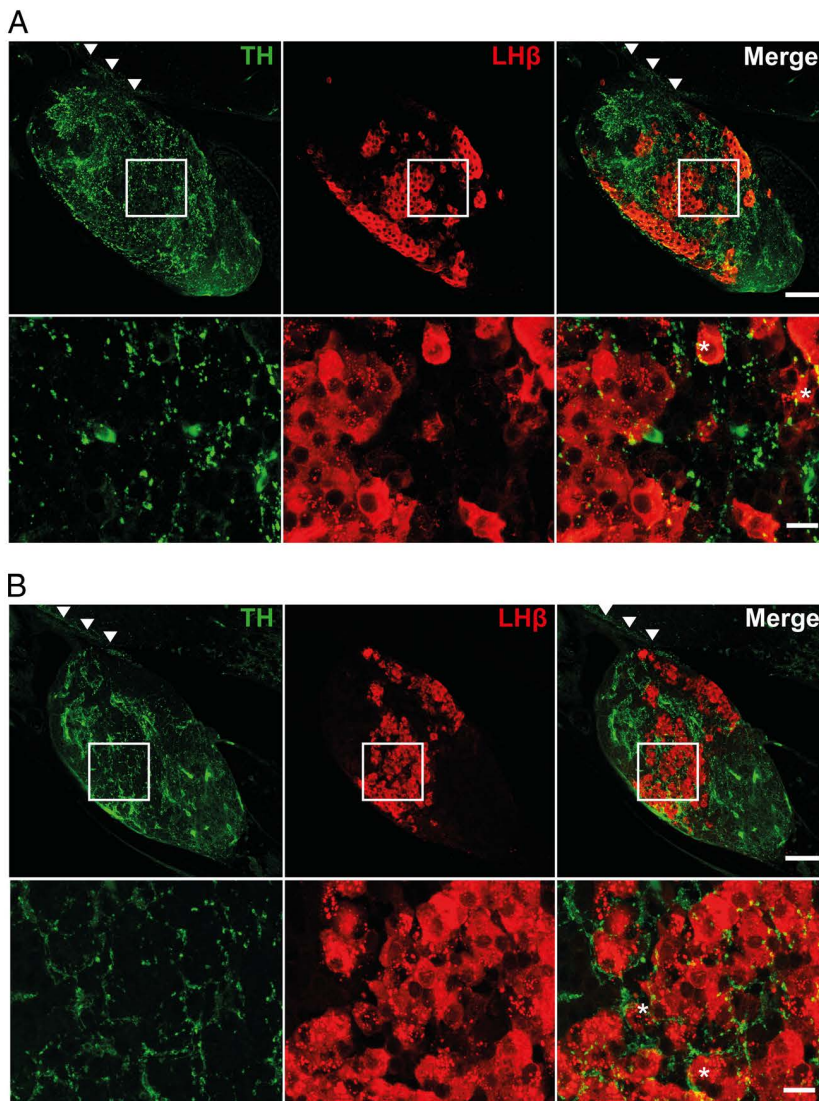
### 3.1. Test of the three probes' specificity in adult zebrafish brain sections

To ensure that each RNA probe does not cross-react with several subtypes of transcripts in hybridization studies, we first examined D2-R subtype expression in adult brain sections, using triple FISH. Confocal images of a transverse brain section at the hypothalamic level (Figure 4) showed that the three probes mostly labeled different cell populations. Moreover, some cells expressed only one or two subtypes of D2-R transcripts: in the dorsal zone of periventricular hypothalamus (Hd; marked by an asterisk) some cells express D2a-R (in green) and D2c-R (in red) transcripts and thus appear in yellow in the merge picture, showing that the D2b-R probe does not cross-react with D2a-R or D2c-R transcripts. Cells in the ventral hypothalamus (Hv; marked by an arrowhead) express D2a-R (in green) and D2b-R (in blue) mRNAs and appear in light blue when merged, showing that D2c-R probe does not cross-react with D2a-R or D2b-R transcripts. Finally, cells in the preglomerular nucleus (PG; marked with a round dot), express only mRNAs encoding D2a-R, appearing in green when merged. Therefore the differential expression of the three transcripts in the adult zebrafish brain showed that the three RNA probes are specific for each subtype of D2-R and suggested a functional specialization of the three receptors.

### 3.2. Localization of the three D2-R subtype transcripts in the zebrafish pituitary PPD

The three-color FISH method was similarly used to detect simultaneously the expression of D2a-R, D2b-R, and D2c-R in the pituitary from sexually regressed (Figure 5A) or cycling females (Figure 5B). In both cases, the tran-





**Figure 3.** Chemoarchitectural evidence for the dopaminergic influence on LH-producing gonadotrope cells in the zebrafish pituitary from (A) sexually regressed and (B) adult cycling females. Top panels: Confocal z-stack (5  $\mu\text{m}$ ) of sagittal sections (anterior to the left) of pituitary attached to the brain, immunostained for TH (green) and LH $\beta$  (red). A bundle of TH-ir fibers (in green) is visible in the pituitary stalk (arrowheads), with a subset of these fibers innervating the PPD where LH $\beta$ -ir cells are located. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . Bottom panels: Confocal z-stacks (3  $\mu\text{m}$ ) of the PPD region framed in the top panels at higher magnification show a dense network of TH-ir fibers threading between LH $\beta$ -producing cells or terminating near some of these cells (marked by asterisks). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

scripts for the three D2-Rs were all found in the pituitary and in largely overlapping areas. Hybridizing pituitaries with the three corresponding sense probes gave no signal (Supplemental Figure 2). While the three subtypes of D2-R exhibit similar distribution, the intensity of the labeling was different from one cell to another and from one region of the gland to another. Both in cycling and sexually regressed females, it is the median region (PPD), known to contain the gonadotrope cells, that exhibited the greatest labeling intensity for the three D2-R subtypes, which appear largely colocalized. Nevertheless, the anterior part of the gland or rostral pars distalis

(RPD) in cycling females, as well as its caudal part or pars intermedia (PI) in all females, also expressed the three D2-R transcripts with a weaker intensity.

### 3.3. Localization of the D2-R subtype transcripts in LH-producing cells

To determine which D2-R subtype(s) was (were) expressed by LH cells and potentially involved in the inhibitory control of LH cells by DA, we coupled FISH of D2-R transcripts with LH $\beta$  immunofluorescence on adult pituitaries in toto. Comparative analysis of FISH and immunofluorescence results (Figure 6) showed that D2-R transcript expression domain of each subtype largely colocalizes with that of LH $\beta$ : the superimposition of the red and green images showed that most if not all of the cells expressing LH $\beta$  also express, more or less intensely, each type of D2-R transcripts (from light green to orange in the merge picture), indicating that each of the three subtypes of D2R is expressed by the vast majority of LH cells.

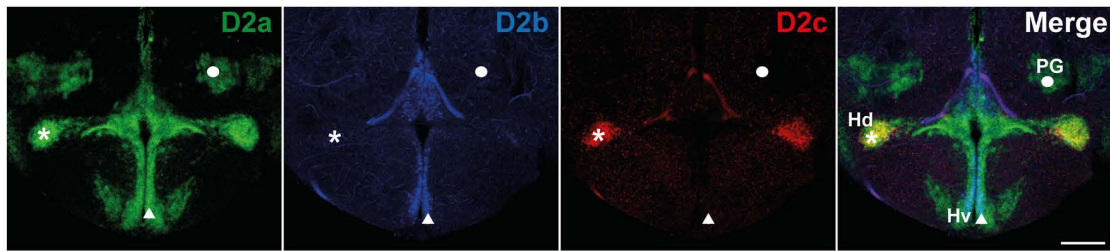
## Discussion

DA of preoptico-hypothalamic origin directly acting at the pituitary level is a key and potent inhibitor of gonadotrope function in a number of teleost fish (for reviews, see Refs. 4, 44–46). However, the functional importance of this inhibitory pathway differs widely from one teleostean species to another. The zebrafish (*Danio rerio*) has emerged over the past decades to become a mainstream animal model, but the role of DA in the neuroendocrine control of its reproduction was not known.

Here we present evidence that DA plays a role in the control of zebrafish gonadotrope function.

### Importance of the dopaminergic inhibitory regulation on the gonadotrope function in zebrafish

We examined the effect of removing a potential dopaminergic inhibition alone or together with a stimulation by

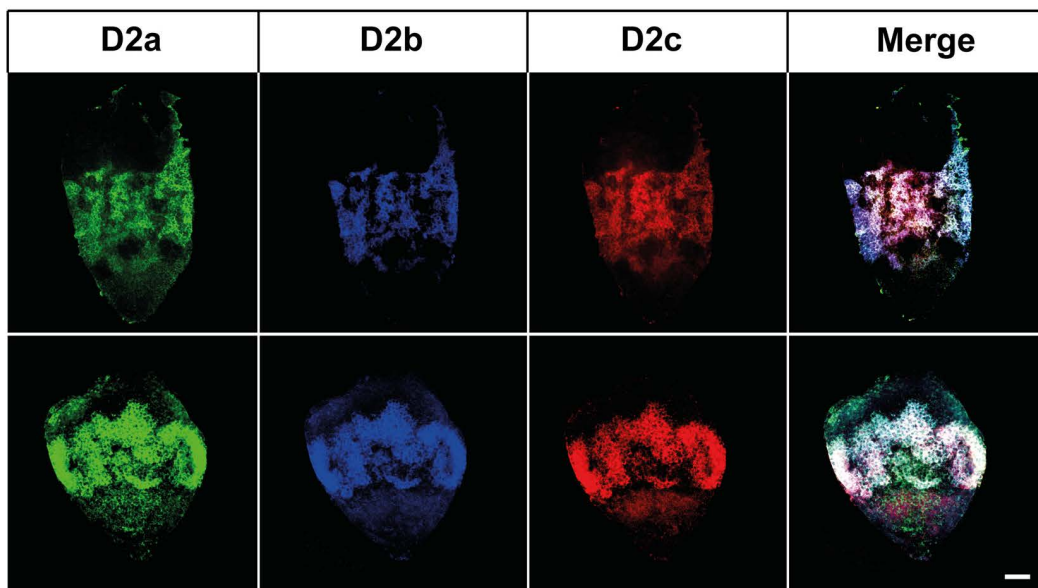


**Figure 4.** Differential expression of the three subtypes of D2-R transcripts in adult zebrafish brain demonstrates specificity of the probes: Transverse brain section (dorsal to the top) at the hypothalamic level stained by three-color FISH for D2a (green) D2b (blue) and D2c (red) receptor transcripts. The three cRNA probes recognize distinct, although partially overlapping, cell populations of the ventral diencephalon and hypothalamus. Note that only D2a probe labels the preglomerular nucleus (PG; marked with a round spot). D2a and D2c probes (but not D2b probe) label the dorsal zone of periventricular hypothalamus (Hd; marked by an asterisk). Finally, D2a and D2b probes (but not D2c probe) label the ventral hypothalamus (Hv; marked by an arrowhead). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .

a GnRHa on the zebrafish gonadotrope axis in sexually regressed females. We showed that although treatment of these females with either GnRH or Domp alone was unable to stimulate the gonadotrope axis, the combined treatment (Domp + GnRHa) was able to trigger an elevation in *lh $\beta$*  expression, leaving unchanged *fsh $\beta$*  expression. We also showed that the same combined treatment induced a marked increase in the ovary weight and therefore in the GSI. Moreover, in the ovaries of control regressed females, but also of GnRHa- or Domp-treated females, all oocytes were arrested at stage II. By contrast, in the ovaries of females who received the combined treatment, an induction of vitellogenesis was observed, as shown by the numerous oocytes containing yolk, thus undergoing exogenous vitellogenesis (47). Exogenous vitellogenesis is a gonadotropin-regulated process, as demon-

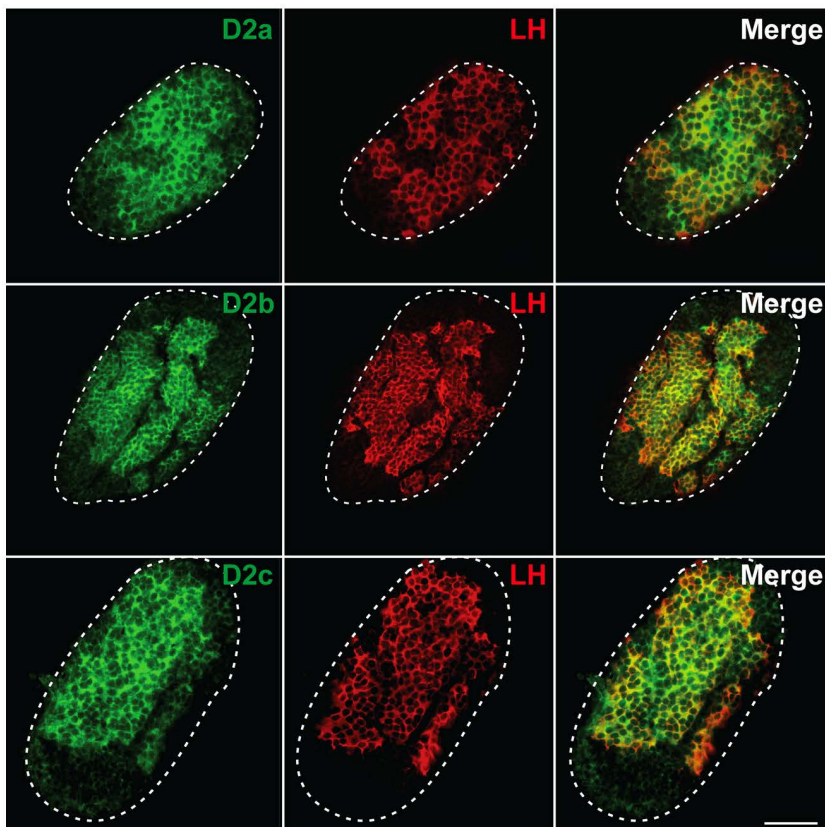
strated previously in the trout (48) and other teleosts. Thus, the combined treatment specifically activated the pituitary-gonadal axis, stimulating both LH synthesis and release and, consequently, vitellogenin production and incorporation.

All together, these results show that, in the old female zebrafish, the removal of the inhibition exerted by DA on LH cells is required for triggering GnRHa-stimulated LH synthesis and release, and for reactivating ovarian function. This is, to our knowledge, the first evidence of the existence of a dopaminergic inhibitory control on LH cells in this teleostean species. Indeed, the blockade of dopaminergic inhibition alone was not sufficient to increase *lh $\beta$*  expression in a significant manner, showing that in old females, the dopaminergic inhibition is accompanied with a deficient production of GnRH. The central involvement



**Figure 5.** The three D2-R subtype of transcripts largely colocalize in sexually regressed (top panels) and in adult cycling (bottom panels) female pituitary: Projection of confocal z stacks of pituitary gland (anterior to the top) stained by three-color FISH for D2a (green), D2b (blue), and D2c (red) D2-R transcripts. The three transcripts are expressed in the gland and the central part or PPD exhibits the greatest labeling intensity. (a, anterior; p, posterior.) In the PPD, no difference could be observed for D2-Rs expression between adult cycling and sexually regressed females. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .





**Figure 6.** Coexpression of D2a, D2b, and D2c receptor transcripts and LH $\beta$ : Projections of confocal z stacks of adult cycling female pituitary. Single FISH for D2-Rs (green) combined with immunofluorescent staining for LH $\beta$  (red) showing an overall colocalization between each of the three D2-R subtypes and LH-producing cells. The dotted lines indicate the shape of the whole pituitary. Scale bar: 50  $\mu$ m.

of GnRH in the regulation of LH secretion has been established functionally in all orders of teleosts (for review, see Ref. 49). Yet, in zebrafish the information on GnRH regulation of gonadotropin subunit genes is limited. Recent *in vitro* studies showed that treatment of zebrafish pituitary cells with salmon GnRH for 72 h had no effect on *fsb $\beta$*  or *gh* expression, while significantly stimulating *lh $\beta$*  expression in a dose-dependent manner (39). We similarly show herein that *in vivo*, in old zebrafish females, GnRH $\alpha$  is able to trigger a significant increase in *lh $\beta$*  expression associated with an ovarian activation, with no change in *fsb $\beta$*  expression, but only when the dopaminergic blockade was removed.

DA effects on LH synthesis have been investigated in a few species. An inhibitory action of DA on *lh* mRNAs was shown only *in vitro* in cultured pituitary cells from prepubertal grass carp (50). In contrast, in cultured pituitary cells from adult tilapia (51) or when administered *in vivo* in adult male striped bass (52), DA had no effect on *lh $\beta$*  transcript levels. We report here an *in vivo* inhibitory effect of DA on *lh $\beta$*  mRNA synthesis in sexually regressed female zebrafish. Moreover, an inhibitory effect of DA on *lh $\beta$*

mRNA synthesis was shown herein in 4-month-old cycling females who received the same combined treatment, although no apparent change was detected at the ovary level. Actually, in control regressed females the GSI values were low ( $6.9 \pm .8\%$ ), and the ovaries contained only stage I and II oocytes; the combined treatment conspicuously reactivated the ovary. By contrast, control cycling females exhibited already elevated GSI values ( $13.5 \pm .9\%$ , in the same range as those found after treatment in regressed females) because asynchronous ovaries contain oocytes at all stages of maturation. This may explain why, in cycling females, treatments fail to induce an additional ovarian stimulation. Nevertheless, the increase in *lh $\beta$*  expression observed in these females after the combined treatment together with the constant dopaminergic innervation of LH cells and expression of the three D2-Rs revealed that the role of DA in the control of LH secretion is not restricted to the ageing period but may also be of importance during the spawning cycles. Additional experiments are needed to clarify the role of DA in the regulation of the LH preovulatory surge and its potential modulation by sex steroids.

It thus appears that, in zebrafish, DA may exert a powerful inhibitory effect capable of opposing the stimulatory action of GnRH on LH production and that, in this species, there is indeed a dual neuroendocrine control of reproduction. On that matter, the zebrafish is similar to other cyprinids, and our results are in keeping with what was discovered initially in goldfish (for reviews, see Refs. 1, 46), then in carp and loach (37), in which this inhibitory control of reproduction is powerful. Based on these data, cyprinid fish aquaculture currently uses coadministration of antagonists of D2-Rs together with GnRH $\alpha$  to induce ovulation and spawning (53).

**Innervation of the gonadotrope cells by DA neurons**

Teleost fish have no hypothalamo-pituitary portal system, and the neurohormones originating from the preoptic/hypothalamic region and controlling the activity of the different pituitary cell types are released directly by nerve

endings located near their target cells. Moreover, in the anterior pituitary, the cells of a given type are generally grouped together in a defined region of the gland, which is not the case in mammals (43). To get a morphological evidence of the dopaminergic control upon gonadotrope function in zebrafish, we studied the dopaminergic innervation of the pituitary with a specific focus on LH-producing cells, in sexually regressed and in adult cycling females. In both cases, we could show that numerous TH-ir fibers terminate in the PPD of female zebrafish pituitary, near LH $\beta$ -producing gonadotrope cells, without obvious changes in the innervation density with ageing. Although TH is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of both DA and noradrenaline (54), noradrenergic cell bodies are not found in the zebrafish forebrain or midbrain, and thus all TH-ir cells in these regions are dopaminergic (55). Our results agree well with previous data obtained in other studied teleosts showing a direct dopaminergic innervation of gonadotrope cells, using immunohistochemical detection of TH or DA (in goldfish, see Ref. 11, 56; in trout, see Ref. 12; in European eel, see Ref. 9; in Senegalese sole, see Ref. 57), and further support an integral role for DA in the neuroendocrine regulation of gonadotrope function in zebrafish.

The precise origin of the TH-ir fibers innervating gonadotrope cells in zebrafish is unknown. Previous studies in other teleosts, combining neural tract tracing and TH immunocytochemistry, have demonstrated that the major dopaminergic innervation of the pituitary originates from a subset of neurons in the anteroventral part of the preoptic area (differently named by the authors, see Refs. 3, 11, 58, 59). Additional studies are needed in zebrafish to selectively trace the fibers terminating in the LH-producing cells to determine which hypophysiotrophic DA cell group(s) control their functions.

Our anatomical data support the classical idea that DA acts directly at the level of gonadotropes through D2-R to inhibit LH secretion. The molecular mechanisms by which DA may interact with GnRH in this regulation have been extensively studied in goldfish and tilapia (for reviews, see Refs. 46, 60, 61).

### Three DA D2-R subtypes in the zebrafish

Pharmacological studies in various teleost species showed that dopaminergic actions on LH release are mediated by receptors of the D2 type (for review, see Ref. 4). In mammals and birds, only one D2-R gene encodes two proteic isoforms (D2s and D2l), generated by an alternative splicing (16, 62). On the other hand, in teleosts such as zebrafish (19), European eel (17), and goldfish (18) several genes encoding D2-R were found. Full sequencing of some teleost genomes gradually lengthens the list of the

species expressing at least two subtypes of D2 receptors (stickleback, medaka, tetraodon), although the physiological role of these multiple receptors has not yet been studied. In zebrafish, the three genes D2a-R, D2b-R, and D2c-R (19) result probably from the event of genome duplication, which took place at the basis of the teleost lineage (whole genome duplication three) (63, 64) and of an additional gene duplication specific to the zebrafish. To study the role of these multiple D2-Rs related to gonadotrope cells function, we used probes whose specificity was demonstrated by the differences in the distribution of the three subtypes of D2-R transcripts on brain sections of adult zebrafish. For example, in a region such as the hypothalamus, the nuclei labeled by our D2-R probes (Hd, Hv, and PG) have been described previously as expressing D2-Rs in other teleosts (65, 66). Moreover, within the same region, the three subtypes of transcripts were mostly expressed by different cells. These results are in agreement with the observations of Boehmler et al (19), who showed that in the embryonic nervous system the transcripts of the three genes presented different, although partially “overlapping,” expression patterns.

### Pituitary expression of the three D2-R subtypes in the zebrafish

The study of the localization of the D2-R transcripts in the pituitary gland, using three-color FISH, showed that the three subtypes were all strongly expressed and largely colocalized in the PPD, either in sexually regressed or in cycling females. The PPD is known to mainly contain gonadotrope cells (LH and FSH cells), as well as thyrotrope (TSH), and somatotrope (GH) cells. This distribution pattern is in agreement with earlier studies on D2-R expression in the PPD of other teleosts (in goldfish, see Ref. 36; in trout, see Ref. 13, 66; in European eel, see Ref. 17). In cycling females, we found some expression of the three D2-R transcripts in the RPD, known to contain lactotrope (prolactin) and corticotrope (ACTH) cells. The presence of D2-R transcripts in the RPD was also observed in the trout (66). Finally, the PI, located in the caudal region of the gland and which contains mainly melanotropes ( $\alpha$ -MSH-expressing) cells, also weakly expressed the three subtypes of D2-R. The presence of D2-R transcripts in the PI is in line with results of previous studies in fish (66, 67) and mammals (68, 69), in which the secretion of  $\alpha$ -MSH is similarly regulated by DA.

### Expression of the three D2-Rs by LH-producing cells

As we observed a large colocalization of the three D2-R transcripts in the PPD, we further examined which of the three subtypes of D2-R was expressed by LH-producing

cells and potentially involved in the inhibitory control of gonadotrope function by DA. The coupled detection of one subtype of D2-R transcript and of LH $\beta$  on the same pituitary gland revealed that, in female zebrafish, most of the cells producing LH express the three subtypes of D2-R. Therefore, they may all be potentially involved in the inhibitory control by DA.

Sequence alignment of the three deduced proteins (19) shows that a major difference between the subtypes of D2-R lies within the third intracellular loop, that is involved in G-protein coupling, regulatory interactions with other signaling molecules, and subcellular localization of the receptors. We can thus hypothesize that the activation of the three subtypes of D2-R expressed by LH cells may lead to a differential activation of intracellular signaling pathways.

In conclusion, current data demonstrate the existence in zebrafish of a dual neuroendocrine control of the gonadotrope function: on old females who have ceased cycling, we showed that the blockade of an endogenous DA inhibitory system allowed GnRH $\alpha$  to stimulate the pituitary expression of LH $\beta$  and reactivate ovarian function. These results revealed that in zebrafish DA represents a powerful counterpart to the well-known stimulating role of GnRH in the neuroendocrine regulation of the reproductive function. We demonstrated the existence of a dense dopaminergic innervation of LH-producing cells, providing the morphological basis of this control. In addition, we showed that the three subtypes of zebrafish D2-Rs were expressed in LH-producing cells, suggesting that they all may be involved in mediating this inhibition. Collectively, these physiological and anatomical findings support the existence of a direct and potent DA inhibitory tone regulating female gonadotrope function and reproduction in zebrafish.

## Acknowledgments

We thank Sebastien Bedu responsible for the zebrafish facility. We also thank Drs. Jean-Yves Sire and Hervé Tostivint for the gift of animals and Drs. Laure Bally-Cuif and Michaël Demarque for helpful discussions.

Address all correspondence and requests for reprints to: C. Pasqualini, Neurobiologie and Développement, Unité Propre de Recherche 3294, Institut de Neurobiologie A. Fessard, Bat 5E, Centre National de la Recherche Scientifique, Avenue de la Terrasse 91198, Gif sur Yvette Cédex, France. E-mail: Pasqualini@inaf.cnrs-gif.fr.

This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche funding (to S.D. and C.P.) (PUBERTEEL no. 08-BLAN-0173); PhD fellowship from the Neuropôle de Recherche Fran-

cais (to R.F.); Seventh FP European Zf-Health (to P.V.); the Centre National de la Recherche Scientifique; and the Museum National d'Histoire Naturelle.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

1. Peter RE, Crim LW, Goos HJ, Crim JW. Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *Gen Comp Endocrinol.* 1978;35:391–401.
2. Chang JP, Peter RE. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology.* 1983;36:351–357.
3. Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology.* 1987;45:451–458.
4. Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol.* 2010;76:129–160.
5. Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B, Rosenfeld H. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol.* 2005;142:212–221.
6. Saligaut C, Linard B, Breton B, et al. Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture.* 1999;177:13–20.
7. Copeland PA, Thomas P. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol.* 1989;74:474–483.
8. Dufour S, Lopez E, Le Menn F, Le Belle N, Baloché S, Fontaine YA. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen Comp Endocrinol.* 1988;70:20–30.
9. Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, et al. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod.* 2004;71:1491–1500.
10. Kah O, Chambolle P, Thibault J, Geffard M. Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. *Neurosci Lett.* 1984;48:293–298.
11. Kah O, Dubourg P, Onteniente B, Geffard M, Calas A. The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell Tissue Res.* 1986;244:577–582.
12. Anglade I, Zandbergen T, Kah O. Origin of the pituitary innervations in the goldfish. *Cell Tissue Res.* 1993;273:345–355.
13. Linard B, Anglade I, Corio M, et al. Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology.* 1996;63:156–165.
14. Weltzien FA, Pasqualini C, Sebert ME, et al. Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology.* 2006;147:2964–2973.
15. Chang JP, Peter RE, Crim LW. Effects of dopamine and apomorphine on gonadotropin release from the transplanted pars distalis in goldfish. *Gen Comp Endocrinol.* 1984;55:347–350.
16. Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature.* 1989;342:923–926.
17. Pasqualini C, Weltzien FA, Vidal B, et al. Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tis-



- sue-specific transcription, and regulation by sex steroids. *Endocrinology*. 2009;150:1377–1392.
18. Popesku JT, Navarro-Martin L, Trudeau VL. Evidence for alternative splicing of a dopamine D2 receptor in a teleost. *Physiol Biochem Zool*. 2011;84:135–146.
  19. Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn*. 2004;230:481–493.
  20. Jagadeeswaran P. Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2005;12:149–152.
  21. Berghmans S, Jette C, Langenau D, et al. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques*. 2005;39:227–237.
  22. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:35–44.
  23. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*. 2005;86:6–19.
  24. Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2008;15:394–404.
  25. Ankley GT, Johnson RD. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR J*. 2004;45:469–483.
  26. Segner H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009;149:187–195.
  27. McGonnell IM, Fowkes RC. Fishing for gene function—endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol*. 2006;189:425–439.
  28. Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*. 2006;39:262–274.
  29. Lessman CA. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries 2011. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011;93:268–280.
  30. Kah O, Pellegrini E, Mouriec K, et al. Oestrogens and neurogenesis: new functions for an old hormone. Lessons from the zebrafish. *J Soc Biol*. 2009;203:29–38.
  31. Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, et al. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod*. 2002;66:1881–1892.
  32. Palevitch O, Kight K, Abraham E, Wray S, Zohar Y, Gothilf Y. Ontogeny of the GnRH systems in zebrafish brain: in situ hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. *Cell Tissue Res*. 2007;327:313–322.
  33. Steven C, Lehnen N, Kight K, et al. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *Gen Comp Endocrinol*. 2003;133:27–37.
  34. Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol Reprod*. 2008;79:776–786.
  35. Abraham E, Palevitch O, Gothilf Y, Zohar Y. Targeted gonadotropin-releasing hormone-3 neuron ablation in zebrafish: effects on neurogenesis, neuronal migration, and reproduction. *Endocrinology*. 2010;332–340.
  36. Sloley BD, Trudeau VL, Dulka JG, Peter RE. Selective depletion of dopamine in the goldfish pituitary caused by domperidone. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69:776–781.
  37. Lin HR, Van der Kraak G, Zhou XJ, et al. Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. *Gen Comp Endocrinol*. 1988;69:31–40.
  38. Weltzien FA, Pasqualini C, Vernier P, Dufour S. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *Gen Comp Endocrinol*. 2005;142:134–142.
  39. Lin SW, Ge W. Differential regulation of gonadotropins (FSH and LH) and growth hormone (GH) by neuroendocrine, endocrine, and paracrine factors in the zebrafish—an in vitro approach. *Gen Comp Endocrinol*. 2009;160:183–193.
  40. Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates: New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43:394–402.
  41. Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA. Development of a heterologous radioimmunoassay for eel (*Anguilla anguilla*) gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol*. 1983;49:404–413.
  42. Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*. 2008;3:59–69.
  43. Ball JN. Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians, and reptiles. *Gen Comp Endocrinol*. 1981;44:135–170.
  44. Pasqualini C, Vidal B, Le Belle N, et al. An antagonist to GnRH in the control of reproduction in teleost fish: dopaminergic inhibition. Ancestral origin and differential conservation within vertebrates? *J Soc Biol*. 2004;198:61–67.
  45. Dufour S, Weltzien F, Sebert M, et al. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1040:9–21.
  46. Popesku JT, Martyniuk CJ, Mennigen J, et al. The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;293:43–56.
  47. Selman K, Wallace R, Sarka A, Qi X. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Morphol*. 1993;218:203–224.
  48. Tyler CR, Sumpter JP, Kawachi H, Swanson P. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol*. 1991;84:291–299.
  49. Zohar Y, Munoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2010;165:438–455.
  50. Wang X, Zhao T, Wei H, Zhou H. Regulation of dopamine D2 receptor expression in grass carp pituitary cells: a possible mechanism for dopaminergic modification of luteinizing hormone synthesis. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;173:48–55.
  51. Melamed P, Gur G, Elizur A, et al. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin II beta subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology*. 1996;64:320–328.
  52. Hassin S, Holland MC, Zohar Y. Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. *Biol Reprod*. 2000;63:1691–1697.
  53. Yaron Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning in the carp. *Aquaculture*. 1995;129:49–73.
  54. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine Hydroxylase. the Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem*. 1964;239:2910–2917.
  55. Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001;440:342–377.
  56. Kah O, Dubourg P, Chambolle P, Calas A. Ultrastructural identification of catecholaminergic fibers in the goldfish pituitary. A high-resolution radioautographic study after in vitro <sup>3</sup>H-dopamine administration. *Cell Tissue Res*. 1984;238:621–626.
  57. Rodriguez-Gómez F, Rendón-Unceta M, Sarasquete C, Muñoz-Cueto J. Localization of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in

- the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J Chem Neuroanat*. 2000;19:17–32.
58. Holmqvist BI, Ekstrom P. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonpeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat*. 1995;8:125–145.
  59. Johnston SA, Maler L. Anatomical organization of the hypophysiotrophic systems in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol*. 1992;317:421–437.
  60. Chang JP, Johnson JD, Sawisky GR, et al. Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts—studies on the goldfish model. *Gen Comp Endocrinol*. 2009;161:42–52.
  61. Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B. Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol*. 2003;225:131–185.
  62. Monsma FJ Jr, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*. 1989;342:926–929.
  63. Christoffels A, Koh EG, Chia JM, Brenner S, Aparicio S, Venkatesh B. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol*. 2004;21:1146–1151.
  64. Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Van de Peer Y. Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1638–1643.
  65. O'Connell LA, Fontenot MR, Hofmann HA. Characterization of the dopaminergic system in the brain of an African cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *J Comp Neurol*. 2011;519:75–92.
  66. Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferriere F, Saligaut C, Kah O. Distribution of dopamine D2 receptor mRNAs in the brain and the pituitary of female rainbow trout: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 2003;458:32–45.
  67. Omeljaniuk RJ, Tonon MC, Peter RE. Dopamine inhibition of gonadotropin and alpha-melanocyte-stimulating hormone release in vitro from the pituitary of the goldfish (*Carassius auratus*). *Gen Comp Endocrinol*. 1989;74:451–467.
  68. Chen CL, Dionne FT, Roberts JL. Regulation of the pro-opiomelanocortin mRNA levels in rat pituitary by dopaminergic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:2211–2215.
  69. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ Jr, Civelli O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:7625–7628.



Members can search for endocrinology conferences,  
meetings and webinars on the **Worldwide Events Calendar**.

[www.endo-society.org/calendar](http://www.endo-society.org/calendar)



SUPPLEMENTAL FIGURE 1

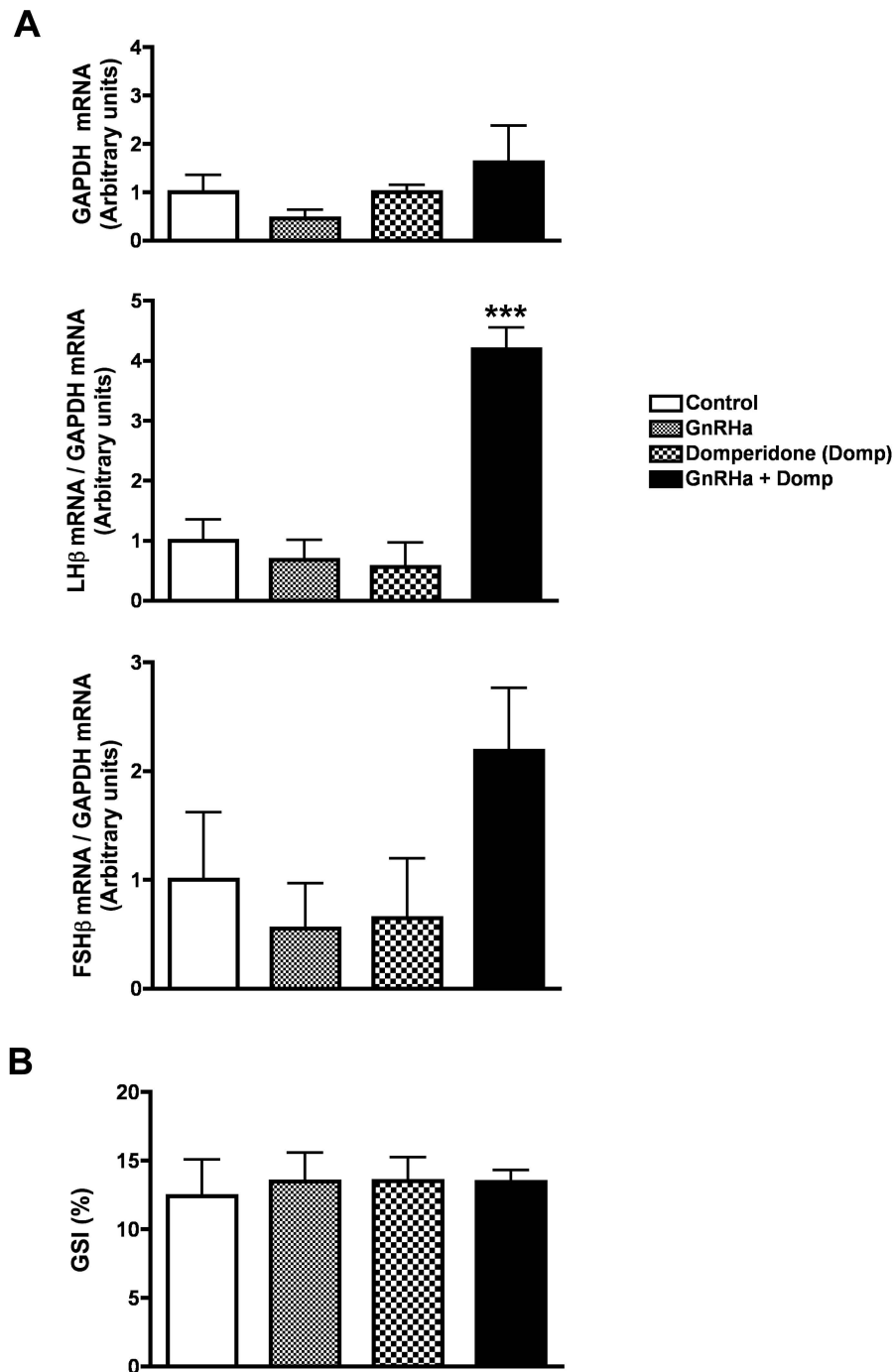


Figure 1: A- Pituitary transcript levels of gonadotropins  $\beta$ -subunits in 4-month cycling females following in vivo treatment with diluent (control), a GnRH agonist (GnRH $\alpha$ ), a dopamine D2-R antagonist domperidone (Domp), or a combination of both (GnRH $\alpha$ +Domp). The amounts of Lh $\beta$  and Fsh $\beta$  mRNAs in each sample were quantified by real time RT-PCR, and normalized to the amount of Gapdh (the reference gene) mRNAs contained in the same sample. The mean control values were set to 100% (or 1), and each treated animal value has been calculated as a percentage of the control value. All data presented are expressed as means  $\pm$  SEM (n=6). Asterisks indicate a significant difference from control group (\*\*\*P < 0.001, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). B- Gonadosomatic index (GSI) in 4-month cycling females following in vivo treatment with diluent (control), GnRH $\alpha$ , domperidone, or a combination of both (GnRH $\alpha$ +Domp).

## SUPPLEMENTAL FIGURE 2

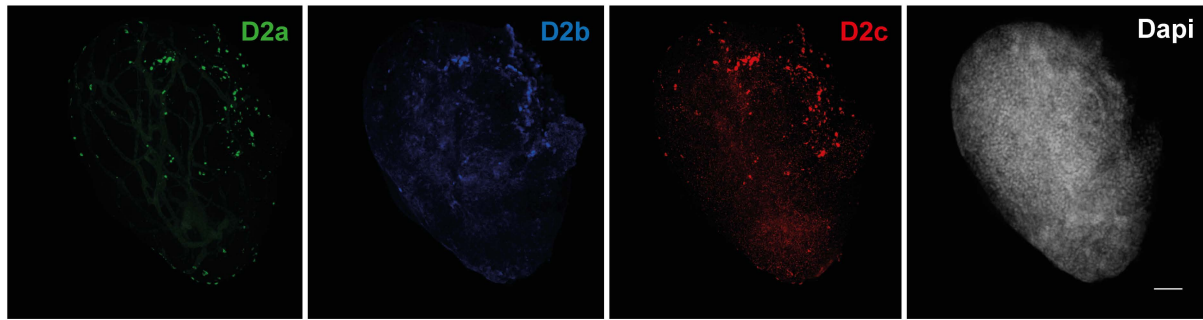


Figure 2: Negative controls of fluorescent in situ hybridisation for zebrafish D2-Rs in the pituitary: Projection of confocal z stacks of pituitary gland stained by three-color fluorescent ISH for D2a (green) D2b (blue) and D2c (red) DA receptors, using sense probes: The sense D2a, D2b, and D2c probes demonstrated no hybridization to the pituitary. Dapi staining indicates the shape of the whole pituitary.

## SUPPLEMENTAL TABLE 1. List of primers used for cloning dopamine D2 receptor genes

Gene	Forward primer	Reverse primer	Ta (°C)	Expected size	Accession#	Location
D2a	<sup>-24</sup> GGTCTAGGGTCTCAGCTT <sup>-15</sup>	<sup>1772</sup> CACCCATACACAGTAATGTTATG <sup>1749</sup>	61.1	1806bp	NM_183068	chr 15
D2b	<sup>-15</sup> CAGAGGATCTTCATCATGCCT <sup>6</sup>	<sup>1320</sup> GTG TGT TCA ACA GTG CAG GAT CTT GAT <sup>1294</sup>	61.1	1335bp	NM_197935 (D2like in NCBI)	chr 16
D2c	<sup>-11</sup> GGC CAC AGC TCA TGG ATT TC <sup>9</sup>	<sup>1303</sup> ATC CTC AGC AGT GCA ATA TC <sup>1284</sup>	57	1374bp	NM_197936 (D2b in NCBI)	chr 5

\* Nucleotide +1 is the A of the ATG codon for the initiating methionine

## SUPPLEMENTAL TABLE 2. Percentage of shared nucleotide identity of the D2-R probes

	D2b	D2c
D2a	67.5	72.5
D2b	-	67.4

## 2. ARTICLE 2. LES NEURONES DOPAMINERGIQUES INHIBITEURS DE LA FONCTION GONADOTROPE : ETUDES ANATOMIQUES ET DEVELOPPEMENTALES

### Résumé :

Nous avons récemment démontré qu'il existait un contrôle dopaminergique inhibiteur de la fonction de reproduction chez le poisson-zèbre, et qu'il pouvait être puissant chez les femelles âgées. Nous avons alors mis en évidence de nombreuses terminaisons dopaminergiques aboutissant sur l'antéhypophyse et en particulier sur - ou à proximité- des cellules gonadotropes à LH.

Nous avons donc dans la présente étude cherché à localiser les corps cellulaires des neurones dopaminergiques émettant ces projections, par des expériences de traçage rétrograde basées sur l'injection de microcristaux de Dil dans l'hypophyse de poissons adultes. Une immunofluorescence (IF) de la tyrosine hydroxylase (TH) après la migration du Dil, nous a permis de déterminer que les neurones dopaminergiques projetant vers l'hypophyse sont originaires de la partie la plus antéro-ventrale de l'aire préoptique. Nous avons appelé ces neurones hypophysiotropes: les neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires (POHDA).

Nous avons ensuite étudié le développement des neurones POHDA et nous l'avons comparé avec celui des neurones dopaminergiques du noyau suprachiasmatique (SCDA) voisin. Grâce à des repères anatomiques précoces, nous avons pu suivre le développement embryonnaire de ces deux populations et déterminer que les neurones POHDA sont les derniers à se différencier (à partir de 72hpf), comparés à toutes les autres populations dopaminergiques du cerveau antérieur, et qu'ils ont de ce fait jusque-là été exclus de toutes les études de développement. En outre, nous avons montré que contrairement à celui des neurones SCDA qui reste constant tout au long de la vie du poisson-zèbre, le nombre des neurones POHDA continue d'augmenter tant que le poisson continue à grandir, et ce probablement grâce à une neurogenèse active. Nous avons aussi observé que cette augmentation est corrélée à la taille du poisson.

Enfin, l'étude des profils d'expression de plusieurs gènes connus pour être impliqués dans le développement d'autres neurones dopaminergiques ou de neurones neuroendocrines ou encore pour être exprimés dans la région préoptique, en utilisant l'hybridation *in situ* fluorescente combinée avec une IF de la TH, a indiqué que les réseaux

## Chapitre 2 : Résultats

généétiques impliqués dans le développement des deux populations sont au moins en partie différents. Cette étude a aussi mis en évidence que le réseau génétique impliqué dans le codage des neurones POHDA est différent de ce qui a été décrit pour les autres neurones neuroendocrines ou dopaminergiques.

Ce travail décrit donc l'anatomie du système dopaminergique préoptico-hypophysaire chez le poisson-zèbre adulte et sa mise en place au cours du développement. Il apporte en outre les premières données génétiques sur le développement de ce groupe de neurones mal connu qui exerce un puissant effet inhibiteur sur la sécrétion des gonadotropines et probablement aussi un contrôle sur la sécrétion des autres hormones antéhypophysaires.

### Techniques utilisées :

- Traçage rétrograde des neurones hypophysiotropes par l'injection de DiI dans l'hypophyse de poissons-zèbre adultes
- Immunofluorescence de la TH pour localiser les corps cellulaires et les fibres des neurones dopaminergiques dans le cerveau du poisson-zèbre et ce à différents stades : adulte, 1 mois, 15, 7, 4, 3 et 2 dpf.
- Incorporation de BrdU pour rechercher une éventuelle neurogenèse après la période embryonnaire au sein de la population dopaminergique étudiée.
- Hybridation *in situ* fluorescente de la prolactine pour repérer l'hypophyse chez l'embryon de poisson-zèbre bien avant l'expression de la *lh* et de la *fsH*.
- Hybridation *in situ* fluorescente de plusieurs facteurs de transcription pour étudier le réseau génétique impliqué dans la différenciation des neurones dopaminergiques neuroendocrines à différents stades de développement, sur des individus de 48, 72, 84 et 96 hpf, et 1 mois.
- Génotypage et analyse des mutants *otpa*<sup>-/-</sup> et *otpb*<sup>-/-</sup> pour étudier le rôle de ces facteurs de transcription dans la différenciation des neurones étudiés.

## **The Dopaminergic Neurons Controlling Anterior Pituitary Functions: Anatomy and Ontogenesis in Zebrafish**

Authors: Romain Fontaine<sup>1</sup>, Pierre Affaticati<sup>1</sup>, Charlotte Bureau<sup>1</sup>, Ingrid Colin<sup>1</sup>, Michaël Demarque<sup>1</sup>, Sylvie Dufour<sup>2</sup>, Philippe Vernier<sup>1</sup>, Kei Yamamoto<sup>1\*</sup>, and Catherine Pasqualini<sup>1\*</sup>

1. CNRS, UPR 3294, Neurobiologie et Développement, Ave de la Terrasse, bat 5E, Gif-sur-Yvette, 91190 Cedex

2. Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, UMR BOREA, MNHN-CNRS7208-IRD207- UPMC-UCBN, 7 rue Cuvier, CP 32, 75231 Paris Cedex 05, France

Corresponding author, \* to whom reprint requests should be addressed: C. Pasqualini  
« Neurobiologie & Développement », UPR 3294, Institut de Neurobiologie A. Fessard, Bat  
5<sup>E</sup> CNRS, Ave de la Terrasse 91198, Gif sur Yvette Cédex, France ;

[Pasqualini@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:Pasqualini@inaf.cnrs-gif.fr)

Tel: +33 (0) 1 69 82 42 86, Fax : +33 (0)1 69 82 42 67

KEY WORDS : Dopaminergic neurons, reproduction, ontogenesis, zebrafish, foxg1, dlx2a, nr4a2, otp, preoptic, neuroendocrine cells, neural differentiation, adult neurogenesis.

GRANTS: PhD fellowship from the Neuropôle de Recherche Francilien to RF.

## Abstract

Dopaminergic (DA) neurons located in the preoptico-hypothalamic region of the brain exert a major neuroendocrine control on reproduction, growth and homeostasis by regulating the secretion of anterior pituitary (or adenohypophysis) hormones. Here, using retrograde tract tracing experiments, we precisely identified the neurons playing this role in the zebrafish as a model. The DA cells projecting directly to the anterior pituitary are localized in the most anteroventral part of the preoptic area, and we named them preoptico-hypophyseal (POH) DA neurons. During development, these neurons do not appear before 72 hpf and are the last DA neurons to differentiate. We also found that the number of neurons in this cell population continues to increase all life-long, proportionally to the growth of the fish. BrdU incorporation analysis suggested that this increase is due to continuous neurogenesis and not due to a phenotypic, plastic change in already existing neurons. Finally, gene expression analysis (e.g. *otp*, *nr4a2*) showed that the gene network involved in their differentiation is distinct from that of other dopaminergic cell populations. This study identified the neurons giving rise to the neuroendocrine DA system in zebrafish, providing the morphological support for the effects of DA on the secretion of anterior pituitary hormones. In addition, it demonstrates that these cells develop as an independent DA cell population in the brain. It also offers some insights into the regional identity of the preoptic area and provides the first genetic bases for functional studies on the development of the POHDA neurons.

## Introduction

Dopamine (DA), a neurotransmitter acting in the central nervous system of vertebrates, is known to control a variety of physiological functions including motor programming, reward-related behavior, vision, learning, memory, and emotions (for review, Bjorklund and Dunnett, 2007). DA also represents the only nonpeptidergic agent exhibiting well-defined hypophysiotropic functions: DA regulates the secretion of anterior pituitary hormones, such as prolactin (PRL), growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH) and melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH; for review, Tuomisto and Mannisto, 1985). In addition, in some vertebrate species, DA exerts an inhibitory control on pituitary gonadotrope cells, counteracting the stimulatory effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on gonadotropin release and reproductive function. Such a dual neuroendocrine control of reproduction by GnRH and DA was first demonstrated in teleosts (Peter et al., 1978; Chang and Peter, 1983; Kah et al., 1987), but similar dopaminergic action in the control of reproduction has been shown in several species in various classes of vertebrates: amphibians (Sotowska-Brochocka et al., 1994), birds (Sharp et al., 1989; Contijoch et al., 1992) and mammals (Huseman et al., 1980; Lacau-Mengido et al., 1993; Thiery et al., 1995; Liu and Herbison, 2012). However, the intensity of DA inhibition largely differs among vertebrate classes as well as within each class.

The zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a powerful model to study the development of DA systems and their physiology (Rink and Wullimann, 2002; Schweitzer and Driever, 2009). We recently demonstrated that DA exerts a potent inhibitory control upon female gonadotrope function in zebrafish (Fontaine et al., 2013). The presence of numerous fibers immunolabeled for tyrosine hydroxylase (THir), the rate-limiting enzyme of the catecholamine synthetic pathway, has been observed in the *proximalis pars distalis* (PPD) of the female zebrafish pituitary, suggesting that a direct dopaminergic innervation

may control the secretion of LH $\beta$  from gonadotrope cells (Fontaine et al., 2013). Unlike amniotes, teleosts do not have hypothalamo-pituitary portal system, and the pituitary target cells are directly innervated by the neuroendocrine nerve terminals (Ball, 1981).

Previous neuroanatomical investigations in other teleosts (goldfish: Kah et al., 1986; Kah et al., 1987; electric fish: Johnston and Maler, 1992; atlantic salmon: Holmqvist and Ekstrom, 1995, trout: Linard et al., 1996, and European eel: Vidal et al., 2004; Weltzien et al., 2006), have demonstrated that the major dopaminergic innervation of the pituitary originates from a subset of neurons in the antero-ventral part of the preoptic area. However, the precise location of the DA neurons that project onto the anterior pituitary gland remained so far unknown in zebrafish and the embryonic development of this DA neuroendocrine system had never been described.

Here we identified the DA neurons projecting to the pituitary gland, providing a morphological support for the DA actions on the anterior pituitary hormone secretion in zebrafish. We showed that this neuroendocrine population possesses developmental peculiarities as compared to other DA populations, and displays neurogenesis even during adulthood. Our findings also offer some insights into the regional identity of the preoptic area in zebrafish.



## Materials and Methods

**Animals.** AB strain zebrafish (*Danio rerio*) and *otpa*<sup>m866/m886</sup> (Ryu et al., 2007) and *otpb*<sup>sa115/sa115</sup> (obtained from Sanger Zebrafish Mutation Project) mutants were maintained at 28°C on a 14/10 hour light/dark cycle and fed once a day. Embryos and larvae were raised at 28 °C until 7dpf in embryo medium (EM), and then in fish water. Developmental stages used are described by Kimmel et al. 1995. The genotype of *otp* alleles was determined by genomic PCR as described in Fernandes et al. 2013. Animal manipulations were performed according to the recommendations of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators (CP, SD).

**TH Immunofluorescence.** We used TH-immunoreactivity as a marker for DA neurons because all catecholaminergic neurons in the forebrain and midbrain are considered to be dopaminergic in all the species studied (Smeets and Reiner, 1994). We used a mouse antibody anti-TH (1:500; MAB318 Millipore) whose specificity was previously validated in zebrafish (Yamamoto et al., 2010), and shown to mostly recognizes TH1. Immunofluorescent staining (IF) was performed onto free-floating vibratome (VT1000S Leica, Germany)-sectioned brains (60 µm) embedded in 3% agarose, as described previously (Fontaine et al., 2013). After incubation with a secondary goat anti-mouse antibody coupled to AlexaFluor 488 (A11001 Invitrogen) or to Cy (Cy3: 115,165,044; Cy5: 115,175,003 Jackson laboratories) at a concentration of 1:1000, tissues were treated for nuclei staining with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride - 32670 Sigma) at a titer of 1/1000.

**Dil Retrograde tracing.** Nine-month old cycling females were sacrificed with an overdose of MS-222. The skull was opened to facilitate the brain fixation in 4% paraformaldehyde (PFA;15710 Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) in phosphate buffer saline (PBS) overnight at 4°C. Since the pituitary stalk of zebrafish is

extremely fragile, the pituitary was exposed from the ventral side by removing the ventral jaw and the surrounding tissues. A small hole was made in the PPD and a microcrystal of DiI (1,1'-Dilinoleyl-3,3,3',3' tetramethylindocarbocyanine perchlorate, FAST DiI™ oil ; D-3899 Invitrogen-Molecular Probes) was implanted. Tissues were then incubated in PBS during 8-10 days in the dark at 37°C for allowing dye migration. Brains were then dissected and processed to make sagittal or frontal sections of 60 µm thickness.

***BrdU incorporation experiments.*** One- and three- month old female fish were incubated in 1mM BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine; B5002 SIGMA) diluted in fish water with 15% DMSO for 3 days. A BrdU solution was used every day, one hour after feeding. After the treatment, BrdU was removed and fish were raised for 3 weeks under standard conditions. Then fish were sacrificed with overdose of MS-222, fixed in 4% PFA overnight. Brains were dissected, subsequently sectioned in sagittal or frontal planes (60 µm). Immunofluorescent staining of rat anti-BrdU (1:500; ab6326 Abcam), revealed with secondary antibody goat anti-rat coupled to AlexaFluor 546 (A11081 Invitrogen), was combined with mouse anti-TH (see above), and followed by DAPI staining.

***Fluorescent in situ hybridization (FISH).*** All *in situ* hybridization were performed as described previously (Fontaine et al., 2013). Briefly, after fixation in PFA4%, the embryos and brains were gradually dehydrated and stored in 100% methanol until used. Whole embryos between 48 and 96 hpf, and brains from 1 month- and 3 month-old fish were rehydrated and treated with proteinase K during 30 minutes for the two latter stages. The following riboprobes were used: *th1* and *th2* (Yamamoto et al., 2010), *otpa/b* (Affaticati et al., submitted), *nr4a2a/b* (Blin et al., 2008), *foxg1a* (Toresson et al., 1998), *dlx2a* (Akimenko et al., 1994), *prl* (Herzog et al., 2003), *shha* (Takamiya and Campos-Ortega, 2006), *nkx2.1a* (Rohr et al., 2001), and *lhx5* (Shanmugalingam et al., 2000). Tissues were hybridized with the antisense riboprobes conjugated with either digoxigenin (DIG;

## Chapitre 2 : Résultats

11277073910 Roche) or fluorescein (FITC; 11685619910 Roche), for 18 hours at 65°C.

Tissues were then incubated with sheep anti-DIG or anti-Fluo conjugated with peroxidase (POD; 1:500; respectively 11207733910 and 11426346910 Roche). The signal was revealed using home-made FITC-conjugated tyramide

(<http://www.xenbase.org/other/static/methods/FISH.jsp>). The *in situ* hybridizations were combined with TH immunofluorescence (visualized in red with Alexa 633) and nuclei staining with DAPI (see above).

**Imaging.** Stained tissues were mounted with the mounting medium for fluorescence Vectashield H-1000 (Vector). All images were acquired using a Zeiss LSM700 confocal microscope with 20× or 40× objectives. Channels were acquired sequentially to avoid signal crossover between the different filters. Images were processed using the ZEN software (Zeiss). Z-projections from confocal stacks of images were obtained using Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Composites were assembled using Adobe Photoshop and Illustrator CS6 (Adobe Systems, San Francisco, California).

**Cell counting and Statistics.** To correlate the number of the cells to body size of the fish, the latter was measured (without taking account of the tail) after the PFA fixation. We manually counted the number of cells in the preoptic area on z-stacks from 50 µm serial sagittal sections with the cell counter plugin of the ImageJ software. All experimental data were expressed as means±S.E.M. The obtained data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Significance was set at P<0.05. Correlation between the number of the cells and body size was measured with Pearson product-moment correlation coefficient (Pearson's r). Data were analyzed using GraphPAd Prism software.

## Results

### **Dopamine neurons projecting to the pituitary are located in the most antero-ventral part of the preoptic area**

Since we previously showed that the pituitary gonadotrope cells in zebrafish are contacted by DA fibers (Fontaine et al., 2013), we searched for the origin of the DA fibers that directly innervate the pituitary gonadotrope cells in zebrafish. In several teleost species, the hypophysiotropic DA cells are mostly located in the preoptic region of the brain. In zebrafish, preoptic area (PO) and hypothalamus contains several distinct DA cell groups with overlapping projection tracts, and identification of DA system that projects onto the anterior pituitary gland has not been possible so far (Lohr and Hammerschmidt, 2011). In order to precisely identify the cells of origin of the neuronal projection onto the anterior pituitary, we applied a Dil crystal in the median part of the pituitary attached to the brain, in adult female zebrafish. After one week of migration, numerous cell bodies were retrogradely labeled in the forebrain. Some labeled neurons were detected in the ventral telencephalon (data not shown), similar to the localization of the well-studied GnRH neurons in zebrafish (Abraham et al., 2008; Abraham et al., 2010). The vast majority of labeled neurons were observed in the PO (labeled in red, Fig. 1A-F). Subsequent fluorescent labeling of TH immunoreactivity (THir; labeled in green, Fig. 1A-F) on frontal (Fig. 1A-C) and sagittal (Fig. 1D-F) sections showed that the colocalization of Dil and THir existed only within the anterior parvocellular preoptic nucleus (PPa), in the most anterior and ventral part of the PO (shown in yellow on merged images, Fig. 1A-F).

In the posterior part of the PO, the posterior parvocellular preoptic nucleus (PPp) the magnocellular preoptic nucleus (PM), and the suprachiasmatic nucleus (SC) also contained THir-labeled cells, but they were not Dil-labeled. The Dil-only labeled cells found in this posterior part of the PO would represent peptidergic cell populations (e.g.

corticotropin-releasing hormone; CRH, thyrotropin-releasing hormone; TRH and somatostatin; SS, as well as oxytocin; OXT, arginine-vasopressin; AVP) already described in this region in the zebrafish (Blechman et al., 2007; Herget et al., 2014).

Since two different TH genes exist in teleosts (*th1* and *th2*; Candy and Collet, 2005), we examined the expression of *th1* and *th2* mRNA by two-color FISH, combined with TH-IF. As already shown in our previous publication (Yamamoto et al., 2010), we observed that, within the PPa, all the THir neurons exhibit *th1* labeling. Some of them are co-labeled for *th2* (Fig. 1G), and importantly, no cell displaying only *th2* was observed (Fig. 1G). Taking into account that the TH antibody recognizes *TH1*, in this region the THir neurons correspond to all the *th* expressing neurons.

Together, these observations show that the antero-ventral part of the preoptic area is the only source of the dopaminergic innervation to the zebrafish pituitary gland. Thus, we named these neurons the “preoptico-hypophyseal dopaminergic” neurons (POHDA), and in the rest of our study, we used THir to visualize these neurons.

### **Ontogeny of the POHDA neurons and development of their projections to the pituitary gland**

Based on available data, the developmental origin of the hypophysiotropic POHDA neurons remains unclear. The teleost fish PO has been subdivided into several subnuclei (Wullimann et al., 1996), the anterior (PPa) and posterior (PPp) parvocellular, the magnocellular (PM) preoptic nuclei, and the suprachiasmatic nucleus (SC). Although this terminology has been applied in studies of adult zebrafish dopaminergic systems (Filippi et al., 2010; Yamamoto et al., 2010, 2011; Herget et al., 2014), the different subpopulations within the PO have not been thoroughly investigated during development. Thus the first step of the developmental analysis

was to identify the precise location of the POHDA neurons within the zebrafish preoptic area (PO), using a constant anatomical landmark.

We thus analyzed THir localization together with DAPI staining in adult female zebrafish first, in order to visualize the general organization of the cells within the PO. On lateral views from a 3 month-old zebrafish brain, we could easily distinguish the POHDA neurons (Fig. 2A-C), since they are located anterior to the optic recess (OR). In contrast, the SC/PPp/PM DA populations are all located posterior to the OR. Using the OR as a landmark, we could easily follow back the ontogeny of the POHDA neurons at earlier developmental stages (from 3-month old back to 48 hours post fertilization (hpf; Fig. 2C-G). The first THir cells anterior to the OR appeared not before 72 hpf (Fig. 2F), at a place that corresponds to PPa, in contrast to the PM or SC in which several THir cells were already present at that time. It was previously reported that at 60 hpf, all the DA cell clusters are present in the embryonic zebrafish brain (Mahler et al., 2010). However, since the POHDA neurons cannot be detected before 72 hpf, it is very likely that they have not been taken into account in these studies. Thus, the POHDA neurons are probably the last dopaminergic cell group to be differentiated in the zebrafish brain during development.

Then, we examined when POHDA axons reached the pituitary gland during embryonic development. To this aim, we attempted to observe the first THir fibers reaching the pituitary, using prolactin transcripts (*prl*; green, Fig. 3) as a marker of the hypophysis primordium at early stages. Indeed in zebrafish, the lactotroph lineage is the first one to differentiate and prolactin (*prl*) expression can be easily detected by ISH from 24 hpf onwards (Herzog et al., 2003), a time when the expression of *fsh* and *lh* gene is extremely low (Lohr and Hammerschmidt, 2011).

Up to 72 hpf, no THir fiber could be detected in the pituitary (data not shown), and the first of those fibers reached the gland between 72 hpf and 84 hpf (Fig. 3), thus shortly

after the appearance of the POHDA cells in the PPa. Few THir fibers have been observed in the most anterior part of the gland (*rostralis pars distalis*; RPD), which contains *prl* expressing cells, although DA is well known to control PRL secretion in zebrafish as early as 48 hpf (Liu et al., 2006). By contrast, the vast majority of THir fibers were observed in the median part of the gland (*proximalis pars distalis*; PPD) which mainly contains gonadotrope, thyrotrope and somatotrope cells in teleosts (Olivereau and Nagahama, 1983; Herzog et al., 2003), suggesting that these cells are the major targets of the DA innervation.

### **Continuous neurogenesis generates POHDA neurons throughout the fish life**

As the POHDA neurons differentiate late as compared to other preoptic DA neurons, we examined when this cell population reaches its full development. We thus counted the number of POHDA cells, just anterior to the OR, at different time points during zebrafish development (Fig. 4A). For seek of comparison, we also counted the number of SCDA cells, just posterior to the OR. By contrast to the number of SCDA cells which reaches a maximum at about 72hpf ( $12 \pm 0,63$  cells), the number of POHDA cells increased throughout the zebrafish life, starting from one/two cells at 72 hpf, to  $551 \pm 29$  cells at 3-years. Zebrafish, as other teleost fishes, is known to keep growing throughout life with an allometric growth of all the organs including the brain. We thus plotted the size of the fish, as well as the number of POHDA neurons, as a function of the age of the fish (Fig. 4B, C). Both the body size and the number of POHDA neurons grow similarly in an exponential manner. Finally, the growth of the fish and the number of the POHDA neurons appeared strongly correlated ( $r^2 = 0.89$ ; Figure 4D), indicating that the number of POHDA neurons increased with body size in an allometric fashion.

As the number of these neurons is increasing throughout zebrafish life, we aimed to determine whether such neurons are generated by recruiting new born cells, or by changing the phenotype of already existing cells. We performed BrdU incorporation experiments at different ages of the fish. One-month-old juvenile and 3-month-old adult fish were treated with BrdU for 3 days, and sacrificed 3 weeks after the BrdU treatments. In both 1-month juvenile (Fig. 5B-B') and 3-month adult (Fig. 5D-D') zebrafish, BrdU and THir were colocalized in some cells of the PPa, showing that there were some progenitor cells that were in S phase at the time of the treatment and exited the cell cycle to give rise to new POHDA neurons soon afterwards. By contrast, no SCDA cell colocalized with BrdU either in 1-month (Fig. 5C) or in 3-month fish (Fig. 5E). Our results support the hypothesis that POHDA neurons, but not SCDA neurons, are generated *de novo* from dividing progenitors at these stages.

### **Regionalization and developmental characterization of POHDA neurons**

DA neurons develop at distinct anatomical sites within the neural tube, in a regionalized manner. The location of dopaminergic cell groups has been extensively studied using immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (THir) and *in situ* hybridization of TH gene transcripts (*th*). TH-expressing cell groups have been described in zebrafish in different regions in the brain in adults (Kaslin and Panula, 2001; Rink and Wullimann, 2001; Ma, 2003; Yamamoto et al., 2011) as well as during development (Rink and Wullimann, 2002; Tay et al., 2011).

Regarding the regionalization of the anterior basal forebrain in the zebrafish, we recently showed that the the preoptic area (PO), flanked by the anterior commissure (ac) and postoptic commissure (poc), represents a morphogenetic entity organized around the optic recess (OR) of the brain ventricle. It is characterized by a neurogenesis taking place at the ventricle, with the cells progressively displaced perpendicular to the ventricular wall. This optic recess region



## Chapitre 2 : Résultats

(ORR) has well defined borders with its neighbor areas (hypothalamus caudo-ventrally, and telecephalon rostro-dorsally) and it express a specific set of genes such as *foxg1a*, *dlx2a*, *sim1a* and *otpb* (Fig. 6A, Affaticati et al., unpublished observations). Since ontogeny of THir cells demonstrated that the three DA cell populations, POHDA, SCDA, and PMDA, are located in the ORR (Fig. 6B), we here analyzed simultaneously the expression of genes inside the ORR with that of THir at different developmental stages. More specifically, we focused on the differential gene expression profiles of POHDA and of SCDA neurons with respect to the regionalization of the anterior forebrain of the zebrafish.

High amount of the *foxg1a* transcripts were found in the most antero-dorsal region of the forebrain up to the optic recess (Fig. 7A) including PPa. At 72hpf (when the first POHDA neurons appears), it was colocalized with THir. Although the intensity of its expression reduced along the development, *foxg1a* went on being expressed in POHDA neurons at least up to 1 month (Fig. 1C). In contrast, *foxg1a* was never expressed in the SCDA neurons, which are located posterior to the OR (Fig. 7A).

*Dlx2a* transcripts are expressed in the ORR at the border area with the telencephalon and the hypothalamus. It has been reported to be colocalized with THir in the SCDA neurons (Filippi et al., 2012). We indeed observed such a coexpression at 48 hpf, however, *dlx2a* expression was switched off in SCDA neurons at later stages. By contrast, our analysis revealed that POHDA neurons express *dlx2a* at 72hpf (Fig. 7B) when they are first detected, and some of them keep expressing it even at 1 month (Fig. 6C).

The transcription factor orthopedia (*Otp*) is also expressed in the lateral domain of the ORR, and it is an important factor of the specification of a subset of neuroendocrine cells in both mammals (Wang and Lufkin, 2000) and zebrafish (Fernandes et al., 2013). In zebrafish, it is also one of the important transcription factors for the development of DA neurons in the posterior tuberculum (Ryu et al., 2007; Fernandes et al., 2013). Here, we

observed that SCDA neurons never expressed *otp* genes (Fig.6C and Fig. 8A). POHDA neurons do not express *otpa* and expressed *otpb* transiently at 72 hpf (Fig. 8A), but this expression was not found at later stages. Since new POHDA neurons are generated at later stages without *otpb* expression (Fig. 6C), *otpb* may not be involved in the late stage of differentiation of POHDA neurons or in their maintenance. The analysis of *otpa*<sup>-/-</sup> and *otpb*<sup>-/-</sup> mutants in adult, did not reveal significant difference in the number of THir cells as compared to wild type fish, further supporting this contention (data not shown).

The *Nkx2.1* and *Shh* genes are key determinants for the development of hypothalamic regions (Kimura et al., 1996; Rohr et al., 2001; van den Akker et al., 2008) and they are not expressed in the zebrafish ORR. Accordingly, *shha*, and *nkx2.1a* transcripts were never found located in POHDA or SCDA neurons (Fig. 6C). Taken together, these results show that the POHDA neurons are born in the anterior domain of the ORR and that they constitute a cell population clearly different from that of the other dopaminergic cell populations in the preoptic area inside the ORR.

We also analyzed genes, which are considered to be important for the development of ventral forebrain regions including the eye field, such as *Six3* and *Lhx5* (Furuta et al., 2000; Inoue et al., 2006; Carlin et al., 2012). The *six3b* transcripts were colocalized with THir both in SCDA and POHDA neurons from 48 to 96hpf, indicating that they may play a role in their differentiation. The fact that POHDA neurons keep expressing *six3b* even at one month also argue in favor of this hypothesis. In contrast, *lhx5a* transcripts never appeared co-localized with THir.

Finally, the orphan nuclear receptors, *nr4a2a* and *nr4a2b*, have been shown to be critical for differentiation of some DA cell populations, including those of the posterior tuberculum and PO (Filippi et al., 2007; Blin et al., 2008). Here we found that SCDA neurons express both *nr4a2a* and *nr4a2b* at all developmental stages we have studied (Fig.

6C and Fig. 8B). By contrast, POHDA neuron never expressed the *nr4a2* genes, strongly suggesting that the SCDA neurons are the DA cell population previously demonstrated to depend on *nr4a2* expression, and that the POHDA neurons are not likely to be dependent on *nr4a2* for their differentiation.

Together, these results indicate that POHDA and SCDA are distinct cell populations within the zebrafish preoptic area. In addition, the genetic networks involved in the development of POHDA neurons are different from other dopaminergic neurons.

## Discussion

Dopamine (DA) originating from the preoptico/hypothalamic region is a key regulator of the secretion of several hormones of the anterior pituitary gland in all vertebrates, and it is a strong inhibitor of gonadotrope function in some of them (for reviews, see Dufour et al., 2005; Dufour et al., 2010) including zebrafish (Fontaine et al., 2013). Zebrafish is an attractive model for developmental studies but also for physiological studies with a growing number of tools allowing locate and follow the activity of cells. However, the anatomical system underlying the role of DA in the pituitary gland has never been studied in zebrafish, a fact which prevented to take full benefit from the amenability of the model.

We first identified the DA neurons projecting to the pituitary *pars distalis* (PD; Fontaine et al., 2013) in the most ventral part of the anterior parvocellular preoptic nucleus (PPa), just anterior to the optic recess (OR). This is in good agreement with previous observation in zebrafish showing that PPa dopaminergic projections join the preoptico-hypophyseal tract (Ma, 2003). Our results also agree with previous studies in goldfish (Kah et al., 1987; Anglade et al., 1993), trout (Linard et al., 1996), and European eel (Vidal et al., 2004; Weltzien et al., 2006), showing that the major dopaminergic innervation of the pituitary PD originates from a subset of neurons in the anteroventral part of the preoptic area (differently named by different authors: NPOav in Kah et al., 1987; Vidal et al., 2004; Weltzien et al., 2006; NPOpc in Anglade et al., 1993; PPa in Johnston and Maler, 1992; SOC in Holmqvist and Ekstrom, 1995). Lesion of this preoptic nucleus in the goldfish removes only dopaminergic innervation in the *pars distalis* but not in the *pars intermedia* (PI) (Kah et al., 1987), suggesting that PPa dopaminergic neurons regulate gonadotropin release (Fryer and Maler, 1981; Kah et al., 1987) and that other DA neurons regulate  $\alpha$ -MSH secretion in the PI. In our study, a single DA cell population was

found to project to the anterior pituitary in zebrafish. Therefore the neurons that control the gonadotropic function reside within this POHDA population. Furthermore, although we could not discriminate between the different projections to the pituitary gland, it is likely that the DA cells regulating PRL, GH, TSH and  $\alpha$ -MSH secretions also reside within this preoptic population.

DA neurons of the preoptic area were described to arise from a late phase of neurogenesis, since they express TH between 48 and 60 hpf (Mahler et al., 2010). However at these stages, we did not detect any THir cells anterior to the OR, in contrast that SC nucleus already contains numerous THir cells. Thus, the DA cluster referred to as “preoptic” in many previous studies (Rink and Wullimann, 2002; Sallinen et al., 2009; Filippi et al., 2010) corresponds in fact to the SC population. Because of the proximity between SC and PPa, and of the late appearance of the POHDA neurons as compared to other DA populations, POHDA population was not described in previous developmental studies.

We further found that the number of POHDA neurons increased all along the zebrafish growth, even in the adult, due to maintenance of neurogenesis for this cell population, which is not the case for SCDA neurons. This sustained neurogenesis is made possible by the maintenance of undifferentiated progenitors in specific niches at adult stage (Chapouton and Godinho, 2010). It has already been reported that PPa ventricular zone in the adult zebrafish is a region of neurogenesis, harboring fast proliferative cells (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Pellegrini et al., 2007). Estrogens are known to affect brain development, and to modulate embryonic and adult neurogenesis (Martinez-Cerdeno et al., 2006; Mouriec et al., 2008; Barha et al., 2009; Kah et al., 2009; Diotel et al., 2013; Coumilleau et al., 2014). Since the embryonic PPa has been shown to express the three estrogen receptor subtypes ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2) from 24hpf onward (Menuet et al., 2002),

the proliferation capability of POHDA progenitors could be estrogen-dependent. However, the role of estrogens in the proliferation capacity of POHDA progenitors awaits experimental evaluation. Interestingly, the growth of POHDA nucleus is proportional to the increased size of the animal throughout life (allometry). Thus, the regulatory role exerted by the POHDA neurons depends on their number, likely because it needs to remain proportional to the number of cells they regulate, here in the pituitary, which also grow permanently in teleost fish such as the zebrafish. It is interesting to note that, in the goldfish, DA was shown to positively control GH cells, via the D<sub>1</sub> class of DA receptors (Wong et al., 1992, 1993). Therefore, the increase in POHDA neurons may be related to the control of GH secretion and of the animal growth.

The differential gene expression profiles in POHDA and SCDA neurons during development (e.g. *foxg1a* and *nr4a2a/b*) further highlighted the different characteristics of POHDA and SCDA, which are closely located during the embryonic stages. Moreover *dlx2a* was expressed in both cell populations, but not in the same period. Interestingly its expression accompanied the timing of differentiation both in POHDA and SCDA cells (Figure 6C). Although *Dlx2* gene is often used as a regional marker (Rubenstein et al., 1998; Puelles and Rubenstein, 2003), it is present only at a specific differentiation cell state of the neural progenitors (Suh et al., 2009), colocalizing with a marker of differentiation (*elavl3*; Affaticati et al., unpublished observations), and our results showing a permanent expression of *dlx2* in POHDA cells, are consistent with this hypothesis. Together with the different anatomical location in relation to the OR, neurogenic properties and the gene expression profiles, our results support that POHDA and SCDA are two distinct DA cell populations in the developing embryo.

Our detailed ontogeny and gene expression studies also helped for better identifying the zebrafish preoptic area (PO), thus allowing comparison with forebrain

areas of other vertebrate species. We showed that zebrafish PO develops from a region flanked by the anterior commissure (ac) and the postoptic commissure (poc). Up to now the corresponding region has been considered as the “optic stalk” in zebrafish embryonic studies (Wilson and Houart, 2004) as well as in mammalian studies (nicely demonstrated in Shimamura et al., 1995). Because of the poor identification of this region, there was a discrepancy in the definition of the “preoptic area” in teleosts and tetrapods. While the tetrapod PO is considered to be a part of the telencephalon (Moreno and Gonzalez, 2011; Puelles et al., 2013) with a continuous expression of *Foxg1*, in zebrafish, only the rostral half of the PO, containing the POHDA, expressed *foxg1a*. Thus only the anterior half of the zebrafish PO, not the posterior PO, corresponds to the tetrapod PO.

Our interpretation that the so-called PO in zebrafish corresponds to a broader forebrain area than the PO in tetrapods agrees with a hypothesis that the *otp*-expressing peptidergic neuroendocrine cells in the zebrafish PO are homologous to those in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) in mammals (Herget et al., 2014). Thus the zebrafish PO would correspond to the area identified as the PO and to a subset of the alar hypothalamus in tetrapods.

The regional homology of the zebrafish PPa with the tetrapod preoptic area suggests that the functional similarity between the zebrafish POHDA and mammalian hypophysiotropic DA neurons are likely to be a consequence of convergent evolution. Mammals possess several hypophysiotropic DA cell populations, and one to one comparison with zebrafish hypophysiotropic DA neurons is very difficult. In ewe, A15 (retrochiasmatic area) DA cells exert the seasonal inhibition of gonadotrophin secretion (Thiery et al., 1989; Viguie et al., 1998). A12 (located in the tuberoinfundibular hypothalamic area) and A14 (located in the periventricular hypothalamic area) play a critical role for the inhibition of prolactin secretion (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001). In

contrast, the POHDA neurons located in the anterior PO are the only DA neurons projecting to the pituitary in zebrafish. How the multiple functions of DA on the pituitary are regulated in zebrafish POHDA awaits future investigations.

As it is illustrated by the presence of *th2* gene or the absence of mesencephalic DA cells, teleost DA system is significantly different from the mammalian one. Nevertheless the recruitment of non-homologous DA cell populations for exerting similar functions in different species suggests that the nature of DA neurotransmission may be commonly required for the neuroendocrine control of pituitary functions in vertebrates.

### **Acknowledgments**

We thank Sebastien Bedu for taking care of the zebrafish used in this study. We thank Drs. Alessandro Alunni and Marion Coolen for their help in the BrdU incorporation experiments. We also thank Dr. Laure Bally-Cuif for the critical reading of the manuscript and Dr. M. Hammerschmidt for providing the *prl* plasmid.



## References

- Abraham E, Palevitch O, Gothilf Y, Zohar Y (2010) Targeted gonadotropin-releasing hormone-3 neuron ablation in zebrafish: effects on neurogenesis, neuronal migration, and reproduction. *Endocrinology* 151:332-340.
- Abraham E, Palevitch O, Ijiri S, Du SJ, Gothilf Y, Zohar Y (2008) Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocrinol* 20:394-405.
- Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhauser B, Strahle U, Gotz M, Bally-Cuif L (2006) Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev Biol* 295:278-293.
- Affaticati P, Yamamoto K, Rizzi B, Bureau C, Peyriéras N, Pasqualini C, Demarque M, Vernier P (submitted) Identification of the optic recess region as a morphogenetic entity in the zebrafish forebrain.
- Akimenko MA, Ekker M, Wegner J, Lin W, Westerfield M (1994) Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *J Neurosci* 14:3475-3486.
- Anglade I, Zandbergen T, Kah O (1993) Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273:345-355.
- Ball JN (1981) Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians, and reptiles. *General and comparative endocrinology* 44:135-170.
- Barha CK, Lieblich SE, Galea LA (2009) Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neuroendocrinol* 21:155-166.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22:724-763.

## Chapitre 2 : Résultats

- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.
- Blechman J, Borodovsky N, Eisenberg M, Nabel-Rosen H, Grimm J, Levkowitz G (2007) Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development* 134:4417-4426.
- Blin M, Norton W, Bally-Cuif L, Vernier P (2008) NR4A2 controls the differentiation of selective dopaminergic nuclei in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci* 39:592-604.
- Candy J, Collet C (2005) Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochim Biophys Acta* 1727:35-44.
- Carlin D, Sepich D, Grover VK, Cooper MK, Solnica-Krezel L, Inbal A (2012) Six3 cooperates with Hedgehog signaling to specify ventral telencephalon by promoting early expression of Foxg1a and repressing Wnt signaling. *Development* 139:2614-2624.
- Chang JP, Peter RE (1983) Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 36:351-357.
- Chapouton P, Godinho L (2010) Neurogenesis, chap 4. In: *METHODS IN CELL BIOLOGY* (Inc. E, ed), pp 73-126.
- Contijoch AM, Gonzalez C, Singh HN, Malamed S, Troncoso S, Advis JP (1992) Dopaminergic regulation of luteinizing hormone-releasing hormone release at the median eminence level: immunocytochemical and physiological evidence in hens. *Neuroendocrinology* 55:290-300.
- Coumailleau P, Pellegrini E, Adrio F, Diotel N, Cano-Nicolau J, Nasri A, Vaillant C, Kah O (2014) Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. *Biochim Biophys Acta*.

## Chapitre 2 : Résultats

- Diotel N, Vaillant C, Gabbero C, Mironov S, Fostier A, Gueguen MM, Anglade I, Kah O, Pellegrini E (2013) Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Horm Behav* 63:193-207.
- Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C (2010) Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol* 76:129-160.
- Dufour S, Weltzien FA, Sebert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C (2005) Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann N Y Acad Sci* 1040:9-21.
- Fernandes AM, Beddows E, Filippi A, Driever W (2013) Orthopedia transcription factor *otpa* and *otpb* paralogous genes function during dopaminergic and neuroendocrine cell specification in larval zebrafish. *PLoS One* 8:e75002.
- Filippi A, Jainok C, Driever W (2012) Analysis of transcriptional codes for zebrafish dopaminergic neurons reveals essential functions of *Arx* and *Isl1* in prethalamic dopaminergic neuron development. *Dev Biol* 369:133-149.
- Filippi A, Mahler J, Schweitzer J, Driever W (2010) Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J Comp Neurol* 518:423-438.
- Filippi A, Durr K, Ryu S, Willaredt M, Holzschuh J, Driever W (2007) Expression and function of *nr4a2*, *lmx1b*, and *pitx3* in zebrafish dopaminergic and noradrenergic neuronal development. *BMC Dev Biol* 7:135.
- Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloché S, Gonnet F, Vernier P, Dufour S, Pasqualini C (2013) Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Endocrinology* 154:807-818.

## Chapitre 2 : Résultats

- Fryer JN, Maler L (1981) Hypophysiotropic neurons in the goldfish hypothalamus demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Cell Tissue Res* 218:93-102.
- Furuta Y, Lagutin O, Hogan BL, Oliver GC (2000) Retina- and ventral forebrain-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* 26:130-132.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol* 295:263-277.
- Herget U, Wolf A, Wullimann MF, Ryu S (2014) Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol* 522:1542-1564.
- Herzog W, Zeng X, Lele Z, Sonntag C, Ting JW, Chang CY, Hammerschmidt M (2003) Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev Biol* 254:36-49.
- Holmqvist BI, Ekstrom P (1995) Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat* 8:125-145.
- Huseman CA, Kugler JA, Schneider IG (1980) Mechanism of dopaminergic suppression of gonadotropin secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 51:209-214.
- Inoue F, Nagayoshi S, Ota S, Islam ME, Tonou-Fujimori N, Odaira Y, Kawakami K, Yamasu K (2006) Genomic organization, alternative splicing, and multiple regulatory regions of the zebrafish *fgf8* gene. *Dev Growth Differ* 48:447-462.
- Johnston SA, Maler L (1992) Anatomical organization of the hypophysiotrophic systems in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol* 317:421-437.

## Chapitre 2 : Résultats

- Kah O, Dubourg P, Onteniente B, Geffard M, Calas A (1986) The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell Tissue Res* 244:577-582.
- Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE (1987) Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45:451-458.
- Kah O, Pellegrini E, Mouriec K, Diotel N, Anglade I, Vaillant C, Thieulant ML, Tong SK, Brion F, Chung BC, Pakdel F (2009) [Oestrogens and neurogenesis: new functions for an old hormone. Lessons from the zebrafish]. *J Soc Biol* 203:29-38.
- Kaslin J, Panula P (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440:342-377.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10:60-69.
- Lacau-Mengido IM, Becu-Villalobos D, Thyssen SM, Rey EB, Lux-Lantos VA, Libertun C (1993) Antidopaminergic-induced hypothalamic LHRH release and pituitary gonadotrophin secretion in 12 day-old female and male rats. *J Neuroendocrinol* 5:705-709.
- Linard B, Anglade I, Corio M, Navas JM, Pakdel F, Saligaut C, Kah O (1996) Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology* 63:156-165.

## Chapitre 2 : Résultats

- Liu NA, Liu Q, Wawrowsky K, Yang Z, Lin S, Melmed S (2006) Prolactin receptor signaling mediates the osmotic response of embryonic zebrafish lactotrophs. *Mol Endocrinol* 20:871-880.
- Liu X, Herbison AE (2012) Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology* 154:340-350.
- Lohr H, Hammerschmidt M (2011) Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu Rev Physiol* 73:183-211.
- Ma PM (2003) Catecholaminergic systems in the zebrafish. IV. Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon. *J Comp Neurol* 460:13-37.
- Mahler J, Filippi A, Driever W (2010) DeltaA/DeltaD regulate multiple and temporally distinct phases of notch signaling during dopaminergic neurogenesis in zebrafish. *J Neurosci* 30:16621-16635.
- Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR (2006) Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 24:3475-3488.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 66:1881-1892.
- Moreno N, Gonzalez A (2011) The non-evaginated secondary prosencephalon of vertebrates. *Front Neuroanat* 5:12.
- Mouriec K, Pellegrini E, Anglade I, Menuet A, Adrio F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O (2008) Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Res Bull* 75:274-280.

## Chapitre 2 : Résultats

- Olivereau M, Nagahama Y (1983) Immunocytochemistry of gonadotropic cells in the pituitary of some teleost species. *Gen Comp Endocrinol* 50:252-260.
- Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O (2007) Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J Comp Neurol* 501:150-167.
- Peter RE, Crim LW, Goos HJ, Crim JW (1978) Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *Gen Comp Endocrinol* 35:391-401.
- Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C (2013) A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36:570-578.
- Rink E, Wullimann MF (2001) The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889:316-330.
- Rink E, Wullimann MF (2002) Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 137:89-100.
- Rohr KB, Barth KA, Varga ZM, Wilson SW (2001) The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* 29:341-351.
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21:445-477.



## Chapitre 2 : Résultats

- Ryu S, Mahler J, Acampora D, Holzschuh J, Erhardt S, Omodei D, Simeone A, Driever W (2007) Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Curr Biol* 17:873-880.
- Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, Reenila I, Khrustalyov D, Kaslin J, Panula P (2009) MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *J Neurochem* 108:719-731.
- Schweitzer J, Driever W (2009) Development of the Dopamine Systems in Zebrafish. In: *Development and Engineering of Dopamine Neurons* (Pasterkamp RJ, Smidt, M.P., Burbach, J.P.H., ed), pp 1-14. New York: Springer
- Shanmugalingam S, Houart C, Picker A, Reifers F, Macdonald R, Barth A, Griffin K, Brand M, Wilson SW (2000) *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* 127:2549-2561.
- Sharp PJ, Talbot RT, Macnamee MC (1989) Evidence for the involvement of dopamine and 5-hydroxytryptamine in the regulation of the preovulatory release of luteinizing hormone in the domestic hen. *Gen Comp Endocrinol* 76:205-213.
- Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, Puellas L, Rubenstein JL (1995) Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121:3923-3933.
- Smeets WJ, Reiner A, eds (1994) *Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates*: Cambridge University Press.
- Sotowska-Brochocka J, Martynska L, Licht P (1994) Dopaminergic inhibition of gonadotropic release in hibernating frogs, *Rana temporaria*. *Gen Comp Endocrinol* 93:192-196.

## Chapitre 2 : Résultats

- Suh Y, Obernier K, Holzl-Wenig G, Mandl C, Herrmann A, Worner K, Eckstein V, Ciccolini F (2009) Interaction between DLX2 and EGFR regulates proliferation and neurogenesis of SVZ precursors. *Mol Cell Neurosci* 42:308-314.
- Takamiya M, Campos-Ortega JA (2006) Hedgehog signalling controls zebrafish neural keel morphogenesis via its level-dependent effects on neurogenesis. *Dev Dyn* 235:978-997.
- Tay TL, Ronneberger O, Ryu S, Nitschke R, Driever W (2011) Comprehensive catecholaminergic projectome analysis reveals single-neuron integration of zebrafish ascending and descending dopaminergic systems. *Nat Commun* 2:171.
- Thiery JC, Martin GB, Tillet Y, Caldani M, Quentin M, Jamain C, Ravault JP (1989) Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 49:80-87.
- Thiery JC, Gayrard V, Le Corre S, Viguie C, Martin GB, Chemineau P, Malpoux B (1995) Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49:285-296.
- Toresson H, Martinez-Barbera JP, Bardsley A, Caubit X, Krauss S (1998) Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Dev Genes Evol* 208:431-439.
- Tuomisto J, Mannisto P (1985) Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol Rev* 37:249-332.
- van den Akker WM, Brox A, Puelles L, Durston AJ, Medina L (2008) Comparative functional analysis provides evidence for a crucial role for the homeobox gene Nkx2.1/Titf-1 in forebrain evolution. *J Comp Neurol* 506:211-223.

## Chapitre 2 : Résultats

Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland MC, Sbaihi M, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004)

Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71:1491-1500.

Viguie C, Picard S, Thiery JC, Malpoux B (1998) Blockade of tyrosine hydroxylase activity in the median eminence partially reverses the long day-induced inhibition of pulsatile LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol* 10:551-558.

Wang W, Lufkin T (2000) The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227:432-449.

Weltzien FA, Pasqualini C, Sebert ME, Vidal B, Le Belle N, Kah O, Vernier P, Dufour S (2006) Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147:2964-2973.

Wilson SW, Houart C (2004) Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6:167-181.

Wong AO, Chang JP, Peter RE (1992) Dopamine stimulates growth hormone release from the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*, through the dopamine D1 receptors. *Endocrinology* 130:1201-1210.

Wong AO, Chang JP, Peter RE (1993) Characterization of D1 receptors mediating dopamine-stimulated growth hormone release from pituitary cells of the goldfish, *Carassius auratus*. *Endocrinology* 133:577-584.

Wullimann MF, Rupp B, Reichert H, eds (1996) *Neuroanatomy of the zebrafish brain: A topological atlas*. Basel: Birkhäuser Verlag.

## Chapitre 2 : Résultats

Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P (2010) Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci* 43:394-402.

Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P (2011) Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *J Comp Neurol* 519:576-598.

## Figure Legends

**Figure 1. Frontal (A-C) and sagittal (D-G) views of POHDA neurons in the anterior preoptic area of the adult zebrafish.** DAPI counterstaining (gray) shows the general anatomical structure of the brain sections. The rostral to the left in all the sagittal sections. **A-F**, Double labeling of DiI tracer (red) and TH immunofluorescence (THir; green). A small crystal of DiI was embedded into the pituitary and TH immunolabeling was performed after 8-10 days. **A**, Single confocal plane of a frontal section showing the anterior part of the preoptic area (PPa). **B**, A schematic overview of the frontal section shown in **A**. **C**, Single confocal plane presenting at a higher magnification of the region framed in **A**, showing the retrogradely labeled DiI tracer is found in TH immunolabeled cells (yellow in the merged image). **D**, Single confocal plane of a sagittal section showing the anterior forebrain containing the preoptic area (PO). **E**, A schematic overview of a sagittal section shown in **D**. **F**, Single confocal plane presenting at a higher magnification of the region framed in **D**, showing that only the most antero-ventral subdivision of the preoptic area (PPa) is colabeled with DiI and THir (yellow in the merged image). The caudo-dorsal DiI labeling negative for THir (red only) corresponds to peptidergic neuroendocrine cells. **G**, Single confocal plane of a sagittal brain section showing the expression of *th1* (green), *th2* (red), and THir (blue) in POHDA neurons. Two-color FISH for *th1* (green) and *th2* (red) with TH immunofluorescent labeling (THir; blue), reveal that all the THir cells express *th1* and that some *th1*-expressing cells coexpress *th2*. In contrast, cells expressing *th2*-only are not found in this region. All the *th1* and *th2* expressing cells colocalize with THir, thus THir is reliable to visualize all the POHDA neurons. Abbreviations: Cb, cerebellum; Hyp, hypothalamus; OB, olfactory bulb; P, pallium; PO, preoptic area; PPa, anterior parvocellular preoptic nucleus; SP, subpallium; TeO, optic tectum; Tel, telencephalon. Scale bars: 100µm for A-F, 50 µm for G.

**Figure 2. Ontogeny of the POHDA and SCDA neurons.** TH immunofluorescence (THir; red) with DAPI counterstaining (gray), in sagittal sections of zebrafish brains (rostral to the left) at different developmental stages. A constant anatomical landmark, the optic recess (OR), allows to follow the ontogeny of preoptic neurons from adulthood (A-C) back to younger stages. **A**, Z-projections (30  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing a global THir labeling (red) in a 3-month old zebrafish brain, with a frame on our region of interest: the preoptic area (PO). **B**, Schematic drawing representing the 3-month old zebrafish brain showed in A. The dashed line represents the optic recess (OR), and horizontal stripes represent fiber bundles, the anterior commissure (ac) and the postoptic commissure (poc) flanking the preoptic area (PO). **C**, Higher magnification of the framed region in A. POHDA neurons are located anterior to the optic recess (OR), in the most antero-ventral part of the parvocellular preoptic area. Posterior to the OR, DA neurons in the suprachiasmatic nucleus (SCDA) are located just above the poc, and those in the magnocellular preoptic nucleus (PMDA) are situated more dorsally. **D**, Z-projections (30  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing POHDA and SCDA cells in a 1-month old juvenile zebrafish. The magnification of this image is higher than C and PMDA neurons are found far more dorsally. **E**, Z-projections (20  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing POHDA, SCDA and PMDA in 96 hpf zebrafish larva, at a higher magnification than C and D. **F**, Z-projections (20  $\mu\text{m}$ ) of confocal images at 72 hpf. The first THir cell body anterior to the OR (POHDA) is observed at this stage, whereas numbers of SCDA and PMDA cells are already present. **G**, Z-projections (20  $\mu\text{m}$ ) of confocal images at 48 hpf. No THir cell is observed anterior to the OR, and the DA cells in PO are represented only by those located near the poc, the SCDA. **H**, Schematic drawing representing the 48 hpf zebrafish embryonic brain. The preoptic area (PO) shown in G is illustrated in the frame. The light gray represents the ventricles and

horizontal stripes represent fiber bundles. As it is the case in the adult brain, PO is flanked by two commissures, ac and poc. Abbreviations: ac: anterior commissure; Hyp, hypothalamus; OB, olfactory bulb; OR, optic recess; poc: postoptic commissure; PO, preoptic area; Tel, telencephalon; TeO, optic tectum. Scale bars: 50µm.

**Figure 3. THir projections to the pituitary in 84 hpf larval brain.** **A**, Z-projections (3 µm) of confocal images showing TH immunofluorescence (THir; red) and prolactin FISH (*prl*; green) labeling, with DAPI counterstaining (gray), in a sagittal section (rostral to the left). The expression of *prl* was used as an early marker of the pituitary (framed). **B**, The pituitary region framed in **A** at a higher magnification. The first THir fibers were observed in the pituitary at 84 hpf. The vast majority of THir fibers are found in the *proximalis pars distalis* (PPD) which contains the gonadotrope cells. Very few THir fibers are observed in the *rostralis pars distalis* (RPD), in the vicinity of *prl* expressing cells. Abbreviations: Hyp, hypothalamus; PI, *pars intermedia*; Pit, pituitary; PO, preoptic area; Tel, telencephalon. Scale bar: 20 µm.

**Figure 4. Consistent increase of the number of POHDA neurons all along the growth of the fish.** **A**, The number of POHDA and SCDA neurons (detected as THir) in a brain was counted from confocal images of sagittal sections, and the means ( $\pm$ SEM) were plotted as a function of the age of the fish. The number of POHDA neurons among four age groups (a-d) were significantly different ( $p < 0,05$ ) using ANOVA multiple comparison test, suggesting that POHDA neurons keep increasing all along the life. In contrast, no significant difference was observed in the number of SCDA neurons among the groups of different ages (with a mean of  $12 \pm 0.63$  cells). **(B)** Body size (without taking account of the tail) of fish plotted as a function of the age (dpf) of the fish. Each square represents



individual fish ( $n = 57$ ). **(C)** Number of POHDA neurons plotted as a function of the age (dpf) of the fish. Each circle represents individual fish ( $n = 43$ ). The patterns of the curves in *B* and *C* both follow a similar exponential type. **(D)** Number of POHDA neurons plotted as a function of the size of the fish. There is a correlation (Pearson's  $r$ ;  $r^2 = 0.89$ ), suggesting that larger fish have more POHDA neurons.

**Figure 5. BrdU incorporation experiment reveals continuous neurogenesis in POHDA.** 1 month (*A-C*) and 3 months old (*D,E*) zebrafish were treated with BrdU during 3 days, and analyzed 3 weeks later by BrdU (red) and TH (THir; blue) immunofluorescence. All images are sagittal sections of the brain (rostral to the left) showing the preoptic area (PO), corresponding to the framed region in Figure 2. **A**, Z-projections (20  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing the PO in a 1-month old fish. The framed areas contain POHDA (*B* and *B'*) and SCDA (*C*) populations. **B**, Single confocal plane showing the framed area in *A* at a higher magnification. The arrow heads show the colocalization of BrdU and THir. **B'** Higher magnification of *B*. The clear BrdU/THir double-labeling suggests that these THir cells were born at 1 month old. **C**, Z-projections (10  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing the framed area in *A*, containing SCDA. There is no colocalization of BrdU and THir. **D**, Single confocal plane showing the POHDA cells in a 3-months old fish. The arrow heads show the colocalization of BrdU and THir. **D'**, Higher magnification of *D*. The clear BrdU/THir double-labeling suggests that these THir cells were born at 3 months old. **E**, Z-projections (10  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing SCDA cells in a 3-month old fish. There is no colocalization of BrdU and THir. Scale bars: 20 $\mu\text{m}$ .

**Figure 6. Gene expression profiles of the optic recess region (ORR) containing POHDA and SCDA neurons.** **A**, A schematic representative of the zebrafish embryonic

brains (around 48-72 hpf) showing the optic recess region (ORR) and expression profiles of *foxg1a* (purple oblic lines), *dlx2a* (green), *otpb* (blue), *shha* (red). The light gray represents the brain ventricles and horizontal stripes represent fiber bundles. The zebrafish preoptic area is flanked by the anterior commissure (ac) and the postoptic commissure (poc), thus corresponding to a morphogenetic entity organized around the optic recess, the optic recess region (ORR; Affaticati et al., unpublished observations). **B**, A schematic representative of the zebrafish embryonic brains (around 48-72 hpf) showing the three DA cell populations within the ORR (= PO), POHDA, SCDA and PMDA. Confocal images of the framed region containing POHDA and SCDA are demonstrated in the Figures 7 and 8. **C**, A table summarizing gene expression profiles in POHDA and SCDA neurons. +: colocalized with all THir cells within the population; +/-: colocalized with some, but not all, of THir within the population; -: no colocalization with THir cells; \*: no THir cells at this stage; Blank: not analyzed.

**Figure 7. Gene expression of *foxg1a* and *dlx2a* in POHDA and SCDA neurons during the development.** Z-projections (20  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing the preoptic area (corresponding to the framed region in Figure 6) in different embryonic stages: 48, 72, and 96 hpf. Dashed lines represent the optic recess, and antero-dorsal part of the brain is shown to the left in all images. POHDA neurons (arrows) start to appear around 72 hpf, whereas SCDA neurons (arrow heads) start to appear earlier, around 48 hpf. **A**, Double-labeling of *foxg1a* FISH (green) and TH immunofluorescence (THir, red), with a DAPI counterstaining (gray). *Foxg1* is expressed in a territory antero-dorsal to the optic recess (OR). It is expressed in POHDA neurons, while not in SCDA. **B**, Double-labeling of *dlx2a* FISH (green) and TH immunofluorescence (THir, red), with a DAPI counterstaining (gray). *dlx2a* is first expressed in the SCDA at 48 hpf (arrow head). In 72 hpf, it is no more

expressed in SCDA while starts to be expressed in POHDA. Abbreviations: ac: anterior commissure; poc: postoptic commissure.

**Figure 8. Gene expression of *otpb* and *nr4a2b* in POHDA and SCDA neurons**

**during the development.** Z-projections (20  $\mu\text{m}$ ) of confocal images showing the preoptic area (corresponding to the framed region in Figure 6) at different embryonic stages: 48, 72, and 96 hpf. Dashed lines represent the border of optic recess region (ORR), and antero-dorsal part of the brain is shown to the left in all images. POHDA neurons (arrows) start to appear around 72 hpf, whereas SCDA neurons (arrow heads) start to appear earlier, around 48 hpf. **A**, Double-labeling of *otpb* FISH (green) and TH immunofluorescence (THir, red), with a DAPI counterstaining (gray). *otpb* is slightly expressed in POHDA neurons at 72 hpf, and not at all expressed in SCDA. **B**, Double-labeling of *nr4a2b* FISH (green) and TH immunofluorescence (THir, red), with a DAPI counterstaining (gray). *nr4a2b* is expressed in SCDA cells at all the three time points studied here. In contrast, no expression is found in POHDA. Note that the asterisks (\*) indicate artifact labeling in blood vessels.

Abbreviations: ac: anterior commissure; poc: postoptic commissure.

Figure 1

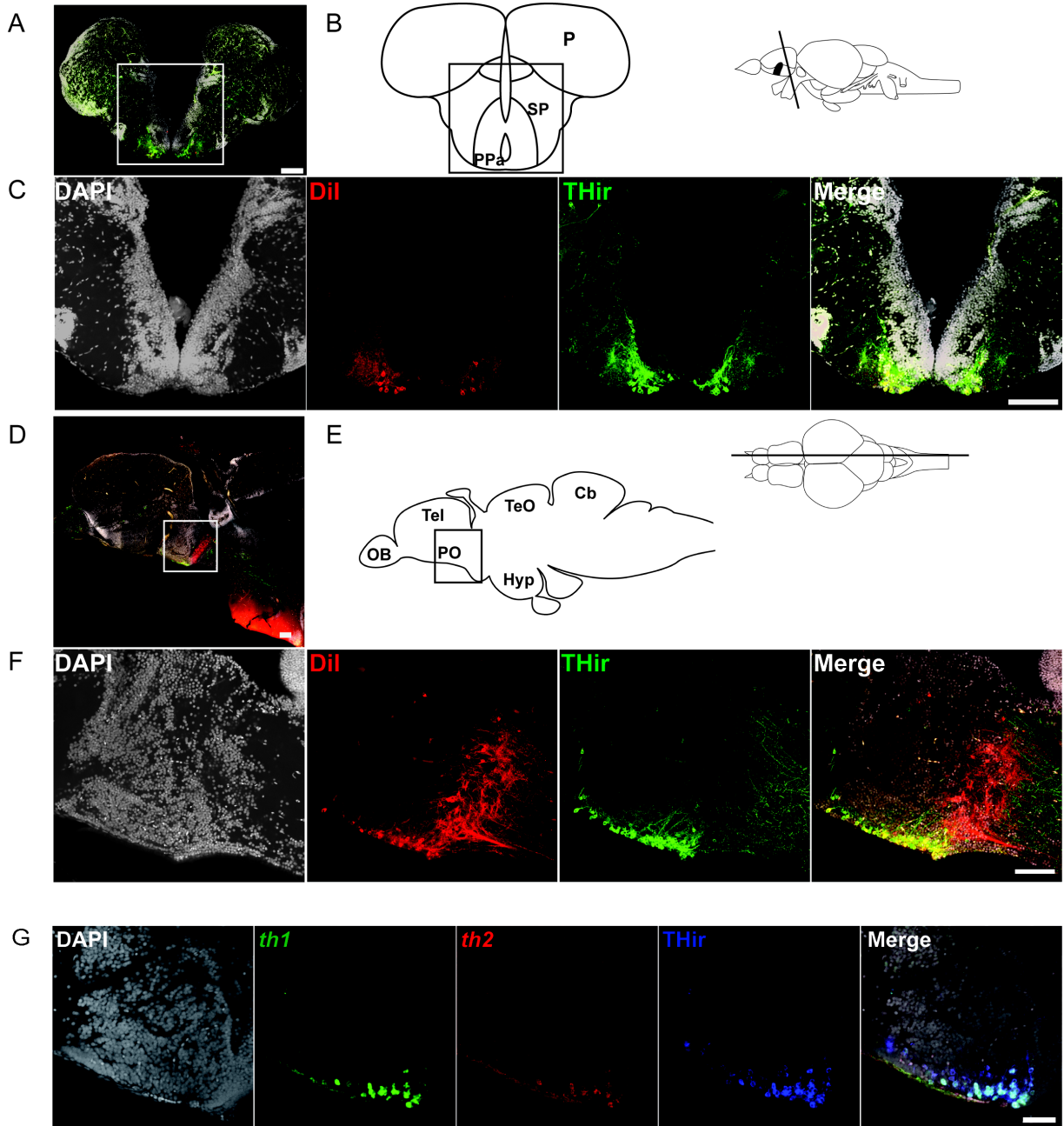
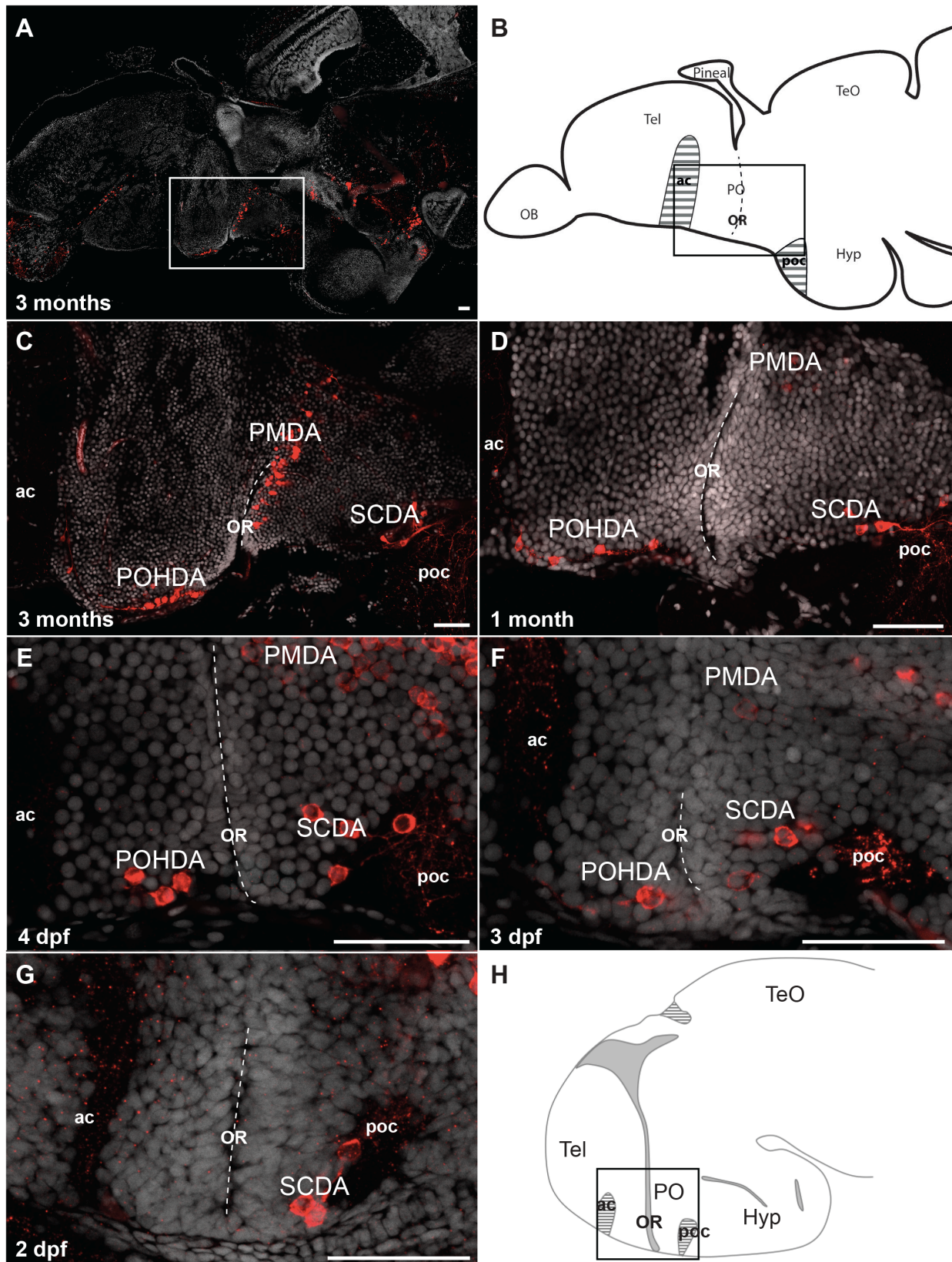




Figure 2



**Figure 3**

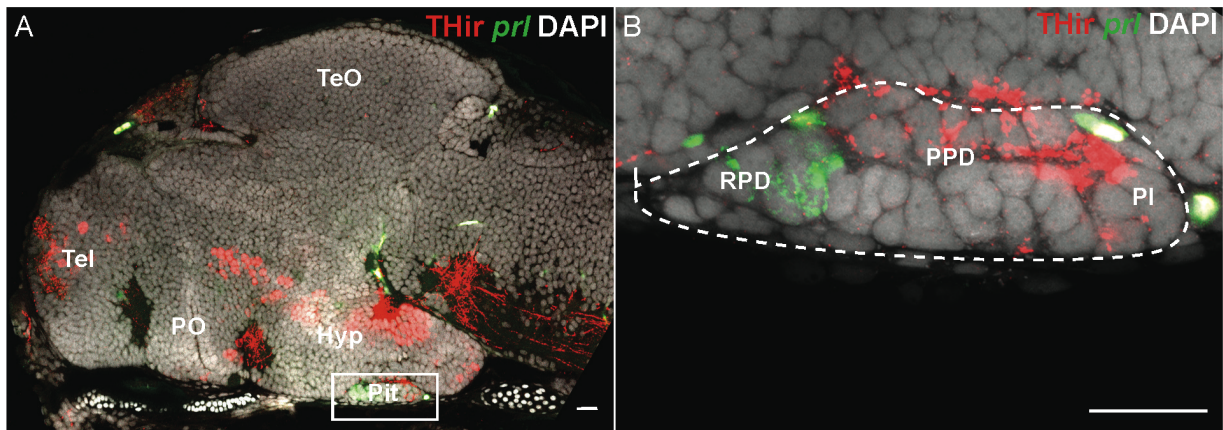
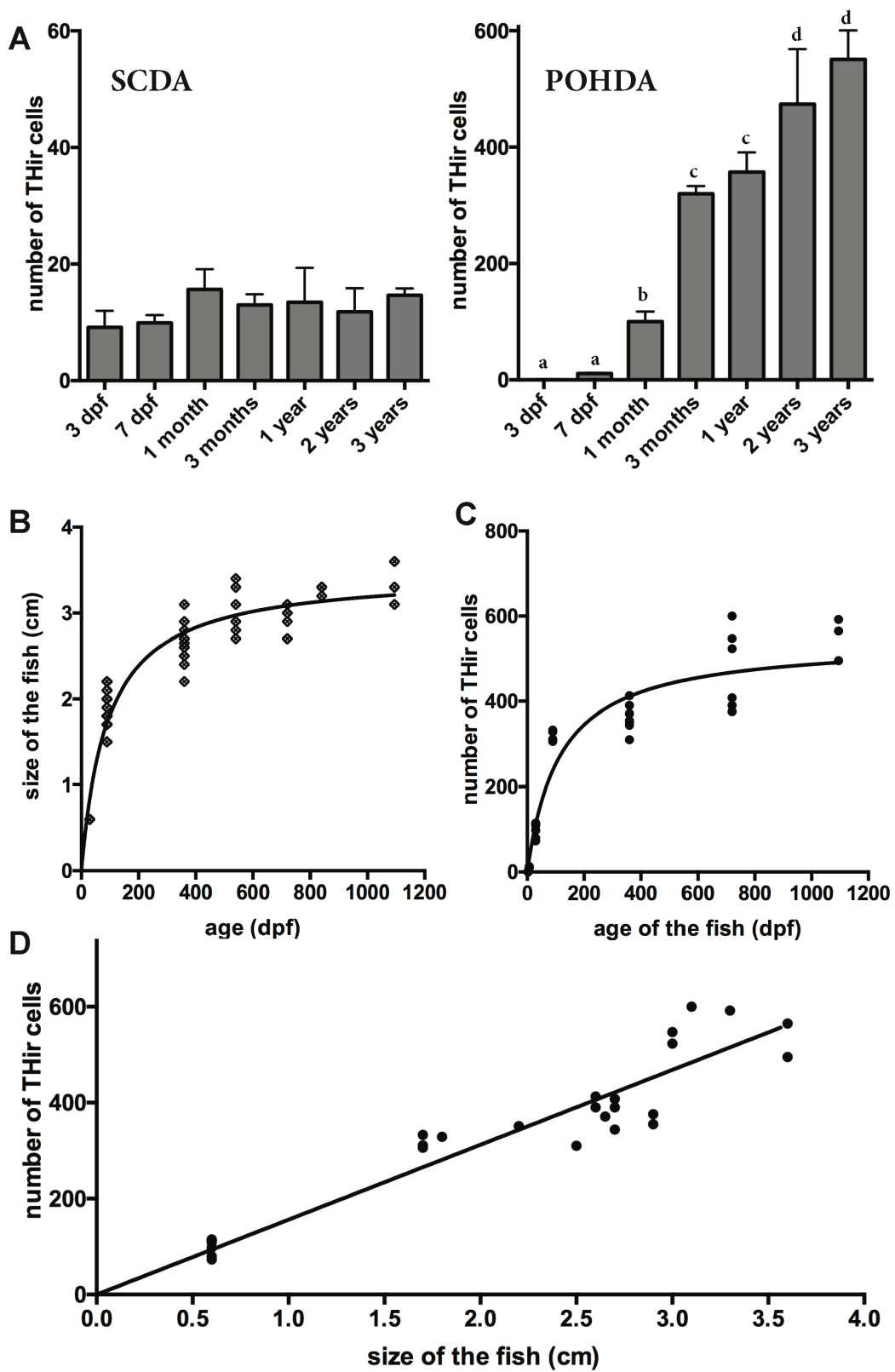


Figure 4



**Figure 5**

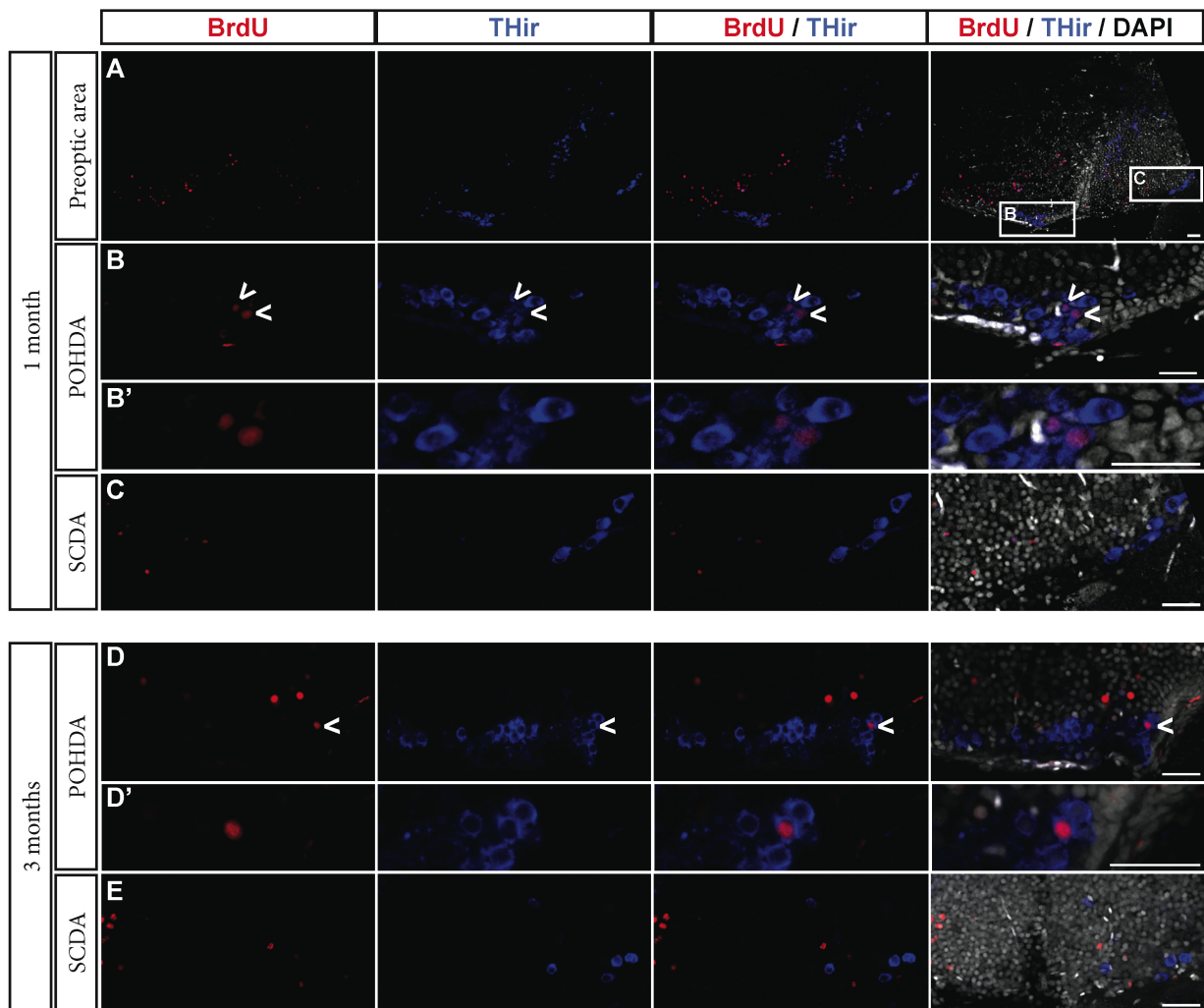
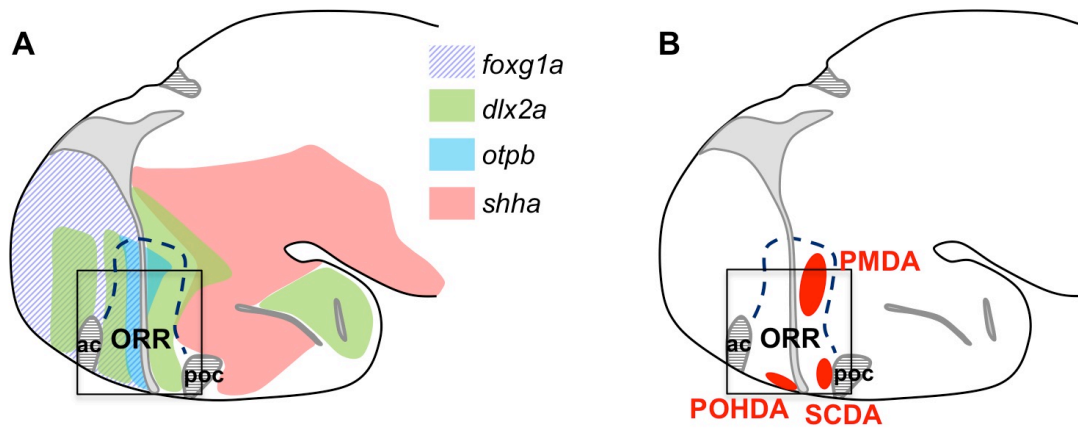




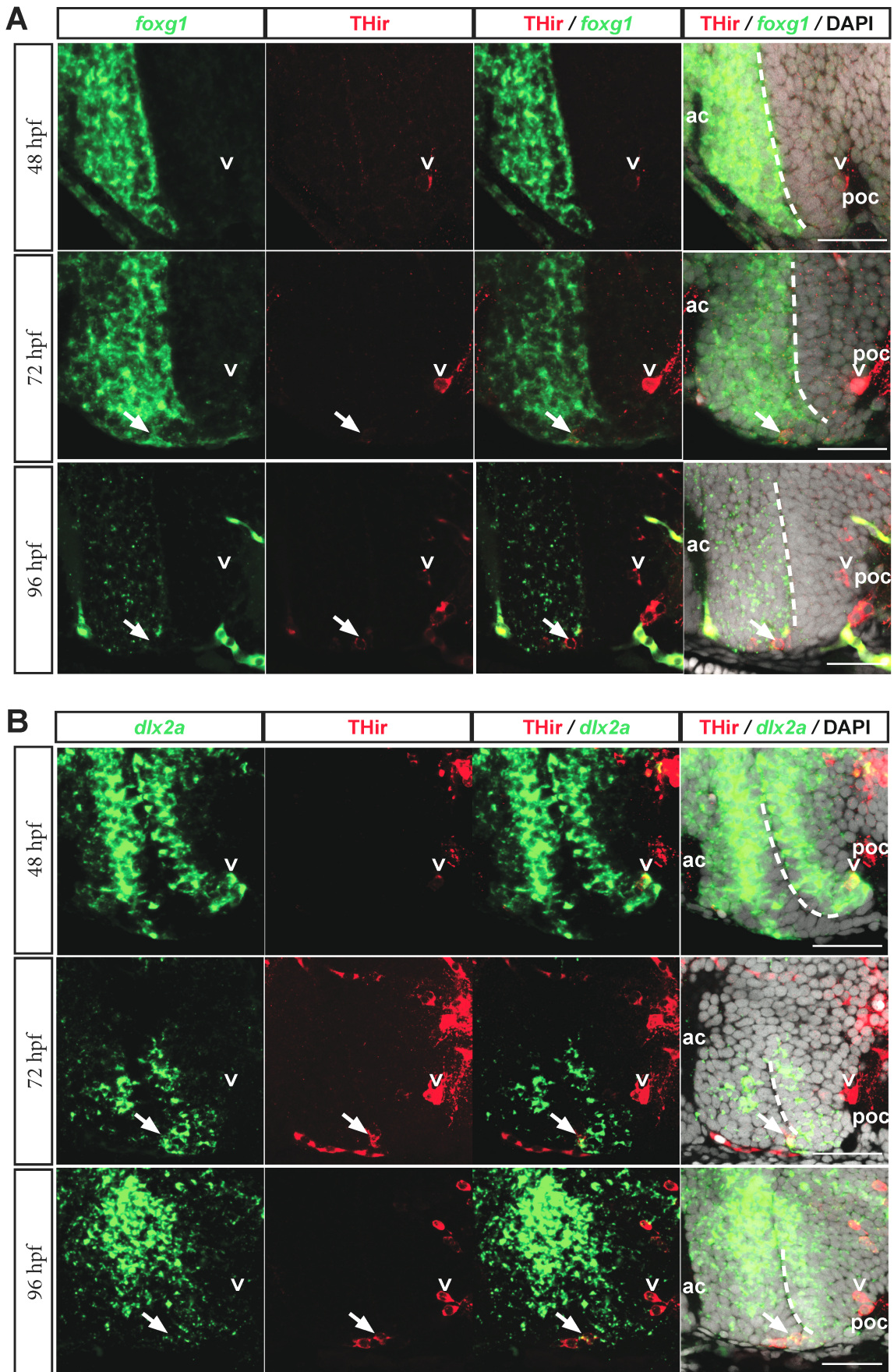
Figure 6



**C**

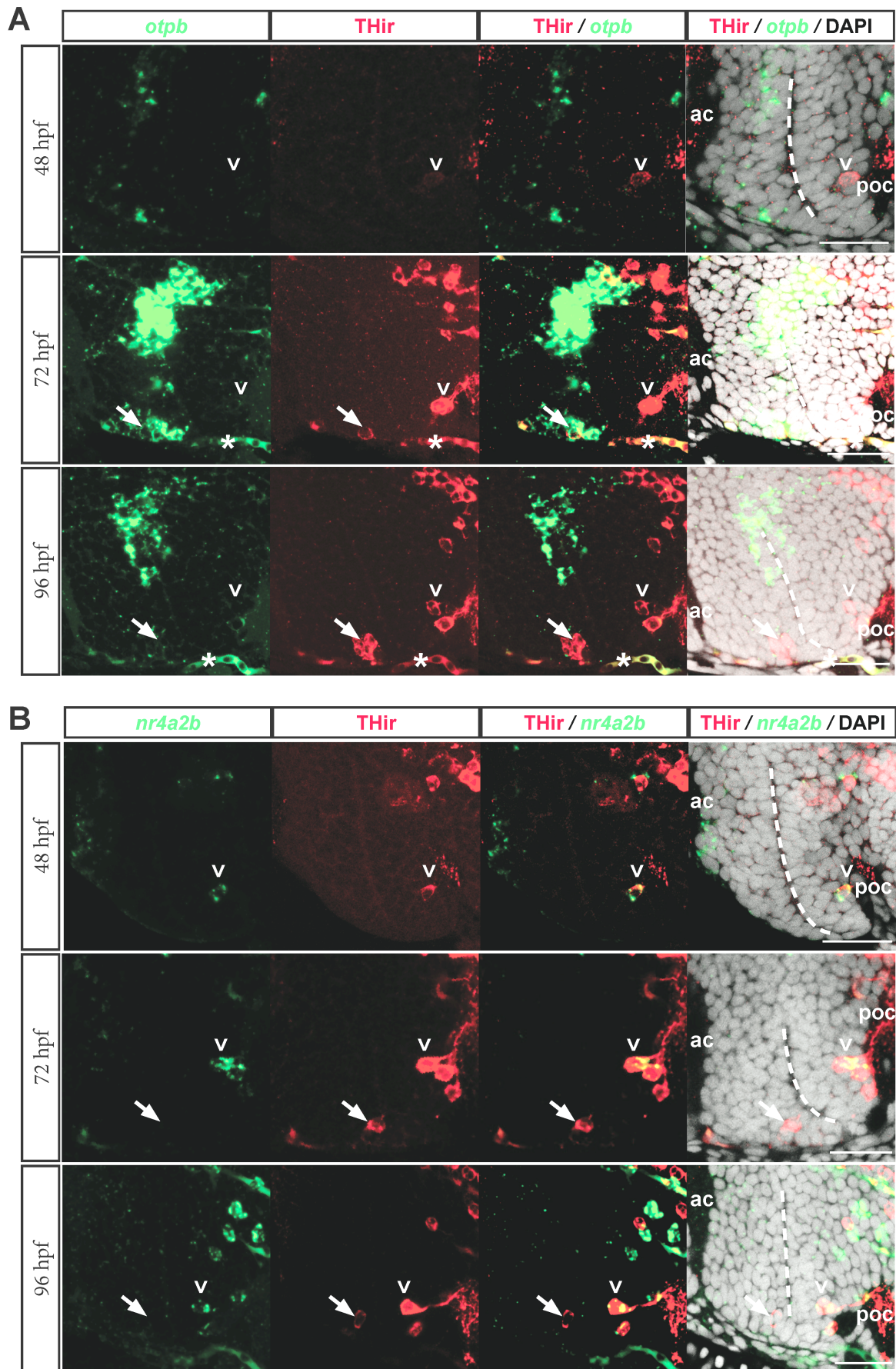
	48 hpf		72 hpf		84 hpf		96 hpf		1 month	
	POHDA	SC DA	POHDA	SC DA	POHDA	SC DA	POHDA	SC DA	POHDA	SC DA
<i>six3b</i>	*	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>nr4a2a</i>	*	+	-	+	-	+	-	+/-		
<i>nr4a2b</i>	*	+	-	+	-	+	-	+/-		
<i>foxg1a</i>	*	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-
<i>dlx2a</i>	*	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-
<i>otpa</i>	*	-	-	-	-	-	-	-		
<i>otpb</i>	*	-	+/-	-	-	-	-	-		
<i>lhx5</i>	*	-	-	-	-	-	-	-		
<i>shha</i>	*	-	-	-	-	-				
<i>nkx2.1a</i>	*	-	-	-	-	-				

Figure 7





**Figure 8**





# DISCUSSION & CONCLUSIONS

---



Ce travail s'inscrivait dans une perspective principalement physiologique, notre but étant d'étudier les neurones responsables du contrôle dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope et leur mise en place au cours du développement.

Pour savoir si le poisson-zèbre était un bon modèle pour l'étude du système dopaminergique responsable de ce contrôle, il a d'abord fallu démontrer l'existence d'un tel contrôle dans cette espèce.

Les outils disponibles ainsi qu'un certain nombre d'autres que nous avons développés ont permis ensuite d'identifier le support anatomique de ce contrôle (corps cellulaires, terminaisons axonales et récepteurs hypophysaires) chez l'adulte, et aussi de suivre la mise en place tardive de ces neurones au cours du développement.

Les résultats obtenus lors de notre étude, nous ont permis d'apporter un certain nombre de réponses, mais soulèvent aussi de nouvelles interrogations. Grâce notamment aux nombreux outils génétiques (lignées, mutants) et à la connaissance de son génome, le poisson-zèbre pourra être utilisé pour poursuivre l'étude de la génétique du développement du système dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope.



## 1. EXISTENCE D'UN CONTROLE DOPAMINERGIQUE INHIBITEUR DE LA FONCTION GONADOTROPE CHEZ LE POISSON-ZEBRE

Pour chercher à savoir s'il existait ou non un contrôle inhibiteur de la fonction gonadotrope par la dopamine chez le poisson-zèbre, nous avons réalisé des expériences *in vivo*, destinées à lever une inhibition dopaminergique potentielle. Nous avons en effet observé que l'injection, chez des femelles cycliques âgées de quatre mois et chez des femelles sexuellement regréssées âgées de deux ans, d'un agoniste du GnRH (GnRH $\alpha$ ) associé à un antagoniste des récepteurs dopaminergiques de type D2 : le dompéridone, entraîne une augmentation significative du niveau des transcrits de la LH $\beta$  hypophysaire par rapport aux femelles témoins, ce que ne permet pas l'injection de l'agoniste du GnRH seul, ou de l'antagoniste des récepteurs dopaminergiques de type D2 seul. Ces résultats mettaient ainsi en évidence *in vivo* sur le modèle du poisson zèbre, l'effet de la levée d'une inhibition DAergique sur la synthèse des ARNm codant la LH. Contrairement aux effets de la DA sur la libération de LH habituellement étudiés, ses effets sur la synthèse de LH n'avait été étudiée que chez quelques espèces. Une action inhibitrice de DA sur l'expression des ARNm de LH a par exemple été montrée *in vitro* sur des cellules hypophysaires en culture de carpe prépubère (Wang et al., 2011). En revanche, dans les cellules hypophysaires en culture de tilapia adulte (Melamed et al., 1996) ou lorsqu'il est administré *in vivo* chez le bar rayé mâle adulte (Hassin et al., 2000), la DA n'a aucun effet sur les niveaux de transcription de la LH $\beta$ .

En revanche, aucune modification de l'expression de la FSH $\beta$  hypophysaire n'a pu être observée après ces traitements. Ces résultats sont en accord avec les études *in vitro* menées sur la régulation des gonadotropines par la GnRH, lesquelles ne montrent aucune régulation de la sous unité  $\beta$  de la *fsH* dans les cellules hypophysaires de poisson-zèbre, après traitement durant 72 heures avec de la GnRH de saumon (Lin and Ge, 2009), contrairement à ce qu'on observe pour la *lh* qui affiche une régulation dose-dépendante. Ceci pourrait s'expliquer notamment par le fait que les cellules à FSH sont peu nombreuses dans l'hypophyse du poisson-zèbre comparées aux cellules à LH (So et al., 2005).

Chez les jeunes femelles en cycle nous n'avons pas pu mettre en évidence d'augmentation significative du rapport gonado-somatique (RGS), ni du nombre d'ovocytes vitellogéniques. Ceci peut s'expliquer par l'asynchronie des ovaires de poisson-zèbre : dans les ovaires des femelles en cycle on trouve des ovocytes à tous les stades de maturation. Il est donc difficile d'y observer l'effet de la stimulation hypophysaire

provoquée par le traitement combiné. En tout cas, d'autres expériences sont nécessaires pour préciser le rôle exact de DA dans la régulation de la sécrétion de LH au cours des cycles de ponte.

Au contraire, chez les femelles âgées sexuellement régressées ayant reçu le traitement combiné, une augmentation importante du poids de l'ovaire -qui s'est traduite par l'augmentation significative du RGS- a pu être observée. En outre, alors que sur les coupes histologiques des femelles âgées témoins, ou injectées soit avec l'agoniste du GnRH seul soit l'antagoniste des récepteurs dopaminergiques de la famille D2 seul, les ovocytes sont tous arrêtés au stade II, chez les vieilles femelles ayant reçu le traitement combiné, nous avons pu observer des ovocytes de stade III, contenant des granules vitellins. Ces ovocytes sont donc entrés dans le processus de vitellogenèse exogène (Selman et al., 1993) qui est hormone-dépendant (Tyler et al., 1991), traduisant une libération de LH qui a permis la reprise des cycles. L'ensemble de ces résultats montre donc que chez les vieilles femelles sexuellement régressées, cette levée d'inhibition a permis au GnRH d'activer la libération de la LH et la reprise des cycles ovariens.

Pour des raisons techniques il n'est malheureusement pas possible de tester les effets de l'injection de l'agoniste du GnRH (GnRH<sub>a</sub>) associé ou non à l'antagoniste des récepteurs dopaminergiques (Dompéridone) sur le déclenchement de la puberté chez de jeunes femelles poisson-zèbre. Au stade pré-pubère (moins de 2.5 mois dans nos conditions d'élevage) il est très difficile de sexer et d'injecter les animaux.

Il apparaît donc que, chez le poisson zèbre, la DA peut exercer un effet inhibiteur puissant, capable de s'opposer à l'action stimulante de la GnRH sur la production de LH et que, chez cette espèce, il existe en effet une dualité dans le contrôle neuroendocrine de la reproduction. C'est à notre connaissance la première preuve de l'existence d'un contrôle inhibiteur sur les cellules dopaminergiques à LH chez ce modèle de téléostéens. Par conséquent, le poisson zèbre ne fait pas exception dans le groupe des cyprinidés. En effet, nos résultats sont en accord avec ce qui a été initialement découvert chez le poisson rouge (Peter et al., 1978; Popesku et al., 2008), puis la carpe et la loche (Lin et al., 1988), dans lesquels ce contrôle inhibiteur de la reproduction est puissant. Ces résultats démontrent aussi que chez le poisson-zèbre, le rôle de la DA dans le contrôle de la sécrétion de LH n'est pas limité à la période de vieillissement, mais peut également être d'importance au cours des cycles de reproduction. Ce contrôle semble donc intervenir dans le blocage des dernières étapes de la maturation ovocytaire en bloquant la synthèse et la libération de la LH, empêchant les ovocytes d'entrer dans la phase de vitellogenèse exogène et donc de

terminer leur maturation. Il faut cependant noter que la levée de l'inhibition dopaminergique seule n'est pas suffisante pour augmenter l'expression de la lh $\beta$  d'une manière significative, ce qui indique que chez les femelles âgées, l'inhibition dopaminergique est accompagnée d'une production déficiente de la GnRH.

Une autre situation dans laquelle ce contrôle dopaminergique pourrait intervenir pour limiter la fonction de reproduction est la restriction alimentaire. En effet, alors que dans nos laboratoires le poisson-zèbre peut se reproduire chaque semaine, dans la nature sa reproduction est saisonnière. Il ne se reproduit qu'une fois par an, au moment de la mousson, lorsque les apports en nourriture sont importants, grâce à la montée des eaux apportée par les fortes pluies (Spence et al., 2008). La restriction alimentaire peut sérieusement affecter le succès de la reproduction. Il a été signalé qu'une réduction de l'alimentation peut provoquer une inhibition de la maturation des gonades chez plusieurs espèces de poissons, y compris le poisson rouge *Carassius auratus*, (Sasayama and Takahashi, 1974), le bar européen *Dicentrarchus labrax*, (Cerdá et al., 1994), et le mâle *Salmo salar* saumon de l'Atlantique, (Berglund, 1995). Chez le bar femelle, les effets néfastes de la restriction alimentaire ont été associés à des niveaux plasmatiques d'estradiol réduits (Cerdá et al., 1994). Toutefois, l'expression des gènes des gonadotropines n'a pas été affectée par la restriction alimentaire chez le poisson rouge femelle adulte (Sohn et al., 1998).

Ce type de contrôle dopaminergique n'a été étudié que chez quelques espèces, majoritairement des téléostéens mais aussi chez quelques mammifères d'intérêt commercial tel que le mouton. Hormis chez les ovins où les bovins chez lesquels il limite la saison de reproduction aux jours courts, les situations physiologiques dans lesquelles ce contrôle inhibiteur intervient ne sont donc pas toutes connues. D'autres expériences seront nécessaires pour mieux identifier les situations physiologiques dans lesquelles ce contrôle est mis en jeu.

Chez l'homme, il a été montré dans plusieurs études portant sur des pathologies de la reproduction que la DA était impliquée ou pouvait traiter en partie certaines d'entre elles (Mikuma et al., 1991; Van den Berghe et al., 1994). Ainsi, il a été rapporté qu'il existait un tonus dopaminergique inhibiteur sur les cellules gonadotropes et qu'en outre la DA supprimait leur sensibilité à la GnRH. Un tel contrôle inhibiteur pourrait être impliqué dans certains cas d'infertilité/stérilité, par exemple ceux observés chez les jeunes femmes atteintes d'anorexie mentale ou chez les sportives pratiquant la compétition de très haut niveau, chez lesquelles les cycles menstruels s'arrêtent.

Présent chez le poisson-zèbre, ainsi que chez d'autres vertébrés (amphibiens, oiseaux et même mammifères (Peter et al., 1986; Dufour et al., 2005)), ce double contrôle cérébral, stimulateur par la gonadolibérine (GnRH), mais aussi inhibiteur par la dopamine, a probablement favorisé au cours de leur évolution la grande diversification des cycles de reproduction (changement de sexe, contrôle de la puberté, contrôle de l'ovulation par les conditions environnementales...) chez les vertébrés, et la réussite de leur adaptation à des conditions environnementales très différentes (Pasqualini et al., 2004; Vidal et al., 2004; Dufour et al., 2005; Dufour et al., 2010).

## **2. BASES ANATOMIQUES DU CONTROLE DOPAMINERGIQUE INHIBITEUR DE LA FONCTION DE REPRODUCTION CHEZ LE POISSON-ZEBRE**

Nous avons recherché le support anatomique de ce contrôle dopaminergique inhibiteur de la fonction de reproduction chez le poisson-zèbre.

### **2.1 Implication des récepteurs dopaminergiques de la famille D2 dans le contrôle de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre**

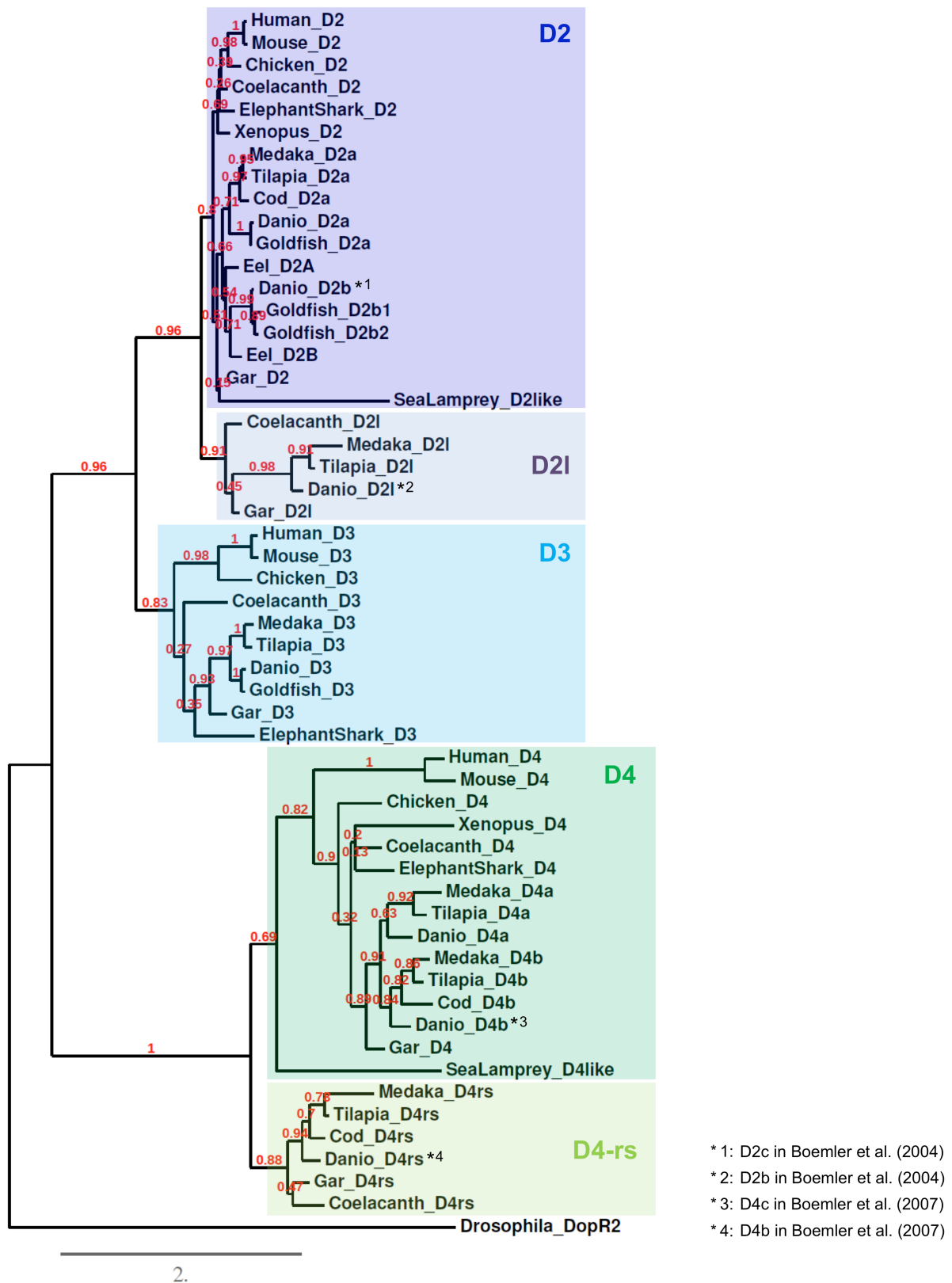
Des études pharmacologiques chez diverses espèces de poissons téléostéens ont montré que les actions de la dopamine sur les cellules gonadotropes sont médiées par des récepteurs de la famille D2 (pour revue (Dufour et al., 2010)).

Alors qu'il n'existe chez les mammifères et les oiseaux qu'un seul gène D2-R, codant deux isoformes protéiques (D2Short et D2Long), générées par un épissage alternatif (Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989), chez les téléostéens tels que le poisson-zèbre (Boehmler et al., 2004), l'anguille européenne (Pasqualini et al., 2009), et le poisson rouge (Popesku et al., 2011) plusieurs gènes codant pour des D2-R ont été trouvés. Le séquençage complet du génome d'autres téléostéens allonge progressivement la liste des espèces exprimant au moins deux sous-types de récepteurs D2 (épinouche, médaka, tétraodon), bien que le rôle physiologique de ces récepteurs multiples n'ait pas encore été abordé.

Il a été décrit, chez le poisson-zèbre, trois gènes codant des récepteurs dopaminergiques D2: D2a, D2b, et D2c (Boehmler et al., 2004). Récemment, la nomenclature des trois gènes D2 a changé dans la base de données dédiée à cet organisme : <http://zfin.org/>. L'ancien D2b a été renommé D2like (D2l), et l'ancien D2c a été renommé D2b. Ceci est dû au fait que la séquence D2l est phylogénétiquement éloignée

de celle des deux autres paralogues. Cependant, ils n'ont jamais été comparés avec les récepteurs D2 des groupes de vertébrés autres que téléostéens, leur histoire évolutive n'est donc pas connue.

Notre nouvelle analyse phylogénétique (*figure 20*), prenant en compte les nouvelles séquences génomiques appartenant à des espèces de vertébrés, autres que des téléostéens, et disponibles sur Ensembl Genome Browser, remet en cause l'hypothèse d'une duplication spécifique aux téléostéens. Elle montre que, en plus des gènes D2 classiques (comprenant D2a et D2c récemment renommé D2b chez le poisson zèbre), il existe un clade supplémentaire, contenant le D2l du poisson-zèbre. On y trouve les séquences de plusieurs espèces de téléostéens. De plus, le coelacanthe, qui est phylogénétiquement plus proche des tétrapodes que des téléostéens, possède lui aussi un orthologue de D2l. Ainsi, notre analyse suggère fortement que le gène D2l préexistait chez l'ancêtre commun Ostéichtyen des Sarcoptérygiens (comprenant le Coelacanthe et les tétrapodes) et des Actinoptérygiens (dont font partie les téléostéens).



\* 1: D2c in Boemler et al. (2004)  
 \* 2: D2b in Boemler et al. (2004)  
 \* 3: D4c in Boemler et al. (2007)  
 \* 4: D4b in Boemler et al. (2007)

Figure 20 : Arbre phylogénétique des protéines codant les récepteurs dopaminergiques de la famille D2

Même s'ils n'appartiennent pas à la même classe, l'analyse de l'expression de ces trois récepteurs D2/D2l a montré qu'ils sont tous exprimés et colocalisés dans la région médiane de l'hypophyse et en particulier dans les cellules gonadotropes sécrétrices de LH, laissant penser qu'ils pourraient tous jouer un rôle dans la réception du message dopaminergique inhibiteur par ces cellules. Nos résultats sur la distribution des D2/D2l dans l'hypophyse est en accord avec des études antérieures réalisées chez d'autres téléostéens [poisson-rouge (Sloley et al., 1991) ; truite (Linard et al., 1996; Vacher et al., 2003) ; anguille européenne (Pasqualini et al., 2009)]. Nos données soutiennent donc l'idée classique que la DA agit directement au niveau des cellules gonadotropes via des récepteurs de la famille D2 pour inhiber la sécrétion de LH. Ayant également retrouvé le D2l dans les cellules à LH chez le poisson-zèbre, on ne peut toutefois exclure de trouver dans ces cellules gonadotropes également des récepteurs D3 et D4 (autres membres de la famille D2). A notre connaissance, leur présence dans l'hypophyse de téléostéen n'a jamais été recherchée. Il se pourrait alors que ce contrôle dopaminergique inhibiteur, en plus d'être transduit par des récepteurs D2/D2l, puisse être transduit aussi par d'autres récepteurs de la famille D2. D'autres expériences sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Même si nous avons observé une importante colocalisation dans l'expression des trois D2/D2l dans l'hypophyse, dans le cerveau leur l'expression ne se superpose pas dans certains noyaux et on observe pour chacun d'entre eux des régions d'expression spécifique. Ces résultats sont en accord avec les observations de Boehmler et al (2004), qui a montré que dans le système nerveux embryonnaire, l'expression des trois gènes est différente dans l'espace et dans le temps, bien que des chevauchements partiels soient observés. Ceci laisse donc supposer une évolution différente des trois D2/D2l, qui ont été sélectionnés de façon différente selon les noyaux et les stades de développement, leur conférant des rôles en partie différents. De plus, l'alignement des séquences des trois protéines déduites montre que la différence principale entre D2a, D2b et D2l se situe dans la troisième boucle intracellulaire, qui est impliquée dans le couplage aux protéines G, les interactions régulatrices avec les autres molécules de signalisation et aussi la localisation subcellulaire des récepteurs (Boehmler et al., 2004). Ceci pourrait soutenir l'hypothèse que l'activation des trois sous-types de D2-like exprimés par les cellules LH peut conduire à une activation différentielle de plusieurs voies de signalisation intracellulaire. De nouvelles études portant sur la signalisation intracellulaire de ces récepteurs sont donc nécessaires, pour étayer ou infirmer cette hypothèse.



## 2.2 Identification des neurones dopaminergiques hypophysiotropes

Chez les téléostéens, il n'existe pas de système porte hypothalamo-hypophysaire, les neurones de la région préoptico-hypothalamique innervent directement leurs cellules cibles dans l'hypophyse. En outre, dans l'antéhypophyse, les cellules d'un type donné sont généralement regroupées dans une région définie de la glande, ce qui n'est pas le cas chez les mammifères (Ball, 1981). L'étude des interactions entre les neurones hypophysiotropes et leurs cellules cibles est donc relativement plus simple chez les téléostéens que chez les mammifères. Pour obtenir une preuve morphologique du contrôle dopaminergique sur la fonction gonadotrope dans cette espèce, nous avons étudié d'abord l'innervation dopaminergique de l'hypophyse en nous concentrant sur les cellules productrices de LH qui ont répondu de façon significative au double traitement. Nous avons observé des fibres TH-immunoreactives (THir) sur- ou au voisinage- des cellules hypophysaires productrices de LH. Ces résultats sont en accord avec les données précédemment obtenues chez d'autres téléostéens, montrant une innervation dopaminergique directe des cellules gonadotropes, en utilisant la détection immunohistochimique de la TH ou de la DA [chez le poisson-rouge (Kah et al., 1984a; Kah et al., 1986a), la truite (Anglade et al., 1993), l'anguille européenne (Vidal et al., 2004) et la sole sénégalaise (Rodriguez-Gomez et al., 2000)], et renforcent l'existence d'une action hypophysaire directe de la DA dans la régulation neuroendocrine de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre.

Pour repérer précisément les neurones dopaminergiques qui projettent leurs terminaisons axonales sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse chez le poisson-zèbre nous avons injecté du Dil dans la partie centrale de l'hypophyse et l'avons laissé migrer 8 à 10 jours : Les uniques neurones dopaminergiques hypophysiotropes que nous avons observés chez le poisson-zèbre sont localisés dans la partie la plus ventrale du noyau préoptique parvocellulaire antérieur (PPa), en avant du récessus optique (OR). Nous les avons donc nommés: les neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires (POHDA).

Ces résultats sont en cohérence avec des études anatomiques menées précédemment chez le poisson-zèbre, chez lequel il a été montré que la principale cible des neurones dopaminergiques du PPa est l'hypophyse, en projetant leurs axones dans le tractus préoptico-hypophysaire (Ma, 2003). Nos résultats sont également en accord avec ceux d'études combinant traçage des voies neuronales et immunocytochimie de la TH chez le poisson rouge (Kah et al., 1984a; Kah et al., 1987a; Anglade et al., 1993), la truite (Linard

et al., 1996), et l'anguille européenne (Vidal et al., 2004; Weltzien et al., 2006), qui ont démontré que l'importante innervation dopaminergique de la région médiane (PPD) de l'hypophyse (contenant les cellules gonadotropes) provient d'un sous-ensemble de neurones localisé dans la partie la plus antéro-ventrale de l'aire préoptique (nommé différemment selon les auteurs : NPOav (Kah et al., 1987a; Vidal et al., 2004; Weltzien et al., 2006); NPOpc (Anglade et al., 1993); PPa (Johnston and Maler, 1992); SOC (Holmqvist and Ekstrom, 1995)). La destruction de ce noyau préoptique chez le poisson rouge ne supprime que l'innervation dopaminergique du lobe antérieur de l'hypophyse; l'innervation du lobe intermédiaire n'est pas affectée (Kah et al., 1987a). Ceci suggère que dans cette espèce, les neurones dopaminergiques du PPa contrôlent la partie antérieure de l'hypophyse (ou *pars distalis*), tandis que les fibres dopaminergiques provenant d'autres neurones THir contrôleraient la *pars intermedia* (Fryer and Maler, 1981; Kah et al., 1987a). La méthode de traçage rétrograde utilisant le DiI ne permet pas de discriminer les différentes projections dans l'hypophyse, dans le lobe antérieur, ou intermédiaire. Cependant, chez le poisson-zèbre, il est apparu clairement que l'ensemble des projections dopaminergiques dans l'hypophyse, proviennent de la région antérieure à l'OR, donc dans les neurones POHDA, contrairement à ce qui a été décrit chez d'autres téléostéens chez lesquels d'autres noyaux dopaminergiques, tels que le SC (Hornby et al., 1987; Meek et al., 1989; Roberts et al., 1989; Ekstrom et al., 1990; Hornby and Piekut, 1990; Sas et al., 1990) et l'organe paraventriculaire (PVO) (Kah et al., 1984b; Fryer et al., 1985; Kah et al., 1986a; Peter et al., 1986) ont également été décrits comme hypophysiotropes. Entre nos mains en tout cas, les populations DAergiques du SC et du PVO n'ont jamais été marquées de façon rétrograde par le DiI. La population POHDA semble donc être la seule population dopaminergique hypophysiotrope et les neurones qui contrôlent la fonction gonadotrope résident donc dans cette population.

Néanmoins, la DA est connue pour contrôler de nombreuses sécrétions hypophysaires (PRL, GH, TSH,  $\alpha$ -MSH; pour revue (Tuomisto and Mannisto, 1985)), d'autres études supplémentaires sont donc nécessaires pour rechercher s'il existe dans cette population POHDA, une ou plusieurs sous-populations, avec pour chacune d'entre elles une fonction hypophysiotrope différente. En effet, nous avons pu observer que les neurones POHDA expriment tous le gène *th1* et que certains d'entre eux expriment aussi *th2*, ce qui pourrait suggérer l'existence de deux sous-populations. Au contraire, il pourrait y avoir une unique population, régulant les différentes fonctions hypophysaires par l'intermédiaire de récepteurs différemment couplés ou de combinaisons différentes de

récepteurs. Dans ce cas, la TH2 servirait simplement à ajuster l'intensité de l'inhibition. Il serait intéressant de savoir si par exemple l'activité ou l'expression de TH2 est régulée par les stéroïdes sexuels. Des techniques telles que le « laser killing » permettant la destruction sélective de chaque neurone POHDA, ou le marquage de cellule unique pourraient aider à répondre à ces questions.

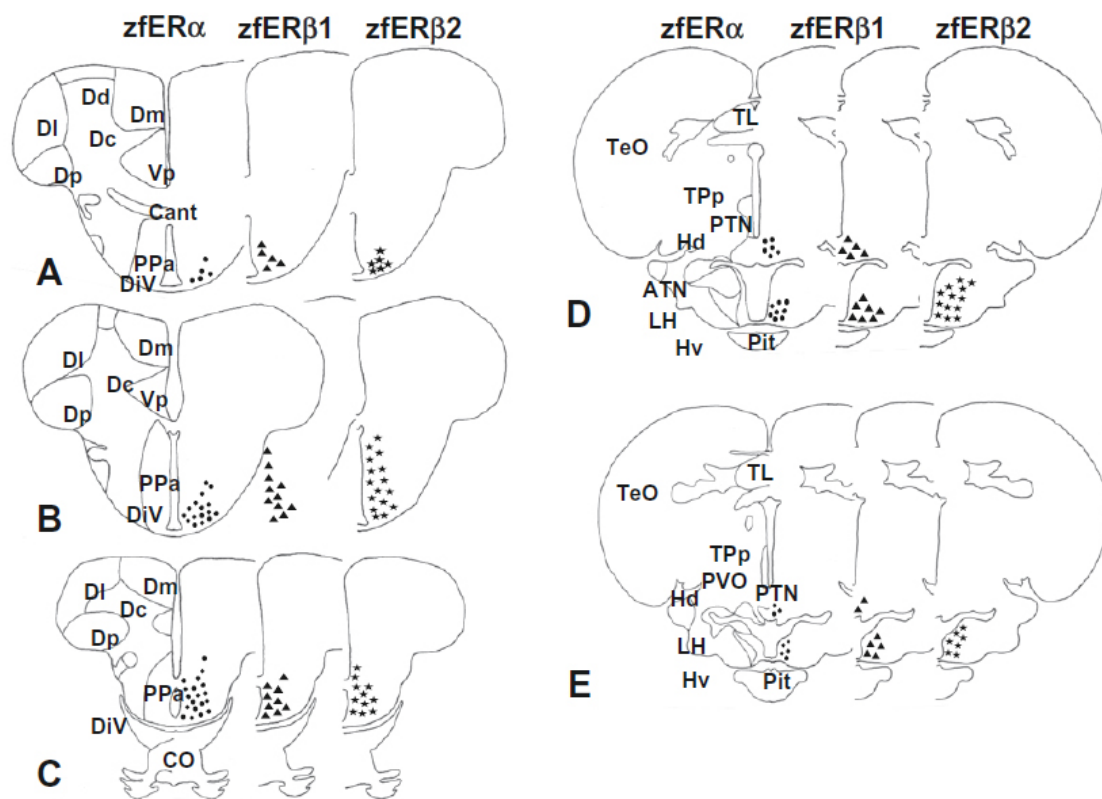
### 2.3 Les neurones dopaminergiques neuroendocrines comme cibles de la rétroaction des stéroïdes sexuels

L'intégration de stimuli internes tels que l'état du cycle ovarien, grâce aux rétrocontrôles exercés par les stéroïdes sexuels est un des rôles importants des neurones DAergiques préoptiques. Il est par exemple connu chez la brebis, qu'une augmentation de l'activité de la DA, sous l'effet de l'œstradiol, est responsable de l'inhibition de la sécrétion pulsatile de GnRH durant la période d'anœstrus saisonnier (pour revue : (Caraty et al., 2001)).

La présence de récepteurs aux œstrogènes dans les neurones à GnRH chez les mammifères est controversée, semblant dépendre de l'espèce considérée : chez la souris la présence du récepteur ER- $\beta$  a été démontrée récemment (Herbison and Pape, 2001), alors que chez la brebis (Thiery et al., 2002) elle n'a jamais pu être mise en évidence. Chez les téléostéens (Navas et al., 1995), les neurones à GnRH n'expriment clairement pas ces récepteurs. En revanche, les neurones dopaminergiques de l'aire préoptique expriment tous un récepteur des œstrogènes (Linard et al., 1996). De plus les œstrogènes sont connus pour affecter profondément le tonus inhibiteur dopaminergique sur la libération de LH chez plusieurs espèces (De Leeuw et al., 1988; Trudeau et al., 1993a; Linard et al., 1995) et d'augmenter l'expression de la *th* chez la truite (Vetillard et al., 2003). Ainsi, les données obtenues chez le poisson rouge et la truite soutiennent l'hypothèse que les neurones dopaminergiques inhibiteurs sont des cibles directes pour l'œstradiol et sont probablement l'un des principaux médiateurs de la rétroaction négative chez les poissons (Trudeau, 1997).

Chez le poisson-zèbre, un rôle similaire de la DA dans l'intégration des messages stéroïdiens, peut être envisagé. Dans cette espèce, tous les récepteurs aux œstrogènes ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2) ont été retrouvés dans le PPa (Menuet et al., 2002) qui contient les neurones POHDA (**figure 21**). De plus nous avons vu qu'une levée de l'inhibition DAergique chez les

femelles cycliques permettait une augmentation de la synthèse de la LH dans l'hypophyse, laissant penser que ce contrôle dopaminergique jouerait un rôle dans le contrôle neuroendocrine de la reproduction pendant les cycles. Il est donc permis de penser que la DA pourrait jouer un rôle de régulateur de la synthèse et de la sécrétion des gonadotropines hypophysaires en réponse à un rétrocontrôle par les stéroïdes sexuels produits par les gonades. Les neurones POHDA pourraient représenter aussi des cibles pour les perturbateurs endocriniens, une voie qui n'a pas encore été explorée.



**Figure 21:** Schéma de la distribution des trois récepteurs des oestrogènes zfERα, zfERβ1 et zfERβ2 dans le cerveau du poisson-zèbre (Zohar et al., 2010). Abréviations: ATN, noyau du tuber antérieur; Cant, Commissure antérieure; CO, Chiasma optique; Dc, zone centrale de l'aire télencéphalique dorsale; Dd, zone dorsale de l'aire télencéphalique dorsale; DiV, ventricule diencéphalique; Dl, zone latérale de l'aire télencéphalique dorsale; Dm, zone médiane de l'aire télencéphalique dorsale; Dp, zone postérieure de l'aire télencéphalique dorsale; Hd, zone dorsale de l'hypothalamus périventriculaire; Hv, zone ventrale de l'hypothalamus périventriculaire; LH, noyau hypothalamique latéral; Pit, hypophyse; PPa, partie antérieure du noyau préoptique parvocellulaire; PTN, noyau du tuber postérieur; TeO, Toit optique; TL, torus longitudinalis; TPp, noyau périventriculaire du tubercule postérieur; Vp, noyau postcommissural de la zone télencéphalique ventrale

L'émergence de lignées transgéniques de médaka et de poisson zèbre chez lesquels les seuls neurones à GnRH expriment des protéines rapportrices fluorescentes (Okubo et al., 2006; Abraham et al., 2008) fournit de nouvelles techniques hautement sensibles pour visualiser et étudier les interactions qu'entretiennent les systèmes neuroendocrines. Même si nous avons mis en évidence une innervation directe des cellules gonadotropes par les neurones dopaminergiques chez le poisson-zèbre, d'autres études seront nécessaires pour analyser les interactions entre ce système DAergique avec les autres systèmes de contrôle neuroendocrine de la reproduction, en particulier avec le système à GnRH au niveau de l'aire préoptique, par exemple.

D'un point de vue comparatif, Il est tentant de comparer les neurones POHDA du poisson-zèbre avec les groupes de cellules DA définies chez les mammifères (Hokfelt et al., 1984). Plusieurs études ont montré que la DA joue un rôle majeur dans l'inhibition saisonnière (en période de jours longs ) de la sécrétion des gonadotropines chez la brebis (Thiery et al., 1989; Viguie et al., 1998) et la vache, et que les cellules DAergiques dans la région rétrochiasmatique latérale, désigné comme A15 chez le mouton, sont impliquées dans cette régulation. Une inhibition dopaminergique de la LH similaire se retrouve aussi chez la poule (Sharp et al., 1989; Contijoch et al., 1992). La différence entre les téléostéens et les amniotes est que chez les téléostéens la DA agit directement sur l'hypophyse, tandis que chez les amniotes, la DA agit au niveau de l'éminence médiane, en inhibant les neurones à GnRH (Kuljis and Advis, 1989). L'homologie régionale des neurones POHDA et des neurones A15 n'est pas claire. Les cellules POHDA se trouvent rostralement par rapport à au récessus optique, tandis que, chez les ovins, les cellules DA impliquées dans l'inhibition de la LH sont situées dans la zone rétrochiasmatique, et donc sont caudales par rapport au récessus optique. Quelle que soit leur situation exacte, de nombreuses espèces de vertébrés utilisent ces neurones dopaminergiques pour l'intégration de multiples signaux internes et environnementaux et limiter ainsi leur fonction de reproduction.

### **3. DEVELOPPEMENT DES NEURONES DOPAMINERGIQUES PREOPTICO-HYPOPHYSAIRES**

Les neurones dopaminergiques se développent dans différentes régions du cerveau et projettent localement ou envoient de longues projections axonales, ce qui fait d'eux des systèmes assez hétérogènes dans le cerveau des vertébrés. Les neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires constituent un exemple rare de neurones non-peptidergiques

impliqués dans le contrôle des sécrétions antéhypophysaires. Nous pensons donc que l'étude de l'origine embryologique et du codage génétique de ces neurones dopaminergiques particuliers (hypophysiotropes), par comparaison avec les autres neurones dopaminergiques du cerveau, en particulier ceux, très étudiés y compris dans notre équipe, impliqués dans le contrôle de l'activité motrice, serait très instructive du point de vue fonctionnel.

Le poisson-zèbre est un excellent modèle pour étudier la spécification et la projection axonale des neurones dopaminergiques. La grande distance évolutive entre les poissons et les mammifères donne l'opportunité d'identifier des mécanismes de base conservés, qui contrôleraient la différenciation et la projection des différents groupes de neurones dopaminergiques chez les vertébrés. En tant que tel, le poisson-zèbre a été largement utilisé ces dernières années pour étudier le rôle joué par les principales voies de signalisation dans le contrôle du développement des neurones diencephaliques. Ces études ont déjà révélé un degré de conservation inter-espèces dans le développement de circuits hypothalamiques et ont mis en évidence l'activité de déterminants transcriptionnels principaux impliqués dans leur différenciation (Machluf et al., 2011).

### 3.1 Ontogenèse des neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires et de leurs projections

Nous avons étudié le développement des neurones POHDA. D'abord nous avons constaté que les premières terminaisons nerveuses de ces neurones atteignent l'hypophyse entre 72 et 84 hpf. De manière surprenante, peu de fibres THir ont pu être observées dans la *pars distalis* rostrale, au voisinage des cellules exprimant la *prl*, dont on sait pourtant qu'elle est contrôlée par la DA à partir de 48hpf (Liu et al., 2006). En revanche, la grande majorité des fibres THir a été observée dans la *pars distalis* proximale (ou région médiane de l'hypophyse) qui contient les cellules gonadotropes (Weltzien et al., 2014), suggérant que ces cellules sont la cible principale de l'innervation dopaminergique.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'ontogénèse de ces neurones. Grâce à des repères anatomiques précis (commissure antérieure, commissure post-optique et récessus optique) nous avons pu différencier aisément les neurones POHDA, antérieurs à l'OR, de ceux du noyau suprachiasmatique (SCDA) voisin mais situés postérieurement par rapport à l'OR, et retracer leur mise en place au cours du développement embryonnaire. Le/les premier(s) neurone(s) POHDA commence(nt) à exprimer la protéine TH à partir de 72hpf,

ils sont donc les derniers à l'exprimer dans le cerveau du poisson-zèbre. Ceci explique probablement pourquoi ils n'ont en fait jamais été observés et considérés dans les études de développement qui s'arrêtent souvent avant qu'ils n'apparaissent. En effet, même si les systèmes à DA ont été décrits dans le cerveau adulte (Kaslin and Panula, 2001; Rink and Wullimann, 2001, 2002b; Ma, 2003), la région préoptique / hypothalamique chez la larve du poisson zèbre n'a pas été précisément étudiée d'un point de vue anatomique, et l'ontogenèse des neurones POHDA n'avait jamais été décrite. En outre, chez l'embryon les différentes populations dopaminergiques sont très proches les unes des autres et leur distinction n'est pas toujours évidente. Quoi qu'il en soit, les groupes dopaminergiques préoptiques sont parmi les derniers à se différencier et ont été relativement peu étudiés jusqu'à présent.

Des études de « birthdating » ont été menées sur l'ensemble des précurseurs DA du cerveau du poisson-zèbre et elles ont montré que les neurones DA préoptiques étaient produits à partir d'une phase tardive de la neurogenèse, et qu'ils expriment la TH entre 48 et 60 hpf (Mahler et al., 2010). Or nos données montrent qu'à ce stade, il n'y a pas de cellules THir dans le PPa, par opposition au noyau SC qui en contient déjà de nombreuses. En raison de la proximité entre le SC et le PPa, et à l'apparition rapide des nombreux neurones SCDA, c'est probablement la population DAergique du SC qui correspond au groupe dopaminergique référencé comme groupe "préoptique" dans de nombreuses études antérieures (Rink and Wullimann, 2002a; Sallinen et al., 2009; Filippi et al., 2010).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux caractéristiques développementales de cette population neuroendocrine. Nous avons d'abord compté les cellules THir et mis en évidence que contrairement au nombre de neurones SCDA qui est maximum dès 72hpf le nombre de neurones POHDA augmente tout au long de la vie du poisson-zèbre, proportionnellement à la taille de l'animal et de façon allométrique. Nous nous sommes demandé si ces neurones provenaient du recrutement de nouvelles cellules ou bien s'ils provenaient d'un changement phénotypique de cellules existant déjà.

Nos analyses d'incorporation de BrdU réalisées à deux stades, juvénile et adulte, ont révélé qu'alors qu'il n'y a jamais colocalisation TH-BrdU dans les neurones SCDA, certains des précurseurs des neurones POHDA ont bien incorporé du BrdU. Ces progéniteurs étaient donc en phase S au moment du traitement (chez des poissons d'un mois et de trois mois) et elles sont sorties peu après du cycle cellulaire pour générer de nouveaux neurones POHDA. Ces résultats suggèrent donc que des neurones POHDA puissent être générés tout au long de la vie du poisson, suggérant fortement l'existence



d'une neurogenèse adulte pour cette population dopaminergique. Une neurogenèse continue est rendue possible par le maintien de progéniteurs indifférenciés dans des niches spécifiques qui peuvent être recrutés dans la cascade neurogène même au stade adulte (Chapouton and Godinho, 2010). Il a déjà été signalé que dans le cerveau de poisson-zèbre adulte, la zone ventriculaire du PPa est une région de neurogenèse qui contient des cellules à prolifération rapide (Adolf et al., 2006).

La capacité inhabituelle de prolifération des précurseurs des neurones POHDA pourrait être liée au fait qu'ils expriment des récepteurs aux œstrogènes. En effet l'expression en quantité importante des trois sous-types de récepteurs œstrogènes ( $\alpha$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) a été démontrée dès 24hpf dans la région du PPa qui contient sûrement les progéniteurs des neurones POHDA (Menuet et al., 2002). Or, les œstrogènes sont connus pour affecter le développement du cerveau, et moduler la neurogenèse embryonnaire et adulte (Martinez-Cerdeno et al., 2006; Mouriec et al., 2008; Barha et al., 2009; Kah et al., 2009; Diotel et al., 2013; Coumaillau et al., 2014). Néanmoins des effets à la fois stimulants et inhibiteurs de ces stéroïdes sexuels sur la neurogenèse ont été décrits et la localisation exacte des progéniteurs des POHDA n'est pas connue. Le rôle des œstrogènes dans la capacité proliférative des précurseurs des neurones POHDA nécessite donc de nouvelles études.

### 3.2 Régionalisation et caractéristiques développementales des neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires

Finalement, l'étude de l'expression d'un certain nombre de gènes durant le développement a mis en évidence que, en plus de se développer à différents moments et dans des noyaux différents, les neurones POHDA possèdent un programme de différenciation distinct des autres neurones dopaminergiques. En effet, contrairement aux neurones dopaminergiques du posterior tuberculum (PT) par exemple, ni les neurones POHDA ni les SCDA n'expriment *otp*. *Otp* est un facteur de transcription pourtant décrit comme essentiel pour le développement des neurones DA du PT, ainsi que pour d'autres cellules neuroendocrines peptidergiques dans la PO (Fernandes et al., 2013; Herget et al., 2014). De plus nous avons observé que les neurones POHDA expriment *foxg1a*, un facteur de transcription souvent utilisé comme marqueur du télencéphale chez le poisson (Toresson et al., 1998; Jeong et al., 2007; Sanek and Grinblat, 2008). Ce n'est pas le cas des neurones SCDA. Au contraire, les neurones POHDA n'expriment jamais *nr4a2a/b*, un

facteur de transcription essentiel pour la différenciation d'autres groupes de neurones dopaminergiques tels que ceux du PT. Ensemble, ces résultats supportent l'idée que les neurones SCDA et POHDA sont bien deux populations dopaminergiques distinctes dans l'embryon en développement.

Par ailleurs, nos analyses suggèrent que *Dlx2a*, souvent utilisé comme un marqueur régional (Rubenstein et al., 1998; Puelles and Rubenstein, 2003), semble plutôt représenter un état de différenciation des cellules. Nos résultats montrant l'expression de *dlx2a* accompagnant la différenciation dopaminergique, à la fois dans les neurones POHDA et les SCDA, sont en accord avec cette hypothèse. Le fait que *dlx2a* reste exprimé dans certains neurones POHDA (jusqu'à 1 mois en tout cas), alors qu'il cesse de l'être dans les neurones SCDA après 48hpf, renforce aussi cette hypothèse. *Dlx2a* serait ainsi un indice des capacités prolifératives des progéniteurs de ces neurones neuroendocrines.

D'un point de vue comparatif, l'étude de l'expression des gènes, combinée avec des repères anatomiques précis tels que la commissure antérieure (ac), la commissure post-optique (poc) et le récessus optique (OR), nous permet de comparer la PO du poisson zèbre avec celle d'autres vertébrés. Alors que la PO chez les tétrapodes est actuellement considérée comme une partie du télencéphale (Moreno and Gonzalez, 2011; Puelles et al., 2013), seulement la moitié antérieure de la PO du poisson-zèbre est *foxg1a*-positive. Une étude antérieure a suggéré que le domaine exprimant *otp* qui contient des cellules neuroendocrines dans la PO chez le poisson zèbre est homologue au noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus chez les mammifères (Herget et al., 2014). Il y a donc une différence dans la définition de l'«aire préoptique» chez les téléostéens et les tétrapodes. Une étude récente réalisée par notre groupe, utilisant des marqueurs de prolifération et de différenciation, a proposé que la PO du poisson-zèbre forme une entité morphogénétique distincte du télencéphale et de l'hypothalamus (Affaticati et al., soumis). Cette région a été renommée « la région du récessus optique (ORR) ».

Nos données montrent donc que le développement de ces deux noyaux dopaminergiques, bien qu'appartenant à une même unité morphologique, est influencé par des réseaux de gènes différents. Probablement parce que les neurones POHDA se développent assez tard par rapport aux autres populations dopaminergiques (Mahler et al., 2010), cette population a été ignorée dans les études de développement (expression des gènes, analyse de mutants ...). Ces neurones constituent un outil nouveau, pour mieux comprendre l'évolution de cette zone charnière du cerveau antérieur qu'est l'ORR et aussi

### Chapitre 3 : Discussion

l'évolution des systèmes dopaminergiques et leur recrutement pour le contrôle de la reproduction.

# BIBLIOGRAPHIE

---



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Abraham E, Palevitch O, Gothilf Y, Zohar Y (2009) The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. *General and comparative endocrinology* 164:151-160.
- Abraham E, Palevitch O, Ijiri S, Du SJ, Gothilf Y, Zohar Y (2008) Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocrinol* 20:394-405.
- Abraham M (1974) Ultrastructure of the cell types and of the neurosecretory innervation in the pituitary of *Mugil cephalus* L. from freshwater, the sea, and a hypersaline lagoon. II. The proximal pars distalis. *General and comparative endocrinology* 24:121-132.
- Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhauser B, Strahle U, Gotz M, Bally-Cuif L (2006) Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Developmental biology* 295:278-293.
- Affaticati P, Yamamoto K, Rizzi B, Bureau C, Peyri ras N, Pasqualini C, Demarque M, Vernier P (soumis) Identification of the optic recess region as a morphogenetic entity in the zebrafish forebrain.
- Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B, Rosenfeld H (2005) Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and comparative endocrinology* 142:212-221.
- Alestrom P, Kisen G, Klungland H, Andersen O (1992) Fish gonadotropin-releasing hormone gene and molecular approaches for control of sexual maturation: development of a transgenic fish model. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1:376-379.
- Alexiuk NA, Uddin M, Vriend J (1996) Melatonin increases the in situ activity of tyrosine hydroxylase in the mediobasal hypothalamus of male Syrian hamsters. *Life Sci* 59:687-694.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124:319-335.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez-Buylla A, Buskirk DR, Nottebohm F (1987) Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain. *The Journal of comparative neurology* 264:159-170.
- Amano M, Iigo M, Ikuta K, Kitamura S, Okuzawa K, Yamada H, Yamamori K (2004) Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zoolog Sci* 21:79-85.
- Amano M, Hyodo S, Urano A, Okumoto N, Kitamura S, Ikuta K, Suzuki Y, Aida K (1994) Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17 alpha-

## Chapitre 4 : Bibliographie

- methytestosterone administration in yearling masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *General and comparative endocrinology* 95:374-380.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun* 44:205-210.
- Anand S, Losee-Olson S, Turek FW, Horton TH (2002) Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male siberian hamsters by exposure to females and photoperiod. *Endocrinology* 143:2178-2188.
- Andersson E, Jensen JB, Parmar M, Guillemot F, Bjorklund A (2006) Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development* 133:507-516.
- Ando H, Urano A (2005) Molecular regulation of gonadotropin secretion by gonadotropin-releasing hormone in salmonid fishes. *Zoological Science* 22:379-389.
- Ang SL (2006) Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133:3499-3506.
- Anglade I, Zandbergen T, Kah O (1993) Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273:345-355.
- Ankley GT, Johnson RD (2004) Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *Ilar J* 45:469-483.
- Aroua S, Maugars G, Jeng SR, Chang CF, Weltzien FA, Rousseau K, Dufour S (2012) Pituitary gonadotropins FSH and LH are oppositely regulated by the activin/follistatin system in a basal teleost, the eel. *General and comparative endocrinology* 175:82-91.
- Backman L, Nyberg L, Lindenberger U, Li SC, Farde L (2006) The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neurosci Biobehav Rev* 30:791-807.
- Ball JN (1981) Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians, and reptiles. *General and comparative endocrinology* 44:135-170.
- Bardet SM, Ferran JL, Sanchez-Arrones L, Puellas L (2010) Ontogenetic expression of sonic hedgehog in the chicken subpallium. *Frontiers in neuroanatomy* 4.
- Barha CK, Lieblich SE, Galea LA (2009) Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neuroendocrinol* 21:155-166.
- Barman RP (1991) A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. *Record of the Zoological Survey of India Occasional Papers* 137:1-91.
- Barnett DK, Bunnell TM, Millar RP, Abbott DH (2006) Gonadotropin-releasing hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys. *Endocrinology* 147:615-623.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Barros TP, Alderton WK, Reynolds HM, Roach AG, Berghmans S (2008) Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol* 154:1400-1413.
- Barry J, Dubois MP, Poulain P (1973) LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. A fluorescent antibody study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 146:351-366.
- Belchetz PE (1983) Gonadotrophin regulation and clinical applications of GnRH. *Clin Endocrinol Metab* 12:619-640.
- Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Ukena K, O'Brien S, Perfito N, Moore IT, Tsutsui K, Wingfield JC (2006) Interactions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305:807-814.
- Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Chowdhury VS, Morita Y, Yano T, Hasunuma I, Binns M, Wingfield JC, Tsutsui K (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *General and comparative endocrinology* 156:34-43.
- Berghmans S, Jette C, Langenau D, Hsu K, Stewart R, Look T, Kanki JP (2005) Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques* 39:227-237.
- Berglund I (1995) Effects of spring temperature and feeding regime on sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) male parr. In: *Reproductive Physiology of Fish* (Goetz FW, Thomas, P., ed), pp 170-172. Austin: Fish Symp. 95.
- Bhatnagar S, Vining C, Iyer V, Kinni V (2006) Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *J Neuroendocrinol* 18:13-24.
- Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B (2008) Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol Reprod* 79:776-786.
- Bittman EL, Kaynard AH, Olster DH, Robinson JE, Yellon SM, Karsch FJ (1985) Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 40:409-418.
- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.
- Blechman J, Borodovsky N, Eisenberg M, Nabel-Rosen H, Grimm J, Levkowitz G (2007) Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein *Orthopedia*. *Development* 134:4417-4426.
- Blin M, Norton W, Bally-Cuif L, Vernier P (2008) NR4A2 controls the differentiation of selective dopaminergic nuclei in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci* 39:592-604.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R (2004) Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 230:481-493.
- Bogerd J, Diepenbroek WB, Hund E, van Oosterhout F, Teves AC, Leurs R, Blomenrohr M (2002) Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. *Endocrinology* 143:4673-4682.
- Bogerd J, Blomenrohr M, Andersson E, van der Putten HH, Tensen CP, Vischer HF, Granneman JC, Janssen-Dommerholt C, Goos HJ, Schulz RW (2001) Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 64:1633-1643.
- Brago CW, Whisnant CS, Goodman RL (1990) A role for catecholaminergic neurons in the suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the prepubertal ewe lamb. *Neuroendocrinology* 52:448-454.
- Breder CM, Rosen DE (1966) Modes of reproduction in fishes. New York, Natural History Press.
- Breton B, Sambroni E (1996) Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and comparative endocrinology* 101:155-164.
- Breton B, Jalabert B, Billard R, Weil C (1971) [In vitro stimulation of the release of pituitary gonadotropic hormone by a hypothalamic factor in the carp *Cyprinus carpio* L]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 273:2591-2594.
- Breton B, Sambroni E, Govoroun M, Weil C (1997) Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *C R Acad Sci III* 320:783-789.
- Breton B, Mikolajczyk T, Popek W, Bieniarz K, Epler P (1991) Neuropeptide Y stimulates in vivo gonadotropin secretion in teleost fish. *General and comparative endocrinology* 84:277-283.
- Breton B, Mikolajczyk T, Danger JM, Gonnet F, Saint-Pierre S, Vaudry H (1989) Neuropeptide Y (NPY) modulates in vitro gonadotropin release from rainbow trout pituitary glands. *Fish Physiol Biochem* 7:77-83.
- Burbach JP, Smidt MP (2006) Molecular programming of stem cells into mesodiencephalic dopaminergic neurons. *Trends Neurosci* 29:601-603.
- Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Haisenleder DJ, Marshall JC (2002) GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 143:3243-3249.
- Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R (1972) Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass

## Chapitre 4 : Bibliographie

- spectrometry-decapeptide-Edman degradation). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 69:278-282.
- Cadman SM, Kim SH, Hu Y, Gonzalez-Martinez D, Bouloux PM (2007) Molecular pathogenesis of Kallmann's syndrome. *Horm Res* 67:231-242.
- Çakıcı Ö, Üçüncü SI (2007) Oocyte development in the zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 24:137-141.
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95:489-502.
- Candy J, Collet C (2005) Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochim Biophys Acta* 1727:35-44.
- Canestro C, Yokoi H, Postlethwait JH (2007) Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat Rev Genet* 8:932-942.
- Cantello R, Aguggia M, Gilli M, Delsedime M, Chiardo Cutin I, Riccio A, Mutani R (1989) Major depression in Parkinson's disease and the mood response to intravenous methylphenidate: possible role of the "hedonic" dopamine synapse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:724-731.
- Caraty A, Duittoz AH, Pelletier J, Thiery JC, Tillet Y, Bouchard P (2001) La libération pulsatile des gonadotropines, de la prolactine et de la GH. Le contrôle de la pulsativité de LH. In: *La reproduction chez les mammifères et l'homme* (Levasseu CTMC, ed), pp 85-107. Paris: . INRA, Ellipses.
- Cave JW, Akiba Y, Banerjee K, Bhosle S, Berlin R, Baker H (2010) Differential regulation of dopaminergic gene expression by Er81. *J Neurosci* 30:4717-4724.
- Cerdá J, Carrillo M, Zanuy S, Ramos J (1994) Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: preliminary observations. *Aquatic Living Resources* 7:255-266.
- Chang JP, Peter RE (1983) Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 36:351-357.
- Chang JP, Van Goor F, Acharya S (1991) Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists and antagonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 54:202-210.
- Chang JP, Yu KL, Wong AO, Peter RE (1990) Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. *Neuroendocrinology* 51:664-674.
- Chapouton P, Godinho L (2010) Neurogenesis, chap 4. In: *METHODS IN CELL BIOLOGY* (Inc. E, ed), pp 73-126.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Chapouton P, Adolf B, Leucht C, Tannhauser B, Ryu S, Driever W, Bally-Cuif L (2006) *her5* expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain. *Development* 133:4293-4303.
- Chaube R, Joy KP (2002a) Effects of ovariectomy and oestradiol-17 $\beta$  replacement on brain tyrosine hydroxylase in the catfish *Heteropneustes fossilis*: changes in *in vivo* activity and kinetic parameters. *The Journal of endocrinology* 175:329-342.
- Chaube R, Joy KP (2002b) Effects of altered photoperiod and temperature, serotonin-affecting drugs, and melatonin on brain tyrosine hydroxylase activity in female catfish, *Heteropneustes fossilis*: a study correlating ovarian activity changes. *J Exp Zool* 293:585-593.
- Chaube R, Joy KP (2003) Brain tyrosine hydroxylase in the catfish *Heteropneustes fossilis*: annual and circadian variations, and sex and regional differences in enzyme activity and some kinetic properties. *General and comparative endocrinology* 130:29-40.
- Chaube R, Joy KP (2005) Estrogen regulation of *in vitro* brain tyrosine hydroxylase activity in the catfish *Heteropneustes fossilis*: interactions with cAMP-protein kinase A and protein kinase C systems in enzyme activation. *General and comparative endocrinology* 141:116-125.
- Chen W, Ge W (2012) Ontogenic expression profiles of gonadotropins (*fshb* and *lhb*) and growth hormone (*gh*) during sexual differentiation and puberty onset in female zebrafish. *Biol Reprod* 86:73.
- Chen YC, Priyadarshini M, Panula P (2009) Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem Cell Biol* 132:375-381.
- Chomicka LK (1992) Biogenic amines and the activity of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in ewes. *J Physiol Pharmacol* 43:57-68.
- Chow MM, Kight KE, Gothilf Y, Alok D, Stubblefield J, Zohar Y (1998) Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the *sbGnRH* and *cGnRH-II* genes from the striped bass, *Morone saxatilis*. *J Mol Endocrinol* 21:277-289.
- Clarke IJ (2011) Control of GnRH secretion: one step back. *Frontiers in neuroendocrinology* 32:367-375.
- Clelland E, Peng C (2009) Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Mol Cell Endocrinol* 312:42-52.
- Combarrous Y, Galet C, Crépieux P, Chopineau M, Conis R (2001) Les gonadotropines: structure, fonctions, mécanismes d'action. In: *La reproduction chez les mammifères et l'homme* (Thibault C, Levasseur, M. C., eds, ed), pp 101-120. Paris: INRA.
- Contijoch AM, Gonzalez C, Singh HN, Malamed S, Troncoso S, Advis JP (1992) Dopaminergic regulation of luteinizing hormone-releasing hormone release at the median eminence level: immunocytochemical and physiological evidence in hens. *Neuroendocrinology* 55:290-300.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Copeland PA, Thomas P (1989) Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *General and comparative endocrinology* 74:474-483.
- Coumailleau P, Pellegrini E, Adrio F, Diotel N, Cano-Nicolau J, Nasri A, Vaillant C, Kah O (2014) Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. *Biochim Biophys Acta*.
- Counis R, Combarrous Y, Chabot V, Taragnat C (2001) Regulation de la synthèse et de la libération des gonadotropines hypophysaires. In: *La reproduction chez les mammifères et l'homme* (Thibault C, Levasseur, M. C., eds, ed), pp 66-84. Paris: INRA.
- Cox B, Kerwin R, Lee TF (1978) Dopamine receptors in the central thermoregulatory pathways of the rat. *J Physiol* 282:471-483.
- Crowley WF, Jr., McArthur JW (1980) Simulation of the normal menstrual cycle in Kallman's syndrome by pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH). *J Clin Endocrinol Metab* 51:173-175.
- Dailey RA, Tsou RC, Tindall GT, Neill JD (1978) Direct hypophysial inhibition of luteinizing hormone release by dopamine in the rabbit. *Life sciences* 22:1491-1498.
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC (1989) The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125:917-924.
- Danesin C, Peres JN, Johansson M, Snowden V, Cording A, Papalopulu N, Houart C (2009) Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev Cell* 16:576-587.
- Darrow KO, Harris WA (2004) Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 1:40-45.
- de Leeuw R, Goos HJ, van Oordt PG (1986) The dopaminergic inhibition of the gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin release: an in vitro study with fragments and cell suspensions from pituitaries of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *General and comparative endocrinology* 63:171-177.
- De Leeuw R, Van 't Veer C, Goos HJ, Van Oordt PG (1988) The dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor binding in the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *General and comparative endocrinology* 72:408-415.
- De Leeuw R, Habibi HR, Nahorniak CS, Peter RE (1989) Dopaminergic regulation of pituitary gonadotrophin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). *The Journal of endocrinology* 121:239-247.
- Del Giacco L, Sordino P, Pistocchi A, Andreakis N, Tarallo R, Di Benedetto B, Cotelli F (2006) Differential regulation of the zebrafish orthopedia 1 gene during fate determination of diencephalic neurons. *BMC developmental biology* 6:50.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Denef C (2008) Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 20:1-70.
- DePaolo LV, King RA, Carrillo AJ (1987) In vivo and in vitro examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 120:272-279.
- Di Paolo T (1994) Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids. *Rev Neurosci* 5:27-41.
- Dickey JT, Swanson P (1998) Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Mol Endocrinol* 21:291-306.
- Diehl DJ, Gershon S (1992) The role of dopamine in mood disorders. *Compr Psychiatry* 33:115-120.
- Diotel N, Vaillant C, Gabbero C, Mironov S, Fostier A, Gueguen MM, Anglade I, Kah O, Pellegrini E (2013) Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Horm Behav* 63:193-207.
- Doetsch F, Hen R (2005) Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 15:121-128.
- Doniach T, Musci TJ (1995) Induction of anteroposterior neural pattern in *Xenopus*: evidence for a quantitative mechanism. *Mechanisms of development* 53:403-413.
- Dooley K, Zon LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:252-256.
- Dubois EA, Florijn MA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ (1998) Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *General and comparative endocrinology* 112:383-393.
- Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Hassing I, van Dijk W, Schulz RW, Goos HJ (2000) Gonadotropin-releasing hormone fibers innervate the pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*) during puberty. *Neuroendocrinology* 72:252-262.
- Dudas B, Merchenthaler I (2006) Three-dimensional representation of the neurotransmitter systems of the human hypothalamus: inputs of the gonadotrophin hormone-releasing hormone neuronal system. *J Neuroendocrinol* 18:79-95.
- Dufour S, Seberty ME, Weltzien FA, Rousseau K, Pasqualini C (2010) Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *J Fish Biol* 76:129-160.
- Dufour S, Lopez E, Le Menn F, Le Belle N, Baloché S, Fontaine YA (1988) Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *General and comparative endocrinology* 70:20-30.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Dufour S, Weltzien FA, Sebert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C (2005) Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann N Y Acad Sci* 1040:9-21.
- Dulka JG, Sloley BD, Stacey NE, Peter RE (1992) A reduction in pituitary dopamine turnover is associated with sex pheromone-induced gonadotropin secretion in male goldfish. *General and comparative endocrinology* 86:496-505.
- Eaton RG, Farley RD (1974) Spawning cycle and egg production in zebrafish, *Brachydanio rerio*, reared in the laboratory. *Copeia* 1:195-204.
- Ekstrom P, Honkanen T, Steinbusch HW (1990) Distribution of dopamine-immunoreactive neuronal perikarya and fibres in the brain of a teleost, *Gasterosteus aculeatus* L. comparison with tyrosine hydroxylase- and dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive neurons. *J Chem Neuroanat* 3:233-260.
- Ekstrom P, Johnsson CM, Ohlin LM (2001) Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *The Journal of comparative neurology* 436:92-110.
- Eranko O (1955) Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. *Endocrinology* 57:363-368.
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A (1982) Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *Brain Res Bull* 9:xi-xv.
- Falcon J, Besseau L, Sauzet S, Boeuf G (2007) Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol Metab* 18:81-88.
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gomez A (2009) Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol* 312:61-71.
- Fernandes AM, Beddows E, Filippi A, Driever W (2013) Orthopedia transcription factor *otpa* and *otpb* paralogous genes function during dopaminergic and neuroendocrine cell specification in larval zebrafish. *PLoS One* 8:e75002.
- Filippi A, Mahler J, Schweitzer J, Driever W (2010) Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J Comp Neurol* 518:423-438.
- Filippi A, Durr K, Ryu S, Willaredt M, Holzschuh J, Driever W (2007) Expression and function of *nr4a2*, *lmx1b*, and *pitx3* in zebrafish dopaminergic and noradrenergic neuronal development. *BMC developmental biology* 7:135.
- Flames N, Hobert O (2009) Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *Nature* 458:885-889.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puellas L, Marin O (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27:9682-9695.
- Flett PA, van der Kraak G, Leatherland JF (1994) Effects of excitatory amino acids on in vivo and in vitro gonadotropin and growth hormone secretion in testosterone-primed immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Zoology* 268:390-399.
- Fochtmann L, Fink M (1992) Role of dopamine in mood disorders. *Compr Psychiatry* 33:417-418.
- Fryer JN, Maler L (1981) Hypophysiotropic neurons in the goldfish hypothalamus demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Cell and tissue research* 218:93-102.
- Fryer JN, Boudreault-Chateauvert C, Kirby RP (1985) Pituitary afferents originating in the paraventricular organ (PVO) of the goldfish hypothalamus. *J Comp Neurol* 242:475-484.
- Garcia-Segura LM, McCarthy MM (2004) Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145:1082-1086.
- Garcia-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 57:765-775.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature neuroscience* 7:1233-1241.
- Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, Demidenko E, Cheng KC (2002) Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol* 37:1055-1068.
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11:177-199.
- Ghosh J, Nath P (2005) Seasonal effects of melatonin on ovary and plasma gonadotropin and vitellogenin levels in intact and pinealectomized catfish, *Clarias batrachus* (Linn). *Indian J Exp Biol* 43:224-232.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.
- Goldman-Rakic PS (1998) The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Adv Pharmacol* 42:707-711.
- Goldman S (2003) Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* 26:590-596.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Goldman SA (1998) Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *Journal of neurobiology* 36:267-286.
- Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Zanuy S, Sarasquete C, Elizur A, Kah O, Munoz-Cueto JA (2002a) Developmental expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 23:255-267.
- Gonzalez-Martinez D, Madigou T, Mananos E, Cerda-Reverter JM, Zanuy S, Kah O, Munoz-Cueto JA (2004) Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. *Biol Reprod* 70:1380-1391.
- Gonzalez-Martinez D, Madigou T, Zmora N, Anglade I, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Munoz-Cueto JA, Kah O (2001) Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Journal of comparative neurology* 429:144-155.
- Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Mananos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O, Munoz-Cueto JA (2002b) Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *The Journal of comparative neurology* 446:95-113.
- Goodman RL, Havern RL, Whisnant CS (1996) Alpha adrenergic neurons inhibit luteinizing hormone pulse amplitude in breeding season ewes. *Biol Reprod* 54:380-386.
- Gothilf Y, Meiri I, Elizur A, Zohar Y (1997) Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids (mRNAs), gonadotropin beta-subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biol Reprod* 57:1145-1154.
- Gothilf Y, Munoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y (1996) Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod* 55:636-645.
- Gotz M, Barde YA (2005) Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46:369-372.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental biology* 295:263-277.
- Grone BP, Maruska KP, Korzan WJ, Fernald RD (2010) Social status regulates kisspeptin receptor mRNA in the brain of *Astatotilapia burtoni*. *General and comparative endocrinology* 169:98-107.
- Gross DS (1976) Distribution of gonadotropin-releasing hormone in the mouse brain as revealed by immunohistochemistry. *Endocrinology* 98:1408-1417.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Grunwald DJ, Eisen JS (2002) Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3:717-724.
- Guilgur LG, Moncaut NP, Canario AV, Somoza GM (2006) Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 144:272-283.
- Guzman JM, Cal R, Garcia-Lopez A, Chereguini O, Kight K, Olmedo M, Sarasquete C, Mylonas CC, Peleteiro JB, Zohar Y, Mananos EL (2011) Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 158:235-245.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA (1991) A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 128:509-517.
- Halawani ME, Burke WH (1976) Brain monoamine metabolism of turkey hens in various stages of their reproductive life cycle. *Biol Reprod* 15:254-259.
- Hassin S, Holland MC, Zohar Y (2000) Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. *Biol Reprod* 63:1691-1697.
- Heffner TG, Zigmond MJ, Stricker EM (1977) Effects of dopaminergic agonists and antagonists of feeding in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 201:386-399.
- Herbison AE, Pape JR (2001) New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22:292-308.
- Herde MK, Geist K, Campbell RE, Herbison AE (2011) Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology* 152:3832-3841.
- Herget U, Wolf A, Wullimann MF, Ryu S (2014) Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol* 522:1542-1564.
- Hernandez-Rauda R, Aldegunde M (2002) Effects of acute 17alpha-methyltestosterone, acute 17beta-estradiol, and chronic 17alpha-methyltestosterone on dopamine, norepinephrine and serotonin levels in the pituitary, hypothalamus and telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Physiol B* 172:659-667.
- Higashino T, Miura T, Miura C, Yamauchi K (2002) Histological studies on early oogenesis in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Zoological Science* 19:557-563.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86:6-19.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Hisaoka KK, Firlit CF (1962) The localization of nucleic acids during oogenesis in the zebrafish. *American Journal of Anatomy* 110:203-215.
- Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225:1326-1334.
- Holland MC, Hassin S, Zohar Y (1998) Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biol Reprod* 59:1153-1162.
- Holmqvist BI, Ekstrom P (1995) Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonpeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *Journal of chemical neuroanatomy* 8:125-145.
- Hornby PJ, Piekut DT (1990) Distribution of catecholamine-synthesizing enzymes in goldfish brains: presumptive dopamine and norepinephrine neuronal organization. *Brain Behav Evol* 35:49-64.
- Hornby PJ, Piekut DT, Demski LS (1987) Localization of immunoreactive tyrosine hydroxylase in the goldfish brain. *J Comp Neurol* 261:1-14.
- Hornykiewicz O (1962) [Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man]. *Dtsch Med Wochenschr* 87:1807-1810.
- Howe K et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498-503.
- Hsia AY, Vincent JD, Lledo PM (1999) Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *Journal of neurophysiology* 82:1082-1085.
- Huseman CA, Kugler JA, Schneider IG (1980) Mechanism of dopaminergic suppression of gonadotropin secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 51:209-214.
- Illing N, Troskie BE, Nahorniak CS, Hapgood JP, Peter RE, Millar RP (1999) Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2526-2531.
- Izquierdo MS, Fernández-Palacios H, Tacon AGJ (2001) Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197:25-42.
- Jagadeeswaran P (2005) Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 12:149-152.
- Jalabert B (2005) Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Dev* 45:261-279.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Jeong JY, Einhorn Z, Mathur P, Chen L, Lee S, Kawakami K, Guo S (2007) Patterning the zebrafish diencephalon by the conserved zinc-finger protein Fezl. *Development* 134:127-136.
- Jeong JY, Einhorn Z, Mercurio S, Lee S, Lau B, Mione M, Wilson SW, Guo S (2006) Neurogenin1 is a determinant of zebrafish basal forebrain dopaminergic neurons and is regulated by the conserved zinc finger protein Tof/Fezl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5143-5148.
- Jodo A, Ando H, Urano A (2003) Five different types of putative GnRH receptor gene are expressed in the brain of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Zoolog Sci* 20:1117-1125.
- Johnston SA, Maler L (1992) Anatomical organization of the hypophysiotrophic systems in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol* 317:421-437.
- Jones RE (1978) Ovarian cycles in nonmammalian vertebrates. In: *The Vertebrate Ovary* (ed. REJ, ed), pp 731-762. New York: Plenum Press.
- Kah O, Peter RE, Dubourg P, Cook H (1983) Effects of monosodium L-glutamate on pituitary innervation in goldfish, *Carassius auratus*. *General and comparative endocrinology* 51:338-346.
- Kah O, Chambolle P, Thibault J, Geffard M (1984a) Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. *Neurosci Lett* 48:293-298.
- Kah O, Dubourg P, Chambolle P, Calas A (1984b) Ultrastructural identification of catecholaminergic fibers in the goldfish pituitary. A high-resolution radioautographic study after in vitro 3H-dopamine administration. *Cell and tissue research* 238:621-626.
- Kah O, Dubourg P, Onteniente B, Geffard M, Calas A (1986a) The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell and tissue research* 244:577-582.
- Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE (1987a) Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45:451-458.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ (2007) GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and comparative endocrinology* 153:346-364.
- Kah O, Dubourg P, Martinoli MG, Rabhi M, Gonnet F, Geffard M, Calas A (1987b) Central GABAergic innervation of the pituitary in goldfish: a radioautographic and immunocytochemical study at the electron microscope level. *General and comparative endocrinology* 67:324-332.
- Kah O, Pontet A, Danger JM, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Calas A (1989) Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 7:69-76.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Kah O, Trudeau VL, Sloley BD, Chang JP, Dubourg P, Yu KL, Peter RE (1992) Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55:396-404.
- Kah O, Breton B, Dulka JG, Nunez-Rodriguez J, Peter RE, Corrigan A, Rivier JE, Vale WW (1986b) A reinvestigation of the Gn-RH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. *Cell and tissue research* 244:327-337.
- Kah O, Pellegrini E, Mouriec K, Diotel N, Anglade I, Vaillant C, Thieulant ML, Tong SK, Brion F, Chung BC, Pakdel F (2009) [Oestrogens and neurogenesis: new functions for an old hormone. Lessons from the zebrafish]. *Journal de la Societe de biologie* 203:29-38.
- Kanda S, Okubo K, Oka Y (2011) Differential regulation of the luteinizing hormone genes in teleosts and tetrapods due to their distinct genomic environments--insights into gonadotropin beta subunit evolution. *General and comparative endocrinology* 173:253-258.
- Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K, Oka Y (2008) Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*oryzias latipes*). *Endocrinology* 149:2467-2476.
- Kaplan MS (1981) Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *The Journal of comparative neurology* 195:323-338.
- Kaslin J, Panula P (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440:342-377.
- Kaslin J, Ganz J, Brand M (2008) Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:101-122.
- Kauffman AS, Rissman EF (2004) The evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II modifies food intake. *Endocrinology* 145:686-691.
- Kaul S, Vollrath L (1974) The goldfish pituitary. II. Innervation. *Cell and tissue research* 154:231-249.
- Kele J, Simplicio N, Ferri AL, Mira H, Guillemot F, Arenas E, Ang SL (2006) Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* 133:495-505.
- Kempermann G (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22:635-638.
- Khakoo Z, Bhatia A, Gedamu L, Habibi HR (1994) Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 134:838-847.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Khan IA, Thomas P (1996) Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *General and comparative endocrinology* 104:231-242.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS (2009) Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150:821-831.
- Koelle GB, Valk Ade T J (1954) Physiological implications of the histochemical localization of monoamine oxidase. *J Physiol* 126:434-447.
- Kuljis RO, Advis JP (1989) Immunocytochemical and physiological evidence of a synapse between dopamine- and luteinizing hormone releasing hormone-containing neurons in the ewe median eminence. *Endocrinology* 124:1579-1581.
- Kumakura N, Okuzawa K, Gen K, Kagawa H (2003) Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General and comparative endocrinology* 131:264-273.
- Kumar RS, Trant JM (2004) Hypophyseal gene expression profiles of FSH-beta, LH-beta, and glycoprotein hormone-alpha subunits in *Ictalurus punctatus* throughout a reproductive cycle. *General and comparative endocrinology* 136:82-89.
- Kuroyanagi Y, Okuyama T, Suehiro Y, Imada H, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Kubo T, Takeuchi H (2010) Proliferation zones in adult medaka (*Oryzias latipes*) brain. *Brain Res* 1323:33-40.
- Kwok HF, So WK, Wang Y, Ge W (2005) Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors--evidence for their distinct functions in follicle development. *Biol Reprod* 72:1370-1381.
- Lalloz MR, Detta A, Clayton RN (1988) Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone beta-subunit gene in vivo. *Endocrinology* 122:1689-1694.
- Lawrence C, Best J, James a, Maloney K (2012) The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* 368-369:103-108.
- Lecointre G, Le Guyader H (2001) Classification phylogénétique du vivant: Belin.
- Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, Osugi T, Otaki N, Sunakawa Y, Kim K, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY, Tsutsui K (2009) Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology* 150:2837-2846.
- Legendre M, Jalabert B (1988) Physiologie de la reproduction. In: *Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains* (Lévêque C, Bruton MN, Ssentongo GWE, eds), pp 153-187: ORSTOM Paris.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Lehman MN, Durham DM, Jansen HT, Adrian B, Goodman RL (1996) Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrus, but not breeding season, ewes. *Endocrinology* 137:4443-4450.
- Lenard NR, Berthoud HR (2008) Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3:S11-22.
- Lessman CA (2011) The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93:268-280.
- Lethimonier C, Madigou T, Munoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O (2004) Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and comparative endocrinology* 135:1-16.
- Levavi-Sivan B, Aizen J, Avitan A (2005) Cloning, characterization and expression of the D2 dopamine receptor from the tilapia pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 236:17-30.
- Levavi-Sivan B, Safarian H, Rosenfeld H, Elizur A, Avitan A (2004) Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. *Biol Reprod* 70:1545-1551.
- Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mananos EL, Gomez A, Lareyre JJ (2010) Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and comparative endocrinology* 165:412-437.
- Levine JE, Ramirez VD (1982) Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111:1439-1448.
- Li S, Zhang Y, Liu Y, Huang X, Huang W, Lu D, Zhu P, Shi Y, Cheng CH, Liu X, Lin H (2009) Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *The Journal of endocrinology* 201:407-418.
- Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353-367.
- Lin HR, Van der Kraak G, Zhou XJ, Liang JY, Peter RE, Rivier JE, Vale WW (1988) Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. *General and comparative endocrinology* 69:31-40.
- Lin SW, Ge W (2009) Differential regulation of gonadotropins (FSH and LH) and growth hormone (GH) by neuroendocrine, endocrine, and paracrine factors in the zebrafish--an in vitro approach. *General and comparative endocrinology* 160:183-193.
- Lin XW, Peter RE (1996) Expression of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II precursor messenger ribonucleic acids in the brain and ovary of goldfish. *General and comparative endocrinology* 101:282-296.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Linard B, Bennani S, Saligaut C (1995) Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology* 99:192-196.
- Linard B, Anglade I, Corio M, Navas JM, Pakdel F, Saligaut C, Kah O (1996) Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology* 63:156-165.
- Lindsey BW, Tropepe V (2006) A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in neurobiology* 80:281-307.
- Liu NA, Liu Q, Wawrowsky K, Yang Z, Lin S, Melmed S (2006) Prolactin receptor signaling mediates the osmotic response of embryonic zebrafish lactotrophs. *Mol Endocrinol* 20:871-880.
- Liu X, Herbison AE (2013) Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology* 154:340-350.
- Liu Z, Kim S, Karsi A (2001) Channel catfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: complementary DNA cloning and expression during ovulation. *Mar Biotechnol (NY)* 3:590-599.
- Lledo PM, Saghatelian A (2005) Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28:248-254.
- Lohr H, Hammerschmidt M (2011) Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu Rev Physiol* 73:183-211.
- Lohr H, Ryu S, Driever W (2009) Zebrafish diencephalic A11-related dopaminergic neurons share a conserved transcriptional network with neuroendocrine cell lineages. *Development* 136:1007-1017.
- Lorang D, Amara SG, Simerly RB (1994) Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J Neurosci* 14:4903-4914.
- Lowery LA, Sive H (2009) Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 31:446-458.
- Lumsden A, Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1115.
- Luo GR, Chen Y, Li XP, Liu TX, Le WD (2008) Nr4a2 is essential for the differentiation of dopaminergic neurons during zebrafish embryogenesis. *Mol Cell Neurosci* 39:202-210.
- Ma PM (1994a) Catecholaminergic systems in the zebrafish. II. Projection pathways and pattern of termination of the locus coeruleus. *J Comp Neurol* 344:256-269.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Ma PM (1994b) Catecholaminergic systems in the zebrafish. I. Number, morphology, and histochemical characteristics of neurons in the locus coeruleus. *J Comp Neurol* 344:242-255.
- Ma PM (1997) Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. *J Comp Neurol* 381:411-427.
- Ma PM (2003) Catecholaminergic systems in the zebrafish. IV. Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon. *The Journal of comparative neurology* 460:13-37.
- Machluf Y, Gutnick A, Levkowitz G (2011) Development of the zebrafish hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci* 1220:93-105.
- Madigou T, Mananos-Sanchez E, Hulshof S, Anglade I, Zanuy S, Kah O (2000) Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 63:1857-1866.
- Mahler J, Filippi A, Driever W (2010) DeltaA/DeltaD regulate multiple and temporally distinct phases of notch signaling during dopaminergic neurogenesis in zebrafish. *J Neurosci* 30:16621-16635.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.
- Mananos EL, Anglade I, Chyb J, Saligaut C, Breton B, Kah O (1999) Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology* 69:269-280.
- Maney DL, Richardson RD, Wingfield JC (1997) Central administration of chicken gonadotropin-releasing hormone-II enhances courtship behavior in a female sparrow. *Horm Behav* 32:11-18.
- Marcano D, Guerrero HY, Gago NC, E., Requena M, Ruiz L (1995) Monoamine metabolism in the hypothalamus of the juvenile teleost fish, *Chaetidipterus faber*. In: *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (P. GFWT, ed), pp 64-66. Austin: TX: The university of Texas at Austin Press.
- Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR (2006) Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 24:3475-3488.
- Mathis L, Nicolas JF (2002) Cellular patterning of the vertebrate embryo. *Trends in genetics* : *TIG* 18:627-635.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339.
- McGonnell IM, Fowkes RC (2006) Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *The Journal of endocrinology* 189:425-439.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- McNay DE, Pelling M, Claxton S, Guillemot F, Ang SL (2006) Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Molecular endocrinology* 20:1623-1632.
- Medina L (2009) Evolution and Embryological Development of Forebrain. In: *Encyclopedia of Neuroscience* (Binder M, Hirokawa N, Windhorst U, eds), pp 1172-1192: Springer Berlin Heidelberg.
- Meek J, Joosten HW, Steinbusch HW (1989) Distribution of dopamine immunoreactivity in the brain of the mormyrid teleost *Gnathonemus petersii*. *J Comp Neurol* 281:362-383.
- Mel'nikova VI, Lavrent'eva AV, Kudrin VS, Raevskii KS, Ugryumov MV (2005) Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rat fetuses. *Neurosci Behav Physiol* 35:809-813.
- Melamed P, Gur G, Elizur A, Rosenfeld H, Sivan B, Rentier-Delrue F, Yaron Z (1996) Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin II beta subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64:320-328.
- Mellinger J (2002) *Sexualité et reproduction chez les poissons*. Paris.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 66:1881-1892.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-17532.
- Mikuma N, Kumamoto Y, Maruta H, Umehara T, Itoh N, Nanbu A, Tachiki H, Nitta T, Akagashi K (1991) [Dopaminergic control of gonadotropin secretion in male senescence]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi* 67:840-848.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mohamed JS, Thomas P, Khan IA (2005) Isolation, cloning, and expression of three prepro-GnRH mRNAs in Atlantic croaker brain and pituitary. *The Journal of comparative neurology* 488:384-395.
- Mok EY, Munro AD (1998) Effects of dopaminergic drugs on locomotor activity in teleost fish of the genus *Oreochromis* (Cichlidae): involvement of the telencephalon. *Physiology & behavior* 64:227-234.
- Moncaut N, Somoza G, Power DM, Canario AV (2005) Five gonadotrophin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. *J Mol Endocrinol* 34:767-779.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Monsma FJ, Jr., McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.
- Montero M, Le Belle N, Vidal B, Dufour S (1996) Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *General and comparative endocrinology* 104:103-115.
- Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP, Dufour S (1995) Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61:525-535.
- Montero M, Vidal B, King JA, Tramu G, Vandesande F, Dufour S, Kah O (1994) Immunocytochemical localization of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *J Chem Neuroanat* 7:227-241.
- Moreno N, Gonzalez A (2011) The non-evaginated secondary prosencephalon of vertebrates. *Front Neuroanat* 5:12.
- Morgan K, Millar RP (2004) Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. *General and comparative endocrinology* 139:191-197.
- Mori T, Buffo A, Gotz M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 69:67-99.
- Mouriec K, Pellegrini E, Anglade I, Menuet A, Adrio F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O (2008) Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? *Brain Res Bull* 75:274-280.
- Nagahama Y (1983) The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish physiology* (Hoar WS, Randal, D. J., & Donaldson, E. M, eds, ed), pp 223-275. New York: Academic press.
- Nagahama Y (1994) Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 38:217-229.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 239:2910-2917.
- Navas JM, Anglade I, Bailhache T, Pakdel F, Breton B, Jégo P, Kah O (1995) Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *The Journal of comparative neurology* 363:461-474.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296:1636-1639.
- Ninkovic J, Bally-Cuif L (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39:262-274.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A (2007) Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and comparative endocrinology* 150:278-287.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K, Kawauchi H (1990a) Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *General and comparative endocrinology* 77:358-367.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K, Kawauchi H (1990b) Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *General and comparative endocrinology* 77:348-357.
- Ohyama A, Nitta H, Shimizu C, Ohara S, Araki K, Kurosaki N, Mataka S (2005) [Educative effect of feedback after medical interview in objective structured clinical examination]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 72:71-76.
- Oka Y (2002) Physiology and release activity of GnRH neurons. *Prog Brain Res* 141:259-281.
- Okubo K, Nagahama Y (2008) Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)* 193:3-15.
- Okubo K, Sakai F, Lau EL, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Naruse K, Aida K, Nagahama Y (2006) Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147:1076-1084.
- Okubo K, Ishii S, Ishida J, Mitani H, Naruse K, Kondo M, Shima A, Tanaka M, Asakawa S, Shimizu N, Aida K (2003) A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314:121-131.
- Olivereau M (1976) [Gonadotropin secreting cells of the pituitary gland of the Atlantic salmon: unity or duality?]. *General and comparative endocrinology* 28:82-95.
- Olivereau M, Ball JN (1964) [Contribution to the Histophysiology of the Pituitary Gland of Teleosts, Particularly Those of the Poecilia Species]. *General and comparative endocrinology* 47:523-532.
- Onteniente B, Kimura H, Maeda T (1983) Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *The Journal of comparative neurology* 215:427-436.
- Osorio J, Mueller T, Retaux S, Vernier P, Wullimann MF (2010) Phylotypic expression of the bHLH genes *Neurogenin2*, *Neurod*, and *Mash1* in the mouse embryonic forebrain. *The Journal of comparative neurology* 518:851-871.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Osugi T, Ukena K, Sower SA, Kawauchi H, Tsutsui K (2006) Evolutionary origin and divergence of PQRfamamide peptides and LPXRFamide peptides in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. *FEBS J* 273:1731-1743.
- Pandolfi M, Munoz Cueto JA, Lo Nostro FL, Downs JL, Paz DA, Maggese MC, Urbanski HF (2005) GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell and tissue research* 321:219-232.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y (2004) Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145:3613-3618.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y (2005) Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2204-2209.
- Pasqualini C, Guibert B, Leviel V (1993) Short-term inhibitory effect of estradiol on tyrosine hydroxylase activity in tuberoinfundibular dopaminergic neurons in vitro. *J Neurochem* 60:1707-1713.
- Pasqualini C, Leviel V, Guibert B, Faucon-Biguet N, Kerdelhue B (1991) Inhibitory actions of acute estradiol treatment on the activity and quantity of tyrosine hydroxylase in the median eminence of ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol* 3:575-580.
- Pasqualini C, Olivier V, Guibert B, Frain O, Leviel V (1996) Rapid stimulation of striatal dopamine synthesis by estradiol. *Cell Mol Neurobiol* 16:411-415.
- Pasqualini C, Vidal B, Le Belle N, Sbahi M, Weltzien FA, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004) [An antagonist to GnRH in the control of reproduction in teleost fish: dopaminergic inhibition. Ancestral origin and differential conservation within vertebrates?]. *Journal de la Societe de biologie* 198:61-67.
- Pasqualini C, Weltzien FA, Vidal B, Baloche S, Rouget C, Gilles N, Servent D, Vernier P, Dufour S (2009) Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tissue-specific transcription, and regulation by sex steroids. *Endocrinology* 150:1377-1392.
- Pati D, Habibi HR (2000) Direct action of GnRH variants on goldfish oocyte meiosis and follicular steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 160:75-88.
- Patiño R (1995) Gonads. In: *An atlas of fish histology, normal and pathological features*, 2nd Edition (Takashima F. HTe, ed), pp 128-153. Tokyo: Kodansha Ltd.
- Patiño R, Sullivan CV (2002) Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26:57-70.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O (2005) Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and comparative endocrinology* 142:60-66.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Peng C, Trudeau VL, Peter RE (1993a) Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: effects of sex steroids. *J Neuroendocrinol* 5:273-280.
- Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PC (1994) Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135:1740-1746.
- Peng C, Humphries S, Peter RE, Rivier JE, Blomqvist AG, Larhammar D (1993b) Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin-II in female goldfish. *General and comparative endocrinology* 90:306-317.
- Peng C, Chang JP, Yu KL, Wong AO, Van Goor F, Peter RE, Rivier JE (1993c) Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. *Endocrinology* 132:1820-1829.
- Peter RE, Paulencu CR (1980) Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 31:133-141.
- Peter RE, Lin HR, Van der Kraak G (1988) Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74:1-10.
- Peter RE, Crim LW, Goos HJ, Crim JW (1978) Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *General and comparative endocrinology* 35:391-401.
- Peter RE, Chang JP, Nahorniak CS, Omeljaniuk RJ, Sokolowska M, Shih SH, Billard R (1986) Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Prog Horm Res* 42:513-548.
- Pilar Garcia Hernandez M, Garcia Ayala A, Zandbergen MA, Agulleiro B (2002) Investigation into the duality of gonadotropic cells of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810): immunocytochemical and ultrastructural studies. *General and comparative endocrinology* 128:25-35.
- Pogoda HM, Hammerschmidt M (2007) Molecular genetics of pituitary development in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 18:543-558.
- Polzonetti-Magni AM, Mosconi G, Soverchia L, Kikuyama S, Carnevali O (2004) Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. *Int Rev Cytol* 239:1-46.
- Pope C, McNeilly JR, Coutts S, Millar M, Anderson RA, McNeilly AS (2006) Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Developmental biology* 297:172-181.
- Popek W, Luszczek-Trojnar E, Drag-Kozak E, Fortuna-Wronska D, Epler P (2005) Effect of the pineal gland and melatonin on dopamine release from perfused hypothalamus of mature female carp during spawning and winter regression. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 35:65-71.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Popek W, Luszczek-Trojnar E, Drag-Kozak E, Rzasa J, Epler P (2006) Effect of melatonin on dopamine secretion in the hypothalamus of mature female common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 36:135-141.
- Popesku JT, Navarro-Martin L, Trudeau VL (2011) Evidence for alternative splicing of a dopamine D2 receptor in a teleost. *Physiol Biochem Zool* 84:135-146.
- Popesku JT, Martyniuk CJ, Mennigen J, Xiong H, Zhang D, Xia X, Cossins AR, Trudeau VL (2008) The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 293:43-56.
- Porcher JM, Delahaye C, Hervin D, Brion F, Poulsen V (2003) Caractérisation du développement embryolaire chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et comparaison des tests de toxicité aigue sur les stades embryo-larvaire et adulte. In, p 18: INERIS.
- Prakash N, Wurst W (2006) Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 575:403-410.
- Prakash N, Brodski C, Naserke T, Puelles E, Gogoi R, Hall A, Panhuysen M, Echevarria D, Sussel L, Weisenhorn DM, Martinez S, Arenas E, Simeone A, Wurst W (2006) A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133:89-98.
- Prat F, Sumpter JP, Tyler CR (1996) Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54:1375-1382.
- Prevot V (2002) Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 14:247-255.
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC (1999) Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140:652-659.
- Prevot V, Hanchate NK, Bellefontaine N, Sharif A, Parkash J, Estrella C, Allet C, de Seranno S, Campagne C, de Tassigny X, Baroncini M (2010) Function-related structural plasticity of the GnRH system: a role for neuronal-glial-endothelial interactions. *Frontiers in neuroendocrinology* 31:241-258.
- Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Puelles L, Harrison M, Paxinos G, Watson C (2013) A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends Neurosci* 36:570-578.
- Qi X, Zhou W, Li S, Lu D, Yi S, Xie R, Liu X, Zhang Y, Lin H (2013) Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol* 366:9-20.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Rao PD, Job TC, Schreibman MP (1993) Hypophysiotropic neurons in the hypothalamus of the catfish *Clarias batrachus*: a cobaltous lysine and HRP study. *Brain, behavior and evolution* 42:24-38.
- Ravaglia MA, Maggese MC (2003) Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), with special reference to the vitelline envelope development. *Tissue Cell* 35:9-17.
- Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ (1992) Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *The Journal of biological chemistry* 267:21281-21284.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Rink E, Wullimann MF (2001) The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889:316-330.
- Rink E, Wullimann MF (2002a) Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 137:89-100.
- Rink E, Wullimann MF (2002b) Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull* 57:385-387.
- Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2008) New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in neuroendocrinology* 29:48-69.
- Roberts BL, Meredith GE, Maslam S (1989) Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Anatomy and embryology* 180:401-412.
- Rodin DA, Lalloz MR, Clayton RN (1989) Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression in the male rat. *Endocrinology* 125:1282-1289.
- Rodriguez-Gomez FJ, Rendon-Unceta MC, Sarasquete C, Munoz-Cueto JA (2000) Localization of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Journal of chemical neuroanatomy* 19:17-32.
- Rohr KB, Barth KA, Varga ZM, Wilson SW (2001) The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* 29:341-351.
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annual review of neuroscience* 21:445-477.
- Rubinstein AL (2003) Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6:218-223.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Rubinstein AL (2006) Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:231-240.
- Russek-Blum N, Gutnick A, Nabel-Rosen H, Blechman J, Staudt N, Dorsky RI, Houart C, Levkowitz G (2008) Dopaminergic neuronal cluster size is determined during early forebrain patterning. *Development* 135:3401-3413.
- Ryu S, Mahler J, Acampora D, Holzschuh J, Erhardt S, Omodei D, Simeone A, Driever W (2007) Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Current biology : CB* 17:873-880.
- Saligaut C, Linard B, Breton B, Anglade I, Bailhache T, Kah O, Jégo P (1999) Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture* 177:13-20.
- Sallinen V, Torkko V, Sundvik M, Reenila I, Khrustalyov D, Kaslin J, Panula P (2009) MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *J Neurochem* 108:719-731.
- Sambroni E, Rolland AD, Lareyre JJ, Le Gac F (2013) FSH and LH have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J Mol Endocrinol* 50:1-18.
- Sanchez MG, Bourque M, Morissette M, Di Paolo T (2010) Steroids-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16:e43-71.
- Sanek NA, Grinblat Y (2008) A novel role for zebrafish *zic2a* during forebrain development. *Dev Biol* 317:325-335.
- Sas E, Maler L, Tinner B (1990) Catecholaminergic systems in the brain of a gymnotiform teleost fish: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 292:127-162.
- Sasayama Y, Takahashi H (1974) Effect of starvation and unilateral castration in male goldfish, *Carassius auratus*, and a design of bioassay for fish gonadotropin using starved goldfish. *Bull Fac Fish:Hokkaido Univ.* 22, 267–283.
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:4013-4018.
- Sawada K, Ukena K, Satake H, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K (2002) Novel fish hypothalamic neuropeptide. *European journal of biochemistry / FEBS* 269:6000-6008.
- Schmidt R, Strahle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural development* 8:3.
- Schmitz M, Aroua S, Vidal B, Le Belle N, Elie P, Dufour S (2005) Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian

## Chapitre 4 : Bibliographie

- development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81:107-119.
- Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int* 15:394-404.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36:241-263.
- Schweitzer J, Lohr H, Filippi A, Driever W (2012) Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72:256-268.
- Sebert M-E (2007) Rôle des facteurs environnementaux dans le contrôle de l'axe gonadotrope de l'anguille européenne: étude des effets de la pression hydrostatique et de la mélatonine. In: *Ecophysiologie, Endocrinologie comparée*. Paris: Université Claude Bernard - Lyon1.
- Sébert M-E, Weltzien F-A, Moisan C, Pasqualini C, Dufour S (2008) Dopaminergic systems in the European eel: characterization, brain distribution, and potential role in migration and reproduction. In: *Fish and Diadromy in Europe (ecology, management, conservation)* (Dufour S, Prévost E, Rochard E, Williot P, eds), pp 27-46: Springer Netherlands.
- Seeburg PH, Mason AJ, Young WS, 3rd, Stewart TA, Nikolics K (1989) The gene encoding GnRH and its associated peptide GAP: some insights into hypogonadism. *J Steroid Biochem* 33:687-691.
- Segner H (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149:187-195.
- Selman K, Wallace RA (1989) Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science* 6:211-231.
- Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X (1993) Stages of oocyte development in the zebrafish, *brachydanio rerio*. *Journal of morphology* 218:203-224.
- Senthilkumaran B, Joy KP (1995) Changes in hypothalamic catecholamines, dopamine-beta-hydroxylase, and phenylethanolamine-N-methyltransferase in the catfish *Heteropneustes fossilis* in relation to season, raised photoperiod and temperature, ovariectomy, and estradiol-17 beta replacement. *General and comparative endocrinology* 97:121-134.
- Senthilkumaran B, Joy KP (1996) Effects of administration of some monoamine-synthesis blockers and precursors on ovariectomy-induced rise in plasma gonadotropin II in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *General and comparative endocrinology* 101:220-226.
- Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, Kagawa H (2001) Effects of serotonin, GABA and neuropeptide Y on seabream gonadotropin releasing hormone release in vitro from preoptic-anterior hypothalamus and pituitary of red seabream, *Pagrus major*. *J Neuroendocrinol* 13:395-400.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Servili A, Le Page Y, Leprince J, Caraty A, Escobar S, Parhar IS, Seong JY, Vaudry H, Kah O (2011) Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology* 152:1527-1540.
- Sharp PJ, Talbot RT, Macnamee MC (1989) Evidence for the involvement of dopamine and 5-hydroxytryptamine in the regulation of the preovulatory release of luteinizing hormone in the domestic hen. *General and comparative endocrinology* 76:205-213.
- Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W (1983) Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:2794-2798.
- Shimizu A, Tanaka H, Kagawa H (2003) Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. *General and comparative endocrinology* 132:35-45.
- Shupnik MA (1996) Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 54:279-286.
- Silverstein JT, Breininger J, Baskin DG, Plisetskaya EM (1998) Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *General and comparative endocrinology* 110:157-165.
- Sloley BD, Trudeau VL, Dulka JG, Peter RE (1991) Selective depletion of dopamine in the goldfish pituitary caused by domperidone. *Can J Physiol Pharmacol* 69:776-781.
- Sloley BD, Kah O, Trudeau VL, Dulka JG, Peter RE (1992) Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *Journal of neurochemistry* 58:2254-2262.
- Smeets W, Reiner A (1994) Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. London: Cambridge university press.
- Smeets WJ, Gonzalez A (2000) Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev* 33:308-379.
- Smidt MP, Burbach JP (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8:21-32.
- Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP, Smidt MP (2003) Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18:1731-1738.
- So WK, Kwok HF, Ge W (2005) Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol Reprod* 72:1382-1396.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Soga T, Sakuma Y, Parhar IS (1998) Testosterone differentially regulates expression of GnRH messenger RNAs in the terminal nerve, preoptic and midbrain of male tilapia. *Brain Res Mol Brain Res* 60:13-20.
- Sohn YC, Suetake H, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K (1998) Structural and expression analyses of gonadotropin Ibeta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene* 222:257-267.
- Sorensen PW, Stacey NE (2004) Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 38:399-417.
- Sotowska-Brochocka J, Martynska L, Licht P (1994) Dopaminergic inhibition of gonadotropic release in hibernating frogs, *Rana temporaria*. *General and comparative endocrinology* 93:192-196.
- Spemann H, Mangold H (2001) Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol* 45:13-38.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 83:13-34.
- Spence R, Fatema MK, Ellis S, Ahmed ZF, Smith C (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *J Fish Biol* 71:304-309.
- Sterba G (1962) *Freshwater Fishes of the World*: Vista Books, London.
- Steven C, Lehnen N, Kight K, Ijiri S, Klenke U, Harris WA, Zohar Y (2003) Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *General and comparative endocrinology* 133:27-37.
- Stigloher C, Ninkovic J, Laplante M, Geling A, Tannhauser B, Topp S, Kikuta H, Becker TS, Houart C, Bally-Cuif L (2006) Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3. *Development* 133:2925-2935.
- Swanson P, Dickey JT, Campbell B (2003) Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:53-59.
- Taupin P, Gage FH (2002) Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of neuroscience research* 69:745-749.
- Taylor MH (1984) Lunar Synchronization of Fish Reproduction. *Transactions of the American Fisheries Society* 113:484-493.
- Tello JA, Wu S, Rivier JE, Sherwood NM (2008) Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, synteny and phylogeny. *Integr Comp Biol* 48:570-587.



## Chapitre 4 : Bibliographie

- Temple JL, Millar RP, Rissman EF (2003) An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology* 144:13-19.
- Thiery JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpoux B (2002) Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol* 23:87-100.
- Thiery JC, Martin GB, Tillet Y, Caldani M, Quentin M, Jamain C, Ravault JP (1989) Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 49:80-87.
- Thiery JC, Gayrard V, Le Corre S, Viguie C, Martin GB, Chemineau P, Malpoux B (1995) Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49:285-296.
- Thomé RG, Bazzoli N, Rizzo E, Santos GB, Ratton TF (2005) Reproductive biology of *Leporinus taeniatus* Lütken (Pisces, Anostomidae) in Juramento Reservoir, São Francisco River basin, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22:565-570.
- Tong SK, Hsu HJ, Chung BC (2010) Zebrafish monosex population reveals female dominance in sex determination and earliest events of gonad differentiation. *Developmental biology* 344:849-856.
- Toresson H, Martinez-Barbera JP, Bardsley A, Caubit X, Krauss S (1998) Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Development genes and evolution* 208:431-439.
- Torgersen J, Nourizadeh-Lillabadi R, Husebye H, Alestrom P (2002) In silico and in situ characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) *gnrh3* (sGnRH) gene. *BMC Genomics* 3:25.
- Trudeau VL (1997) Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 2:55-68.
- Trudeau VL, Sloley BD, Wong AO, Peter RE (1993a) Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in the goldfish. *General and comparative endocrinology* 89:39-50.
- Trudeau VL, Murthy CK, Habibi HR, Sloley BD, Peter RE (1993b) Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biol Reprod* 48:300-307.
- Tsutsui K, Ukena K (2006) Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 27:1121-1129.
- Tsutsui K, Bentley GE, Ubuka T, Saigoh E, Yin H, Osugi T, Inoue K, Chowdhury VS, Ukena K, Ciccone N, Sharp PJ, Wingfield JC (2007) The general and comparative biology of

## Chapitre 4 : Bibliographie

- gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *General and comparative endocrinology* 153:365-370.
- Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealton SC (1992) Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Molecular endocrinology* 6:1163-1169.
- Tuomisto J, Mannisto P (1985) Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacological reviews* 37:249-332.
- Tyler CR, Sumpter JP (1996) Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6.
- Tyler CR, Sumpter JP, Kawachi H, Swanson P (1991) Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and comparative endocrinology* 84:291-299.
- Ulloa P, Iturra P, Niera R, Araneda C (2011) Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21:649-666.
- Vacher C, Ferriere F, Marmignon MH, Pellegrini E, Saligaut C (2002) Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. *General and comparative endocrinology* 127:198-206.
- Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferriere F, Saligaut C, Kah O (2003) Distribution of dopamine D2 receptor mRNAs in the brain and the pituitary of female rainbow trout: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology* 458:32-45.
- van den Akker WM, Brox A, Puelles L, Durston AJ, Medina L (2008) Comparative functional analysis provides evidence for a crucial role for the homeobox gene *Nkx2.1/Titf-1* in forebrain evolution. *J Comp Neurol* 506:211-223.
- Van den Berghe G, de Zegher F, Lauwers P, Veldhuis JD (1994) Luteinizing hormone secretion and hypoandrogenaemia in critically ill men: effect of dopamine. *Clin Endocrinol* 41:563-569.
- Van Der Kraak G, Donaldson EM, Chang JP (1986) Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in coho salmon. *Canadian Journal of Zoology* 64:1245-1248.
- Vernier P, Wullimann MF (2008) The posterior tuberculum. In: *Springer Encyclopedic Reference of Neuroscience*. (Binder MD, Hirokawa, N., Windhorst, U. , ed). Heidelberg, Germany: Springer Verlag.
- Vernier P, Moret F, Callier S, Snapyan M, Wersinger C, Sidhu A (2004) The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system. *Ann N Y Acad Sci* 1035:231-249.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Vetillard A, Ferriere F, Jego P, Bailhache T (2006) Regulation of salmon gonadotrophin-releasing hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. *J Neuroendocrinol* 18:445-453.
- Vetillard A, Atteke C, Saligaut C, Jego P, Bailhache T (2003) Differential regulation of tyrosine hydroxylase and estradiol receptor expression in the rainbow trout brain. *Molecular and cellular endocrinology* 199:37-47.
- Vickers ED, Laberge F, Adams BA, Hara TJ, Sherwood NM (2004) Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod* 70:1136-1146.
- Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland MC, Sbaihi M, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004) Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71:1491-1500.
- Vieira C, Pombero A, Garcia-Lopez R, Gimeno L, Echevarria D, Martinez S (2010) Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* 54:7-20.
- Viguie C, Caraty A, Locatelli A, Malpaux B (1995) Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. II. Changes in N-methyl-D,L-aspartic acid-induced LHRH release during the stimulation of luteinizing hormone secretion by melatonin. *Biol Reprod* 52:1156-1161.
- Viguie C, Picard S, Thiery JC, Malpaux B (1998) Blockade of tyrosine hydroxylase activity in the median eminence partially reverses the long day-induced inhibition of pulsatile LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol* 10:551-558.
- Viguie C, Thibault J, Thiery JC, Tillet Y, Malpaux B (1996) Photoperiodic modulation of monoamines and amino-acids involved in the control of prolactin and LH secretion in the ewe: evidence for a regulation of tyrosine hydroxylase activity. *J Neuroendocrinol* 8:465-474.
- von Schalburg KR, Warby CM, Sherwood NM (1999) Evidence for gonadotropin-releasing hormone peptides in the ovary and testis of rainbow trout. *Biol Reprod* 60:1338-1344.
- Wallace RA, Selman K (1981) Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. *American Zoologist* 21:325-343.
- Wallace RA, Selman K (1990) Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Microsc Tech* 16:175-201.
- Wang X, Zhao T, Wei H, Zhou H (2011) Regulation of dopamine D2 receptor expression in grass carp pituitary cells: a possible mechanism for dopaminergic modification of luteinizing hormone synthesis. *General and comparative endocrinology* 173:48-55.
- Weihe E, Depboylu C, Schutz B, Schafer MK, Eiden LE (2006) Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol Neurobiol* 26:659-678.

## Chapitre 4 : Bibliographie

- Weil C, Marcuzzi O (1990a) Cultured pituitary cell GtH response to GnRH at different stages of rainbow trout spermatogenesis and influence of steroid hormones. *General and comparative endocrinology* 79:492-498.
- Weil C, Marcuzzi O (1990b) Cultured pituitary cell GtH response to GnRH at different stages of rainbow trout oogenesis and influence of steroid hormones. *General and comparative endocrinology* 79:483-491.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 137:447-477.
- Weltzien FA, Hildahl J, Hodne K, Okubo K, Haug TM (2014) Embryonic development of gonadotrope cells and gonadotropic hormones--lessons from model fish. *Molecular and cellular endocrinology* 385:18-27.
- Weltzien FA, Pasqualini C, Sebert ME, Vidal B, Le Belle N, Kah O, Vernier P, Dufour S (2006) Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147:2964-2973.
- White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD (1995) Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8363-8367.
- Winberg S, Myrberg AA, Jr., Nilsson GE (1993) Predator exposure alters brain serotonin metabolism in bicolour damselfish. *Neuroreport* 4:399-402.
- Xia W, Smith O, Zmora N, Xu S, Zohar Y (2014) Comprehensive analysis of GnRH2 neuronal projections in zebrafish. *Sci Rep* 4:3676.
- Yamamoto K, Vernier P (2011) The evolution of dopamine systems in chordates. *Front Neuroanat* 5:21.
- Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P (2010) Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci* 43:394-402.
- Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P (2011) Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *The Journal of comparative neurology* 519:576-598.
- Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B (2003) Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol* 225:131-185.
- Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH (2006) Cells of the anterior pituitary. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38:1441-1449.
- Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K (2005) A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*):

## Chapitre 4 : Bibliographie

- identification, expression and binding activity. *The Journal of endocrinology* 184:257-266.
- Yoshiura Y, Suetake H, Aida K (1999) Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *General and comparative endocrinology* 114:121-131.
- Yoshiura Y, Kobayashi M, Kato Y, Aida K (1997) Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin beta subunits (GTH-I beta and -II beta) from the goldfish, *Carassius auratus*. *General and comparative endocrinology* 105:379-389.
- Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7:295-309.
- Yu KL, Peter RE (1992) Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary in vitro. *General and comparative endocrinology* 85:138-146.
- Yu KL, Rosenblum PM, Peter RE (1991) In vitro release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *General and comparative endocrinology* 81:256-267.
- Yu KL, He ML, Chik CC, Lin XW, Chang JP, Peter RE (1998) mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. *General and comparative endocrinology* 112:303-311.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 276:248-250.
- Zigmond MJ, Stricker EM (1989) Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *International review of neurobiology* 31:1-79.
- Zohar Y, Mylonas CC (2001) Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197:99-136.
- Zohar Y, Harel M, Hassin S, Tandler A (1995) Broodstock management and manipulation of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (Bromage NR, R.J. eds, ed), pp 94-117. London: Blackwell Science Press.
- Zohar Y, Munoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O (2010) Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and comparative endocrinology* 165:438-455.
- Zon LI, Peterson RT (2005) In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4:35-44.
- Zupanc GK (2001) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav Evol* 58:250-275.

## Chapitre 4 : Bibliographie

Zupanc GK, Hinsch K, Gage FH (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *The Journal of comparative neurology* 488:290-319.

Zupanc GK, Sirbulescu RF, Nichols A, Ilies I (2006) Electric interactions through chirping behavior in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 192:159-173.





## ABSTRACT

It was first demonstrated in a teleost fish that the stimulatory control of the gonadotrope axis by GnRH can be counterbalanced by an inhibitory control exerted by dopamine (DA). Later on, this inhibitory dopaminergic control was found in various vertebrate species. However the functional importance of this regulatory pathway varies according to the species. To deepen our knowledge on this inhibitory dopaminergic system, we used the zebrafish (*Danio rerio*) as a model, in which numerous molecular tools are available.

First we demonstrated that DA indeed plays a role in the neuroendocrine control of zebrafish reproduction. By injecting a dopamine receptor antagonist together with an agonist of the GnRH (GnRH $\alpha$ ), we were able to stimulate LH expression in the pituitary, and to reactivate the spawning cycles in sexually regressed old females, an effect of which was not produced by the GnRH $\alpha$  alone.

We then studied the neuroanatomical basis of this inhibitory control. After observing the expression of the D2-DA receptors subtypes in LH cells, we highlighted numerous dopaminergic terminals on- or in the vicinity of- these cells. We then localized, by DiI retrograde tracing experiments in adult zebrafish, the dopaminergic cell bodies giving rise to these projections in the most antero-ventral part of the preoptic area. We have called these hypophysiotropic neurons the preoptico-hypophysial (POH) DA neurons.

We next studied the development of POHDA neurons. Taking advantage of early anatomical landmarks, we followed the embryonic development of these cells. We showed that the first POHDA neurons arise at around 72 hours post fertilization (hpf), more than 24 hours later than the DA neurons in the neighbor suprachiasmatic nucleus (SCDA). This late differentiation would explain why POHDA neurons have not been studied in the developing embryo so far. We showed that contrary to the number of the SCDA neurons, which is constant all along the fish life, that of POHDA neurons increases proportionally to the growth of the fish due to continuous neurogenesis. Finally, we examined the expression profiles of developmental genes related to the regionalization of the anterior forebrain. We showed that the genetic networks involved in the development of POHDA and SCDA populations are at least partly different.

To summarize, this work demonstrates for the first time the existence of a dopaminergic inhibitory control of gonadotrope function in zebrafish. It describes the anatomy of the preoptico-hypophysial dopaminergic system supporting these DA actions and the setting up of these neurons during embryonic development. We show that these neuroendocrine population displays neurogenesis even during adulthood. Our findings also provide the genetic bases for future functional studies on the development of POHDA, a poorly studied neuroendocrine DA population.

## RESUME

C'est chez un téléostéen qu'il a été démontré pour la première fois que le contrôle stimulateur de l'axe gonadotrope par la GnRH peut être contrebalancé par un contrôle inhibiteur assuré par la dopamine (DA). Ce contrôle dopaminergique inhibiteur a été retrouvé par la suite chez diverses espèces de vertébrés. Cependant l'importance fonctionnelle de cette voie inhibitrice de régulation varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Pour approfondir nos connaissances sur ce système dopaminergique inhibiteur de la reproduction, nous avons utilisé le poisson zèbre (*Danio rerio*), un modèle de vertébrés pour lequel de nombreux outils moléculaires sont disponibles.

Nous avons d'abord démontré qu'il existait bien un contrôle dopaminergique de la fonction gonadotrope dans cette espèce: en injectant un antagoniste dopaminergique en même temps qu'un analogue de la GnRH, nous avons pu stimuler l'expression de la LH dans l'hypophyse et réactiver les cycles de ponte chez des femelles âgées sexuellement régressées, un effet qui n'est pas produit par l'agoniste de la GnRH seul.

Nous avons ensuite étudié le substrat neuroanatomique de cette action inhibitrice. Après avoir observé l'expression par les cellules à LH des sous-types de récepteurs D2 qui existent chez le poisson-zèbre, nous avons mis en évidence de nombreuses terminaisons dopaminergiques sur- ou à proximité- de ces cellules gonadotropes. Nous avons ensuite localisé, par des expériences de traçage rétrograde chez l'adulte, les corps cellulaires des neurones dopaminergiques qui émettent ces projections, dans la partie la plus antéro-ventrale de l'aire préoptique. Nous avons appelé ces neurones hypophysiotropes: les neurones dopaminergiques préoptico-hypophysaires (POHDA).

Nous nous sommes aussi intéressés au développement des neurones POHDA. Grâce à des repères anatomiques précoces, nous avons pu les repérer précisément au sein de l'aire préoptique et suivre leur apparition sur des embryons de plus en plus jeunes. Nous avons ainsi mis en évidence que les tout premiers neurones POHDA n'apparaissent qu'à partir de 72 heures post-fécondation (hpf), soit plus de 24 h après les neurones dopaminergiques du noyau suprachiasmatique (SCDA) voisin. Cette différenciation tardive explique probablement pourquoi les neurones POHDA ont jusque-là été ignorés dans toutes les études de développement. En outre, nous avons montré que contrairement au nombre des neurones SCDA qui reste constant tout au long de la vie du poisson-zèbre, celui des neurones POHDA continue d'augmenter tant que le poisson continue à grandir de manière allométrique, grâce à une neurogenèse continue. Enfin, nous avons examiné les profils d'expression de plusieurs gènes en relation avec la régionalisation du cerveau antérieur. Cette étude a permis de montrer que les réseaux génétiques impliqués dans le développement des populations SCDA et POHDA sont au moins en partie différents.

Ces travaux démontrent pour la première fois l'existence d'un contrôle dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre. Ils décrivent l'anatomie de ce système dopaminergique chez l'adulte, sa mise en place au cours du développement et ses capacités de neurogenèse continue. Ils apportent chez le poisson-zèbre des bases génétiques sur l'identité régionale de l'aire préoptique qui vont permettre d'aborder des études fonctionnelles sur le développement de ces neurones neuroendocrines mal connus.