**TITRE:**

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

**TITLE:**

Study of the dopaminergic inhibitory system controlling the gonadotrope function in zebrafish

**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 (GnRHa), 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 GnRHa 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 that 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-hypophyseal 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 répérer 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.

Mots clefs : Dopamine, neuroendocrine, reproduction, developpement, poisson-zèbre

Keywords : Dopamine, neuroendocrine, reproduction, development,zebrafish

**COMPOSITION DU JURY :**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| **Président :**  Catherine Pasqualini | Chargée de recherche (CNRS, Gif sur Yvette) |
| **Président :** |  |
| Michael Schumacher | Directeur de recherche (INSERM, Paris) |
| **Rapporteurs :** |  |
| Paolo Giacobini  Yonathan Zohar | Chargé de recherche (INSERM, Lille)  Professeur (Université du Maryland, Baltimore) |
| **Examinateurs :** |  |
| Sylvie Dufour  Olivier Kah | Directrice de recherche (CNRS-MNHN, Paris)  Directeur de recherche (INSERM, Rennes) |

Thèse réalisée dans le laboratoire de Neurobiologie et Développement (UPR 3294) au CNRS de Gif sur Yvette