



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE  
Faculté des Sciences et Techniques  
Béni-Mellal



N° d'ordre : /



## THÈSE

Présentée par



**Ben yamine MALLOUKI**

Pour l'obtention du grade de

**Docteur**

*Option : Biologie*

*Spécialité : Neuroendocrinologie*

*Présenté à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal*

*Université Sultan Moulay Slimane*

### **Caractérisation du rôle neuroendocrine de la Sélénoprotéine T (SELENOT) dans le contrôle de la reproduction**

Mr. Ahmed Ait Chaoui	Professeur, FST-USMS-Béni Mellal	Rapporteur/Président
Mr. Mohamed Bennis	Professeur, Université de Cadi Ayyad, Marrakech	Invité
Mr. Khalid El Allali	Professeur, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II	Rapporteur
Mme. Souad Bamhamed	Professeur, Université de Cadi Ayyad, Marrakech	Rapporteur
Mme. Loubna Boukhzar	Attachée de recherche PhD, INSERM, Université de Rouen Normandie	Invitée
Mme. Fatiha Chigr	Professeur, FST-USMS-Béni Mellal	Directeur de thèse
Mr. Youssef Anouar	Directeur de recherche, INSERM, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce manuscrit a fait l'objet d'une collaboration inter-laboratoire sous les directions du Dr. Fatiha Chigr du Laboratoire Génie Biologique, Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal, Maroc, et du Dr. Youssef Anouar du laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N) de l'Université de Rouen, Inserm U1239, Normandie (France). Je voudrais tout d'abord remercier les membres du Jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger mon travail. Je voudrais remercier le Dr. Khalid El Allali, Professeur à l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II, de me faire l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse en tant que rapporteur. Je vous suis reconnaissant de l'intérêt que vous portez à nos thématiques de recherche. Je suis également très reconnaissant envers le Dr. Souad Bamhamed, Professeur à l'Université de Cadi Ayyad, Marrakech, d'avoir également accepté d'être rapporteur de ma thèse. Outre cet immense plaisir. Je tiens également à témoigner toute ma gratitude envers le Professeur Mohamed Ait Chaoui, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal, d'avoir gentiment accepté d'être rapporteur de ma thèse. Je tiens également à témoigner toute ma gratitude envers le Dr. Mohamed Bennis, d'avoir gentiment accepté de siéger dans mon jury de thèse. Je remercie également le Dr, Loubna Boukhzar d'avoir gentiment acceptée de siéger dans mon jury de thèse. J'apprécie pleinement la chance que j'ai de vous avoir en face de moi aujourd'hui. Je remercie le Dr. Fatiha Chigr, de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de m'intégrer au sein du laboratoire DC2N. Je la remercie aussi pour sa confiance tout au long de ces quatre années de travail. Vous m'avez toujours assuré la possibilité de travailler dans les meilleures conditions. Vous étiez impliquée dans l'orientation de mes formations de licence, master et thèse, vous étiez compréhensive dans les moments difficiles, comme une mère, et rigoureuse dans les moments de formation. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Je remercie le Dr. Youssef Anouar, directeur de l'équipe PPN de m'avoir encadré tout le long de ma thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez donnée dans ce projet, et qui m'a beaucoup apporté. J'ai énormément appris grâce à vous et je vous

remercie pour le soutien dont vous avez toujours fait preuve, ce qui m'a permis d'améliorer mes réflexions et ma passion pour la recherche scientifique. J'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous ces quatre années. Je ne peux qu'être infiniment reconnaissant pour tout ce qui m'a été donné. Aussi je voudrais rendre hommage au Dr. Mohamed Najimi, Professeur à l'université Sultan Moulay Slimane de Béni Mellal (FST). C'est avec une infinie tristesse que nous avons appris le décès, j'ai eu la chance de suivre ses cours passionnés et passionnants de neurosciences en master. Il m'a aussi prêté une oreille attentive et curieuse à mes recherches de master et doctorat. Il était bienveillant et lumineux face à ses étudiants, un homme de science plein d'humanité. C'est avec une profonde émotion que j'adresse à sa famille mes sincères condoléances. Au Dr. Loubna Boukhar, la première personne qui m'a guidé au sein du laboratoire, qui m'a accueilli avec un grand sourire et m'a immédiatement mis à l'aise. Merci pour votre aide à réaliser ce projet de recherche, l'enseignante qui m'a appris beaucoup de choses durant mes premières expériences. Merci à David Godefroy pour son aide technique et sa grande disponibilité. Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe. Marjo, merci pour votre aide, vous étiez toujours disponible même à 7h du matin, la plus drôle de notre équipe. Par la même occasion, j'adresse mes sincères remerciements à mes chers amis, soit Michael, Inès, Omayma, Mouna, Houssein... pour leur soutien amical. Merci d'être toujours là pour moi, nous avons vécu des moments inoubliables. Je vous remercie sincèrement de votre amitié fidèle au cours de ces années. Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille : À mes sœurs et frères, Vous m'avez aussi grandement soutenu et je vous en suis très reconnaissant. Merci d'avoir supporté mes doutes, mes états d'âme et d'avoir toujours été là pour moi. Je vous aime. À mon très cher père, Grâce à toi, j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Ces années de thèse n'ont pas dû être faciles pour toi non plus, mais ton amour me porte et me guide tous les jours, tu as toujours cru en moi. Je t'aime papa. À ma maman d'amour, je voudrais te remercier pour ton amour, ton humour et ta générosité, ta compréhension, ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. J'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse. Finalement, j'y suis arrivé et c'est aussi grandement grâce à toi qui a vécu cette thèse en même temps que moi. Merci Papa, Mama pour tous

les instants magiques qui m'ont fait retrouver le sourire dans les moments difficiles. Pour votre écoute, pour m'avoir supporté tout simplement. Je vous aime. Un clin d'œil à toutes les personnes et évènements qui ont croisé ma route et qui ont tenté de me décourager, vous m'avez aidé plus que vous ne le pensez, pour ça, je vous remercie.

# RESUME

Le contrôle de la reproduction est assuré par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG). Dans cet axe, l'hypothalamus intègre et centralise la majorité des stimuli externes et internes qui vont influencer sur la fonction de la reproduction. Chez les mammifères, la neurohormone qui sert de messenger entre l'hypothalamus et l'hypophyse, la « Gonadotropin-Releasing Hormone » (GnRH) ou gonadolibérine est considérée comme l'acteur majeur qui régule l'axe HHG. Les neurones à GnRH de l'hypothalamus projettent leurs axones vers l'éminence médiane, au niveau de laquelle ils libèrent la GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire qui lui-même achemine la neurohormone jusqu'aux cellules gonadotropes de l'adénohypophyse. En effet, la GnRH stimule la production et la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH). L'hypophyse joue un rôle de relai et d'amplificateur des signaux de communication entre l'hypothalamus et les gonades, par l'intermédiaire de LH et de FSH. La LH et la FSH sont libérées dans la circulation sanguine générale afin de relayer l'information cérébrale en contrôlant le développement des gamètes (gamétogénèse) et la production des stéroïdes sexuels (stéroïdogénèse). Ces hormones, en particulier les stéroïdes, agissent aussi au niveau central et exercent des rétrocontrôles sur l'hypothalamus et l'hypophyse.

Les troubles de la reproduction sont liés à des perturbations neuroendocriniennes de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG), qui peuvent résulter notamment d'un défaut de production et d'action de la GnRH. Nous avons récemment montré que la SELENOT, une nouvelle thiorédoxine fortement exprimée dans les cellules neuroendocrines et endocrines, joue un rôle crucial dans la sécrétion hormonale en contrôlant le stress du réticulum endoplasmique. De manière fort intéressante, l'inactivation conditionnelle du gène de la SELENOT dans le système nerveux central entraîne une très forte baisse de la fertilité chez les souris mâles et femelles génétiquement modifiées (SELENOT<sup>-/-</sup>). Les animaux montrent de sévères troubles hormonaux et un comportement sexuel altéré. De plus, un cycle ovarien dérégulé et un phénotype similaire au syndrome de l'ovaire polykystique (SOPK) ont été observés chez la femelle. Ces résultats suggèrent que la SELENOT joue un rôle central dans le fonctionnement de l'axe HHG.

Nous avons ensuite recherché au niveau central l'origine des altérations observées, en examinant la production de la GnRH dans l'hypothalamus des souris invalidées. Nous avons observé une augmentation de la densité des neurones à GnRH, ce qui se traduit par une augmentation du niveau de la LH, des perturbations endocriniennes et un dysfonctionnement gonadique chez les souris femelles et mâles. Des co-marquages ont été réalisés par immunohistochimie qui ont permis d'identifier des défauts de neurotransmission vers les neurones à GnRH via la kisspeptine et la dopamine. L'ensemble de ces résultats révèle que l'expression de la SELENOT et l'équilibre rédox sont essentiels pour le bon fonctionnement de l'axe gonadotrope.

## ملخص

يتم التحكم في التكاثر والإنتاج عن طريق المحور الوطائي - النخامي - التناسلي. في هذا المحور، يقوم الوطاء بدمج وتركيز غالبية المحفزات الداخلية والخارجية التي تؤثر على وظيفة الإنجاب. عند الثدييات، يعتبر الهرمون العصبي الذي يعمل بمثابة رسول بين الوطاء والغدة النخامية هرمون إفراز محتوى الغدة التناسلية من أبرز العوامل المؤثرة على هذا المحور. توجد الخلايا العصبية المفرزة لهذا الهرمون على مستوى الوطاء وتطلق تشجراتها إلى نظام بوابة الغدة النخامية حيث تقوم بإطلاق هرمون إفراز محتوى الغدة التناسلية، بدوره يقوم بتحفيز إفراز هرمونين، على مستوى الغدة النخامية. تعمل هذه الغدة كوسيلة ترابط للإشارات بين الوطاء والغدة التناسلية. بمعنى آخر، هذين الهرمونين يساعدون على التحكم في تطور الأمشاج (تكوين الأمشاج) وإنتاج الهرمونات الجنسية (تكوين الستيرويد).

الاضطرابات التناسلية ممكن أن تنتج عن مشكل في إنتاج هرمونات المحور الوطائي - النخامي - التناسلي وبالضبط إنتاج هرمون إفراز محتوى الغدة التناسلية. لقد أظهرنا مؤخرًا أن سيلينوبروتينين، بمثابة تيوردوكسين جديد والذي يتواجد بكثرة في الخلايا العصبية وخلايا الغدة المفرزة للهرمونات، يلعب دورًا مهمًا في إفراز الهرمونات من خلال التحكم في إجهاد الشبكة الأندوبلازمية. ومن المثير للاهتمام، أن إبطال جينات سيلينوبروتينين في الجهاز العصبي المركزي يؤدي إلى انخفاض شديد في الإنجاب عند الفئران، كما أن هذه الفئران المعدلة وراثيًا ذكور وإناث تظهر اضطرابات هرمونية شديدة وسلوك جنسي غير عادي. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ وجود دورة مبيض غير منتظمة ونمط ظاهري مشابهة للأنثى متعددة الكيسات. تشير هذه النتائج إلى أن سيلينوبروتينين تلعب دورًا مركزيًا في عمل المحور الوطائي - النخامي - التناسلي.

بعد ذلك، بحثنا مركزيًا عن أصل التغييرات المرصودة، من خلال فحص إنتاج هرمون إفراز محتوى الغدة التناسلية في منطقة الوطاء عند الفئران المعدلة وراثيًا. لاحظنا زيادة في كثافة الخلايا العصبية المفرزة لهرمون إفراز محتوى الغدة التناسلية والتي تُترجم إلى زيادة في مستوى هرمون المحفز للجسم الأصفر أو الهرمون الملوتن، واختلال وظائف الغدة التناسلية عند الإناث والذكور. تكشف كل هذه النتائج أن إنتاج سيلينوبروتينين وتوازن الأكسدة والاختزال ضروريان للتشغيل السليم للمحور الوطائي - النخامي - التناسلي.

# PRODUCTION SCIENTIFIQUE

## Publications :

- R. Mazza, A. Gattuso, S. Imbrogno, L. Boukhzar, Serena Leo, **B-Y. Mallouki**, M. Filice, C. Rocca, T. Angelone, Y. Anouar, M. Carmela Cerra. Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Biol*, 222, jeb201202, 2019.
- H. Rahmi, **B-Y. Mallouki**, F. Chigr, M. Najimi. The effects of smoking Haschich on blood parameters in young people from the Beni Mellal region in Morocco. *AIMS Medical Science*. 8, 2021.
- D. Godefroy, L. Boukhzar, **B-Y. Mallouki**, E. Carpentier, C. Dubessy, F. Chigr, Y. Tillet, Y. Anouar. SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study. *Neuroendocrinology*, 2022.
- **B-Y. Mallouki**, L. Boukhzar, D. Godefroy, L. Dumont, M. Gras, Y. Tillet, N. Rives, F. Chigr, V. Prévot, Y. Anouar. Central SELENOT expression regulates gonadotrope axis function, sexual behavior and fertility. Article soumis
- E. Carpentier, A. Falluel-Morel, L. Brunet, M. Bénard, D. Godefroy, **B-Y. Mallouki**, L. Boukhzar, A. Arabo, Y. Anouar. SELENOT deficiency alters projection neuron migration during corticogenesis in mice. Article soumis.

## Présentations affichées :

- **B-Y. Mallouki**, L. Boukhzar, D. Godefroy, L. Dumont, M. Gras, Y. Tillet, N. Rives, F. Chigr, V. Prévot, Y. Anouar (2022). Intrahypothalamic stress and reproductive function. Journée scientifique de la SNE (société de neuroendocrinologie), Lyon, France
- **B-Y. Mallouki**, L. Boukhzar, M. Najimi, F. Chigr, Y. Anouar (2022). Caractérisation du rôle neuroendocrine de la Sélénoprotéine T (SELENOT) dans

le contrôle de la reproduction. The international congress of neuroendocrinology (ICN), Glasgow, Scotland

- **B-Y. Mallouki**, L. Boukhzar, M. Najimi, F. Chigr, Y. Anouar (2021). Caractérisation du rôle neuroendocrine de la Sélénoprotéine T (SELENOT) dans le contrôle de la reproduction. Colloque de la société de neuroendocrinologie (SNE), Bordeaux, France
- **B-Y. Mallouki**, L. Boukhzar, M. Najimi, F. Chigr, Y. Anouar (2019). Caractérisation du rôle neuroendocrine de la Sélénoprotéine T (SELENOT) dans le contrôle de la reproduction. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), Caen, France
- H. Malqui, **B-Y. Mallouki**, K. EL Manja, G. Er-Taoui, M. Najimi, F. Chigr (2015). Chemical stress and developmental behavior in mouse: the case of mercury. International Symposium on Stress, Addiction, and Obesity: Stress and Appetitive Behaviors. A Potential Link between Obesity and Addiction, Marrakach, Maro



# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Distribution des neurones à GnRH dans l'aire pré-optique, le septum médiane et ses terminaisons nerveuses dans l'éminence médiane .....	7
Figure 2 : Coupe transversale des tubes séminifères de testicule de souris adulte.....	10
Figure 3 : Coupe histologique d'ovaire de souris et principaux types de follicules ovariens.....	12
Figure 4 : Populations cellulaires dominantes et observations correspondantes des différents stades du cycle estrien de la souris.....	13
Figure 5 : Distribution des neurones à GnRH dans le cerveau de souris.....	15
Figure 6 : Diagramme schématisant la relation entre les profils temporels de l'activité du générateur de la LH et de la GnRH au cours du cycle estrien de souris.....	16
Figure 7 : Coupe transversale schématique de l'épithélium séminifère et du tissu interstitiel de testicule de souris.....	19
Figure 8 : Profils de sécrétion de certaines hormones au cours du cycle estrien chez la souris.....	22
Figure 9 : illustration schématique du mécanisme contrôlant la génération de l'impulsion de GnRH chez les mammifères .....	28
Figure 10 : Cycle du comportement sexuel chez la souris.....	34
Figure 11 : Structure chimique de la sélénobase 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine.....	39
Figure 12 : Structure chimique de la méthionine, sélénométhionine, cystéine et sélénocystéine.....	40
Figure 13 : Sélénoprotéome humain.....	42
Figure 14 : Structure de la SELENOT murine.....	48
Figure 15 : Expression des ARNm de la SELENOT dans les tissus de rat au cours de l'embryogenèse.....	49
Figure 16 : Fonction intracellulaire de la SELENOT dans les cellules PC12 différenciées par le PACAP.....	50
Figure 17 : Modèle proposé pour l'intégration de la SELENOT dans le complexe OST.....	52

Figure 18 : Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole expérimental de frottis vaginal.....	57
Figure 19 : Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole d'ELISA.....	59
Figure 20 : Schéma représentant les différentes phases du comportement sexuel chez la souris.....	61
Figure 21 : coloration basée sur l'immunofluorescence à l'aide de coupe flottante du cerveau.....	64
Figure 22 : Schéma récapitulant les différentes étapes de l'étude histologique.....	65
Figure 23 : Schématique de la technique d'immunofluorescence et d'imagerie 3D de cerveaux transparaissés.....	67
Figure 24 : Schématique de l'expérience du traitement à l'antagoniste de la GnRH.....	68
Figure 25 : Comportement sexuel des souris SELENOT <sup>-/-</sup> (P90).....	71
Figure 26 : Comportement sexuel des souris SELENOT <sup>-/-</sup> avec des souris témoin (P90).....	72
Figure 27 : Evaluation de la fertilité des souris SELENOT <sup>-/-</sup> (P90).....	73
Figure 28 : Evaluation de la fertilité des souris SELENOT <sup>-/-</sup> avec des souris témoin (P90).....	74
Figure 29 : Cycle ovarien et niveaux d'hormones circulantes chez les femelles SELENOT <sup>-/-</sup> (P90-P120).....	76
Figure 30: Morphologie des ovaires et de l'utérus chez les souris femelles SELENOT <sup>-/-</sup> (P120).....	77
Figure 31 : Niveaux d'hormones chez les souris mâles SELENOT <sup>-/-</sup> (P120). ....	78
Figure 32 : Morphologie des testicules chez les souris mâles SELENOT <sup>-/-</sup> (P120).....	80
Figure 33 : Imagerie tridimensionnelle de l'immunomarquage de neurones à GnRH dans le cerveau des souris SELENOT <sup>-/-</sup> (P120).....	82
Figure 34 : Distribution des neurones à GnRH dans l'APO et l'EM.....	83
Figure 35 : Protocole du traitement par l'antagoniste de GnRH chez les souris femelles SELENOT <sup>-/-</sup> (P90).....	84
Figure 36 : Analyse du cycle ovarien avant, pendant et après le traitement par l'antagoniste de GnRH chez les souris femelles SELENOT <sup>-/-</sup> (P90).....	85

Figure 37 : Le taux circulant de LH et morphologie des ovaires après traitement par l'antagoniste de GnRH chez les souris femelles SELENOT <sup>-/-</sup> (P90).....	86
Figure 38 : Imagerie tridimensionnel de l'immunomarquage de neurones à TH dans le cerveau et les neurones à Kisspeptine dans l'AVPV de la souris adulte (P120).....	88
Tableau 1 : Les sélénoprotéines identifiées chez les eucaryotes sont représentées sur cet arbre récapitulatif.....	38
Tableau 2 : Technique utilisée pour la déshydratation et l'inclusion à la paraffine..... ;	62
Tableau 3 : Programme disponible sur le Varistain (automate utilisé pour le déparaffinage et la réhydratation).....	63
Tableau 4 : La distribution spatio-temporelle de la SELENOT chez le rat Wistar.....	91

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABP</b>	androgen binding protein
<b>AHA</b>	aire hypothalamique antérieure
<b>AMH</b>	anti Müllerian Hormone
<b>APO</b>	aire pré-optique
<b>ARC</b>	noyau arqué
<b>AR</b>	récepteur des androgènes
<b>ARN</b>	acide ribonuléique
<b>ATV</b>	aire tegmentale ventrale
<b>AVPV</b>	le noyau antéroventral périventriculaire
<b>DHT</b>	dihydrotestosterone
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>ERAD</b>	ER-associated degradation
<b>EM</b>	éminence médiane
<b>ER<math>\alpha</math></b>	estrogen receptor alpha
<b>ER<math>\beta</math></b>	estrogen receptor beta
<b>E2</b>	œstradiol
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>FSH</b>	follicle stimulating hormone
<b>GDX</b>	gonadectomie
<b>GnRH</b>	gonadotropin releasing hormone
<b>GPx</b>	glutathione peroxidases
<b>HH</b>	hypothalamo-hypophysaire
<b>HHG</b>	hypothalamo-hypophyso-gonadique
<b>HPG</b>	hypogonadisme hypogonadotrophique
<b>IGF-1</b>	insulin growth factor 1
<b>KNDy</b>	kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin
<b>KOR</b>	kappa-opioïde receptor
<b>LH</b>	luteinising hormone
<b>mPOA</b>	aire préoptique médiale
<b>MPTP</b>	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine

<b>NK3R</b>	Neurokinin 3 receptor
<b>OPD</b>	o-phénylènediamine
<b>OVLT</b>	organe vasculaire de la lame terminale
<b>PACAP</b>	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
<b>PAG</b>	substance grise périaqueducale
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PVpo</b>	noyau périventriculaire de l'aire préoptique
<b>RER</b>	réticulum endoplasmique rugueux
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>ROS</b>	espèces réactives de l'oxygène
<b>rPOA</b>	l'aire préoptique rostrale
<b>SBP2</b>	SECIS binding protein 2
<b>SECIS</b>	Selenocysteine insertion sequence
<b>SM</b>	septum médiane
<b>SOPK</b>	le syndrome des ovaires polykystiques
<b>SSC</b>	cellules souches spermatogoniales
<b>SELENOT</b>	sélenoprotéine T
<b>SNC</b>	système nerveux central
<b>T</b>	testostérone
<b>TH</b>	tyrosine hydroxylase
<b>TGF</b>	transforming growth factor
<b>VMH</b>	ventromédian de l'hypothalamus
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -hydroxysteroïde déshydrogénase

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>3</b>
<b>PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>6</b>
<b>I. Le complexe Hypothalamo-Hypophyso-Gonadique</b>	<b>7</b>
I.1. Hypothalamus	8
I.2. Hypophyse	8
I.3. Gonades	9
I.3.1. Testicules	9
I.3.2. Ovaires	11
I.3.2.1. Cycle estrien	12
<b>II. Fonctions de l'axe HHG</b>	<b>13</b>
II.1. Le réseau de neurones à GnRH	13
II.2. La sécrétion pulsatile de la GnRH et sa régulation	15
II.3. Les gonadotrophines	17
II.4. Gamétogenèse et synthèse des hormones stéroïdiennes	18
II.4.1. Chez le mâle	18
II.4.2. Chez la femelle	20
<b>III. Les signaux nerveux et hormonaux contrôlant le système à GnRH</b>	<b>23</b>
III.1. L'action des œstrogènes sur les neurones à GnRH	23
III.2. L'action de la progestérone sur les neurones à GnRH	25
III.3. L'action de la Kisspeptine sur les neurones à GnRH	25
III.4. L'action des neurones KNDy sur les neurones à GnRH	27
III.5. L'action des androgènes sur les neurones à GnRH	28
III.6. L'action du glutamate et du GABA sur les neurones à GnRH	29
III.7. L'action de la dopamine sur les neurones à GnRH	31
<b>IV. Comportement sexuel</b>	<b>32</b>
IV.1. Chez le mâle	33
IV.2. Chez la femelle	34
<b>V. Physiopathologie de l'axe gonadotrope</b>	<b>35</b>
V.3. Syndrome des ovaires polykystiques	35
V.4. Stress oxydant	36
<b>VI- les sélénoprotéines</b>	<b>38</b>

VI.1. Les principales formes biologiques du sélénium	38
VI.1.1. Sélénobase	39
VI.1.2. Acides aminés séléniés	39
VI.1.3. Sélénométhionine	39
VI.1.4. Sélénocystéine	39
VI.2. Principaux rôles physiologiques des sélénoprotéines	40
VI.2.1 Rôles des sélénoprotéines dans le SNC	44
VI.2.2. Expression et rôle neuroprotecteur des sélénoprotéines dans le SNC	45
VI.2.3. Apport des souris transgéniques	46
VI.2.4. Distribution et rôles de certaines sélénoprotéines au cours de l'embryogenèse	47
VI.3. La Sélénoprotéine T	47
VI.3.1. Caractéristiques structurales de la SELENOT	47
VI.3.2 Expression tissulaire de la SELENOT	48
VI.3.3. Rôles biologiques de la SELENOT	50
VI.4. Sélénoprotéines et fertilité	52
<b>PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES</b>	<b>54</b>
<b>PARTIE 3 : RESULTATS</b>	<b>69</b>
<b>PARTIE 4 : DISCUSSION</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>106</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>110</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>134</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

« A la source de toute connaissance, il y a une idée, une pensée, puis l'expérience vient confirmer l'idée. » Claude Bernad



La fertilité et la reproduction sont des fonctions physiologiques vitales qui assurent le maintien des espèces. Chez les mammifères, ces fonctions sont sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) dont le chef d'orchestre est le neuropeptide GnRH produit dans l'hypothalamus. Chez les vertébrés, l'axe HHG est le cadre anatomique responsable de la compétence reproductive et donc de la fertilité. La coordination de ce système biologique à trois étages, repose sur le contrôle neuronal de libération de la *Gonadotrophin-Releasing Hormone* (GnRH), sa libération dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires qui sont impliquées dans le déclenchement de la puberté et la régulation de la fonction gonadique. Les neurones producteurs de GnRH reçoivent des entrées de divers réseaux neuronaux qui règlent avec précision l'activité des neurones à GnRH, par l'action de différents neurotransmetteurs et neuropeptides. Ces derniers sont produits et libérés de manière régulée afin d'assurer le bon fonctionnement de l'axe gonadotrope (Todman et al., 2005 ; Liu et al., 2013). Une dérégulation de l'action et de la production de GnRH peut donner des troubles de la reproduction et de la fertilité. Ainsi, les neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de la reproduction doivent exprimer des mécanismes de soutien qui leur permettent de maintenir une sécrétion hormonale régulée. La SELENOT est une nouvelle thiorédoxine qui a été décrite pour la première fois suite à son identification par des outils bioinformatiques (Kruyokov et al. 1999), elle est fortement exprimée dans les cellules neuroendocrines et endocrines et joue un rôle crucial dans la sécrétion hormonale en contrôlant le stress du réticulum endoplasmique (RE) (Grumolato et al., 2008 ; Anouar et al., 2016 ; Hamieh et al., 2017). Le travail de cette thèse s'inscrit dans une étude basée sur la recherche du rôle neuroendocrine de la SELENOT dans la régulation de la reproduction chez la souris. Nos travaux ont été menés sur un modèle de souris transgénique, qui n'exprime pas la SELENOT au niveau central, ce qui a permis d'étudier l'implication de la SELENOT au niveau central dans la régulation neuroendocrine de différentes fonctions physiologiques, notamment la reproduction. A ce jour, peu de travaux fondamentaux ont évalué le rôle des selenoprotéines dans l'axe HHG.

Les travaux de cette thèse ont été guidés par trois objectifs :

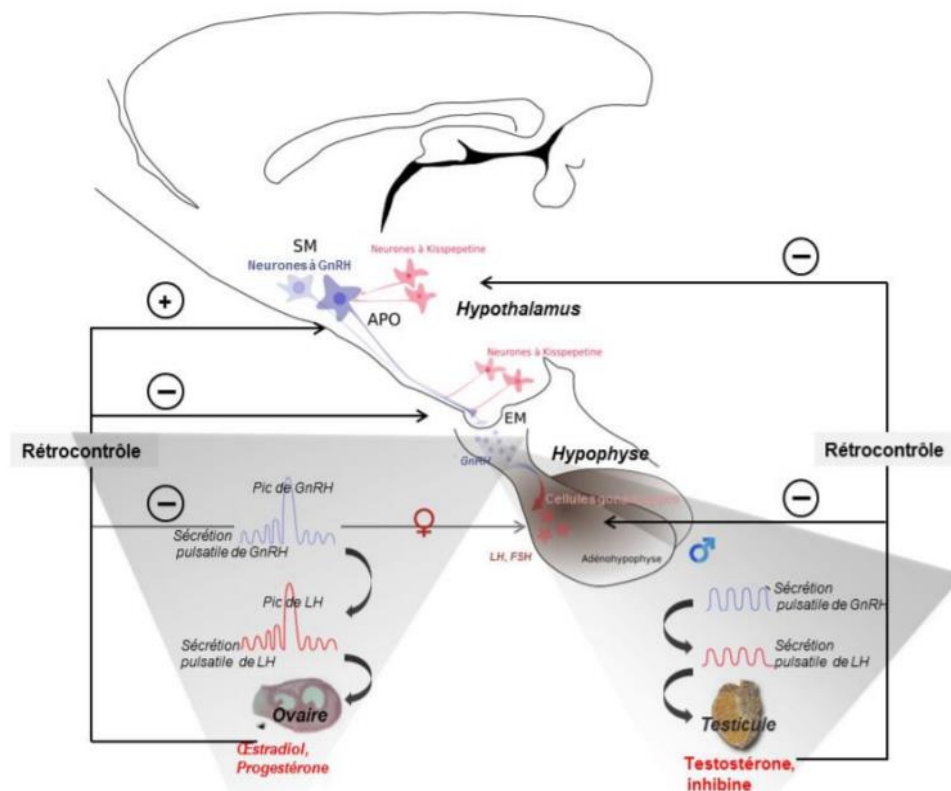
- Le premier objectif est basé sur l'analyse de la fertilité et du comportement sexuel chez la souris SELENOT KO, en effectuant des tests d'accouplement et des enregistrements du comportement sexuel afin de sonder le degré de fertilité.
- Le deuxième objectif était de caractériser le phénotype des souris transgéniques, en se basant sur des études histologiques et des dosages hormonaux, afin d'examiner la morphologie des gonades et d'évaluer les niveaux d'hormones sexuelles produites chez les souris SELENOT KO.
- Le troisième objectif était de décrire la dynamique d'expression et de distribution des acteurs cérébraux de l'axe gonadotrope à l'âge adulte. Notamment les neurones à GnRH, catécholaminergique et à kisspeptine, en utilisant la technique d'immunofluorescence et l'imagerie 3D de cerveaux transparisés.

La finalité de ce travail est d'apporter de nouvelles connaissances sur la physiologie de l'axe gonadotrope chez la souris ainsi que l'effet de la SELENOT sur le système neuroendocrine contrôlant la reproduction.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Le complexe Hypothalamo-Hypophysaire-Gonadique

L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HHG) ou l'axe gonadotrope, est le système neuroendocrinien qui contrôle la fonction de la reproduction. Il comporte 3 structures distinctes interconnectées (hypothalamus, hypophyse et gonades) dont la synchronisation et la régulation permet d'assurer la fonction de reproduction. Bien que les mécanismes spécifiques de régulation de l'activité de la reproduction puissent varier selon les espèces, les neurones hypothalamiques à GnRH (gonadotropin-releasing hormone) restent les chefs d'orchestre de l'activité de cet axe (Figure 1). Les neurones à GnRH se projettent dans l'éminence médiane et libèrent la GnRH dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire pour atteindre l'antéhypophyse (Hahn et Coen, 2006).



**Figure 1 : Distribution des neurones à GnRH dans l'aire pré-optique (APO) et leurs terminaisons nerveuses dans l'éminence médiane (EM) (D'après Migaud et al, 2016).**

Les sécrétions pulsatiles de GnRH stimulent la sécrétion des gonadotrophines FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinising Hormone). Les gonadotrophines sont libérées dans la circulation générale et stimulent la production des stéroïdes sexuels.

Ces derniers exercent un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH) pour réguler la production de GnRH et donc de FSH et LH. Chez la femelle, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif pendant la période pré-ovulatoire en agissant sur les neurones à kisspeptine de l'APO, induisant ainsi le pic pré-ovulatoire de GnRH puis de LH. Pendant la phase lutéale, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif au niveau du noyau arqué via les neurones à kisspeptine et au niveau des cellules gonadotropes adénohypophysaires. Chez le mâle les stéroïdes sexuels exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe HHG.

### **I.1. Hypothalamus**

L'hypothalamus est situé dans la partie ventrale du diencephale au niveau du 3ème ventricule. Cette partie du système nerveux central joue le rôle d'intégrateur et de régulateur des signaux hormonaux (œstrogènes, androgènes, progestérone) qui lui parviennent des gonades et qui exercent des rétrocontrôles permettant de réguler l'axe HHG. Chez les mâles comme chez les femelles à l'âge adulte, les corps cellulaires des neurones à GnRH ne se regroupent pas en noyaux comme les autres populations, mais sont dispersés selon l'axe rostro-caudale en formant un continuum. Ces corps cellulaires sont principalement localisés dans 3 régions : le septum médian (SM), l'aire préoptique (APO) ainsi que dans l'aire hypothalamique antérieure (AHA) (Jasoni et al., 2009). Quelle que soit leur localisation, les neurones à GnRH émettent de très longs prolongements au niveau de l'éminence médiane.

L'éminence médiane (EM) est un organe neurohémal, situé dans la partie tubérale de l'hypothalamus et par lequel procède la tige pituitaire vers la glande hypophysaire, c'est à ce niveau que les projections des neurones hypothalamique libèrent la GnRH sous forme de pulse dans le système porte hypothalamo-hypophysaire permettant de libérer la GnRH sous forme de pulses dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Moenter et al., 1992).

### **I.2. Hypophyse**

Les gonadotrophines sont synthétisées au niveau de l'hypophyse, une petite glande neuroendocrine située à la base du cerveau. Chez tous les vertébrés, l'hypophyse est reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire, contenant par les axones des neurones

hypothalamiques. On distingue deux parties de l'hypophyse dont la fonction et l'origine embryologique sont bien distinctes.

L'adénohypophyse qui est la partie antérieure de l'hypophyse, elle renferme différentes cellules endocrines comme les cellules gonadotropes ou corticotropes par exemple.

Alors que la neurohypophyse (posthypophyse) est principalement constitué de tissu nerveux contenant des fibres qui libèrent deux hormones l'ocytocine et la vasopressine.

Dans l'adénohypophyse, les cellules gonadotropes synthétisant les gonadotrophines ne représentent que 10 à 15% des cellules endocrines hypophysaires, Ces cellules possèdent des récepteurs à sept domaines transmembranaires, spécifiques au GnRH, permettant la libération de LH et de FSH drainées par la circulation générale pour agir au niveau des gonades. La biosynthèse et la libération de ces hormones sont directement régulées par la GnRH, produite au niveau hypothalamique. Ces hormones sont libérées dans le système sanguin et agissent au niveau des gonades pour réguler la production d'hormones stéroïdiennes et la gamétogenèse. Plus précisément, la FSH permet la maturation des follicules ovariens chez les femelles et la spermatogenèse chez les mâles. Et la LH induit la synthèse et la libération des hormones stéroïdiennes sexuelles, la gamétogenèse et régule l'ovulation (Hillier et al. 2001). Chez le mâle comme chez la femelle la libération de la GnRH est pulsatile et va entraîner une sécrétion pulsatile de LH (Moenter et al., 1992). Il existe une particularité chez la femelle, en période de reproduction, la fréquence des pulses de la GnRH va être plus élevée, précédant une décharge massive de GnRH et ainsi entraîner un pic de LH. Ces pics de GnRH/LH sont dits pics pré-ovulatoires car sont responsables du déclenchement de l'ovulation spontanée (Moenter et al., 1992).

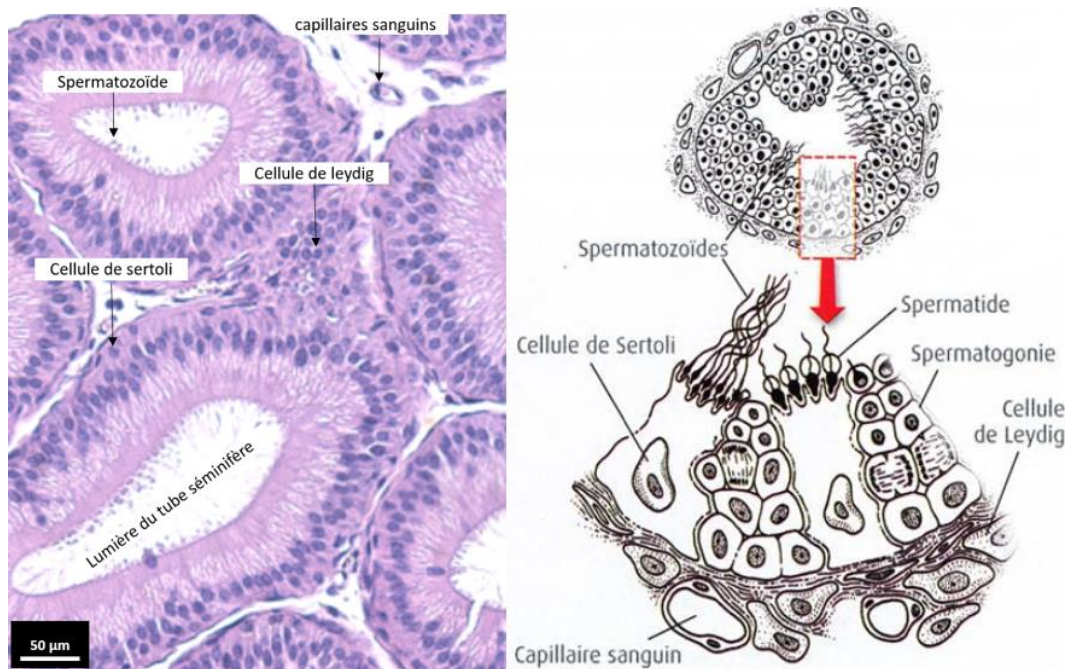
### **I.3. Gonades**

Une fois libérées dans la circulation générale, les gonadotrophines vont avoir une action directe sur les gonades en stimulant la synthèse des hormones sexuelles (la stéroïdogenèse) et la production des gamètes (la gamétogenèse).

#### **I.3.1. Testicules**

Le testicule est un organe pair de forme ovoïde. Il est logé dans les bourses, dont le revêtement cutané est le scrotum. Le testicule est le lieu de production des gamètes

mâles (fonction exocrine), et des hormones sexuelle (fonction endocrine). Il s'organise en tubes séminifères, unité de production des spermatozoïdes, Cette structure se prolonge en canaux efférents puis en épидидyme. Les tubes séminifères contiennent des cellules spéciales, les cellules de Sertoli, elles entourent les cellules germinales pendant toute la méiose et synchronisent la spermatogenèse de manière centripète (de la périphérie vers la lumière au centre du tube). Entre les tubes séminifères, dans le tissu interstitiel, se trouve les capillaires sanguins et les cellules du système immunitaire ainsi que les cellules de Leydig qui s'organisent en îlots (Figure 2). Ces cellules synthétisent et libèrent la testostérone dès l'embryogenèse. Elles sont à l'origine de 95% de la testostérone plasmatique, le reste provient de la synthèse surrénalienne ou d'une conversion périphérique de l'androsténedione. La testostérone est une hormone indispensable à la mise en place et au maintien de la spermatogenèse. En effet, deux périodes de sécrétion de cette hormone sont distinguées : durant l'embryogenèse puis à la puberté.



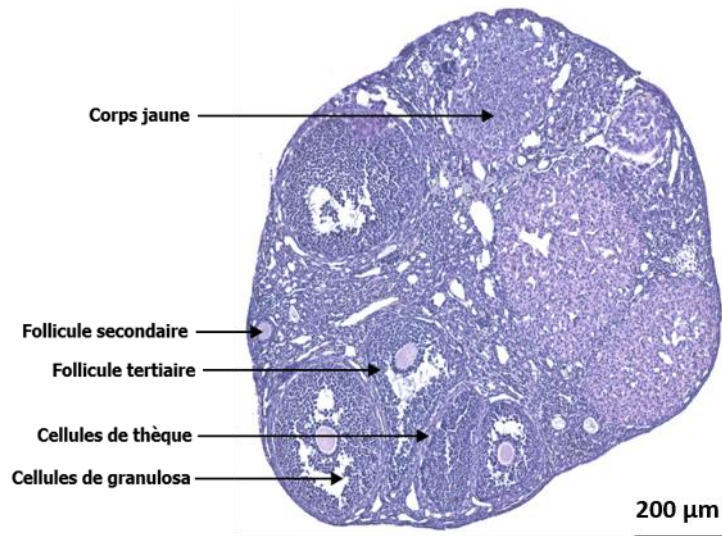
**Figure 2 : Coupe transversale des tubes séminifères de testicule de souris adulte.** Le testicule est constitué d'un enchevêtrement organisé de tubes séminifères séparés par un tissu interstitiel dans lequel résident les cellules de Leydig, assurant la fonction stéroïdogénique. Le tube séminifère présente un épithélium germinal composé de cellules somatiques, les cellules de Sertoli, soutenant des cellules germinales (Mallouki et al., soumis).

### I.3.2. Ovaires

L'ovaire est le lieu de production d'ovocytes, aptes à être fécondés. Cet organe est formé d'une médulla centrale où sont disposés les nerfs et les vaisseaux lymphatiques et sanguins, et à l'extérieur, d'un cortex renfermant les follicules en croissance. Un follicule est une structure évolutive où mature contenant un ovocyte (la cellule germinale) entouré de cellules somatiques. Il existe différents stades évolutifs d'un follicule (Figure 3) :

- Follicule primaire, renfermant l'ovocyte entouré d'une couche de cellules de la granulosa.
- Follicule secondaire où une deuxième couche de cellules cuboïdales est visible. Une autre assise de cellules, la thèque interne, se distingue à l'extérieur du follicule et la zone pellucide (enveloppe glycoprotéique) se forme autour de l'ovocyte. Puis les cellules de la granulosa accélèrent leur mitose pour former plusieurs couches autour de l'ovocyte, formant le follicule préantral.
- Follicule tertiaire ou follicule à antrum est également appelé follicule préovulatoire quand il est prêt à ovuler. Les cellules de la granulosa se différencient et se multiplient intensément et une cavité est observable dans cet amas cellulaire : l'antrum, rempli du liquide folliculaire. Une lame basale s'est développée entre les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque, qui se sont différenciées en thèque interne et thèque externe.
- Les cellules de la granulosa et de la thèque de/des l'ovocyte(s) ovulé(s) se transforment en cellules lutéales et forment un corps jaune qui est une structure stéroïdogène indispensable pour le maintien de la gestation.





**Figure 3. Coupe histologique d'ovaire de souris et principaux types de follicules ovariens (Mallouki et al., soumis).**

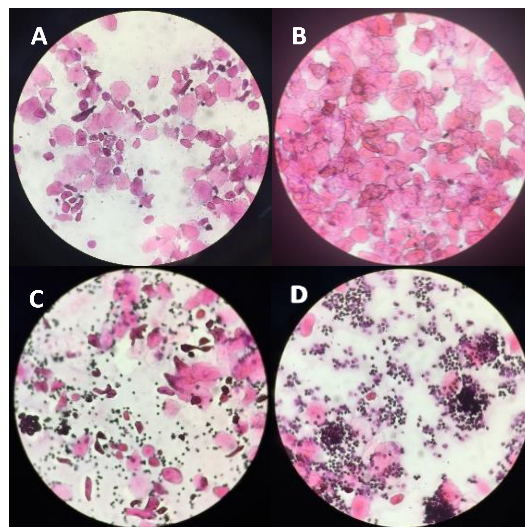
### I.3.2.1. Cycle estrien

Le cycle estrien chez la souris dure environ 4 à 5 jours, il s'agit d'une série de phénomènes liés à la maturation de l'ovocyte (ovogénèse) et des cellules folliculaires. Le cycle estrien est divisé en phase folliculaire et phase lutéale séparées par l'ovulation. Quatre étapes du cycle ont été définies dès 1900 par Heape, les concepts qu'il a introduits sont encore utilisés de nos jours. Chez la souris, un frottis vaginal quotidien permet de distinguer les différents stades du cycle estrien (Figure 4) :

- Proestrus (ou la phase de croissance folliculaire) est caractérisé par la présence de petites cellules épithéliales nucléées et quelques cellules cornifiées (Figure 4A). Quelques leucocytes peuvent être présents si la femelle est au début du proestrus. Lorsque la phase du cycle progresse vers l'estrus, la plupart des cellules épithéliales cornifiées sont présentes.
- L'estrus (ou phase d'ovulation), caractérisé par la présence de cellules épithéliales cornifiées regroupées (Figure 4B). Période de réceptivité, de l'accouplement et de l'ovulation. Si le cycle n'est pas interrompu par une grossesse, une pseudo-grossesse ou d'autres phénomènes, le métestrus commence.
- Le métestrus est une brève phase au cours de laquelle les corps jaunes se forment à partir des follicules qui ont ovulés. En absence de fécondation, les corps jaunes

régressent progressivement et la muqueuse utérine commence à s'effriter, ce qui se manifeste par la présence de cellules épithéliales cornées et de leucocytes polymorphonucléaires dans les prélèvements vaginaux. Quelques cellules épithéliales nucléées sont également présentes à la fin du métrus (Figure 4C).

- Le diestrus est le plus long des stades, le frottis vaginal pendant le diestrus montrent principalement des leucocytes polymorphonucléaires et quelques cellules épithéliales pendant la fin du diestrus (Figure 4D). Les leucocytes restent le type de cellule prédominant après avoir éliminé les débris cellulaires. Le cycle se répète ensuite (Schally et al., 1971).



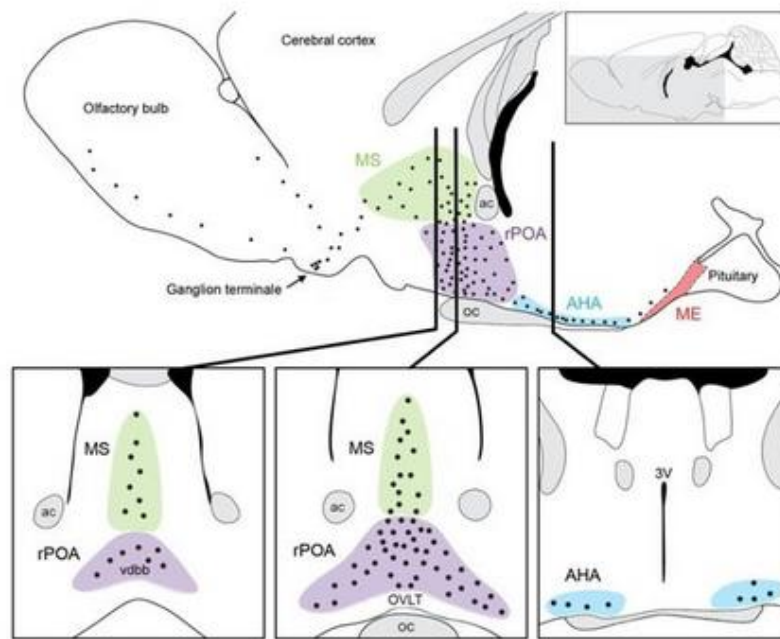
**Figure 4 : Populations cellulaires dominantes et observations correspondantes des différents stades du cycle estrien de la souris : A) proestrus B) estrus, C) métrus, D) diestrus.**

## II. Fonctions de l'axe HHG

### II.1. Le réseau de neurones à GnRH

La GnRH est un décapeptide hypothalamique (pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) synthétisé par les neurones à GnRH. Il existe plusieurs formes de cette neurohormone (Schally et al., 1971), la GnRH-I qui est la forme hypothalamique et la GnRH-II mésencéphalique décrits chez les mammifères, et la GnRH-III télencéphalique exclusivement décrite chez le poisson. Les cellules exprimant la GnRH-II et la GnRH-III auraient un rôle dans le comportement sexuel (Eisthen et al., 2000 ; Millar et al. 2004), les cellules hypothalamiques exprimant la GnRH-I ont des capacités neuroendocrines contrôlant la physiologie des gonades à travers une régulation de

l'hypophyse. Chez la souris, la seule forme conservée du système GnRH est la forme I codée par le gène GnRH-I. La GnRH est stockée puis transportée dans les granules de sécrétion vers les terminaisons axonales des neurones qui projettent dans l'EM (Prevot et al., 1999). Le clonage du gène GnRH-I, puis l'injection du transgène GnRH à des embryons de souris HPG (hypogonadisme hypogonadotrophique), a permis la récupération d'un phénotype normal chez ces souris, permettant ainsi de comprendre son rôle crucial dans la fonction de reproduction (Seeburg et al. 1987). Les neurones à GnRH constituent une petite population d'environ 800 neurones, dispersées dans le cerveau antérieur chez les mammifères. La localisation des neurones à GnRH a été précisément décrite dans l'hypothalamus de rongeur dans les années 70. Les neurones à GnRH sont localisés dans le SM, l'APO et l'AHA (Figure 5) (Jasoni et al., 2009). Les terminaisons nerveuses de ces neurones se projettent essentiellement dans l'EM, permettant de sécréter la GnRH dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire qui le draine dans l'adénohypophyse. Ainsi, l'ensemble de ce réseau neuronal diffusé est intégré dans un réseau neuroendocrine hypothalamique étroitement connecté avec les neurones à GnRH, permettant la régulation de la synthèse et de la libération du GnRH en fonction de l'état physiologique (Huber et al., 2003).

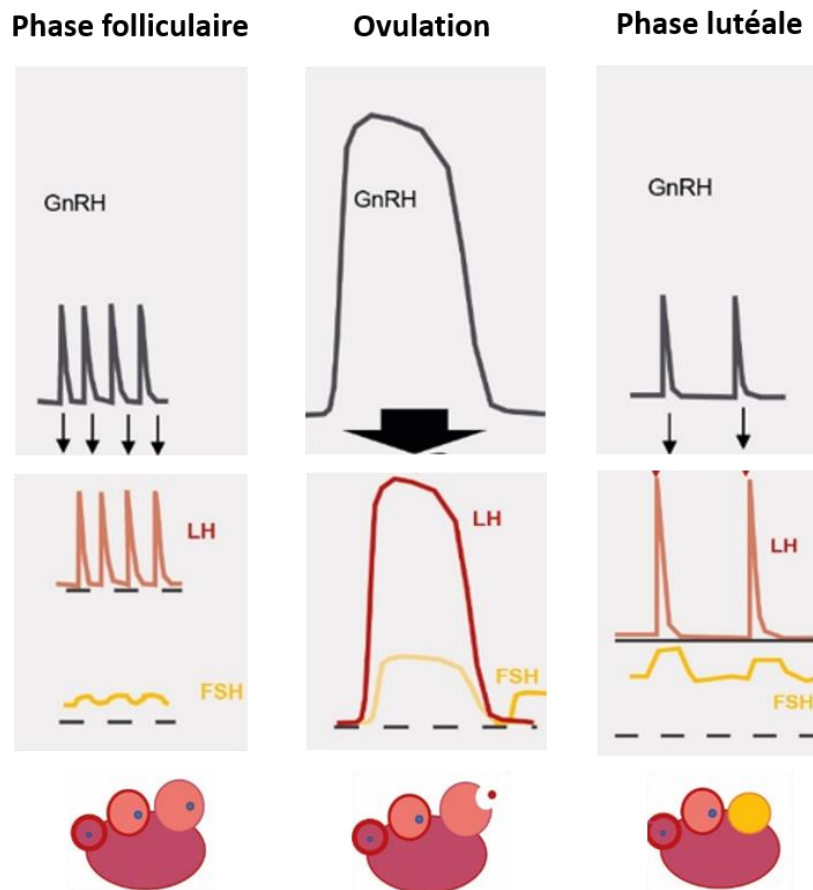


**Figure 5 : Distribution des neurones à GnRH dans le cerveau de souris.** Schémas de plan sagittal (en haut) et coronal (en bas). Les neurones à GnRH (points noirs) s'étendent du bulbe olfactif jusqu'à l'éminence médiane (EM), les neurones à GnRH résidant dans trois régions anatomiques du cerveau définies arbitrairement : la population septale médiane (MS), la population de l'aire préoptique rostrale (rPOA) et les neurones de l'aire hypothalamique antérieure (AHA). La zone de projection des neurones à GnRH est dans l'éminence médiane. Des vues coronales aux trois endroits indiqués sur le plan sagittal sont montrées illustrant le concept de la distribution en Y inversé (adapté d'après Plant et Zeleznik, 2014).

## II.2. La sécrétion pulsatile de la GnRH et sa régulation

La compréhension du mode de sécrétion de la GnRH s'est principalement appuyée sur des techniques de prélèvements sanguins réalisés sur les capillaires du système porte hypophysaire de mouton (Clarke et Cummins, 1985 ; Caraty et al., 1989). Etant donné la petite taille de ces vaisseaux chez les autres espèces, la libération de la GnRH ne peut pas être directement mesurée. La synchronisation entre la libération de la GnRH et celle de la LH permettra, chez ces espèces, d'évaluer la fréquence de sécrétion de la GnRH en suivant celle de la LH dosée dans la circulation générale (Figure 6), la LH devenant le marqueur de l'activité pulsatile de la GnRH.

La GnRH est libérée de manière pulsatile au niveau des terminaisons nerveuses dans la région de l'éminence médiane (Maeda et al., 2010). Ces pulses se produisent à des intervalles de 30 à 120 minutes selon les espèces et durent quelques minutes à quelques dizaines de minutes. La fréquence des pulses de GnRH varie pendant le cycle estrien. De façon générale, la sécrétion de LH est favorisée par une pulsativité de fréquence élevée alors que celle de la FSH (moins marquée) l'est à plus basse fréquence (Czieselsky et al., 2016).



**Figure 6 : Diagramme schématisant la relation entre les profils temporels de l'activité du générateur de la LH, FSH et de la GnRH au cours du cycle estrien de la souris. (D'après Derouin-Tochon et al., 2019).**

L'administration intermittente de GnRH à une fréquence optimale a permis de développer des traitements d'impubérismes ou d'infertilités chez l'homme. A l'inverse, l'administration continue de la GnRH ou d'analogues superactifs produit une inhibition de la libération des gonadotrophines (désensibilisation), provoquant un effet de « gonadectomie » réversible, utilisable pour le traitement des pubertés précoces ou des

pathologies diverses liées à la production des stéroïdes sexuels (ex, cancer de la prostate, hirsutisme...) (Msaouel et al., 2007). De nombreux troubles de la reproduction peuvent être associés à un défaut de pulsativité de la GnRH (Stamatiades et al., 2017). En effet, la persistance de fréquence élevée de pulsativité de la GnRH augmente le rapport LH /FSH et contribue ainsi à une production excessive d'androgènes ovariens et une altération de l'ovulation. Ces effets sont observés dans le cas du syndrome des ovaires polykystiques, une pathologie affectant 5 à 18% des femmes (Silva et al., 2022). Inversement, une pulsativité à faible fréquence en GnRH conduisant à des taux anormaux en gonadotrophines est généralement associée aux aménorrhées hypothalamiques (McCartney et al., 2016). Ces exemples mettent en lumière l'importance du mode de sécrétion de la GnRH et de sa pulsativité dans la régulation différentielle de la LH et de la FSH, afin d'assurer une fonction de reproduction adaptée.

### II.3. Les gonadotrophines

Les gonadotrophines (LH et la FSH) sont synthétisées et sécrétées en réponse à la fixation de la GnRH sur son récepteur, et jouent un rôle essentiel dans la régulation des fonctions de reproduction, puisqu'elles régulent la folliculogenèse et la stéroïdogenèse gonadiques. La LH et la FSH sont des glycoprotéines composées de deux sous unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans une espèce donnée, la sous-unité  $\alpha$  est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques et elle est le produit d'un même gène.

A l'inverse, les sous unités  $\beta$  sont spécifiques de chaque hormone et sont codées par des gènes différents, ce qui leur confèrent des propriétés biologiques et immunologiques spécifiques (Pierce et al., 1981). Par ailleurs, la glycosylation des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  est indispensable à l'acquisition de leur structure tridimensionnelle. Les gonadotrophines portent des chaînes N-saccharidiques sur leurs sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La glycosylation se produit dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) au cours de la traduction et le repliement de ces protéines (Kourides et al., 1980). Au niveau de l'appareil de Golgi, les gonadotrophines glycosylées subissent des maturations qui varient selon la gonadotrophine. Cette maturation conduit à des structures ramifiées complexes caractérisées par le N-acetyl glucosamine/sulfate pour la LH et le galactose/acide sialique pour la FSH (Greenwald-Yarnell et al., 2016). Les hormones gonadotrophiques agissent

sur les gonades pour stimuler la maturation sexuelle et la gamétogenèse (spermatogenèse chez l'homme et ovogenèse chez la femme). Les gonades produisent des stéroïdes sexuels (testostérone chez les mâles, œstrogènes et progestérone chez les femelles), qui sont nécessaires à la gamétogenèse, à la maturation des organes sexuels et aux boucles de rétroaction hormonale qui régulent la libération de la GnRH et des hormones gonadotrophiques dans différentes conditions physiologiques.

Une perturbation des mécanismes de glycosylation, peut alors contribuer à des anomalies de la fertilité (Castro-Fernández et al., 2000 ; Goverman et al., 1982 ; Padmanabhan et al., 1988). Les variations de sécrétion des hormones gonadotropes et notamment de la LH sont à l'origine des changements saisonniers de l'activité sexuelle (Karsch et al., 1984). En effet, la LH a la particularité d'être libérées sous forme pulsatile et la fréquence des pulses est variable entre la saison de repos sexuel et la saison de reproduction et entre les différentes étapes du cycle estrien. D'autre part, les variations de la sécrétion de la LH au cours du cycle sont le reflet exact de celles de GnRH (Goodman, 1995).

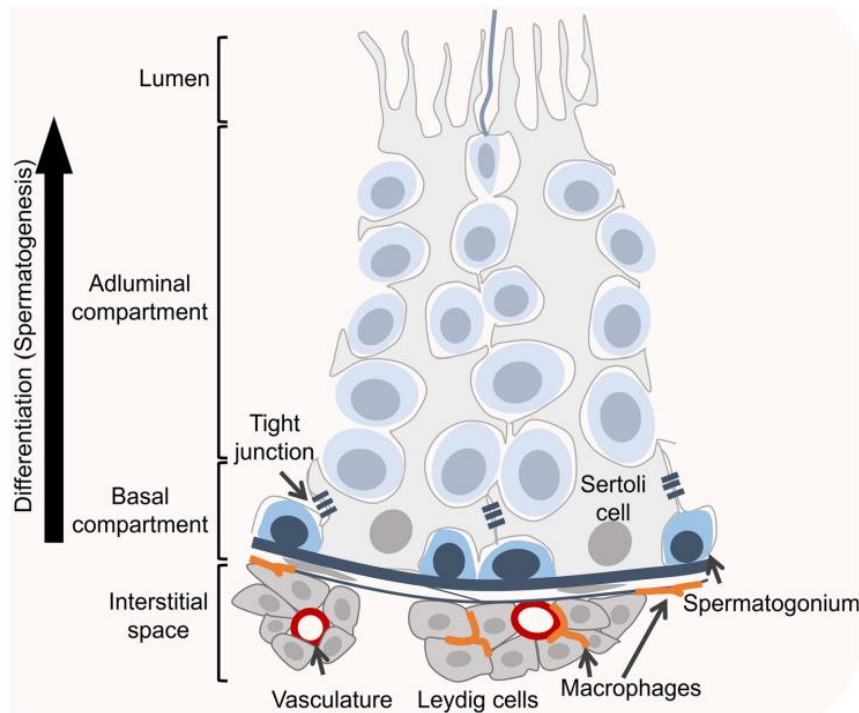
## **II.4. Gamétogenèse et synthèse des hormones stéroïdiennes**

### **II.4.1 Chez le mâle**

Les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial dans le soutien de la fonction des cellules souches spermatogoniales (SSC) et de la spermatogenèse : ce sont des cellules nourricières et protectrices des cellules germinales, elles structurent les tubes séminifères et sécrètent des molécules régulant la spermatogenèse. Elles sont délimitées à leur base par une lame basale et au pôle apical, par la lumière du tube séminifère.

Deux zones sont définies dans le tube séminifère : un compartiment basal où sont retrouvées les cellules germinales souches (spermatogonies) et les spermatocytes jusqu'au stade préleptotène (début de méiose), et une région centrale ou adluminale où les spermatocytes en cours de méiose et les spermatides se différencient en spermatozoïdes (Figure 7).

Ces deux compartiments sont délimités par un ensemble de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli qui forment la barrière hémato-testiculaire. Cette structure permet de protéger les gamètes en formation contre des infections virales ou bactériennes.



**Figure 7 : Coupe transversale schématique de l'épithélium séminifère et du tissu interstitiel de testicule de souris (adapté d'après La et Hobbs, 2019).**

Les cellules de Sertoli forment des jonctions serrées qui séparent fonctionnellement les compartiments basal et adluminal. Les spermatogonies sont présentes dans le compartiment basal. Au fur et à mesure que la méiose progresse, les cellules germinales migrent à travers les jonctions serrées des cellules de Sertoli dans le compartiment adluminal et génèrent des spermatocytes matures puis des spermatozoïdes haploïdes. L'espace interstitiel situé entre les tubules séminifères contient des cellules de Leydig, des macrophages et le système vasculaire, qui jouent également un rôle important dans le soutien de la spermatogenèse

Les cellules de Sertoli définissent donc l'arrangement et la dynamique de la spermatogenèse. Leur fonctionnement est régulé par la FSH et elles participent aux régulations paracrines et hormonales de la méiose. En effet, ces cellules synthétisent plusieurs molécules dont :

- L'inhibine et l'activine qui contrôlent la sécrétion de la FSH par l'hypophyse (rétrocontrôle négatif et positif), la stéroïdogénèse et l'entrée des gamètes en méiose



- Des protéines de transport telles que l'Androgen binding protein (ABP) et la transferrine.
- Des facteurs de croissance comme l'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1), les Transforming Growth Factor (TGF)  $\alpha$  et  $\beta$ , les Fibroblast Growth Factor (FGF)
- L'Anti Müllerian Hormone (AMH) durant l'embryogenèse permettant la régression du tractus génital femelle.
- Des substances nutritives nécessaires aux cellules germinales : le pyruvate et le lactate.

Les cellules de Leydig se trouvent à l'extérieur du tube séminifère, groupées en îlots autour des capillaires sanguins. Les cellules de Leydig et leur synthèse d'androgènes sont stimulées par la LH ; la testostérone produite par le testicule, exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse, ce qui permet d'assurer une régulation adaptée de l'axe HHG. La testostérone est une hormone indispensable à la mise en place et au maintien de la spermatogenèse. La FSH, quant à elle, régule la fonction exocrine de testicule en stimulant la spermatogenèse. En effet, deux pics de testostérone jouent un rôle primordial dans la différenciation sexuelle du système nerveux :

Un premier pic observé à E18-19, suivi d'un second pic quelques heures après la naissance (Salgueiro et Reyss, 2002). Par la suite, les taux de testostérone diminuent et restent faibles jusqu'à la puberté. Les taux augmentent ensuite progressivement à partir du 35-40ème jour postnatal chez la souris (Clarkson et al., 2012). Cette nouvelle augmentation est responsable de l'acquisition des caractères physiques secondaires et du déclenchement de la spermatogenèse. Enfin, entre le 50ème et le 60ème jour postnatal les taux se stabilisent et vont atteindre environ 1 ng/ml à l'âge adulte chez le rongeur (Jean-Faucher et al., 1978 ; O'Shaughnessy et al., 2009).

#### II.4.2 Chez la femelle

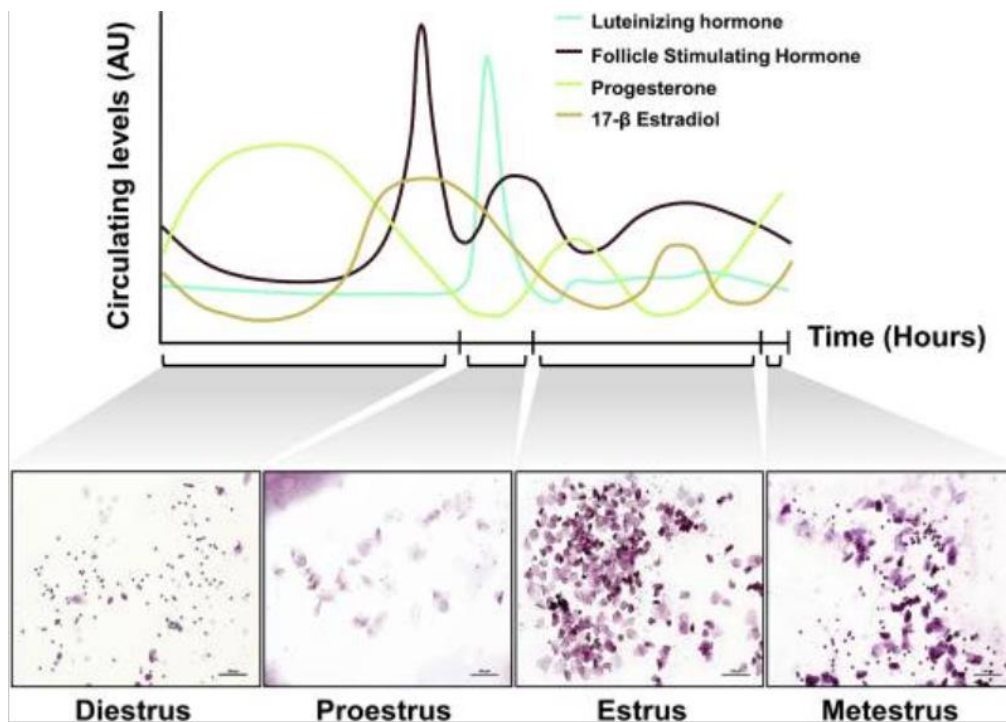
La folliculogenèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule, du stade primordial jusqu'au follicule pré-ovulatoire et à sa rupture ou lors de son involution (atrésie folliculaire). Deux phases sont distinguées :

- La croissance folliculaire basale correspond à la croissance lente et continue des follicules primordiaux vers le stade secondaire (deux couches de cellules de la granulosa autour de l'ovocyte). Elle se met en place durant la vie embryonnaire chez la femme (14 semaines post-conception) et à la naissance chez la souris (3 jours post natal), et se poursuivra jusqu'à la ménopause qui sera marquée par l'épuisement du stock de follicules primordiaux.

A partir de la mise en place de la folliculogénèse, tous les jours, des follicules primordiaux, intermédiaires et primaires quittent la réserve folliculaire (qui représente 95% des follicules présents dans un ovaire) et entrent en croissance.

- La croissance folliculaire terminale est caractérisée par la dépendance des follicules aux gonadotrophines d'origine hypophysaire (FSH puis LH). Les cellules de la granulosa présentent des récepteurs à la FSH à leur surface et les cellules de la thèque interne des récepteurs à la LH. Cette dépendance apparaît chez les follicules de 200µm chez la souris et de 2 mm chez la femme. Pendant cette période, une cohorte de follicules recrutés va croître et subir une maturation : le volume de l'antrum s'agrandit et la mitose des cellules de la granulosa décroît, la vascularisation est augmentée et les cellules somatiques (de la granulosa et de la thèque) se différencient en cellules stéroïdogènes. Ce recrutement est dépendant de la sensibilité à la FSH des follicules recrutés.

Le cycle estrien chez la souris ou le cycle menstruel chez la femme dure environ 4 à 5 jours et 28 jours, respectivement, et peut être divisé en deux phases : la phase folliculaire, qui correspond à l'intervalle entre la régression du corps jaune (lutéolyse) et l'ovulation, et la phase lutéale qui couvre la période séparant l'ovulation de la lutéolyse. Conventionnellement, chez les rongeurs, le jour 0 du cycle estrien est le jour de l'ovulation qui sépare les deux phases. Chacune de ces phases (estrus, métestrus, diestrus, proestrus) est caractérisée par des variations des concentrations hormonales hypophysaires et ovariennes spécifiques (Figure 8).



**Figure 8 : Profils de sécrétion de certaines hormones au cours du cycle estrien chez la souris.**

Le cycle estrien dure environ 4 jours et se compose de 4 stades : diestrus, proestrus, estrus, métrus. Les niveaux relatifs des hormones gonadotropes (LH, FSH), des stéroïdes (œstradiol, progestérones) gonadiques sont représentés par les différentes lignes pointillées légendées dans la figure. (Adapté d'après Wallace et al., 2018).

Au cours de la phase folliculaire, la FSH stimule la maturation des follicules qui vont produire une quantité croissante d'œstradiol. Au milieu du proestrus (fin de phase folliculaire), les niveaux d'œstradiol vont atteindre un seuil critique qui entraîne un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, à l'origine du pic préovulatoire de LH menant à l'ovulation. En absence de fécondation, le cycle progresse vers la phase lutéale suivi lutéolyse. Durant cette phase, le corps jaune commence à dégénérer et à produire de l'œstradiol et de la progestérone qui exercent à ce stade un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH et de FSH. La sécrétion de FSH ré-augmente graduellement réinitialisant la croissance des follicules, un nouveau cycle commence. Les stéroïdes sexuels, l'œstradiol, la progestérone et la testostérone, sont tous synthétisés à partir du cholestérol qui provient soit d'une synthèse locale par les cellules stéroïdogènes, soit qui est véhiculé sous la forme d'esters de cholestérol dans les cellules de la thèque et de la granulosa de l'ovaire (Baulieu et al., 1975).

Lors de la première réaction commune à tous les stéroïdes, le cholestérol est converti en prégnénolone par le complexe enzymatique cytochrome P-450<sub>scc</sub> (side-chain cleavage). A partir de la prégnénolone, trois voies de synthèse sont alors possibles. L'une mène directement à la synthèse de la progestérone avec l'intervention de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) et l'isomérase. La seconde voie aboutit à la synthèse du cortisol avec l'activité successive de la 3 $\beta$ -HSD/isomérase et de deux cytochromes P-450<sub>C21</sub> et P-450<sub>C11</sub>. Dans la troisième et dernière voie, la testostérone est obtenue après l'intervention d'un second cytochrome, le P-450<sub>C17</sub> (17 $\alpha$ -hydroxylase), de la 3 $\beta$ -HSD accompagnée de l'isomérase puis de la 17-kétostéroïde réductase. Enfin, la conversion de la testostérone en œstradiol est assurée par le cytochrome P-450<sub>aro</sub> (aromatase) dans les cellules de granulosa (Miller, 1988).

Les ovaires sont silencieux et aucune synthèse d'hormones stéroïdiennes n'est observée au cours de la vie fœtale. Les taux d'œstradiol croissent progressivement à partir du 7<sup>ème</sup> jour postnatal (Lamprecht et al., 1976 ; Greco et Payne, 1994) jusqu'à la puberté où la synthèse d'œstradiol devient cyclique entre les 40<sup>ème</sup> et 50<sup>ème</sup> jour postnatal (Kauffman, 2009).

### III. Les signaux nerveux et hormonaux contrôlant le système à GnRH

#### III.1. L'action des œstrogènes sur les neurones à GnRH

Il est maintenant bien établi que les neurones à GnRH n'expriment que l'isoforme bêta du récepteur aux œstrogènes (ER $\beta$ ) chez la souris (Skynner et al., 1999), chez le rat (Hrabovszky et al., 2000), ainsi que chez l'Homme (Hrabovszky et al., 2007). Toutefois, il a été montré que le mécanisme de rétrocontrôle positif des œstrogènes sur l'axe gonadotrope chez la souris nécessite plutôt l'isoforme alpha du récepteur aux œstrogènes (ER $\alpha$ ). En effet, la lignée de souris ER $\alpha$ -KO globale est totalement infertile avec des taux de gonadotrophines sévèrement affectés, voire absents, alors que les mutants ER $\beta$ KO ont un phénotype plus discret, avec différents degrés de subfertilité (Krege et al., 1998 ; Dupont et al., 2000), et des pics de LH observables (Wintermantel et al., 2006). ER $\beta$  n'est en effet pas essentiel à la régulation de la libération de GnRH via les œstrogènes (Dorling et al., 2003). L'absence de ER $\alpha$  dans les cellules à GnRH implique donc que les œstrogènes agissent sur les neurones à GnRH par des voies indirectes.

Le marquage de ER $\alpha$  a montré que les neurones susceptibles d'être impliqués dans le rétrocontrôle positif œstrogène-dépendant étaient concentrés principalement dans 3 noyaux hypothalamiques : le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV), le noyau périventriculaire de l'aire préoptique (PVpo), et l'aire préoptique médiale (mPOA) (Herbison., 2008). Un plus petit nombre des neurones a aussi été décrit au sein du noyau arqué (ARC) (Wintermantel et al., 2006). Ces neurones exprimant le glutamate (Eyigor et al., 2004), le GABA (Herbison, 1997), la kisspeptine (Clarkson et al., 2008) et la neurotensine (Herbison et Theodosis, 1992). Toutefois, l'avancée la plus considérable a été réalisée grâce aux travaux de Campbell et al. (2007), qui ont permis de mettre en évidence les neurones exprimant ER $\alpha$  et faisant directement synapse avec les neurones à GnRH. La population de cellules ayant un rôle critique dans le rétrocontrôle estrogène-dépendant n'est pas encore bien déterminée. Cependant les neurones à kisspeptine, les neurones glutamatergiques et les neurones GABAergiques sont les principaux candidats pour ce rôle.

Il existe deux populations hypothalamiques primaires de neurones à Kisspeptine : dans l'AVPV et l'ARC (Gottsch et al., 2004 ; Clarkson et Herbison, 2006). Dans l'ARC, les neurones à Kisspeptine sont probablement impliqués dans la sécrétion pulsatile de la gonadotrophine et dans la rétroaction négative des hormones stéroïdiennes. Des études ont démontré que la gonadectomie (GDX) augmente les niveaux d'expression de Kisspeptine (Kiss1) dans l'ARC, alors que le traitement à la testostérone (T) ou à l'œstradiol (E2) supprime l'expression de Kiss1 dans l'ARC (Smith et al., 2005 ; Kauffman et al., 2007). Contrairement à l'ARC, dans l'AVPV/PeN, la GDX diminue l'expression de Kiss1, alors que le traitement à l'E2 augmente l'expression de Kiss1 (Smith et al., 2005 ; Kauffman et al., 2007). Ainsi, la Kiss1 dans l'AVPV/PeN est supposé être impliqué dans la médiation de la rétroaction positive de l'E2, qui déclenche la poussée pré-ovulatoire de LH. A l'appui de cette hypothèse, l'expression de Kiss1 est plus importante chez les femelles que chez les mâles (les mâles ne présentent pas de poussée de LH), les neurones à kisspeptine dans l'AVPV/PeN expriment le ER et présentent une activation neuronale accrue exclusivement pendant la poussée de LH, et les souris Kiss1 KO et Kiss1r KO ne peuvent pas présenter une poussée de LH même avec un traitement exogène à l'E2 (Smith et al., 2005 ; Dror et al., 2013).

### III.2. L'action de la progestérone sur les neurones à GnRH

La progestérone est l'hormone stéroïde ovarienne dominante dans la circulation périphérique au cours du cycle de reproduction des mammifères. Les taux de progestérone augmentent pendant la phase lutéale qui suit l'ovulation.

Cette augmentation inhibe la sécrétion pulsatile de GnRH et de LH en diminuant la fréquence de sécrétion (Karsch., 1980 ; Karsch et al., 1987), et prévient l'apparition d'un autre pic de sécrétion en réponse aux fluctuations d'œstrogènes qui accompagnent les vagues de croissance folliculaire (Kasa-Vubu et al., 1992 ; Scaramuzzi et al., 1971 ; Dierschke et al., 1973). Il existe peu d'études focalisées sur les rongeurs concernant l'effet de la progestérone sur le contrôle de la sécrétion de GnRH, et la plupart des études ont été réalisées chez le mouton. Les quelques études sur les rongeurs montrent que l'inhibition de la synthèse des stéroïdes gonadiques bloque l'ovulation, et que la supplémentation en progestérone la restaure (Lipner et al., 1971). De plus, un modèle murin transgénique dont le récepteur à la progestérone est invalidé ne montre aucune ovulation (Lydon et al., 1995). Pendant la période de diestrus chez le rongeur, quand les taux de progestérone sont élevés, cette hormone stimule la sécrétion de la sémaphorine 7A (Sema7A) par les tanocytes au niveau de l'éminence médiane, et participe ainsi à l'expansion des pieds tanocytaires, qui recouvrent les terminaisons à GnRH. La progestérone aurait ainsi un rôle dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH, en limitant l'accès de la neurohormone à l'espace péricapillaire (Parkash et al., 2015). Chez la femme, la progestérone représente le régulateur majeur de la fréquence des pics de GnRH, avec la même action suppressive que vu précédemment (Gill et al., 2002 ; Soules et al., 1984).

### III.3. L'action de la kisspeptine sur les neurones à GnRH

La kisspeptine est un polypeptide de 53 acides aminés, codée par le gène Kiss1 (Oakley et al. 2009), qui par clivage enzymatique donne différents produits dont la kisspeptine-10 (de 10 acides aminés) qui semble jouer un rôle majeur dans la fonction de reproduction (Gottsch et al., 2004). Les kisspeptines sont de puissants stimulateurs de la sécrétion de la GnRH. L'administration centrale ou périphérique de kisspeptine entraîne

la sécrétion de la LH et de la FSH à des doses maximales (Gottsch et al., 2004 ; Thompson et al., 2004). De fait, la majorité des neurones à GnRH expriment le récepteur de la kisspeptine, la protéine GPR54 (Irwig et al., 2004).

Le rôle crucial de la signalisation KiSS1/GPR54 est d'abord mis en évidence par la découverte d'une délétion et d'une mutation inactivatrice du gène GPR54 chez des patients souffrant d'un hypogonadisme hypogonadotrope (HH) (De Roux et al., 2006 ; Seminara et al., 2003). Parallèlement, l'inactivation du récepteur GPR54 dans une lignée de souris conduit au même phénotype que celui observé chez l'homme (Funes et al., 2003). Ce phénotype étant lié à un défaut de sécrétion de GnRH, il semblerait alors que le récepteur GPR54 et son ligand, la kisspeptine, soient impliqués dans une régulation située en amont de la sécrétion de GnRH, comme par exemple dans le « pulse generator », et pour le moins essentiel à son fonctionnement.

Les neurones à kisspeptine sont subdivisés en deux populations chez le rongeur, au vu de leur localisation au sein de deux noyaux distincts : l'AVPV et l'ARC (Gottsch et al., 2004 ; Irwig et al., 2004). La population de neurones à Kisspeptine de l'AVPV projette directement ses axones sur les neurones à GnRH (Wintermantel et al., 2006) et sont activés en même temps que les neurones à GnRH, au moment du pic préovulatoire, comme il a été démontré grâce à des marquages immunohistochimiques ciblant le cFos (Smith et al., 2006 ; Clarkson et al., 2008). Ces données sont en accord avec des données plus récentes montrant une forte activité des neurones à Kisspeptine avant le proestrus, et une diminution de cette activité après le pic de GnRH, dans cette région (de Croft et al., 2012). Cette population aurait donc un rôle préférentiel dans l'activation des neurones à GnRH pour générer le pic préovulatoire de GnRH/LH. Les neurones à kisspeptine de l'ARC projettent leurs axones vers l'aire préoptique (Caron et al., 2012), mais ils ne semblent pas être en contact direct avec les neurones à GnRH (Kalló et al. 2012 ; True et al., 2011). Une gonadectomie augmente l'expression du gène Kiss1, ce qui pourrait suggérer que la population de neurones à kisspeptine de l'ARC serait impliquée dans le rétrocontrôle négatif médié par les œstrogènes.

### III.4. L'action des neurones KNDy sur les neurones à GnRH

Les neurones à kisspeptine de l'ARC coexpriment deux autres peptides impliqués dans la régulation de la reproduction, la neurokinine B (NKB) et la dynorphine A, et sont souvent désignés sous le nom de neurones KNDy (Kisspeptin, neurokinin B et dynorphin A) (Yeo et al., 2011 ; Clarkson et Herbison., 2006).

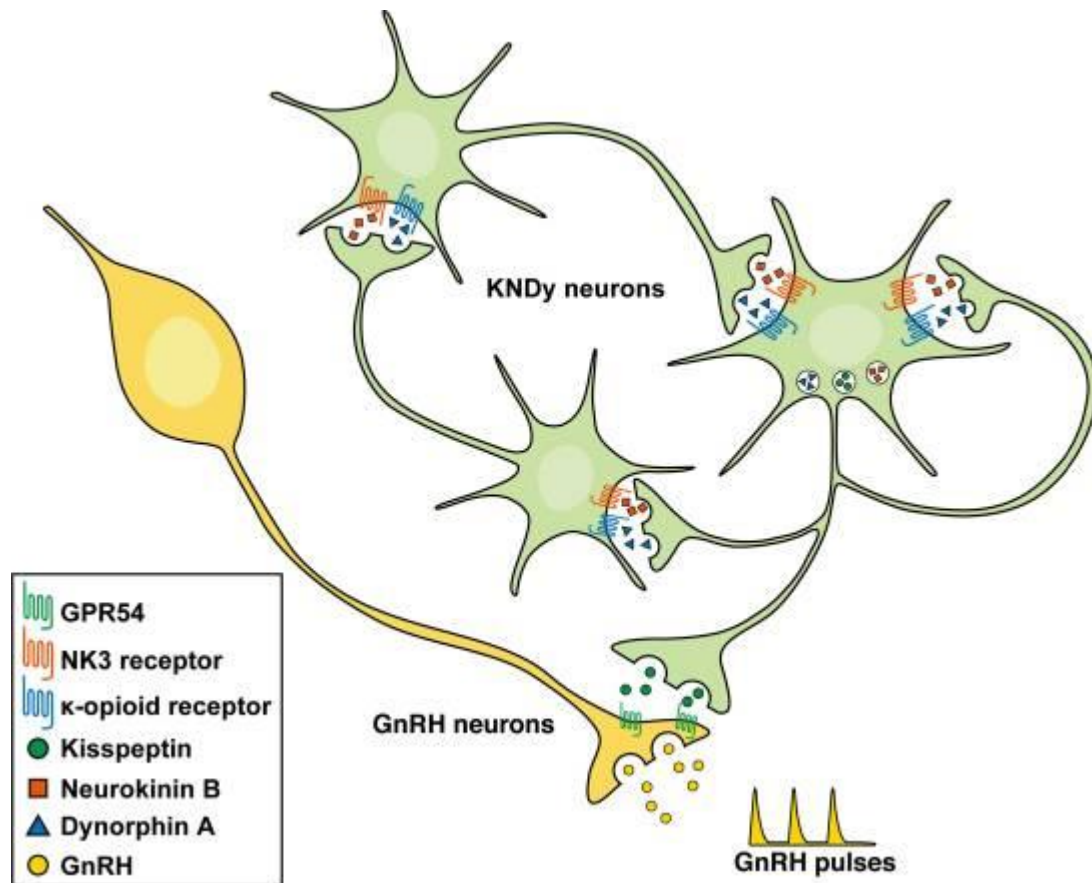
La neurokinine B et la dynorphine A fonctionnent réciproquement en tant que régulateurs positifs et négatifs majeurs de la libération épisodique de kisspeptine (Lehman et al., 2010 ; Kumar et al., 2015 ; Yip et al., 2015). En effet, la neurokinine B initie et/ou accélère l'activité neuronale de la KNDy par l'intermédiaire de récepteurs NK3R (Neurokinin 3 receptor), stimulant la libération de kisspeptine qui stimule la libération de la GnRH par l'intermédiaire du GPR54 exprimé dans les neurones à GnRH. La dynorphine A libérée par les neurones de la KNDy met ensuite fin à l'activité neuronale de la KNDy par l'intermédiaire des récepteurs KOR (kappa-opioïde receptor) (Ruka et al., 2013). La plupart des neurones KNDy expriment le NK3R. Or, un plus petit pourcentage de ces neurones exprimant le récepteur kappa spécifique de la dynorphine A (KOR) (Krajewski et al., 2005 ; Navarro et al., 2009) (Figure 9).

La rétroaction négative par les stéroïdes sexuels se produit principalement au niveau de l'ARC par l'inhibition de la kisspeptine et de la libération de la dynorphine A par les neurones KNDy. En effet, l'ER $\alpha$  l'isoforme requise pour la rétroaction négative des œstrogènes (Dorling et al., 2003), est exprimée dans les neurones KNDy du noyau arqué (Burke et al., 2006), mais pas dans les neurones à GnRH (Hrabovszky et al., 2010).

Bien que la rétroaction positive des œstrogènes se produit également par des interactions au niveau des neurones KNDy de l'hypothalamus (Garcia-Galiano et al., 2012), il a été démontré que les neurones à kisspeptine de l'AVPV sont considérés comme médiateurs de rétroaction positive (Smith et al., 2005). Des études récentes ont démontré que ces neurones sont plus excitables lors d'une rétroaction positive (Zhang et al., 2013 ; Wang et al., 2016). L'ER $\alpha$  dans les neurones à kisspeptine est nécessaire à la rétroaction positive, car les souris knock-out du ER spécifiquement dans les neurones à kisspeptine (KERKO) ne présentent pas de caractère pulsatile de la LH induite par l'œstradiol (Mayer et al., 2010 ; Dubois et al., 2015 ; Greenwald-Yarnell et al., 2016).



L'ensemble de ces observations indiquent une hypothèse selon laquelle les neurones KNDy forment un réseau interconnecté qui est modulé par ses neuropeptides pour contrôler le rythme des impulsions de GnRH et donc de la LH (Skorupskaite et al., 2014).



**Figure 9 : illustration schématique du mécanisme contrôlant la génération de l'impulsion de GnRH chez les mammifères (D'après Uenoyama et al., 2021).**

### III.5. L'action des androgènes sur les neurones à GnRH

Les androgènes fonctionnent via le récepteur des androgènes (AR), un facteur de transcription dépendant du ligand. Il contient un domaine de transactivation N-terminal, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de liaison au ligand (la testostérone (T) et la dihydrotestostérone) (Donath et al, 1997).

La régulation de ces récepteurs commence dès la période périnatale, qui est caractérisée par des pics de testostérone gonadique prénatales et postnatales, et se poursuit pendant la puberté et même à l'âge adulte.

Dans le système nerveux, les effets de la testostérone sont médiés soit par le récepteur des androgènes (AR), soit, après aromatisation neurale en  $17\beta$ -œstradiol, par les récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Ooishi et al., 2012).

La testostérone libérée agit à son tour pour réduire la libération de la GnRH et par conséquent la sécrétion des gonadotrophines. Dans l'hypothalamus, le feed-back négatif exercé par la testostérone ne semble pas cibler directement les neurones de la GnRH, puisque ces neurones sont dépourvues d'AR et d'ER $\alpha$ . La rétroaction négative semble se produire en amont des neurones à GnRH, au niveau du système à kisspeptine. Ce système agit comme un régulateur de l'axe HHG, il est considéré actuellement comme une cible clé de la rétroaction de testostérone pour la libération de la GnRH et de LH (Navarro et al., 2011, Raskin et al., 2009, Ruka et al., 2016, Smith et al., 2005).

Chez les souris mâles, il a été démontré que la régulation de l'expression du Kiss1 induite par la testostérone implique l'ER $\alpha$  et l'AR, qui sont tous deux co-exprimés dans la plupart des neurones à kisspeptine du noyau arqué (Smith et al., 2005). Dans ce noyau, la kisspeptine est co-exprimée avec la neurokinine B, un autre régulateur majeur des neurones à GnRH (Navarro et al., 2009). Des études ont montré que les agonistes de ER $\alpha$  et AR inhibent la réponse neuronale à l'activation du récepteur de la neurokinine-3 chez les souris adultes (Ruka et al., 2016).

Les mâles knock-out pour l'AR neuronal présentent des niveaux élevés de la LH et de la testostérone circulants (Raskin et al., 2009), indiquant l'implication de l'AR hypothalamique dans la régulation négative de l'axe HHG. En revanche, l'AR neural ne semble pas être impliqué dans l'organisation périnatale de la zone périventriculaire rostrale du noyau du troisième ventricule, puisque le nombre de neurones à kisspeptine était similaire chez les souris témoins et mutantes (Picot et al., 2014).

### **III.6. L'action de glutamate et du GABA sur les neurones à GnRH**

Les neurones glutamatergiques sont présents dans la région préoptique (Dumalska et al., 2008), et projettent leurs axones vers les corps cellulaires des neurones à GnRH (Kiss et al., 2003). De plus, les neurones à GnRH expriment les récepteurs du glutamate (Iremonger et al., 2010). Des études montrent qu'il existerait une augmentation du nombre de synapses glutamatergiques au moment du pic préovulatoire de GnRH/LH

(Ottem et al., 2004), ainsi qu'une augmentation du taux de glutamate à proximité des corps cellulaires à GnRH chez la rate au même moment (Jarry et al., 1995). La majorité des neurones glutamatergiques chez le rat expriment l'ER $\alpha$ , mais aussi l'ER $\beta$  (Kiss et al., 2013). Les œstrogènes activeraient, en effet, les neurones glutamatergiques pour stimuler les neurones à GnRH au cours du rétrocontrôle positif (Tada et al., 2013).

Le GABA joue un rôle majeur dans le système à GnRH post-natal ainsi que dans le déclenchement de la puberté. Il agit très probablement via la présence de terminaisons GABAergiques, contactant directement les neurones à GnRH dans l'aire préoptique (Leranth et al. 1985) ainsi que leurs terminaisons chez la souris (Cottrell et al., 2006), et via l'expression des récepteurs du GABA de type A et B par les neurones à GnRH (Herbison et Moenter, 2011). D'après des études récentes, les neurones GABAergiques innervant les neurones à GnRH proviendraient de l'AVPV (Liu et al., 2011), l'aire préoptique latérale (Penatti et al., 2010), ou encore les noyaux supraoptiques (Christian Moenter, 2007). Différentes études montrent que les niveaux de GABA à proximité des corps cellulaires des neurones à GnRH sont élevés le matin du proestrus chez la rate, puis diminuent rapidement dans l'après-midi, juste avant le pic préovulatoire de GnRH/LH (Jarry et al., 1995 ; Mitsushima et al., 2002 ; Moenter, 2007). Le GABA exercerait un effet inhibiteur puissant et probablement direct sur les neurones à GnRH (Mitsushima et al., 2002) et une diminution de son action est nécessaire à la survenue du pic de la GnRH/LH (Herbison et Dyer, 1991). Toutefois des études *in vitro* montrent que le GABA est capable de stimuler la sécrétion de la GnRH (Moenter et DeFazio, 2005), via la stimulation du récepteur du GABA de type A (DeFazio et al., 2002). Ces effets opposés pourraient être relayés par des récepteurs différents, notamment l'effet inhibiteur du GABA sur les neurones à GnRH serait dû à l'activation du récepteur du GABA de type B (Liu et al., 2011). Les neurones GABAergiques de la région préoptique sont également sensibles aux œstrogènes (Herbison, 1997). Il semblerait d'après une étude de Ottem et al., en 2004 que les sous-populations des neurones glutamatergiques et GABAergiques de l'aire préoptique sensibles aux œstrogènes sont en fait une seule et même population de neurones exprimant les deux neurotransmetteurs.

### III.7. L'action de la dopamine sur les neurones à GnRH.

La dopamine régule divers processus physiologiques et comportementaux, dont la reproduction, la dopamine influence probablement sur l'axe HHG principalement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, en régulant la libération de GnRH et de gonadotrophines (Dufour et al., 2005). Cependant, les mécanismes qui sous-tendent la régulation dopaminergique de la libération de l'hormone gonadotrope restent peu clairs. Certaines études ont montré que chez les tétrapodes, la dopamine inhibe la libération de la GnRH (Ching et Lin, 1994) via des actions à la fois au niveau du soma hypothalamique des neurones à GnRH et de leurs terminaisons synaptiques dans le système vasculaire portal (Liu et al., 2013). Chez les poissons, la dopamine agirait principalement dans l'hypophyse, en réduisant la libération de gonadotrophines soit indirectement, en supprimant les axones de libération de GnRH, soit directement, en inhibant les gonadotrophines hypophysaires (Vacher et al., 2002 ; Van Goor et al., 1998). La tyrosine hydroxylase (TH) est l'enzyme limitant la vitesse de la biosynthèse des catécholamines ; elle utilise la tétrahydrobioptérine et l'oxygène moléculaire pour convertir la tyrosine en dopamine. Les neurones à TH de l'AVPV sont connus pour être dopaminergiques (Simerly et al., 1985 ; Scott et al., 2015). Ces neurones AVPV dopaminergiques ont des projections directes et indirectes vers les neurones à GnRH, indiquant que la dopamine dérivée de l'AVPV peut participer à la régulation de l'axe HHG (Clarkson et Herbison, 2011 ; Kumar et al., 2015). Cependant, il existe des preuves contradictoires quant à savoir si la dopamine stimule ou inhibe la libération de la GnRH. L'application de la dopamine à des explants de la partie basale de l'hypothalamus médiane augmente la libération de la GnRH (Rotsztein et al., 1977 ; Jarjour et al., 1986). Cependant, des injections intracérébroventriculaires d'antagonistes de la dopamine augmentent la quantité de GnRH et la libération de LH pendant une poussée de GnRH induite par la PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin), ce qui suggère que la dopamine inhibe la libération de GnRH (Sarkar et Fink, 1981). A l'appui d'un rôle inhibiteur de la dopamine sur la GnRH, des expériences d'électrophysiologie démontrent que la dopamine peut inhiber la décharge de la GnRH directement, via les récepteurs D1 et D2 (Liu et Herbison, 2013). Chez la souris, la grande majorité des neurones à kisspeptine de l'AVPV sont dopaminergiques et coexpriment la TH (Semaan et al., 2010), alors que la TH n'est pas

localisée avec la kisspeptine dans la région de l'ARC (Szawka et al., 2010). Cependant, la fonction de la dopamine produite dans les neurones à kisspeptine de l'AVPV est actuellement inconnue. Jusqu'à 75 % des neurones à kisspeptine de l'AVPV qui coexpriment la TH, envoient des projections de fibres qui apposent des neurones à GnRH (Clarkson et Herbison, 2011 ; Kumar et al., 2015), ce qui suggère que la signalisation dopaminergique provenant des neurones à kisspeptine de l'AVPV peut moduler directement la sécrétion de GnRH et, par conséquent, le système neuroendocrinien de reproduction.

#### **IV. Comportement sexuel**

Lors de l'accouplement, les mâles et les femelles adoptent des comportements et des postures différentes, dont le déroulement et la durée peuvent varier selon les espèces. Les souris sont des animaux nocturnes et dépendent fortement des signaux olfactifs, tels que les phéromones, pour identifier leurs partenaires potentiels (Brown, 1979). Les phéromones sont détectées et traitées par un circuit neuronal hautement spécialisé, l'organe voméronasale (VNO). Les signaux déclenchés par les phéromones dans les neurones voméronasaux sont transmis aux neurones à GnRH. En effet, les phéromones modulent l'activité neuronale de la GnRH de manière dépendante du sexe (Bronson et al, 1976 ; Youn et al, 2015). Des études ont montré que l'exposition à des phéromones femelles active les neurones de la GnRH chez les souris mâles, ce qui entraîne une poussée de LH/testostérone, et inversement, les phéromones mâles induisent la libération de LH chez les souris femelles (Bronson, 1982).

Les hormones sexuelles fournissent une rétroaction gonadique au niveau de cerveau ; cependant, les neurones à GnRH n'expriment pas les récepteurs d'hormones stéroïdiennes et ne sont donc pas des cibles directes de cette régulation par rétroaction (Herbison, 2006). Au lieu de cela, la rétroaction des stéroïdes sexuels gonadiques est indirectement relayée aux neurones GnRH. Une population neuronale critique relayant le retour des stéroïdes sexuels aux neurones à GnRH se trouve dans la zone périventriculaire rostrale du troisième ventricule (RP3V) de l'hypothalamus et produit la kisspeptine.

## IV.1. Chez le mâle

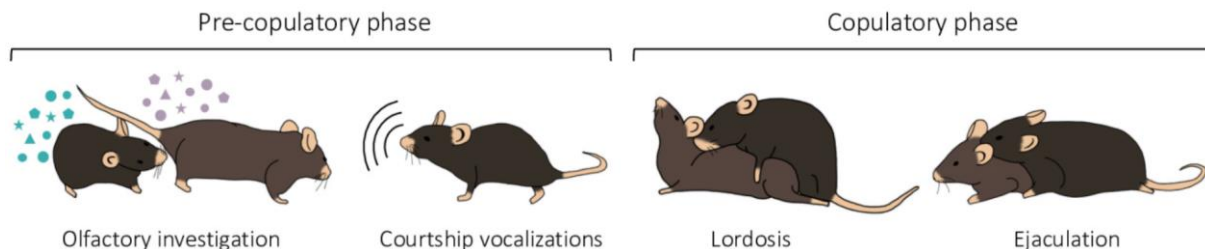
Le comportement sexuel s'exprime en continu pendant la période de reproduction. Il est initié dès que le mâle est mis en présence d'une femelle réceptive. Il est composé de deux phases chez les rongeurs (Figure 10) (Hull et Rodríguez-Manzo, 2013) :

- Une phase pré-copulatoire qui correspond à la phase d'excitation du mâle. Ce dernier réalise des vocalisations ultrasonores et marque à l'urine le territoire. Le mâle renifle activement les parties ano-génitales de la femelle en soulevant son arrière train avec son museau et ses pattes antérieures. En effet chez le rongeur, les stimuli olfactifs jouent un rôle essentiel dans le déclenchement du comportement reproducteur.
- Une phase copulatoire (ou consommatoire), qui débute dès les premières tentatives de montées qui sont accompagnées de mouvements pelviens rapides. La latence de la première montée est le reflet de l'état de motivation du mâle. Les montées sont accompagnées de mouvements de va-et-vient appelés « thrust ». Les mouvements pelviens ralentissent ensuite et sont de plus forte amplitude lorsque le mâle parvient à faire des montées avec intromissions (autrement dit quand le pénis est placé avec succès dans le vagin de la femelle). Après chaque montée avec intromissions, le mâle réalise une toilette génitale, témoin de l'activité érectile. L'accouplement se termine par l'éjaculation, caractérisée par la chute sur le côté et l'immobilité complète du mâle pendant 20 à 30 secondes. Après, les deux animaux passent plusieurs minutes à se toiletter chacun de son côté. La durée de l'accouplement et le nombre d'intromissions renseignent sur la performance sexuelle du mâle. Le temps nécessaire pour manifester un deuxième accouplement, appelé intervalle post-éjaculatoire, varie selon la souche de souris (Burns-Cusato et al., 2004).

L'ensemble de ces comportements est contrôlé par un circuit neuronal impliquant plusieurs régions cérébrales. Notamment, les neurones à kisspeptine qui sont caractérisés par l'expression de récepteurs d'androgène et d'oestradiol (Hull et Dominguez, 2007).

## IV.2. Chez la femelle

Le comportement sexuel ne s'exprime que pendant une période restreinte dans le temps, correspondant à l'augmentation transitoire de la sécrétion d'œstradiol et l'ovulation pendant l'estrus. Au cours de cette période, dite de réceptivité, la femelle participe activement à l'accouplement en manifestant un comportement appétitif et motivant afin de favoriser les montées du mâle. La phase copulatoire qui implique l'acte d'accouplement est fortement dimorphe sexuellement. Chez les souris mâles, il comprend la montée et l'intromission, alors que chez les souris femelles, il s'agit principalement de l'adoption de la posture de lordose. Pendant la phase copulatoire, le comportement sexuel de la femelle est défini par sa réceptivité. Cette dernière peut être mesurée par la position, dite de lordose, adoptée lors des montées réalisées par le mâle. La lordose se caractérise par l'immobilité, la cambrure du dos, l'élévation de la tête et de la queue qui est déviée pour faciliter les intromissions réalisées par le mâle. La manifestation de cette posture est relativement courte, avec des durées variables selon l'espèce étudiée (Pfaff, 1973 ; Blaustein et Erskine, 2002).



**Figure 10 : Cycle du comportement sexuel chez la souris. Le comportement sexuel des souris dépend de signaux internes et externes et peut être subdivisé en deux phases principales** : phase de pré-copulation (ou d'appétit), impliquant la reconnaissance d'un individu du sexe opposé, phase de copulation (ou de consommation), impliquant plusieurs tentatives de montées du mâle jusqu'à ce que la femelle atteigne la lordose, la fin de cette phase est caractérisée par le moment où le mâle atteint l'éjaculation.

Le comportement sexuel chez les deux sexes est fortement régulé par les concentrations circulantes d'hormones stéroïdes gonadiques, dont les androgènes (testostérone), les œstrogènes (œstradiol), et la progestérone.

Chez les souris, cette régulation hormonale est peut-être plus évidente chez les femelles au cours du cycle oestral de 4 à 5 jours. Les concentrations d'estradiol sont faibles pendant le diestrus mais atteignent un pic à la fin du proestrus, déclenche l'ovulation (Levin et al, 2015). Ce pic est rapidement suivi d'un pic de progestérone produit par le corps jaune (Butcher et al, 1974). L'augmentation séquentielle des œstrogènes suivie de la progestérone prépare le cerveau et la physiologie féminins à la motivation sexuelle et donc d'assurer une position d'ordose ((Pfaus, 2009).

## **V. Physiopathologie de l'axe gonadotrope**

### **V.1. Syndrome des ovaires polykystiques**

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est l'un des troubles endocriniens les plus courants chez les femmes en âge de procréer. Il touche environ 5 à 18 % des femmes dans le monde (Silva et al., 2022), le SOPK peut se manifester avant ou pendant la puberté (Bronstein et al., 2011 ; Franks et al., 2002). Les caractéristiques principales de ce syndrome sont l'hyperandrogénie, l'anovulation chronique et les ovaires polykystiques. Des études ont suggéré que les femmes atteintes du SOPK présentent une fréquence accrue des impulsions de GnRH qui entraînant une sécrétion excessive de la LH (Blank et al., 2006). L'expression prématurée du récepteur de la LH par les follicules en croissance à des stades précoces entraîne une augmentation de la production d'androgènes ovariens (Blank et al., 2006). Cependant, l'hyperinsulinémie peut également contribuer à la production élevée d'androgènes, puisque l'insuline stimule la réponse stéroïdienne de l'ovaire en synergie avec la LH (Franks et al., 1999). La production prématurée d'androgènes peut expliquer l'arrêt de développement des follicules antraux dans le SOPK (Franks et al., 2000). Outre les effets sur la folliculogénèse, les androgènes ont également de multiples effets sur la fonction adipocytaire. Des expériences *in vitro* utilisant des adipocytes de femmes préménopausées en bonne santé ont révélé une altération de l'absorption du glucose médiée par l'insuline lorsque les adipocytes étaient exposés à la testostérone (Corbould et al., 2007).

Cependant, ce qui est le plus préoccupant, c'est que ces jeunes femmes ont une plus grande probabilité à développer des maladies métaboliques ainsi qu'une infertilité et des fausses



couches récurrentes (Chang et Katz., 1999). Près de 40 % des femmes atteintes du SOPK présentent une résistance à l'insuline, un état qui n'est qu'aggravé par la prévalence accrue de l'obésité chez les femmes atteintes de ce syndrome (Legro et al., 2004). Selon les critères de Rotterdam, le SPOK est caractérisé par deux des trois critères suivants : hyperandrogénie clinique ou biochimique, oligo- ou aménorrhée, et ovaires polykystiques (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored SOPK Consensus Workshop Group. 2004). En outre, les patientes souffrant du SOPK présentent souvent des perturbations métaboliques qui sont des facteurs de risque pour le développement de maladies cardiovasculaires, de diabète et d'hypercholestérolémie.

Bien que l'étiologie du SOPK soit mal connue, des études d'héritabilité et de jumeaux indiquent qu'il existe une forte composante génétique, probablement polygénique (Barber et Franks., 2013). Des facteurs environnementaux, notamment l'exposition prénatale aux androgènes, peuvent également jouer un rôle (Abbott et Bacha., 2013). Le SOPK se manifeste souvent au début de la période de reproduction, ce qui suggère que la puberté pourrait être une période critique pour l'apparition du SOPK (Anderson et al., 2014).

## V.2. Stress oxydant

Une caractéristique déterminante de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique est la sécrétion épisodique des hormones gonadotrophines LH et FSH par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. La sécrétion d'hormones est dictée par une stimulation pulsatile, la GnRH étant libérée par des neurones hypothalamiques qui se lient et activent le récepteur de la GnRH couplé à la protéine G exprimé par les gonadotropes. La sécrétion d'hormones et la synthèse des gonadotrophines sont influencées par l'amplitude et la fréquence de la stimulation de la GnRH ; la variation de l'une ou l'autre affecte la proportion de LH et de la FSH sécrétée et la régulation différentielle de l'expression des gènes des sous-unités hormonales. Par conséquent, un décodage correct des signaux de la GnRH est essentiel pour une synthèse et une sécrétion appropriées des gonadotrophines. Le récepteur de la GnRH active de manière robuste les cascades de signalisation en aval pour faciliter l'exocytose et stimuler l'expression des gènes et la synthèse des protéines. Il est nécessaire d'éteindre rapidement la signalisation pour préserver la sensibilité et l'adaptabilité aux changements de schémas d'impulsion.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les oxydases activées par les récepteurs jouent le rôle d'intermédiaires de signalisation rapides qui facilitent une signalisation robuste et transitoire. Cependant, un excès de ROS peut être préjudiciable et, s'il n'est pas contrôlé, peut perturber l'interprétation du signal.

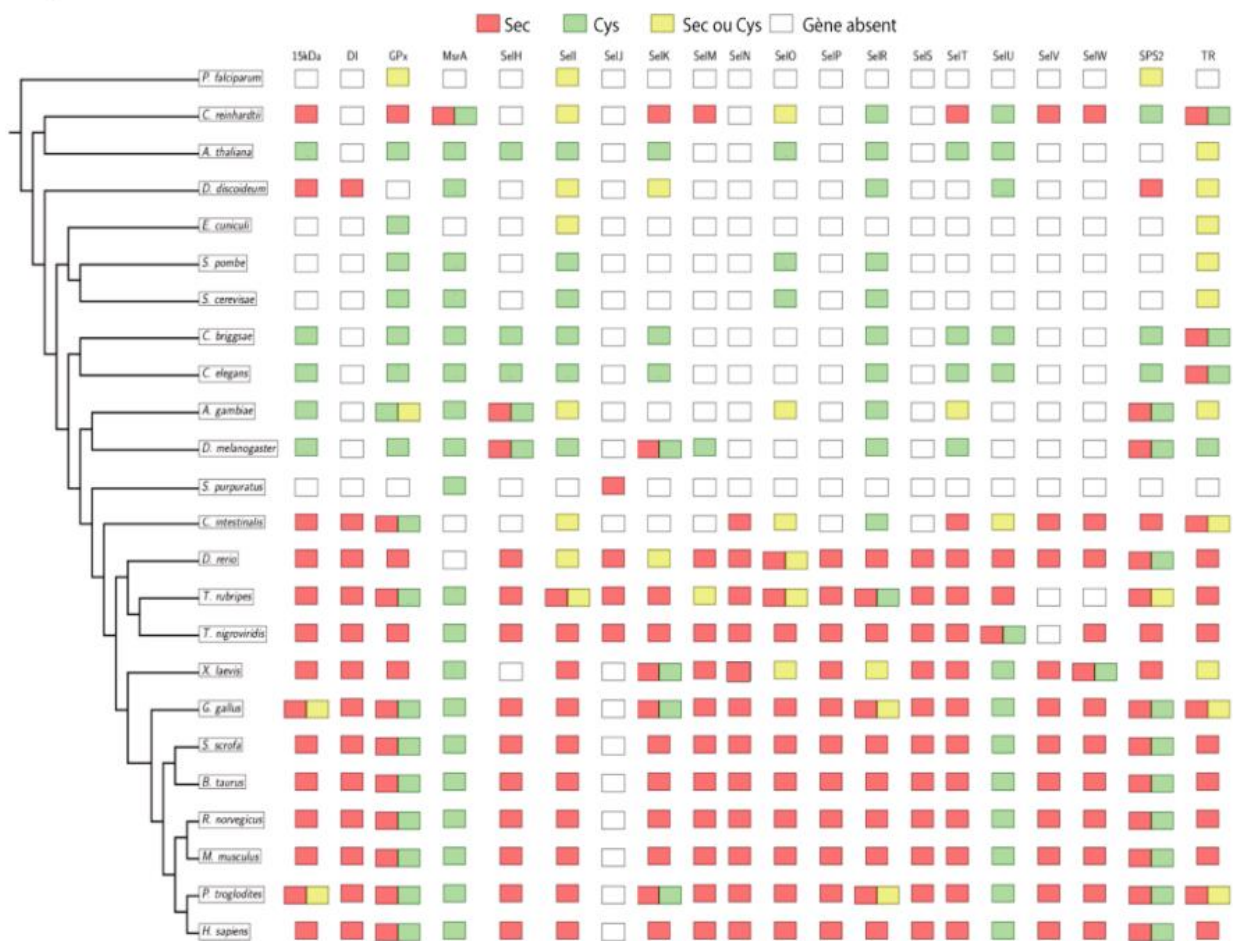
Il est généralement admis que les ROS sont un sous-produit important mais potentiellement toxique des processus biologiques qui doit être géré efficacement (Jiang et al., 2011). De multiples réactions biochimiques produisent des ROS comme produit secondaire de la catalyse ou de l'oxydation, et ces produits sont néfastes pour les macromolécules cellulaires (Finkel, 2001). L'oxydation des sites catalytiques ou des composants structurels des protéines entraîne leur dérèglement ou leur inactivation, et l'oxydation des acides nucléiques peut entraîner une mauvaise régulation de l'expression des gènes et des mutations (Rhee, 2006. Formann et torres, 2002). Bien que potentiellement dangereux, l'oxygène réactif sous forme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est de plus en plus apprécié comme une importante molécule de signalisation qui participe aux cascades de signalisation régulant la croissance, la différenciation et les fonctions des cellules différenciées (Rhee, 2006).

Le rôle du stress oxydatif est bien reconnu comme un facteur contribuant à la réduction de la fertilité chez les hommes et les femmes (Agarwal et al., 2012. Aitken et al., 2014). Le syndrome des ovaires polykystiques, l'une des pathologies endocriniennes reproductives les plus courantes, est également associé au stress oxydatif, à la dyslipidémie et à l'obésité (Liu et Zhang, 2012. Barber et al., 2013). La démonstration que les ROS font partie intégrante de la signalisation de la GnRH et que l'altération de l'équilibre redox entraîne une diminution de l'expression des gonadotrophines, impliquent un rôle dans le déclin de la production de gonadotrophines lié à l'obésité ou dans la dérégulation générale des gonadotrophines par la perturbation de l'interprétation du signal pulsatile. Ainsi, la production des ROS par le métabolisme des acides gras dans les cellules gonadotropes L $\beta$ T<sub>2</sub> limite l'expression des gènes et la sécrétion de gonadotrophines *in vitro* (Li et al., 2018). La poursuite des études sur le rôle des ROS dans la régulation de la production de gonadotrophines médiée par la GnRH pourrait faire la lumière sur les conséquences normales et physiopathologiques des ROS sur la reproduction.

## VI. Les Sélénoprotéines

Les sélénoprotéines représentent une famille de protéines d'une trentaine de membres identifiés à ce jour et sont présentes dans de très nombreux organismes et tous les mammifères en possèdent (Tableau 1). Les sélénoprotéines se caractérisent par la présence d'au moins une molécule de sélénium incorporée dans leur séquence sous forme de sélénocystéine (Sec ou U) (Bellinger et al., 2009).

Tableau 1 : Les sélénoprotéines identifiées chez les eucaryotes sont représentées sur cet arbre récapitulatif (D'après Castellano et al., 2005).

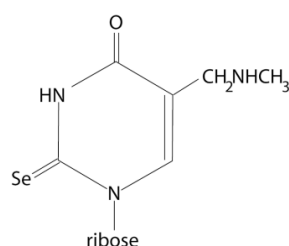


### VI.1. Les principales formes biologiques du sélénium

Dans l'organisme, le sélénium est principalement présent sous 3 formes : il peut être associé à des acides nucléiques (sélénobase), conjugué à des glucides ou des lipides, ou enfin retrouvé sous la forme d'acides aminés sélénés (sélénométhionine et sélénocystéine).

### VI.1.1. La sélénobase

La 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine (Figure 11) est une base modifiée retrouvée dans l'anticodon des ARN de transfert glutamate et lysine chez *E. coli*, *C. stricklandii* et *M. vanielii*. Sa synthèse fait intervenir du sélénium sous sa forme sélénophosphate (Figure 11) (Veres et al., 1994). La présence de cette base modifiée, en position 34 de la boucle de l'anticodon de ces ARN de transfert, est d'une importance capitale pour leur aminoacylation (Ching et Stadtman, 1982).



**Figure 11 : Structure chimique de la sélénobase 5-méthyl-aminométhyl-2-sélénouridine.** Cette base modifiée est présente dans l'anticodon des ARN de transfert glutamate et lysine chez *E. coli*, *C. stricklandii* et *M. vanielii*.

### VI.1.2. Les acides aminés séléniés

Deux mécanismes distincts permettent l'introduction du sélénium dans les protéines, sous la forme de sélénocystéine ou de sélénométhionine.

### VI.1.3. La sélénométhionine

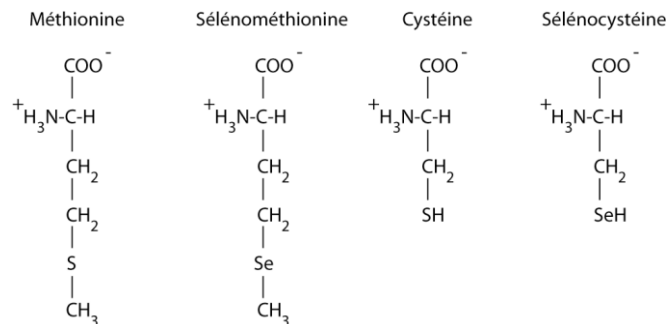
Cet acide aminé (Figure 12) est présent essentiellement dans certaines enzymes de l'espèce bactérienne *Clostridium*, ainsi que chez les plantes. Au cours du métabolisme des composés soufrés, un atome de sélénium peut remplacer de façon aléatoire un atome de soufre ; la fréquence de cet événement est directement proportionnelle à la concentration de sélénium présent dans la cellule.

### VI.1.4. La sélénocystéine

La sélénocystéine (Sec ou U) est un analogue de la cystéine (Figure 12), dans lequel l'atome de soufre du groupement thiol est remplacé par un atome de sélénium pour

former un groupement séléniol. Par son mécanisme d'incorporation spécifique dans les sélénoprotéines, la Sec est considérée comme le 21ème acide aminé protéogénique et se distingue donc de la sélénométhionine, incorporée de façon aléatoire.

Le groupement séléniol (pKa=5,2), contrairement au thiol (pKa=8), est entièrement ionisé à pH physiologique. Cette ionisation, à laquelle s'ajoute sa taille plus importante, fait du séléniol un meilleur nucléophile. De ce fait, la réactivité des protéines à sélénocystéine est bien plus importante que celle de leurs homologues à cystéine (Gromer et al., 2003 ; Johansson et al., 2005 ; Müller et al., 1994). Cette réactivité accrue constitue probablement la raison d'être des sélénoprotéines, malgré la faible efficacité et le coût énergétique élevé de leur synthèse.



**Figure 12 : Structure chimique de la méthionine, sélénométhionine, cystéine et sélénocystéine.** La sélénocystéine est un analogue de la cystéine, mais de réactivité bien supérieure. Elle est synthétisée à partir de la sérine.

## VI.2. Principaux rôles physiologiques des sélénoprotéines

La caractéristique essentielle à l'activité de toutes les sélénoprotéines est la présence de résidus Sec dans leur séquence. A quelques exceptions près, cet acide aminé est situé dans les sites actifs enzymatiques où il est utilisé pour effectuer des réactions d'oxydoréduction catalytiques (Arnèr, 2010).

Par conséquent, les fonctions physiologiques des sélénoprotéines dépendent strictement de la présence de la Sec. Le sélénoprotéome humain est codé par 25 gènes (Figure 13). Bien que toutes les sélénoprotéines caractérisées ont des fonctions redox, la Sec peut être utilisée pour remplir divers rôles biologiques des sélénoprotéines. La plupart des sélénoenzymes ont été classées en fonction de leur activité catalytique principale. Les Glutathiones peroxidases (GPx), les iodothyronines désiodases et les thiorédoxines

réductases sont les mieux caractérisées actuellement. D'autres sélénoprotéines telles que les SELENO H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, V, W, 15 et la sélénophosphate synthétase constituent le reste de cette famille chez l'Homme.

Bien qu'agissant par oxydoréduction quasi systématiquement, ces sélénoprotéines peuvent présenter des mécanismes d'action différents et impacter différents processus cellulaires. L'importance des sélénoprotéines est démontrée par les expériences d'inactivation génique réalisées dans des modèles animaux tels que la souris ou le poisson zèbre, et l'existence de mutations des gènes de sélénoprotéines ou de facteurs impliqués dans leur biosynthèse qui entraînent des phénotypes relativement sévères. D'ailleurs, certaines malformations observées chez les souris déficientes rappellent les symptômes de patients atteints de la maladie de Kashin-Beck liée à une déficience en Se (Downey et al., 2009). Chez l'Homme, des mutations au niveau du gène SBP2 qui se fixe à la séquence SECIS du message des sélénoprotéines indispensable à l'incorporation de la Sec entraînent plusieurs anomalies telles qu'une azoospermie, une dystrophie musculaire, un déficit immunitaire ou une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Schoenmakers et al., 2010). De même, la mutation du gène de l'ARNt de la Sec entraîne plusieurs anomalies dont une faiblesse musculaire, une dysfonction thyroïdienne, la fatigue et l'effondrement des teneurs plasmatiques de Se, en provoquant des changements dans la biosynthèse des sélénoprotéines (Schoenmakers et al., 2016).

Selenoprotein	Abbreviation	Sec location (protein size)	Function
Glutathione peroxidase 1	GPx1, GPX1	47 (201)	Cytosolic glutathione peroxidase
Glutathione peroxidase 2	GPx2, GPX2	40 (190)	Gastrointestinal glutathione peroxidase
Glutathione peroxidase 3	GPx3, GPX3	73 (226)	Plasma glutathione peroxidase
Glutathione peroxidase 4	GPx4, GPX4	73 (197)	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
Glutathione peroxidase 6	GPx6, GPX6	73 (221)	Olfactory glutathione peroxidase
Iodothyronine deiodinase 1	DI1, D1, DIO1	126 (249)	Thyroid hormone-activating iodothyronine deiodinase
Iodothyronine deiodinase 2	DI2, D2, DIO2	133, 266 (273)	Tissue-specific thyroid hormone-activating iodothyronine deiodinase
Iodothyronine deiodinase 3	DI3, D3, DIO3	144 (278)	Tissue-specific thyroid hormone-deactivating iodothyronine deiodinase
Thioredoxin reductase 1	TR1, TrxR1, TXNRD1	498 (499)	Reduction of cytosolic thioredoxin
Thioredoxin/glutathione reductase	TGR, TR2, TrxR3, TXNRD3	655 (656)	Testis-specific thioredoxin reductase
Thioredoxin reductase 3	TR3, TrxR2, TXNRD2	522 (523)	Reduction of mitochondrial thioredoxin and glutaredoxin
Methionine-R-sulfoxide reductase	MsrB1, SelR, SelX, MSRB1	95 (116)	Reduction of oxidized methionine residues
Selenophosphate synthetase 2	SPS2, SEPHS2	60 (448)	Involved in synthesis of selenoproteins
Selenoprotein W	SelW, SEPW1	13 (87)	Unknown
Selenoprotein T	SelT	36 (182)	Unknown
Selenoprotein H	SelH	38 (116)	Unknown
Selenoprotein V	SelV	273 (346)	Unknown
Selenoprotein I	SelI, SEPI, EPT1	387 (397)	Unknown
15 kDa selenoprotein	Sep15	93 (162)	Putative role in quality control of protein folding in the ER
Selenoprotein M	SelM, SEPM	48 (145)	Unknown
Selenoprotein K	SelK	92 (94)	Putative role in ER-associated degradation
Selenoprotein S	SelS, SEPS1, VIMP	188 (189)	Putative role in ER-associated degradation
Selenoprotein O	SelO	667 (669)	Unknown
Selenoprotein N	SelN, SepN, SEPN1,	428 (556)	Putative role during muscle development
Selenoprotein P	SelP, SEPP1	59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378 (381)	Se transport

**Figure 13 : Sélénoprotéome humain.** La longueur relative des sélénoprotéines et la localisation de la Sec dans différentes sélénoprotéines sont indiquées sur la droite (D'après Labunsky et al., 2014).

D'autre part, des mutations de la SELENON entraînent une rigidité musculaire avec mini-corps (Lescure et al., 2009). Enfin, la perte de la synthèse de la Sec chez l'homme est associée à des anomalies neuroanatomiques avec une atrophie cérébro-cérébelleuse. La présence des sélénoprotéines est requise pour plusieurs processus cellulaires, à savoir le transport et le stockage du Se, le repliement des protéines, le métabolisme des hormones thyroïdiennes, la réduction des protéines et des membranes oxydées, la régulation de la signalisation redox et la biosynthèse des bases nucléiques.

Plusieurs sélénoprotéines ont été caractérisées plus récemment et font l'objet de nombreuses études depuis une quinzaine d'années.

Leurs fonctions sont extrêmement variées. Ainsi, la SELENOR ou méthionine sulfoxyde réductase B1 est une enzyme dont l'activité principale est la réduction de la méthionine, le second acide aminé le plus sensible à l'oxydation après la Cys. Ainsi, cette sélénoprotéine participe à l'activation/inactivation de protéines en contrôlant l'oxydation des méthionines, un acide aminé clé qui initie la synthèse protéique dans tous les organismes vivants connus (Achilli et al., 2015). Parmi les sélénoprotéines, un certain nombre est exprimé principalement dans le réticulum endoplasmique (RE), un organe intracellulaire dont les membranes sont propices à la formation de complexes protéiques nécessaires à la biosynthèse et à la maturation post-traductionnelle des protéines. Ainsi, la SELENOK et la SELENOS sont localisées dans la membrane du RE où elles interagissent avec plusieurs autres protéines. La SELENO15 joue un rôle dans le contrôle qualité des protéines et la formation des ponts disulfures, en s'associant avec la protéine chaperonne UDP-glucose : glycoprotein glycosyltransferase (UGGT) (Labunsky et al., 2007). La SELENOS et la SELENOK sont impliquées dans le système ER-associated degradation (ERAD) responsable de la translocation des protéines du RE vers le cytosol afin qu'elles y soient dégradées par le protéasome (Trifonov et al., 2014). De plus, la SELENOK est nécessaire à la palmitoylation du canal calcique IP3-dépendant (IP3R) de la membrane du RE grâce à son association avec une acyltransférase appelée DHHCC qui facilite l'addition du palmitate sur les groupements thiols des Cys. Ce mécanisme contribue à la régulation du flux calcique, au moins dans les cellules immunitaires (Fredericks et Hoffmann, 2015). De même, la SELENON ou SEPN1, dont la mutation du gène est responsable d'une myopathie (Moghadaszadeh et al., 2001), s'associe avec le récepteur de la ryanodine qui forme un canal calcique de la membrane du réticulum sarcoplasmique (Jurynek et al., 2008). La SELENON joue un rôle important dans le développement du tissu musculaire et sa défaillance altère les mouvements calciques suite à l'oxydation des résidus Cys du récepteur ryanodine, entraînant un dysfonctionnement musculaire associé à une rigidité de la colonne vertébrale et une insuffisance respiratoire, symptômes associés aux myopathies congénitales (Marino et al., 2014). Les sélénoprotéines SELENOW, SELENOV, SELENOH et SELENOT appartiennent à la



famille des protéines à « thioredoxin-like fold ». La SELENOW joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire en réduisant le pont disulfure de la phosphatase CDC25B, ce qui la libère de son complexe avec la protéine 14-3-3 et entraîne l'élimination d'un groupement phosphate inactivateur de la kinase cdk1. Ceci entraîne l'entrée en mitose après un arrêt du cycle G2 causé par les lésions de l'ADN (Park et al., 2012). La SELENOV et la SELENOH ont des fonctions peu connues même s'il a été montré un rôle important de la SELENOH dans le développement et l'apparition de tumeurs chez le poisson zèbre, en interagissant avec la protéine p53 (Cox et al., 2016). Les rôles de la SELENOT sont décrits plus spécifiquement dans un chapitre présenté à la fin de cette introduction.

Enfin, une sélénoprotéine particulière avec ses nombreux résidus Sec (10 chez l'Homme) est la SELENOP. C'est une sélénoprotéine plasmatique qui assure le transport et l'apport du Se aux différents tissus (Saito et Takahashi, 2002). L'absence de SELENOP provoque une chute des taux de Se dans le cerveau, les testicules et le rein associés à des déficits sévères (Kasaikina et al., 2012).

### VI.2.1. Rôles des sélénoprotéines dans le SNC

Depuis une trentaine d'année, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la distribution et aux rôles des sélénoprotéines dans le système nerveux. Le stress oxydant est l'une des causes majeures invoquées lors de processus neurodégénératifs (Niizuma et al., 2009), notamment au cours de pathologies telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, ou les accidents vasculaires cérébraux. Compte-tenu des capacités antioxydantes portées par plusieurs sélénoprotéines, il n'est pas étonnant que plusieurs d'entre-elles puissent jouer un rôle clef dans la régulation neuroendocrine et la protection neuronale, en condition normale ou physiopathologique. En effet, des modèles de surexpression et de knockout de sélénoprotéines cibles dans le cerveau a permis de mettre en évidence leur rôle déterminant dans le développement du système nerveux central (SNC) et le maintien de l'homéostasie cérébrale.

### VI.2.2. Expression et rôle neuroprotecteur des sélénoprotéines dans le SNC

Certaines sélénoprotéines sont très abondantes dans le cerveau des mammifères, comme les Thioredoxin reductases 1 et 2 (TrxR1 et 2) (Hill et al., 1997 ; Lovell et al., 2000), la SELENOP (Hill et al., 1997 ; Scharpf et al., 2007), la SELENOR (Moskovitz et al., 1996) ou la SELENOM (Pitts et al., 2013). Certaines sélénoprotéines telles que la SELENOR (Moskovitz et al., 1996) et la SELENOP sont abondantes dans les cellules GABAergiques de Purkinje (Saijoh et al., 1995), en plus la SELENOP a été par ailleurs détectée dans le liquide céphalo-rachidien et les cellules épendymaires (Scharpf et al., 2007). Enfin, la SELENOW a été détectée dans le cortex, le cervelet et le thalamus (Sun et al., 2001). Les niveaux d'expression des sélénoprotéines peuvent être stimulés lors de lésions cérébrales. Ainsi, les taux de la GPx (Lindenau et al., 1998) et plus particulièrement de la GPx4, mitochondriale et membranaire (Savaskan et al., 2007), ainsi que de la SELENOM (Reeves et al., 2010) sont nettement accrus lors de processus neurodégénératifs.

L'activité neuroprotectrice des sélénoprotéines a tout d'abord été démontrée *in vitro* en utilisant des modèles cellulaires permettant leur inhibition ou surexpression. Ainsi, Reeves et al. (2010) ont montré que l'inactivation de la SELENOM dans des cellules d'origine neuronale et gliale, les rendait plus sensibles à un stress oxydatif. Ils ont à l'inverse montré que la surexpression de cette sélénoprotéine diminuait significativement la toxicité calcique induite par un traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favorisant ainsi la survie cellulaire. Plusieurs études suggèrent également un rôle neuroprotecteur de la SELENOP, grâce à son extrémité N-terminale portant une activité redox. En effet, Steinbrenner et al. (2006) ont montré que l'inhibition de la SELENOP diminuait la viabilité des astrocytes en conditions contrôles ou oxydantes. Par ailleurs, la présence de la SELENOP a été montrée au sein des plaques amyloïdes, dans les plexus choroïdes et le liquide céphalo-rachidien chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui suggère un rôle de cette protéine dans la physiopathologie de cette maladie neurodégénérative (Bellinger et al., 2008, Rueli et al., 2015). D'autre part, la surexpression de la SELENOS rend les cellules gliales plus résistantes face à un stress du réticulum, alors que son inhibition diminue fortement la survie de ces cellules (Fradejas et al., 2011). Enfin, plusieurs auteurs ont également souligné l'activité anti-oxydante de la SELENOW au niveau cérébral.

En effet, la SELENOW est abondante au cours des stades tardifs de l'ontogenèse cérébrale (Chung et al., 2009), et son rôle protecteur vis-à-vis d'agents neurotoxiques tels que les métaux lourds ont été documentés (Amantana et al., 2002 ; Kim et al., 2005).

### VI.2.3. Apport des souris transgéniques

Le système d'inactivation Cre/Lox, a permis de générer un des knockouts ciblés au cerveau des gènes des sélénoprotéines, ce qui a été essentiel pour l'étude de ces protéines notamment celles dont le knockout global est létal comme GPx4 ou la TrxR 1 et 2. Ainsi, une lignée de souris portant une délétion conditionnelle du gène de l'ARNt de la Sec dans le cerveau et plus particulièrement dans les neurones a entraîné un retard de croissance, une perte d'équilibre et une hyperexcitabilité (Wirth et al., 2010).

D'autre part, Seiler et al. (2008) ont développé une lignée transgénique portant une délétion de la GPx4 dans les neurones corticaux et hippocampiques. Dès P10, les jeunes souriceaux présentaient une démarche ataxique alors qu'à P12, ces animaux étaient devenus hyperexcitables et très agressifs. Soerensen et al. (2008) ont invalidé la TrxR1 dans le cerveau par croisement de souris  $TrxR1^{fl/wt}$  et Nestin-Cre, provoquant une diminution significative de la taille des animaux homozygotes  $TrxR1^{fl/fl}/Nes-Cre$  et une ataxie très sévère. Les auteurs ont observé que la structure du cervelet était fortement altérée et que les animaux homozygotes  $TrxR1^{fl/fl}/Nes-Cre$  présentaient un défaut de prolifération des cellules granulaires immatures et une perturbation organisationnelle de la glie de Bergmann. Il apparaît donc que les sélénoprotéines sont indispensables pour le développement du SNC et pour limiter les processus pathologiques neurodégénératifs. Toutefois, l'étude de certaines sélénoprotéines identifiées plus récemment comme la SELENO H, I, K, O, U, V ou encore T, sont à leur début et il est fort à parier que leur caractérisation permettra de mettre en évidence leur rôle important dans différents tissus dont le SNC.

#### VI.2.4. Distribution et rôles de certaines sélénoprotéines au cours de L'embryogenèse

Une grande partie des sélénoprotéines n'a pas été encore étudiée au cours de l'embryogenèse, même si de nombreuses études s'accordent sur le fait que leurs niveaux d'expression sont particulièrement élevés dans les tissus en développement.

A titre d'exemple, la GPx4 qui maintient l'intégrité des membranes biologiques, joue un rôle important dans l'embryogenèse. En effet cette sélénoprotéine est fortement exprimée au cours du développement (Baek et al., 2005), en particulier lors de l'ontogenèse cérébrale et de la somitogenèse, mais cette expression décline significativement après la naissance (Savaskan et al., 2007). L'expression cellulaire de GPx4 est quasiment insensible à une déprivation en Se, et son invalidation et surtout celle de ses isoformes longues (mitochondriales) et courtes (membranaires) est précocement létale (Conrad, 2009).

L'invalidation du gène de la GPx1 ne provoque pas de phénotype particulier (Esworthy et al., 2000), mais son niveau d'expression, comme celui de la GPx4, augmente en cas de pré-éclampsie au cours de la gestation chez l'homme (Boutet et al., 2009).

La SELENOP est très fortement exprimée durant tous les stades de l'embryogenèse, notamment dans les stades embryonnaires E8-E13, dans le tissu nerveux immature (E9-E18) ou dans les membres en développement (E19) (Lee et al., 2004). L'invalidation de ce gène chez les souris entraîne une perte de poids, des troubles ataxiques, et des défauts de distribution de Se dans l'organisme, en particulier dans le SNC (Hill et al., 2003, 2004).

### VI.3. La sélénoprotéine T

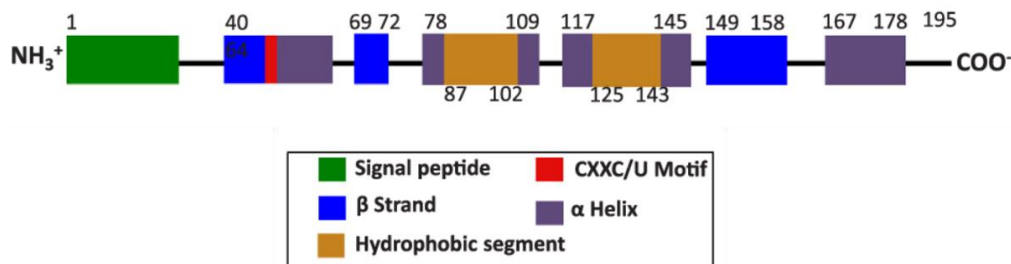
Phylogénitiquement, la SELENOT a été décrite pour la première fois par Kryukov et al. (1999) suite à son identification par des outils bioinformatiques basée sur la reconnaissance de l'élément SECIS dans les bases de données génomique.

#### VI.3.1. Caractéristiques structurales de la SELENOT

La SELENOT fait partie des plus anciennes sélénoprotéines chez les vertébrés, et il en existe des homologues contenant la Cys à la place de la Sec chez des protozoaires, des plantes terrestres et aquatiques et des insectes. Ces observations indiquent que la

SELENOT pourrait avoir une origine très ancienne chez les organismes vivants, ce qui renforce l'idée d'un rôle important de cette protéine (Moustafa et Antar, 2012). Aucune fonction n'était connue pour cette sélénoprotéine dont le gène est situé sur le chromosome 3q25 chez l'homme. Au cours de l'évolution, sa séquence nucléotidique est extrêmement conservée, avec 97-100% d'homologie entre l'homme et les mammifères, 95% avec le poulet ou encore 89% avec la grenouille (Mariotti et al., 2012). Elle est formée de 195 acides aminés chez l'homme et les rongeurs. Sa séquence contient un peptide signal en position 1-19.

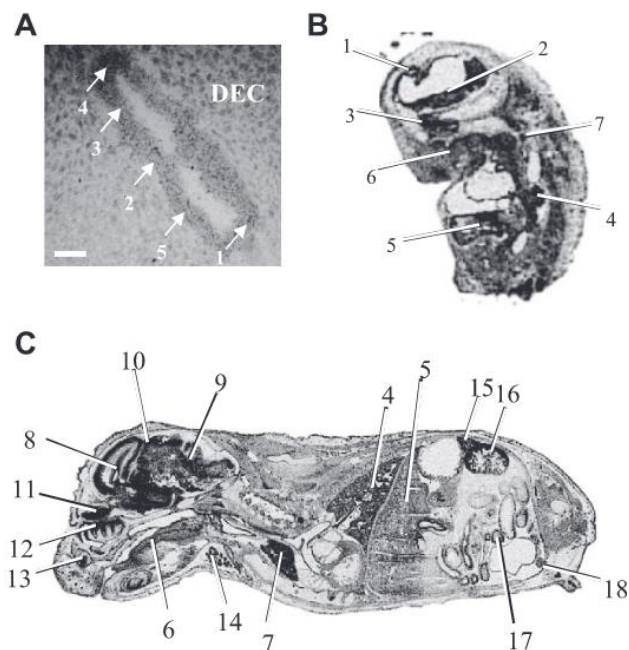
Elle contient un résidu Sec du côté N-terminal, au sein du centre redox CVSU situé entre une hélice  $\alpha$  et un brin  $\beta$ , caractéristique des « thioredoxin fold proteins » (Figure 14). La SELENOT possède deux domaines hydrophobes en position 87-102 et 125-143, à cheval sur 4 hélices  $\alpha$ , qui lui confère une localisation transmembranaire (Dikiy et al., 2007 ; Grumolato et al., 2008 ; Shchedrina et al., 2010).



**Figure 14 : Structure de la SELENOT murine.** Différents éléments de structure secondaire ont été identifiés dans la structure de la SELENOT d'après une analyse bioinformatique, tels que des hélices  $\alpha$  et des brin  $\beta$ . Deux de ces éléments encadrent le thioredoxin like domain (en rouge), dans lequel la Sec est incluse. D'autres domaines spécifiques ont également été mis en évidence, notamment un peptide signal et un domaine transmembranaire (d'après Anouar et al., 2018).

### VI.3.2. Expression tissulaire de la SELENOT

En 2008, Grumolato et ses collaborateurs ont montré la présence de la SELENOT dans de très nombreux tissus au cours du développement embryonnaire (Figure 15). Les études de distribution tissulaire menées dans notre unité ont démontré que la SELENOT est abondamment exprimée dans le cerveau en développement notamment dans les progéniteurs neuronaux et dans diverses régions comme le cortex et le cervelet.



**Figure 15 : Expression des ARNm de la SELENOT dans les tissus de rat au cours de l'embryogenèse.** (A) Stade E7 ; 1, cône ectoplacentaire ; 2, endoderme pariétal ; 3, endoderme viscéral ; 4, ectoderme primaire ; 5, ectoderme extra-embryonnaire et DEC, ectoderme extra-embryonnaire. Barre d'échelle = 40  $\mu$ m. (B, C) Coupes parasagittales des embryons E14 et E21 hybridés avec la sonde antisens de la SELENOT ; 1, neuro-épithélium cortical ; 2, télencéphale basal ; 3, ecoturbinat ; 4, poumon ; 5, foie ; 6, langue ; 7, thymus ; 8, hippocampe ; 9, cervelet ; 10, mésencéphale ; 11, neuroépithélium du bulbe olfactif ; 12, endoturbinat ; 13, organe voméro-nasal ; 14, glande salivaire ; 15, glande surrénale ; 16, rein ; 17, intestin ; 18, testicule (Grumolato et al., 2008).

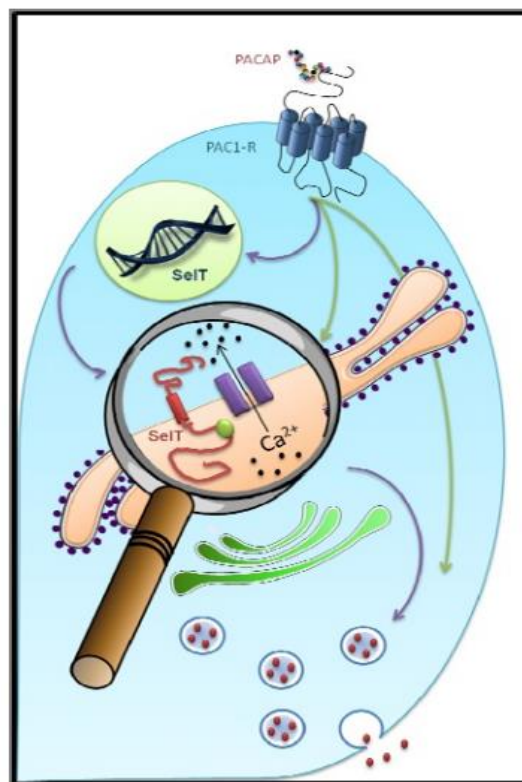
En revanche, cette expression décroît fortement dans la plupart des tissus après naissance pour devenir quasiment indétectable chez l'adulte (Grumolato et al., 2008. Tanguy et al., 2011).

Toutefois, l'expression de la SELENOT est exceptionnellement maintenue dans des tissus qui possèdent une activité endocrine. A titre d'exemple dans la glande pituitaire, la SELENOT est présente dans les cellules sécrétrices du lobe antérieur, tandis que dans les testicules, elle est présente uniquement dans les cellules germinales et les cellules de Leydig. Dans le pancréas endocrine, la SELENOT est majoritairement produite dans les cellules qui produisent l'insuline (cellules  $\beta$ ) et somatostatine (cellules  $\alpha$ ) (Dikiy et al., 2007 ; Prevost et al., 2013 ; Tanguy et al., 2011). La SELENOT est réexprimée dans

certaines situations physiopathologiques telles que l'hypoxie cérébrale chez la souris (Ikematsu et al., 2007), et l'hypoxie cardiaque chez les poissons (Mazza et al., 2019), la dégénérescence neuronale dans le modèle murin MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) de la maladie de Parkinson (Boukhar et al., 2016) et la régénération hépatique (Tanguy et al., 2011).

### VI.3.3. Rôles biologiques de la SELENOT

La SELENOT a été identifiée parmi les gènes stimulés par le neuropeptide PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) dans les cellules chromaffines tumorales de la lignée PC12 de phéochromocytome de rat lors d'une étude transcriptomique réalisée par les chercheurs de notre laboratoire. Ainsi, elle joue un rôle important dans la mobilisation calcique intracellulaire, couplée à la sécrétion des catécholamines dans les cellules PC12 (Figure 16) (Grumolato et al., 2003, 2008).



**Figure 16 : Fonction intracellulaire de la SELENOT dans les cellules PC12 différenciées par le PACAP.** Au cours de la différenciation des cellules PC12, le PACAP augmente la concentration cytosolique de  $Ca^{2+}$  et stimule la libération des catécholamines (flèches vertes). Cet effet pourrait être renforcé par la stimulation de l'expression du gène SELENOT puisque sa

présence dans le RE a permis d'amplifier la mobilisation du  $Ca^{2+}$  à partir des pools intracellulaires, probablement par le biais d'une interaction avec les récepteurs du canal  $Ca^{2+}$  récepteurs (flèches violettes). (Adapté d'après Tanguy et al. 2011)

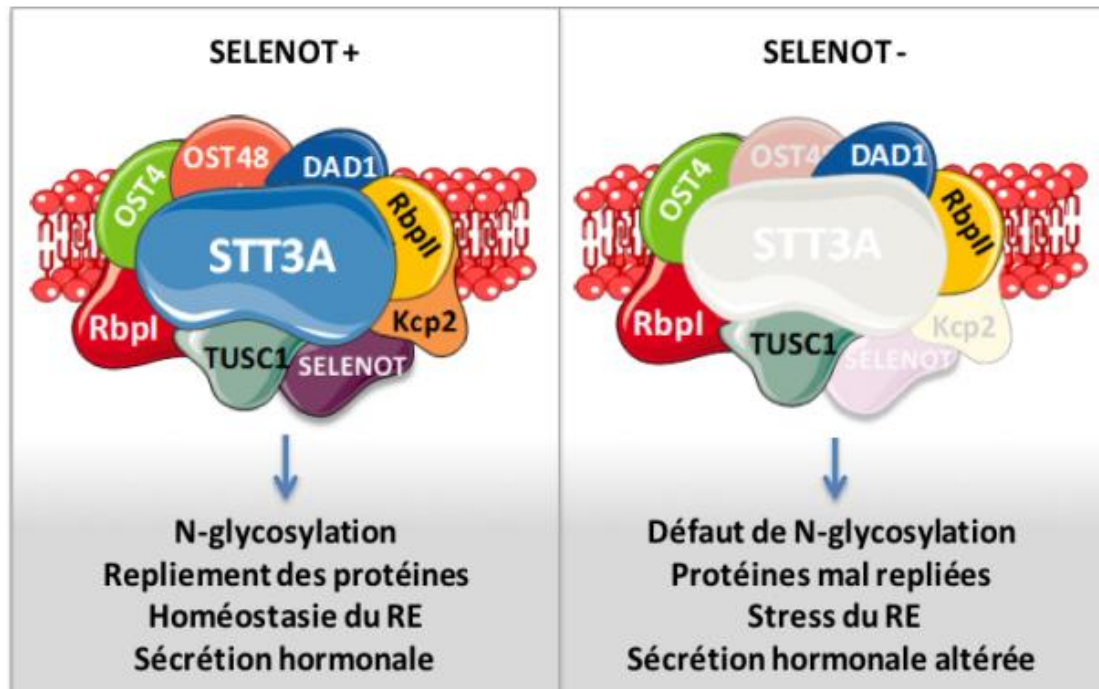
Cet effet dans la sécrétion hormonale a également été démontré pour la libération d'insuline *in vitro* à partir de cellules  $\beta$ -pancréatiques stimulées par le PACAP (Prevost et al., 2013). Afin d'étudier le rôle de la SELENOT dans les fonctions physiologiques et physiopathologiques, en particulier dans le cerveau, une approche d'invalidation génique de cette sélénoprotéine a été réalisée chez la souris, au sein de notre laboratoire.

De façon fort intéressante, l'invalidation totale de l'expression de la SELENOT dans l'embryon de souris est létale *in utero* soulignant le rôle essentiel de cette sélénoprotéine au cours du développement (Boukhzar et al., 2016). Des modèles d'invalidation ont été créés permettant d'éteindre spécifiquement l'expression de la SELENOT dans le cerveau (Castex et al., 2016), et les cellules  $\beta$  pancréatiques (Prevost et al., 2013). Grâce au système Cre/Lox, les souris dépourvues de SELENOT dans le cerveau sont viables mais présentent une hyperactivité locomotrice, signe d'une altération fonctionnelle des réseaux neuronaux associée à des déficits comportementaux (Castex et al., 2016).

D'autres études de l'équipe ont montré, une diminution des taux de dopamine dans la voie nigrostriée (Boukhzar et al., 2016) et dans l'hypothalamus (Godefroy et al., 2022), associée à une baisse de l'activité de la TH et à des signes de stress oxydatif.

Une invalidation conditionnelle du gène de la SELENOT dans les cellules  $\beta$  pancréatiques entraîne un déficit de la production et de la sécrétion d'insuline. La taille des ilots de cellules  $\beta$  est diminuée et l'homéostasie glucidique perturbée (Prevost et al., 2013). Au niveau moléculaire, d'autres travaux de l'équipe soulignent l'importance de la SELENOT dans le RE au cours de la production de protéines destinées à être sécrétées (Hamieh et al., 2017). En effet, les chercheurs de notre équipe ont montré que la SELENOT fait partie du complexe oligosaccharyltransférase (OST) qui est impliqué dans la N-glycosylation et la maturation post-traductionnelle de glycoprotéines hormonales, pour lesquelles la formation de ponts disulfures est essentielle (Figure 17).





**Figure 17 : Modèle proposé pour l'intégration de la SELENOT dans le complexe OST constitué de plusieurs sous unités et nécessaire pour assurer la N-glycosylation et la production des hormones : Son absence entraîne un défaut de glycosylation, l'accumulation de protéines mal-conformées, un stress du réticulum endoplasmique et une sécrétion hormonale altérée. (D'après Hamieh et al., 2017).**

Ces différentes données obtenues *in vivo* et *in vitro* ont été regroupées dans deux revues récente écrites par les chercheurs de notre groupe (Anouar et al., 2018 ; Pothion et al., 2020).

#### **VI.4. Sélénoprotéines et fertilité**

Les sélénoprotéines possèdent des propriétés antioxydantes et redox, avec une capacité à réduire le stress oxydant. Or, un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants est reconnu comme un facteur contribuant à la réduction de la fertilité chez les hommes et les femmes (Agarwal et al., 2012). A titre d'exemple, le syndrome des ovaires polykystiques, l'une des pathologies endocriniennes les plus courantes, est associé au stress oxydatif (Liu et Zhang, 2012). Une première indication du rôle important des sélénoprotéines dans la régulation de la reproduction est que la baisse du sélénium

circulant entraîne un dysfonctionnement du métabolisme thyroïdien, et une diminution de la fertilité

(Mehdi et Dufrasne, 2016), L'augmentation de la fertilité lors de l'ajout de sélénium est attribuée à la réduction de la mort embryonnaire au cours du premier mois de gestation.

D'autre part, il a été montré que le taux du sélénium dans le fluide folliculaire qui nourrit et entoure l'ovocyte, est réduit chez les femmes qui présentaient une infertilité (Paszkowski et al., 1995), probablement en raison de son utilisation accrue afin de synthétiser des sélénoprotéines qui protégeraient les follicules en souffrance. Il a été également montré que le sélénium est essentiel à la biosynthèse de la testostérone et à la formation et au développement des spermatozoïdes. Le tissu testiculaire contient une quantité importante de sélénium, qui est garant de la qualité du sperme et de la fertilité masculine (Rayman et al., 2012). Notre équipe a pu montrer la présence de la SELENOP au niveau du testicule chez la souris (Tanguy et al., 2011), suggérant un rôle dans la spermatogénèse et la synthèse des androgènes.

La SELENOP et la GPx4 jouent un rôle important dans la spermatogénèse. En effet, la SELENOP est requise pour l'apport de sélénium au testicule (Flohé et al., 2007). Il a été montré que la GPx4 joue un rôle essentiel dans le maintien de la structure des spermatozoïdes, il semble que le sélénium a un effet indirect sur la spermatogénèse par sa régulation de la production de testostérone (Ingold et al., 2015). Enfin, une étude menée chez les bovins à montrer qu'une carence en sélénium diminue la fertilité et contribue à la formation de kystes ovariens, et un prolongement de l'anoestrus (Zarczynska et al., 2012).

Les mécanismes d'action des sélénoprotéines dans la régulation neuroendocrinienne de l'axe HHG, notamment dans la production et l'action de GnRH ne sont pas encore connus.

# **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Animaux

Des souris SELENOT floxées (SELENOT<sup>fl/fl</sup>) ont été produites à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France ; <http://www.ics-mci.fr/>). Pour cela, un fragment d'ADN de 1,1 kb contenant les exons 2 et 3 (E2-3) du gène murin codant pour la SELENOT (C57Bl/6J) 2810407C02Rik et une cassette du gène de résistance à la néomycine ont été insérés dans un vecteur de ciblage conditionnel de manière à flanquer E2-3 par des sites LoxP et le gène de résistance à la néomycine par des sites FRT. La construction linéarisée a été électroporée dans 129 cellules souches embryonnaires (ES) de souris Sv. Les cellules ES recombinantes ont été sélectionnées par co-traitement avec du gancyclovir et du G418. Après confirmation de la recombinaison par Southern blot, deux clones générés ont été injectés dans des blastocystes de souris, puis implantées dans des souris pseudo-gestantes, conduisant à la génération de 8 souris chimériques. Le gène de la néomycine flanqué par des sites FRT a été excisé en croisant les souris chimères avec des souris exprimant la recombinase flp au niveau germinale. Les souris ainsi générées ont ensuite été croisées avec des souris exprimant la recombinase Cre afin de favoriser la délétion génétique du motif thiorédoxine (Boukhzar et al., 2016 ; Castex et al., 2016). Le knock-out complet a été obtenu en croisant des souris SELENOT<sup>fl</sup> avec des animaux transgéniques CMV-Cre également obtenus à partir de l'Institut Clinique de la Souris. Pour éteindre sélectivement le gène de la SELENOT dans les cellules neurales, des souris SELENOT<sup>fl/fl</sup> ont été croisées avec des souris Tg (Nestin-Cre) 1 Kln +/- knock-in, acquises du Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Le génotypage a été réalisé par PCR via de l'ADN extrait à partir de la queue et des amorces spécifiques : SELENOT forward, 5'-GGCTTTATGTAAGCAGTTCTAAACTGTTTCTGC-3'; et reverse, 5'-CGCCCCATTTTATAAACTTTGTATGTTTATGCCC-3' pour les allèles wt (211 bp) et SELENOT<sup>fl</sup> (261 pb); et Cre forward, 5'-ATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATAAC-3' ; et reverse, 5'-GCCAGATTACGTATATCCTGGCAGC-3' pour l'allèle Nes-Cre (387 pb). L'allèle SELENOT a été identifié par PCR en utilisant l'ADN extrait à partir de cerveau et les amorces SELENOT forward, 5'-GGCTTTATGTAAGCAGTTCTAAACTGTTTCTGC-3'; et reverse, 5'-GCCTAGGTTTTACCTGAGAAACCAAAGG-3' (409 pb). L'absence de protéine SELENOT dans le cerveau de souris Nes d'extrait de protéines provenant du cortex de

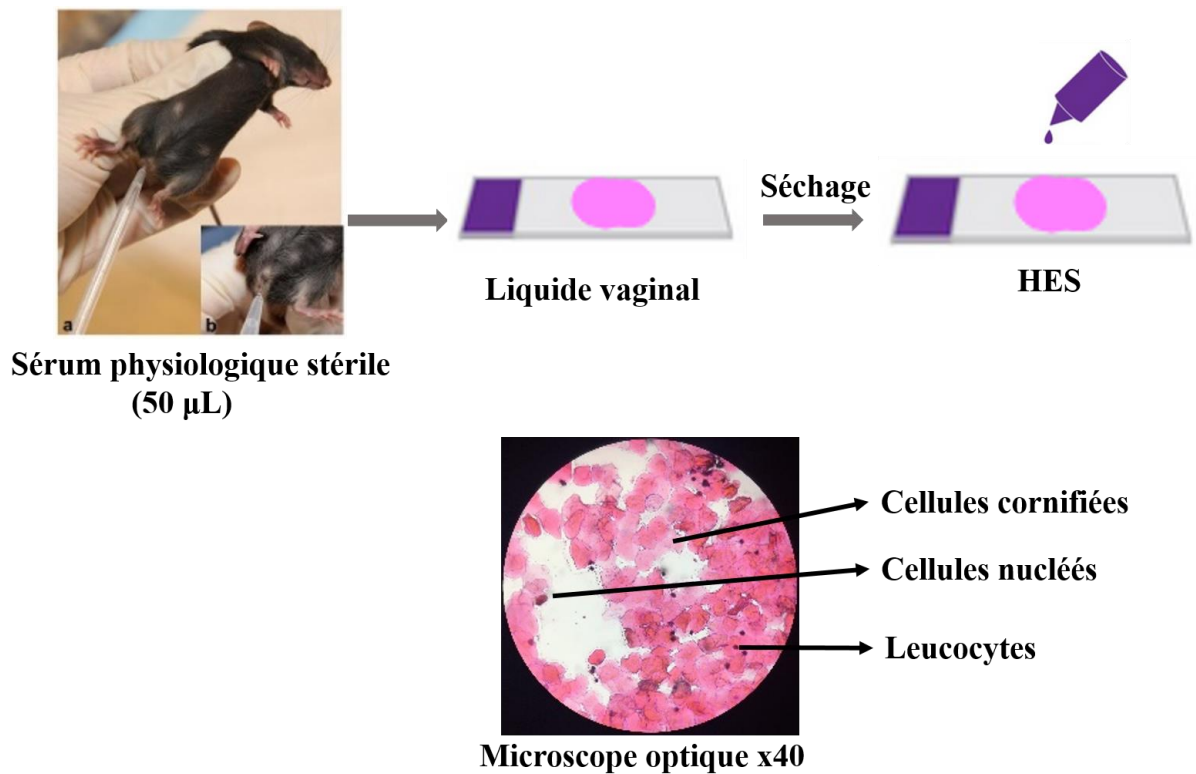
souris nouveau-nés. Les animaux ont été groupés par colonie et élevés à une température de  $22 \pm 2$  ° C avec un cycle lumière / obscurité de 12h (lumière allumée à 07h00) et un accès à la nourriture et à l'eau ad libitum. Toutes les procédures expérimentales ont été préalablement approuvées par le Comité d'éthique régional de Normandie (Autorisation n° 05-02-13/13 /02-16) et réalisées conformément à la Directive du Conseil Européen du 24 novembre 1986 (86/609/CEE).

## **2. Etude du cycle ovarien**

Le cycle estrien d'une souris femelle dure 4-5 jours et se caractérise par 4 stades : proestrus (jour du pic préovulatoire de LH), estrus (jour de l'ovulation), métestrus et diestrus. Le cycle estrien a pu être déterminé quotidiennement via des frottis vaginaux selon la technique décrite par McLean (Nelson et al., 1982 ; McLean et al., 1996). Le frottis vaginal est une technique de choix pour déterminer le stade ovarien car la muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle et ses modifications cytologiques reflètent les variations cycliques des hormones sexuelles. Les différentes phases du cycle estrien sont caractérisées par une cytologie particulière visible à un grossissement 40x ou 100x au microscope optique.

- Le métestrus (M) et le diestrus (D) se caractérisent par quelques cellules nucléées et une prédominance de cellules leucocytaires qui augmentent progressivement en nombre.
- Le proestrus (P) se caractérise par la présence d'une grande proportion de cellules nucléées et quelques cellules cornifiées.
- L'estrus (E) se caractérise par la présence des cellules cornifiées.

Le frottis, ou lavage vaginal, consiste en l'insertion douce dans l'ouverture du canal vaginal de la souris d'une pipette stérile préalablement remplie d'environ 30 à 50 µl de solution physiologique stérile (NaCl 9%) puis d'une aspiration douce répétée 3 à 5 fois pour obtenir un nombre suffisant de cellules dans un seul échantillon. Le liquide recueilli est étalé sur une lame de verre de microscope qui est par la suite séchée à température ambiante, colorée à l'hématoxyline-éosine (HE) puis examinée au microscope optique pour déterminer le type de cellules présentes dans le frottis (Figure 18).



**Figure 18 : Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole expérimental de frottis vaginal.**

### 3. Dosage hormonaux

Nous avons effectué des dosages hormonaux sur les souris SELENOT KO et témoin, mâles et femelles âgées de 3 mois. Les taux plasmatiques de la testostérone, de l'œstradiol et de la LH ont été mesurés par la technique d'ELISA.

### 4. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins effectués pour mesurer la concentration de la LH, Testostérone et œstradiol ont été réalisés par une technique non létale de microprélèvement au bout de la queue. Cette technique consiste à sectionner au ciseau moins d'un millimètre du bout de la queue des souris puis à masser la queue pour faire sortir au moins 4 µl de sang qui sont prélevés avec une pipette, puis immédiatement dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du tampon de phosphate salin tween 20 (PBST) (0.1M PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4) et congelés à -80°C jusqu'au dosage de LH. Or, le dosage de Testostérone et d'œstradiol nécessitent 40 µl du sang qui sont congelés immédiatement à -80°C.

La production de ces hormones pouvant être perturbée par le stress des souris, il est important d'habituer les souris à ces gestes avant de réaliser cette expérience.

## **5. Dosage ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

La concentration sanguine de LH a été mesurée par une technique d'ELISA mis au point par Steyn (Steyn et al., 2013). Le dosage se fait à l'aide d'une gamme de 12 échantillons standards de LH de souris (AFP-5306A, National Hormon and Peptide Program (NHPP)) préparés par dilution en cascade dans du PBST contenant 0.2% d'albumine bovine sérique pour obtenir des concentrations allant de 0 à 4 ng/ml.

Le premier jour, les puits d'une plaque de 96 puits sont recouverts de 50 µl d'un anticorps (AC) de capture anti-bovin LHβ (518β7, NHPP) à une dilution au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS. Après une nuit à 4°C, la solution d'AC est enlevée et les puits sont remplis de 200 µl d'un tampon de blocage (5% of skim milk powder in PBS) pendant une heure, puis les puits sont lavés trois fois avec du PBST pendant 3 minutes pour éliminer ce qui n'a pas été fixé par l'AC de capture. Ensuite les puits reçoivent, en duplicata, 50 µL de standards de LH et des échantillons de sang dilués. Le tout est incubé sous agitation douce pendant 2 heures. Après un lavage au PBST (3x3 minutes), 50 µL de l'AC primaire (AFP240580Rb, NHPP) sont déposés dans les puits à une dilution de 1/10000<sup>ème</sup> dans du tampon de blocage. Les plaques sont laissées 1,5 heure sous agitation à température ambiante puis rincées au PBST. L'étape suivante consiste à recouvrir les puits avec 50 µL de l'AC secondaire de chèvre anti-lapin (DAKO) couplé à la peroxydase de Raifort dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans un mélange équivalent en PBS et tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Les AC non fixés sont lavés avec trois lavages successifs de 200 µL de PBST. Finalement, le marquage est détecté par un système composé d'o-phénylènediamine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (OPD, Invitrogen) et d'un tampon de citrate phosphate qui est appliqué durant 30 minutes à température ambiante sous agitation et à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique consiste en une oxydation du complexe OPD- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la peroxydase de raifort qui produit un précipité jaune (Figure 19). La réaction est stoppée par l'ajout d'acide chlorhydrique (3 M) puis les densités optiques à 492 et 650 nm sont lues pour chaque puits par spectrophotométrie (Thermolab). A partir des densités optiques (DO) obtenues pour chaque valeur de LH standard, une droite d'étalonnage est réalisée

selon l'équation  $DO=2,3051x+0,0011875$ . Ensuite, la moyenne des deux densités optiques mesurées pour un même échantillon est intégrée à l'équation précédente.

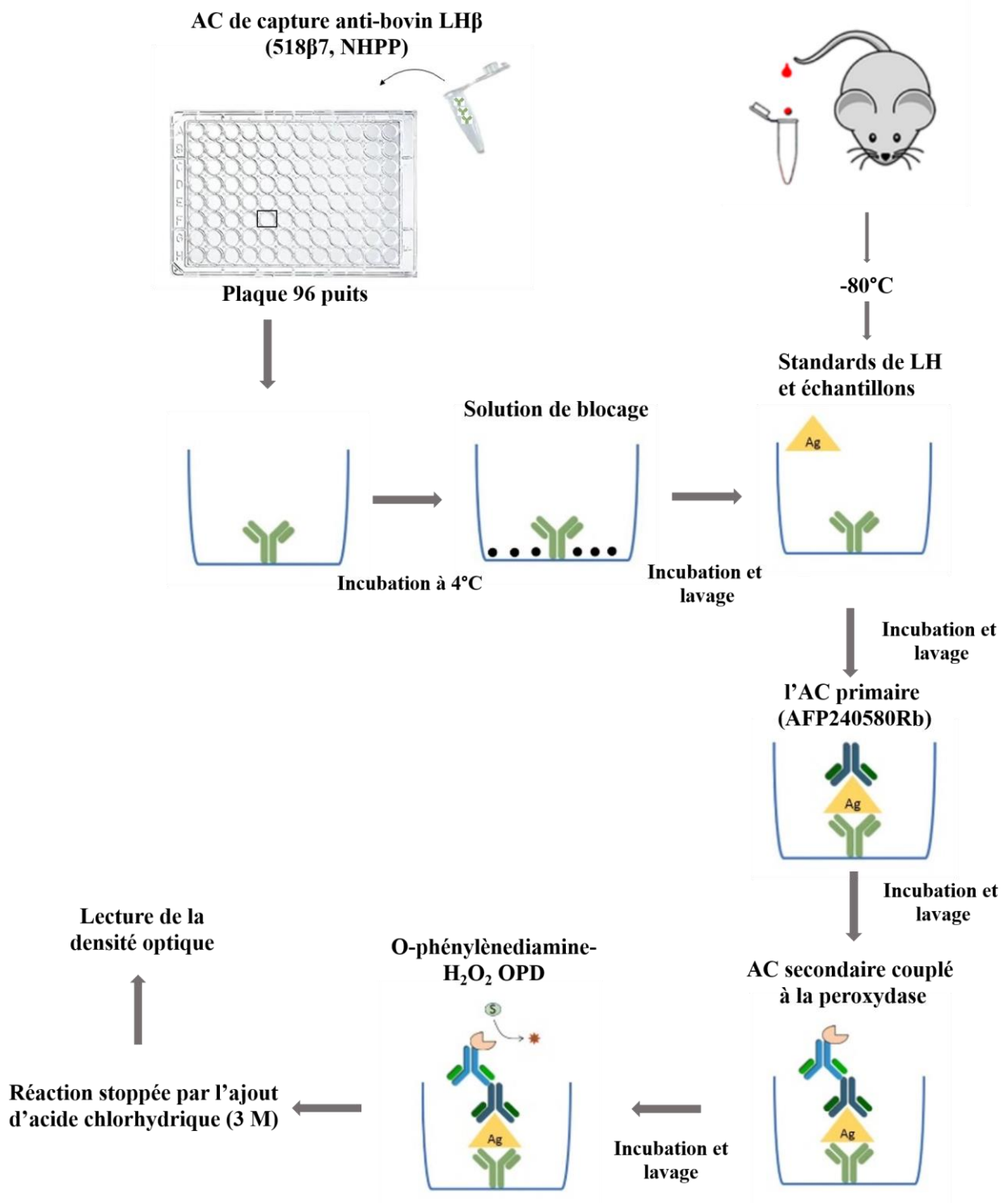


Figure 19 : Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole d'ELISA.



Des kits ELISA de testostérone et d'œstradiol de souris ont été utilisés pour mesurer la testostérone plasmatique (DEV9911 ; Demeditec Diagnostics, GmnH) et d'œstradiol (Cayman Chemical, Catalogue n : 582251, USA). Chez les femelles tous les échantillons du sang prélevés à été effectué durant la phase de diestrus.

## **6. Etude du comportement sexuel**

Des souris mâles et femelles âgés de 12 semaines ont été élevés individuellement pendant une semaine avant d'être utilisés. Le test a été réalisé dans une cage en plexiglas (40 cm × 26 cm × 21 cm) dans un environnement calme deux heures après l'extinction de la lumière rouge. Les souris mâles ont été placés individuellement dans la cage de test pour une préadaptation. Après 15 minutes, une femelle réceptive en phase d'estrus a été introduite dans la cage. Le test a été enregistré 2 heures sur vidéo et noté manuellement. Les souris mâles commencent généralement une rencontre sexuelle, le mâle effectue une série de montées et d'intromissions qui se terminent par l'éjaculation, une nouvelle série de montées et d'intromissions commence. En effet, deux semaines avant de procéder au test, des mâles naïfs témoin et SELENOT KO ont été hébergés individuellement. Ensuite, chaque mâle a été accouplé dans sa cage d'origine avec une femelle témoin sexuellement réceptive. Cette première expérience sexuelle a été réalisée pour renforcer les différents comportements sexuels tels que la préférence olfactive, les vocalisations ultrasoniques et l'intérêt sexuel des mâles envers les femelles réceptives afin de conférer une plus grande efficacité de copulation (Capela et al., 2018). Par la suite, le test est réalisé et les différents événements réalisés par le mâle sont analysés : les latences (temps mis pour réaliser l'événement) de la première montée et de l'intromission, le nombre de montées et de l'intromissions, l'efficacité copulatoire (fréquence de l'intromission divisée par la somme de la fréquence de montée et la fréquence de l'intromission) (Figure 20).

La montée est définie lorsqu'un mâle utilise ses deux pattes antérieures pour grimper sur une femelle par derrière en vue de la copulation. L'intromission a été définie comme une poussée pelvienne du mâle avec une fréquence stable en continu.

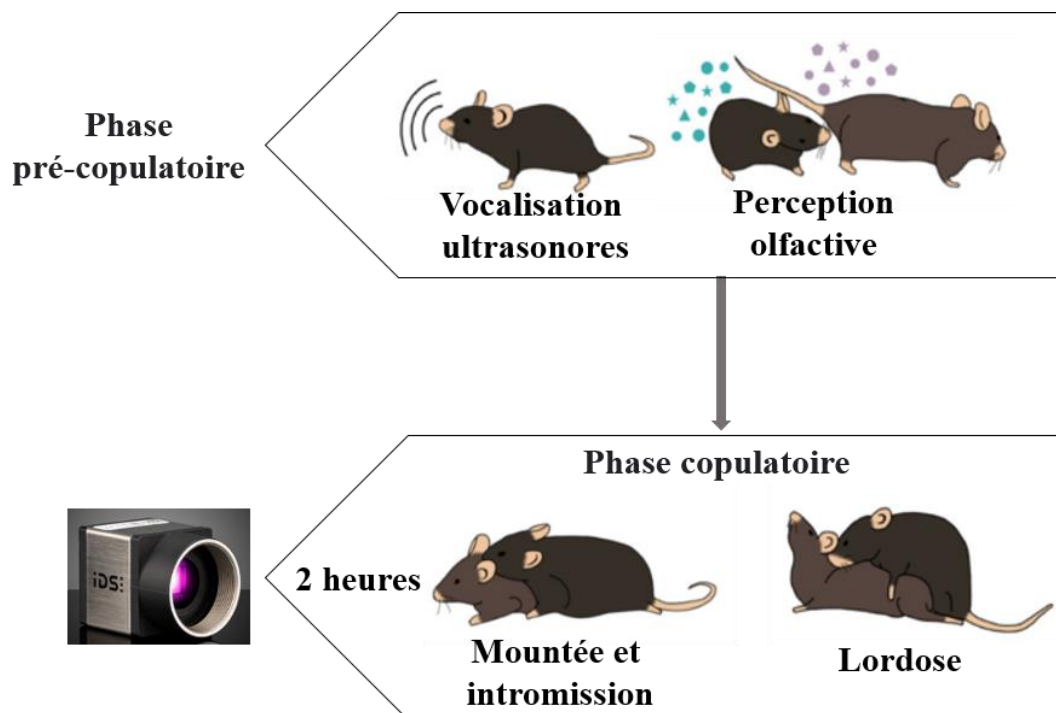
La latence de montée a été déterminée comme le temps entre l'introduction d'une souris femelle et la première montée. La latence d'intromission a été déterminée comme le temps entre l'introduction d'une souris femelle et la première intromission. La fréquence de

montée a été calculée comme le nombre de montée pendant la session de test. La fréquence d'intromissions a été calculée comme le nombre d'intromissions pendant la session de test.

## 7. Etude de la réceptivité sexuelle chez la femelle (lordose)

Pour évaluer la réceptivité des souris femelles, la mesure la plus fréquemment utilisée est le réflexe stéréotypé de lordose (Bonthuis, et al., 2010). Le réflexe de lordose se produit en réponse à une montée par un mâle et généralement associé à une intromission puis à une éjaculation (Paredes et Vazquez, 1999). Cette posture est déterminée à partir des critères suivants : les quatre pattes sont au sol, la tête est relevée, le dos est arqué et la queue est dirigée vers le haut (Figure 20).

Le coefficient de lordose (QL= nombre de position de lordose divisé par le nombre de montée reçues (x-100)) est calculé pour chaque femelle.



**Figure 20** : Schéma représentant les différentes phases du comportement sexuel chez la souris.

## 8. Test de fertilité

La fertilité des souris a été estimée par le taux de gestation, le nombre de naissance et le nombre de petits nés par naissance (taille de portée). En effet, la fourchette d'âge qui a été utilisée pour mettre en place cette étude de fertilité chez la souris est de 12 semaines, âge auquel la maturation sexuelle est terminée dans la plupart des conditions expérimentales. L'étude de fertilité a été réalisée pendant 5 mois, chaque mâle a été mis en cage avec trois souris femelles, le mâle a été retiré des femelles après 7 jours. La date de mise en place de l'accouplement, la date de naissance des portées et le nombre de petits nés, y compris les petits morts et vivants ont été notés et enregistrés. La gestation a été vérifiée en pesant les femelles chaque jour et en surveillant les bouchons de mucus vaginal.

## 9. Etude histologique

Nous avons réalisé une étude histologique afin de déterminer la morphologie des gonades. Pour ceci, les ovaires, les testicules et les epididymes prélevés sur les animaux SELENOT KO et contrôles ont été fixés toute une nuit dans une solution de PFA 4% à pH 7,4 à 4°C et en Bouin à température ambiante respectivement. Les échantillons ont été déshydratés, inclus dans la paraffine (Tableau 2), puis sectionnés en coupes de 5 µm puis finalement fixées sur des lames histologiques.

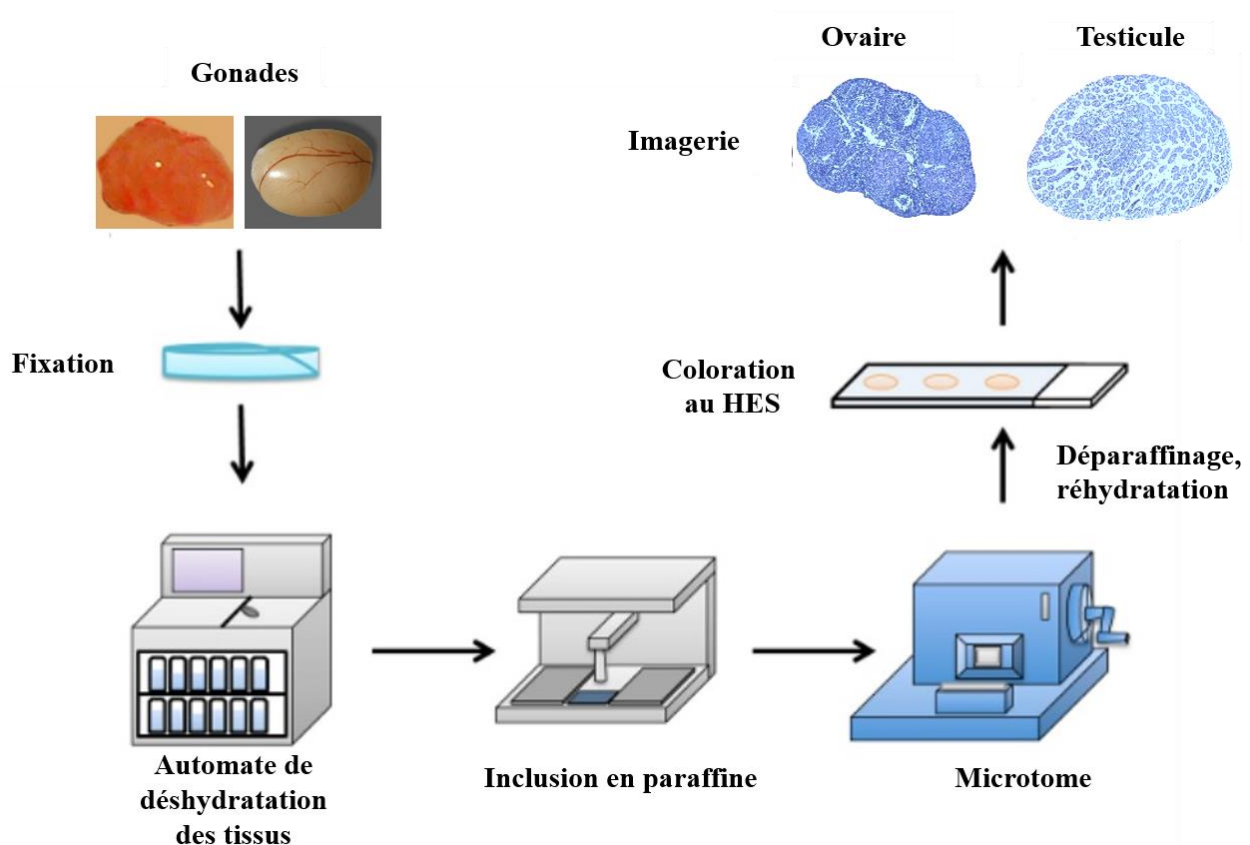
Tableau 2 : Technique utilisée pour la déshydratation et l'inclusion à la paraffine.

	durée des bains
Ethanol 70%	6 h
Ethanol 70%	6 h
Ethanol 70%	5 h
Ethanol 70%	1 h
Ethanol 70%	1 h
Butanol (1)	2 h
Butanol (2)	5 h
Butanol (3)	4 h
Paraffine (1)	2 h
Paraffine(2)	> 2 h

Après déparaffinage, réhydratation (Tableau 3) et lavage au PBS, des coupes de testicules ont été choisies aléatoirement pour chaque groupe et marqué à l'hématoxyline-eosine-safran. Les coupes ont été déshydratées puis montées entre lame et lamelle (Figure 22). Les follicules primaire, secondaire, tertiaires et corps jaune de toutes les coupes ovariennes ont été comptés à l'aide d'un microscope optique (Zeiss Axioscope, BrightField Germany).

Tableau 3 : Technique de déparaffinage et de réhydratation.

	durée des bains
Toluène (1)	10 min
Toluène (2)	10 min
Toluène (3)	10 min
Ethanol 100 % x 2	5 min
Ethanol 95 % (1) x2	2 min
Ethanol 90 %	2 min
Ethanol 80 %	2 min
Ethanol 70 %	2 min
Ethanol 60 %	2 min
Ethanol 50 %	2 min
H2O	2 min



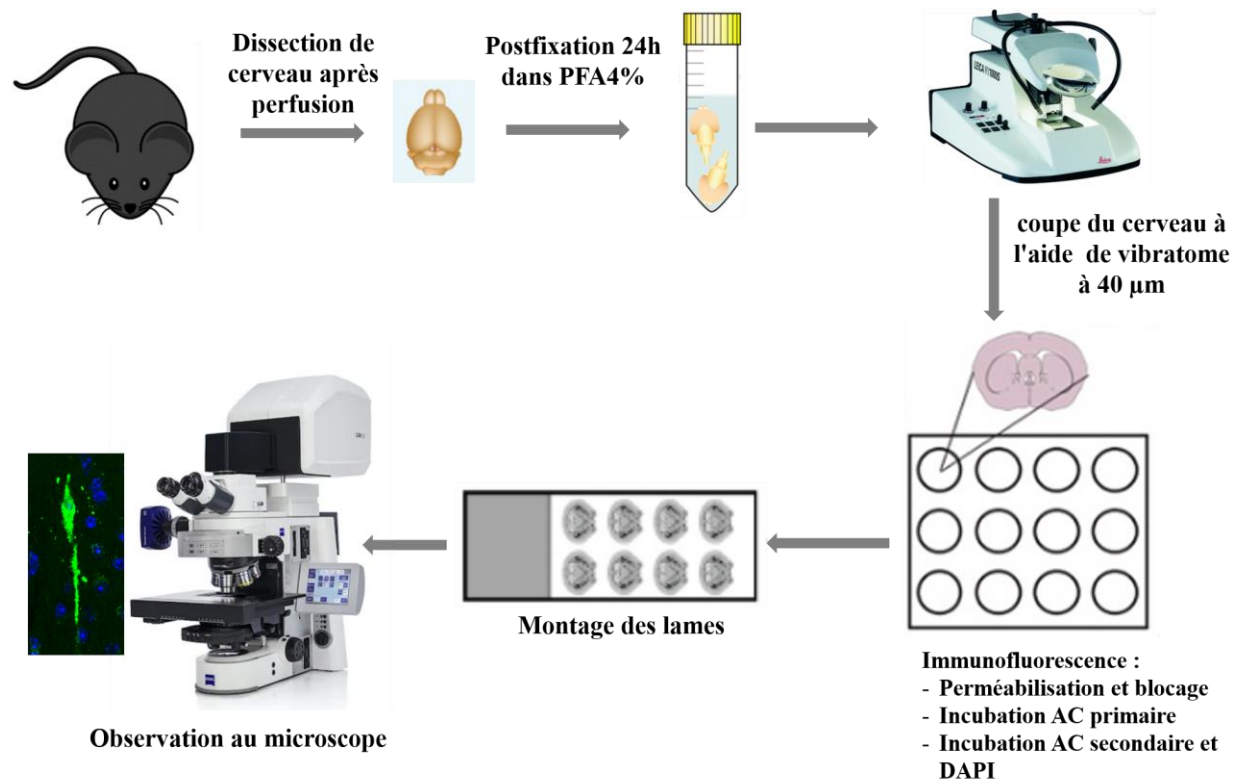
**Figure 22 : Schéma récapitulant les différentes étapes de l'étude histologique.**

## 10. Etude immunohistochimique

Les animaux anesthésiés avec de la ketamine (100 mg/kg) et la xylazine (10 mg/kg) (Ceva Santé Animale, Libourne, France) sont perfusés par voie intracardiaque avec 0,9% de NaCl dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), puis avec 4% de paraformaldéhyde (PFA) dans du PBS. Les cerveaux ont été prélevés et post-fixés à 4°C dans le même fixateur, remplacé après 24h par du sodium azide. Les tissus ont été coupés en tranches de 40 µm avec un vibratome.

Les coupes ont été incubées avec du sérum d'âne à 1% dilué dans du BSA à 1% et du Triton X-100 à 0,3% dans du PBS pendant 2 h à température ambiante, puis exposées pendant une nuit à 4°C à un anticorps primaire, anti-GnRH dilué 1/5000<sup>ème</sup> (gracieusement fourni par le Dr, Y. Tillet), anti-SELENOT dilué 1/200<sup>ème</sup> (Grumolato et al., 2008), anti-TH dilué 1/500<sup>ème</sup> (Millipore, Temecula, CA) et anti-Kiss dilué 1/200<sup>ème</sup> (AC053; gracieusement fourni par le Dr, Alain Caraty, National Institute for Agronomic Research, France). L'immunocoloration a été visualisée en utilisant un anticorps

secondaire conjugués à l’Alexa Fluor 488 dilué au 1/200<sup>ème</sup> (Invitrogen, Saint Aubin, France). Une contre-coloration avec du 4,6-diamino-2-phénylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) à 1 pg/ml dans du PBS pendant 1 min a été effectuée avant le montage des lames avec PBS / Glycerol (50/50). Les échantillons ont été analysés avec un microscope confocal à balayage laser Leica SP8 (DMRAX-UV, Leica Microsystems, Nanterre, France).



**Figure 21 : coloration basée sur l’immunofluorescence à l’aide de coupe flottante du cerveau.**

## 11. Imagerie tridimensionnelle par immunomarquage d’organes entiers (IDISCO)

### - Immunomarquage du cerveau entier

Les cerveaux post-fixés dans du PFA 4% pendant une nuit à 4°C ont été lavés deux fois dans du PBS pendant 1h, puis incubés par phases d’une heure dans des solutions de méthanol/ H<sub>2</sub>O (20%, 40%, 60% et 80%) puis deux fois dans du méthanol à 100% pendant une heure. Ils sont ensuite blanchis avec une solution d’H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5% dans du méthanol à 100% pendant une nuit à 4°C dans l’obscurité et sans agitation. Les cerveaux ont été réhydratés successivement dans du méthanol à 80%, 60%, 40%, 20%, et du PBS par

phases d'une heure. Les cerveaux ont été incubés dans une solution de perméabilisation (0,2% de Triton X-100, 20% de DMSO et 0,3M de glycine dans du PBS) à 37°C pendant 2 jours et sous agitation. Les cerveaux sont transférés dans une solution de blocage (0,2% de Triton X-100, 6% de sérum d'âne, 10% de DMSO dans du PBS) à 37°C pendant 2 jours et sous agitation. Les cerveaux ont ensuite été lavés dans une solution de PBS contenant 0,2% de Tween-20, 10 µg/ml d'héparine pendant 36 heures.

Les cerveaux sont incubés avec l'anticorps primaire (anti-GnRH de lapin, gracieusement fourni par le Dr, Y. Tillet) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans une solution d'incubation (0,2% de Tween-20, 5% de DMSO, 10 µg/ml d'héparine, 3% de sérum d'âne dans du PBS) pendant 7 jours à 37°C et sous agitation. Les cerveaux ont ensuite été lavés avec la solution de lavage pendant un jour, puis incubés avec l'anticorps secondaire (anti-lapin d'âne Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch, Interchim, Montluçon, France) dilués au 1/500<sup>ème</sup> dans une solution d'incubation (0,2% de Tween-20, 10 µg/mL d'héparine, 3% de sérum d'âne dans du PBS) pendant 7 jours à 37°C et sous agitation. Les cerveaux ont ensuite été lavés dans la solution de lavage pendant 24 heures (Figure 23).

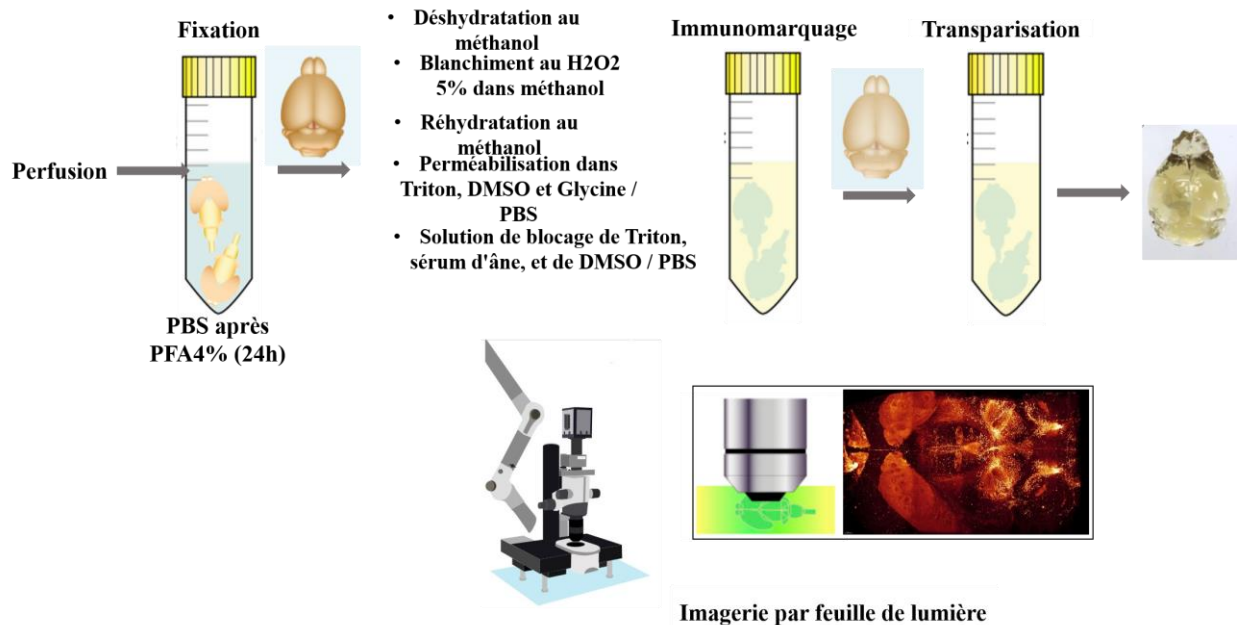
#### **- Procédure de transparence**

Les cerveaux ont été déshydratés par phases d'incubations d'une heure dans une solution de méthanol/ H<sub>2</sub>O (20 %, 40 %, 60 % et 80 %) puis deux fois dans du méthanol à 100 % pendant une heure, sous agitation. Les cerveaux ont ensuite été incubés pendant une nuit dans 1 volume de méthanol à 100 % et 2 volumes de dichlorométhane anhydre à 100% (Sigma-Aldrich) à température ambiante, puis lavés deux fois pendant 15 minutes dans du dichlorométhane à 100% sous agitation. Enfin, les cerveaux ont été incubés dans de l'éther dibenzyle à 100 % (Sigma-Aldrich) pendant au moins 3 heures sous agitation avant imagerie (Figure 23).

#### **- Imagerie par feuille de lumière**

Les acquisitions ont été réalisées via l'ultramicroscope II (LaVision BioTec, Bielefeld, Allemagne) en utilisant une longueur d'onde de 640 nm générée par un laser (Coherent Sapphire Laser, LaVision BioTec). Un stéréomicroscope binoculaire (MXV10, Olympus, Bielefeld Allemagne) a été utilisé avec un grossissement de 0,63x.

L'image tridimensionnelle a été construite à partir d'une série Z d'images de fluorescence en utilisant le logiciel Imaris, version 9.0.0\_64 (<http://bitplane.com>, Zürich, Suisse). Les images en trois dimensions et les séries tiff ont été obtenues à l'aide de l'outil "Snapshot" et le comptage manuel des neurones à GnRH a été effectué avec l'outil "Clipping plan".

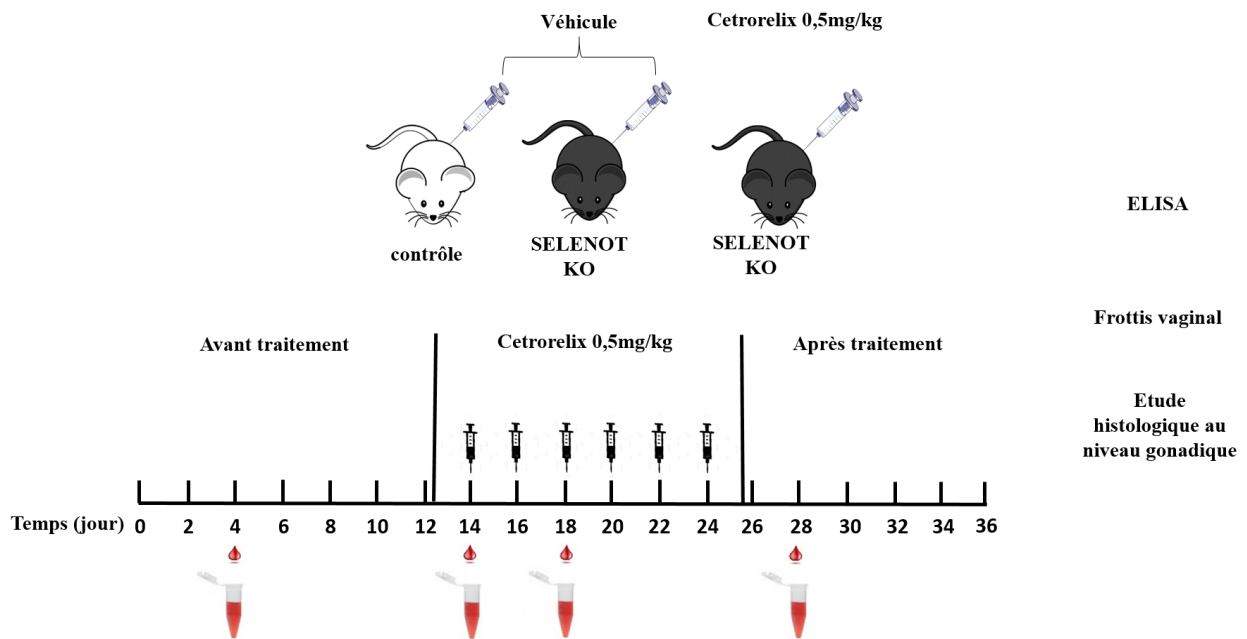


**Figure 23 : Schéma représentant la technique d'immunofluorescence et d'imagerie 3D de cerveaux transparisés.**

## 12. Protocole du traitement à l'antagoniste de la GnRH

Les femelles adultes ont été cyclées pendant 12 jours avant le début du traitement. La cytologie vaginale a été analysée sous le microscope afin d'identifier le jour spécifique du cycle estrien. Les animaux ont reçu une injection i.p. de 200  $\mu$ L d'une solution contenant 0,5 mg/kg de l'antagoniste de la GnRH, l'acétate de cetrorelix (Sigma, cat. #C5249) dans du PBS 0,01 M (pH 7,4), tous les deux jours pendant 12 jours. Des échantillons du sang de la queue ont été prélevés afin de mesurer la LH avant le début du traitement, aux jours 2 et 6 du traitement puis au jour 4 après la dernière injection (sans traitement). Chez les femelles adultes ayant reçu une injection de PBS, le sang de la queue a été prélevé pendant les mêmes fenêtres temporelles que pour les souris ayant reçu l'acétate de cetrorelix. La cyclicité œstrale a été suivie quotidiennement à la même heure avant, pendant et après le traitement avec l'antagoniste de la GnRH (Figure 24).





**Figure 24 : Schématisation de l'expérience du traitement à l'antagoniste de la GnRH.**

### Analyses statistiques

L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, USA). La significativité statistique des différences entre les groupes a été déterminée par le test *t* de student. Pour les courbes de l'expérience du traitement à l'antagoniste de la GnRH, les comparaisons statistiques entre les groupes ont été faites en utilisant one-way ANOVA.

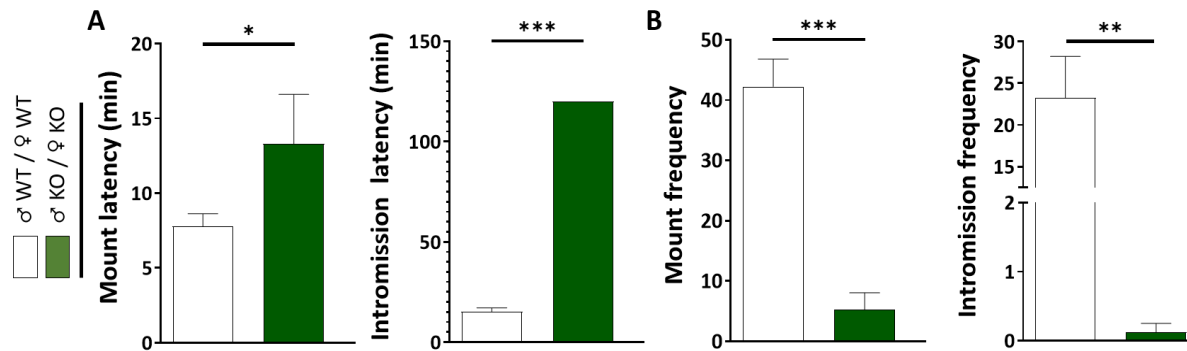
# **RESULTATS**

## **I. La déficience en SELENOT dans le cerveau entraîne un comportement sexuel altéré**

Le comportement sexuel est essentiel à la survie de nombreuses espèces. Chez la souris femelle, la préférence pour le mâle et le comportement copulatoire dépendent des phéromones et sont synchronisés avec l'ovulation pour assurer le succès de la reproduction. Chez le mâle, le comportement copulatoire est initié en présence d'une femelle réceptive (en phase d'estrus). Les circuits neuronaux activés par les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes jouent un rôle primordial dans le contrôle du comportement sexuel chez la souris, et sont peu étudiés.

### **1-1- Etude du comportement sexuel chez le couple SELENOT KO**

Afin de déterminer l'impact de la suppression de la SELENOT dans le cerveau sur le comportement sexuel, et donc sur la fertilité, nous avons tout d'abord effectué une analyse du comportement sexuel chez les souris adultes SELENOT KO par rapport à des souris témoins de même âge (3 mois). Nous avons aussi analysé le coefficient de lordose et les différents événements réalisés par le mâle à savoir : les latences (temps mis pour réaliser l'événement) de la première montée et de l'intromission (mouvements de va et vient), le nombre de montées et d'intromissions et l'efficacité copulatoire (fréquence de l'intromission divisée par la somme de la fréquence de montée et de l'intromission). L'analyse du comportement sexuel consiste à introduire une souris femelle sexuellement réceptive dans la cage de test qui contient auparavant un mâle, les comportements de montée, d'intromission sont évalués en termes de durée et de nombre d'occurrences pendant deux heures. Notre analyse du comportement sexuel des souris mâles SELENOT KO mis avec des femelles SELENOT KO ( $\text{♂ SELENOT}^{-/-}/\text{♀ SELENOT}^{-/-}$ ) a montré que les souris mâles sont incapables d'initier un accouplement, et ont présenté un temps de latence de montée et d'intromission plus long par rapport aux souris mâles témoins misent avec des femelles témoins ( $\text{♂ WT}/\text{♀ WT}$ ) (Fig. 25A). Nous avons noté également une baisse de la fréquence de montées et d'intromissions chez le groupe SELENOT KO par rapport au groupe témoin (Fig. 25B).



**Figure 25 : Comportement sexuel des souris SELENOT<sup>-/-</sup> (P90).** (A, B), analyse du comportement sexuel des mâles SELENOT<sup>-/-</sup> accouplés avec des femelles SELENOT<sup>-/-</sup> (♂ KO/♀ KO, n = 8), groupe témoin (♂ WT/♀ WT, n = 11). Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

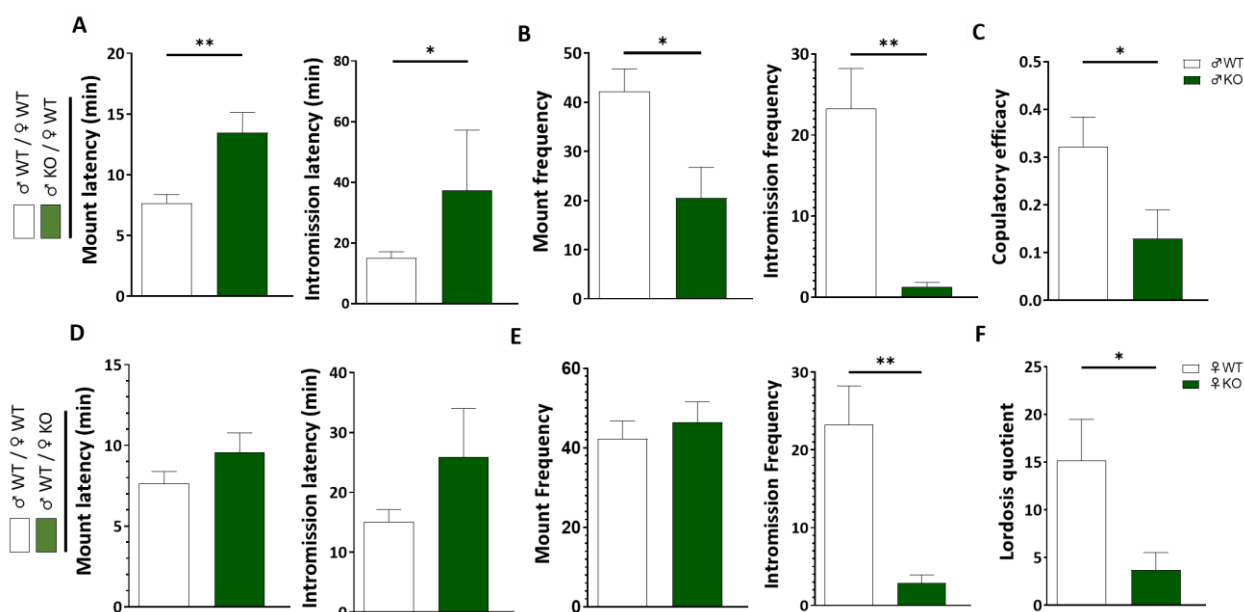
### 1-2- Etude du comportement sexuel chez la souris SELENOT KO croisée avec une souris témoin.

Les souris mâles commencent généralement une rencontre sexuelle, le mâle effectue une série de montées et d'intromissions qui se terminent par l'éjaculation, une nouvelle série de montées et d'intromissions commence. Des études suggèrent que la montée et l'intromission, dépendent de la stimulation cutanée d'une manière similaire à la posture de lordose chez les femelles (Youn et al, 2015). La réceptivité chez la femelle correspond à l'ensemble des réactions féminines nécessaires et suffisantes pour une copulation fertile avec un mâle, notamment le réflexe stéréotypé de lordose qui maintient un contact suffisamment longtemps pour que l'éjaculation intra-vaginale puisse se produire. Pour cela, le comportement sexuel pour chaque sexe a été évalué séparément, nous avons tout d'abord analysé le comportement sexuel chez le mâle SELENOT KO mis avec une femelle témoin sexuellement réceptive. Le comportement sexuel chez le mâle SELENOT KO montre une augmentation du temps de latence de montée et d'intromission (Fig. 26A), et une baisse de la fréquence des montées et d'intromissions (Fig. 26B). De même, une diminution significative de l'efficacité copulatoire a été observée chez les mâles SELENOT KO accouplés aux femelles témoins par rapport au groupe témoin (Fig. 26C).

Chez la femelle SELENOT KO, l'analyse du coefficient de lordose dépend du nombre de position de lordose et du nombre de montée réalisé par le mâle témoin pendant le test. Nous avons constaté que le temps de latence et la fréquence des montées, qui dépendent

de l'efficacité de mâle, n'ont pas été modifiés en présence d'une souris femelle SELENOT KO accouplée avec un mâle témoin ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  SELENOT<sup>-/-</sup>) (Fig. 26D).

Cependant, la fréquence d'intromission, était nettement diminuée chez le mâle témoin accouplé avec une femelle SELENOT KO par rapport au groupe témoin (Fig. 26E). Cette baisse de la fréquence d'intromission a été confirmée par l'analyse du coefficient de lordose, qui est significativement faible chez les femelles SELENOT KO par rapport aux femelles témoins (Fig. 26F). Enfin, nous avons observé, chez ces femelles, un comportement de rejet du mâle plus fréquent que celui du groupe témoin.



**Figure 26 : Comportement sexuel des souris SELENOT<sup>-/-</sup> avec des souris témoin (P90).** (A, B), analyse du comportement sexuel des mâles SELENOT<sup>-/-</sup> accouplés avec des femelles témoin ( $\sigma$  KO/ $\varphi$  WT, n =8), groupe témoin ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  WT, n = 11). (C), efficacité copulatoire. (D, E), analyse du comportement sexuel des mâles témoin accouplés avec des femelles SELENOT<sup>-/-</sup> ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  KO, n =8), groupe témoin ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  WT, n = 11). (F), le coefficient de lordose. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P< 0,05, \*\*P< 0,01, \*\*\*P< 0,001.

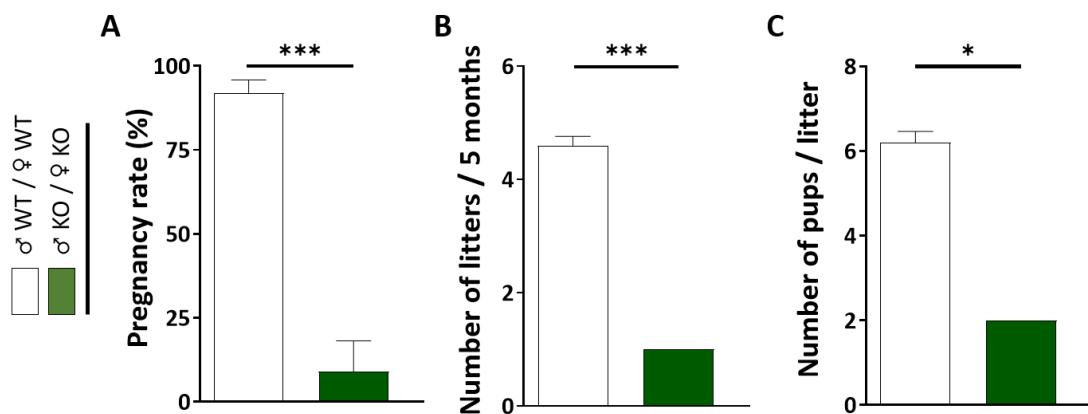
## I- La déficience en SELENOT dans le cerveau entraîne une infertilité

La méthode utilisée pour analyser la fertilité chez les souris est basée sur la performance reproductive. Notamment, le taux de gestation, la taille et le nombre de portées (ou l'indice de fertilité) au cours de la vie reproductive de la souris. En effet, chaque mâle a été mis en cage avec trois souris femelles, le mâle a été retiré des femelles après 7 jours, et la gestation a été vérifiée en pesant les femelles chaque jour et en

surveillant les bouchons de mucus vaginal, les femelles et les mâles SELENOT KO et témoins étaient âgées de 11 semaines.

### 2-1- Analyse de la fertilité chez le couple SELENOT KO.

Dans une durée de cinq mois, nous avons soumis les souris à des tests d'accouplement, au cours desquelles les femelles témoins ont été accouplées avec les mâles témoins (♀ WT / ♂ WT) et les femelles SELENOT KO ont été accouplées avec les mâles SELENOT KO (♀ KO / ♂ KO). Comme le montre la figure 27, le taux de gestation des femelles était significativement réduit dans le groupe SELENOT KO par rapport au groupe témoin qui représente un comportement reproductif normal (Fig. 27A). De plus, le nombre de portée (Fig. 27B) et le nombre de nouveau-né par portée (Fig. 27C) produits sur une période de cinq mois était plus faible chez le groupe SELENOT KO par rapport au groupe témoin.



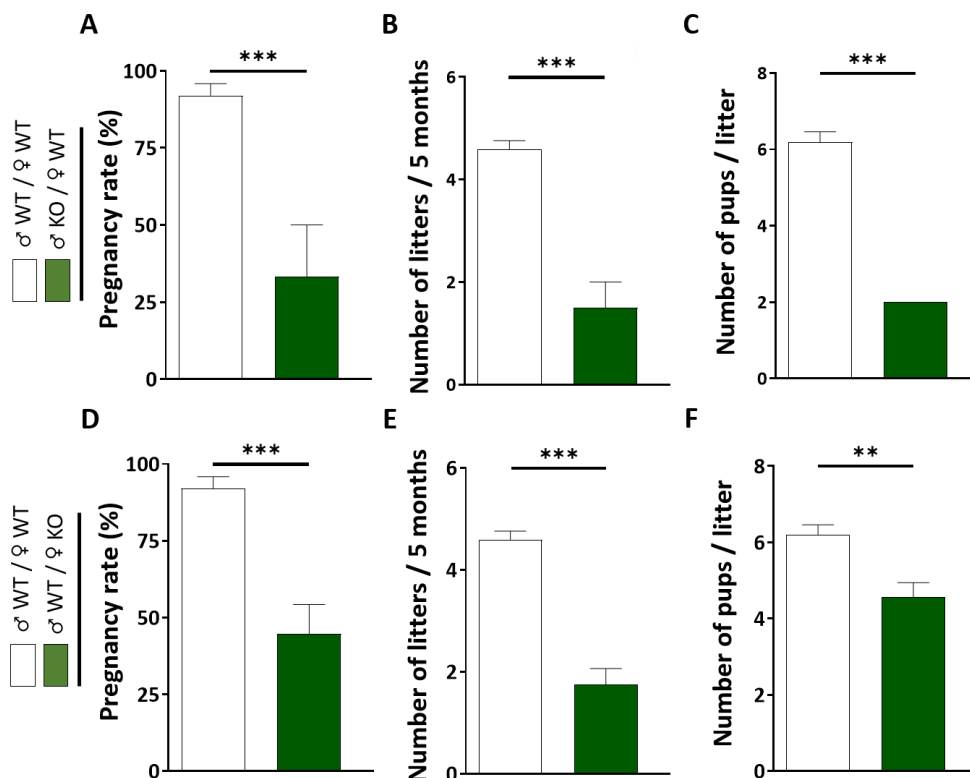
**Figure 27 : Evaluation de la fertilité des souris SELENOT<sup>-/-</sup> (P90).** L'accouplement a été effectué pendant 5 mois. (A), pourcentage de gestation. (B), nombre de portée. (C), nombres de nouveau nés par portée obtenus après accouplement entre mâle SELENOT<sup>-/-</sup> et femelle SELENOT<sup>-/-</sup> (♂ KO/♀ KO, n =8), groupe témoin (♂ WT/♀ WT, n =10). Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P< 0,05, \*\*P< 0,01, \*\*\*P< 0,001.

### 2-2- Analyse de la fertilité chez la souris SELENOT KO croisée avec une souris témoin.

Les femelles SELENOT KO accouplées avec les mâles SELENOT KO ont engendrés moins de portée avec un nombre réduit de souriceaux. Afin d'analyser la fertilité pour chaque sexe, les femelles témoins ont été accouplées avec des mâles SELENOT KO (♀ WT / ♂ KO), et le taux de gestation, nombre de portée et leur taille ont été également suivis pendant 5 mois. En effet, le nombre des femelles témoins devenant

gestantes après accouplement avec un mâle SELENOT KO était significativement plus réduit par rapport au groupe témoin (Fig. 28A). De ce fait, ces femelles témoins ont eu moins de portées (Fig. 28B) et la taille de portée produite sur 5 mois était significativement plus réduite par rapport au groupe témoin (Fig. 28C). La fertilité des femelles SELENOT KO a également été évaluée avec un mâle témoin ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  SELENOT<sup>-/-</sup>), l'accouplement effectué a montré que le nombre des femelles SELENOT devenant gestantes après accouplement avec un mâle témoin était significativement plus réduit par rapport au groupe témoin (Fig. 28D).

Le nombre de portée (Fig. 28E) et le nombre de nouveau-nés par portée (Fig. 28F) était significativement plus réduit chez les femelles SELENOT KO accouplées avec des mâles témoins par rapport au groupe témoin.



**Figure 28 : Evaluation de la fertilité des souris SELENOT<sup>-/-</sup> avec des souris témoin (P90).** L'accouplement a été effectué pendant 5 mois. (A), pourcentage de gestation. (B, C), nombre de portée et nombre de nouveau nés par portée obtenus après accouplement entre mâle SELENOT<sup>-/-</sup> et femelle témoin ( $\sigma$  KO/ $\varphi$  WT, n = 8), groupe témoin ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  WT, n = 8). (D), pourcentage de gestation. (E, F), nombre de portée et nombre de nouveau nés par portée obtenus après accouplement entre mâle témoin et femelle SELENOT<sup>-/-</sup> ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  KO, n = 8), groupe témoin ( $\sigma$  WT/ $\varphi$  WT, n = 8). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

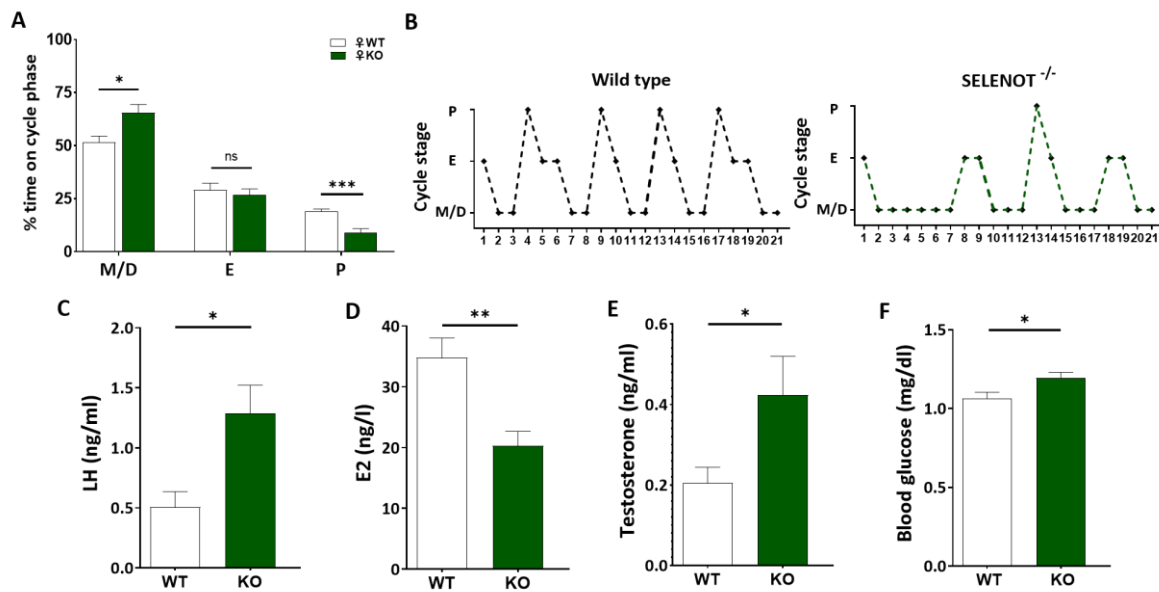
## **II. Les souris femelles SELENOT KO présentent une stéroïdogénèse altérée et un défaut de développement folliculaire**

Le cycle oestral comporte quatre phases, à savoir le proestrus, l'œstrus, le métœstrus et le diestrus, et dure de 4 à 5 jours. L'estimation de la phase du cycle oestral est basée sur la proportion des cellules trouvées dans la sécrétion vaginale, il s'agit des leucocytes, des cellules épithéliales nucléées et des cellules épithéliales cornées. Notre analyse du cycle oestral montre que la majorité des femelles SELENOT KO présentent un cycle ovarien dérégulé (oligo-ovulation).

En effet, les femelles SELENOT KO atteignaient rarement le stade pré-ovulatoire du cycle oestral (proestrus), passaient une durée prolongée en métœstrus/diœstrus et passaient une durée presque identique en œstrus par rapport aux femelles témoins (Fig. 29A, B), ce qui pourrait expliquer l'infertilité observée chez les souris femelles SELENOT KO. La dérégulation des taux d'hormones sexuelles peut altérer le déroulement normal du cycle ovarien et mener à des cycles anovulatoires. En effet, le cycle ovarien est sous le contrôle des stéroïdes, lorsqu'une concentration seuil en œstrogènes est atteinte, signalant que l'ovulation peut avoir lieu, les œstrogènes exercent un rétrocontrôle positif au niveau de l'hypothalamus, qui déclenche un pic de LH permettant l'expulsion de l'ovule. Cet événement marque le début de la phase lutéale, pendant laquelle en plus des sécrétions oestrogéniques, les cellules de la granulosa lutéinisées vont se mettre à produire de la progestérone qui aura aussi un rôle de rétrocontrôle négatif sur l'axe HHG.

Les dosages hormonaux effectués dans notre étude ont révélé que le taux plasmatique de LH était plus élevé chez les femelles SELENOT KO (Fig. 29C), tandis que le taux plasmatique d'œstradiol était plus faible (Fig. 29D) et le taux plasmatique de testostérone était plus élevé (Fig. 29E) par rapport aux souris femelles témoins. On peut alors conclure que les dérégulations hormonales présentaient chez les femelles SELENOT KO se répercutent sur la régulation du cycle ovarien et du comportement sexuel et donc sur la fertilité. Nous avons également mesuré la glycémie à jeun chez les souris SELENOT KO, une hyperglycémie a été observée chez ces souris SELENOT KO par rapport aux souris femelles témoins (Fig. 29F).

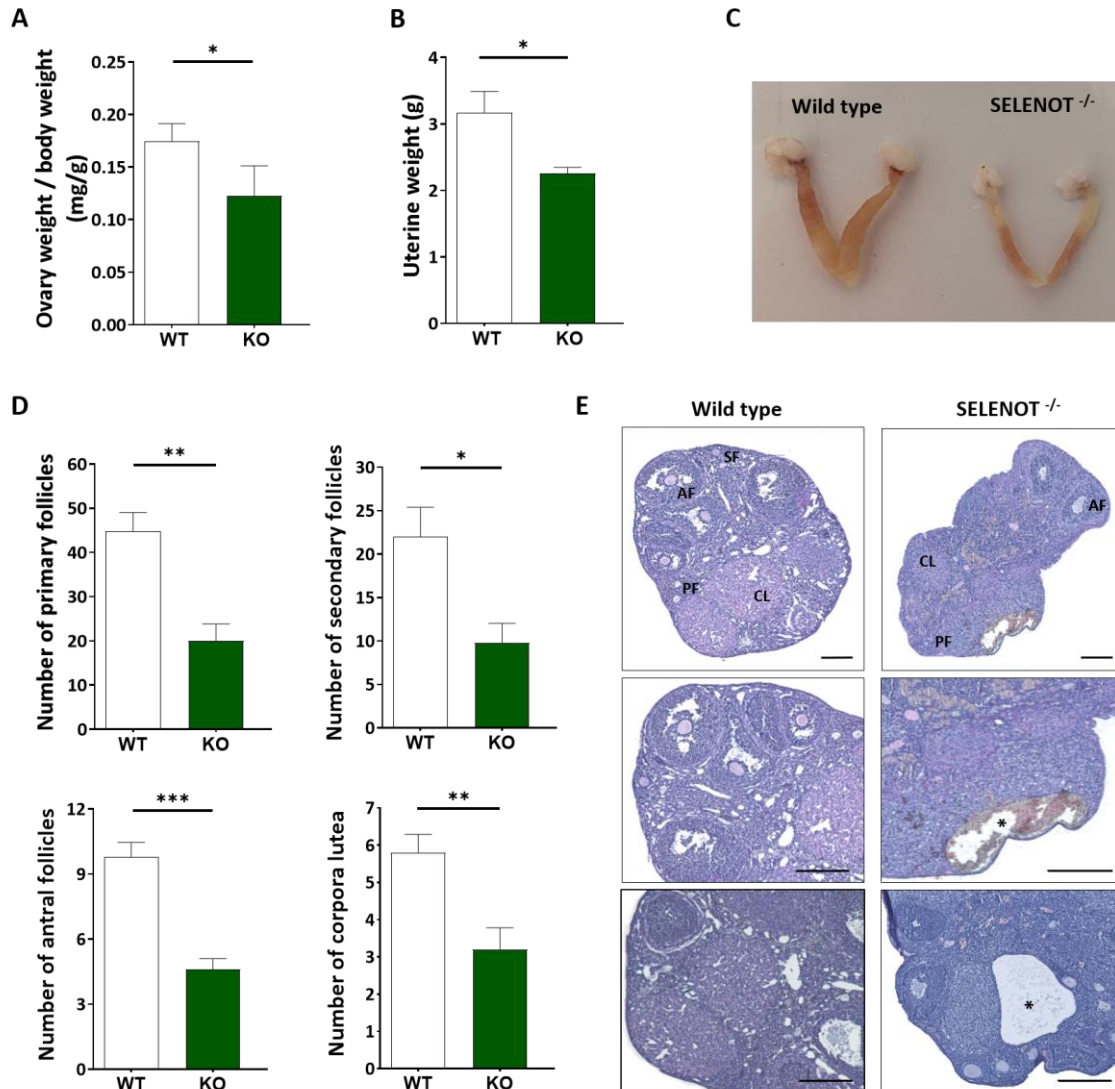




**Figure 29 : Cycle ovarien et niveaux d'hormones circulantes chez les femelles SELENOT<sup>-/-</sup> (P90-P120).** (A), pourcentage du temps passé à chaque stade du cycle oestral (E, œstrus ; M/D, métœstrus/diœstrus ; P, proœstrus) chez les femelles adultes témoin, n = 7 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. (B), cycle oestral représentatif de 7 souris par groupe pendant 21 jours consécutifs. (C), concentration plasmatique de LH chez les femelles adultes témoin, n = 7 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. (D), concentration plasmatique de 17β-œstrogène chez les femelles adultes témoin, n = 6 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 8. (E), concentration plasmatique de testostérone mesurée chez les femelles adultes témoin, n = 8 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. (F), concentration plasmatique de glucose sanguin mesurée à jeun chez les femelles adultes témoin, n = 7 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P < 0,05, \*\*P ≤ 0,005, \*\*\*P ≤ 0,0001.

L'infertilité observée chez les souris femelles SELENOT KO était également associée à un défaut de maturation folliculaire. Le poids des ovaires et le poids de l'utérus, marqueurs de niveau circulants d'œstrogène, était significativement plus réduits chez les souris femelles SELENOT KO par rapport aux souris témoins (Fig. 30, A-C). L'examen histologique des ovaires a montré que les femelles SELENOT KO présentent, moins de follicules préovulatoires (follicules primaires, secondaires et antraux) et de corps jaunes (post-ovulatoires) par rapport aux femelles témoins (Fig. 30D). Plusieurs études menées sur des modèles de souris mimant le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), montrent une dérégulation du cycle ovarien et une infertilité, avec une augmentation du taux plasmatique de testostérone (Tata et al., 2018). Dans notre étude, l'évaluation histologique par coloration à l'HES du tissu ovarien chez la souris femelle adulte a révélé la présence de kystes ovariens chez les femelles SELENOT KO comme étant des cavités

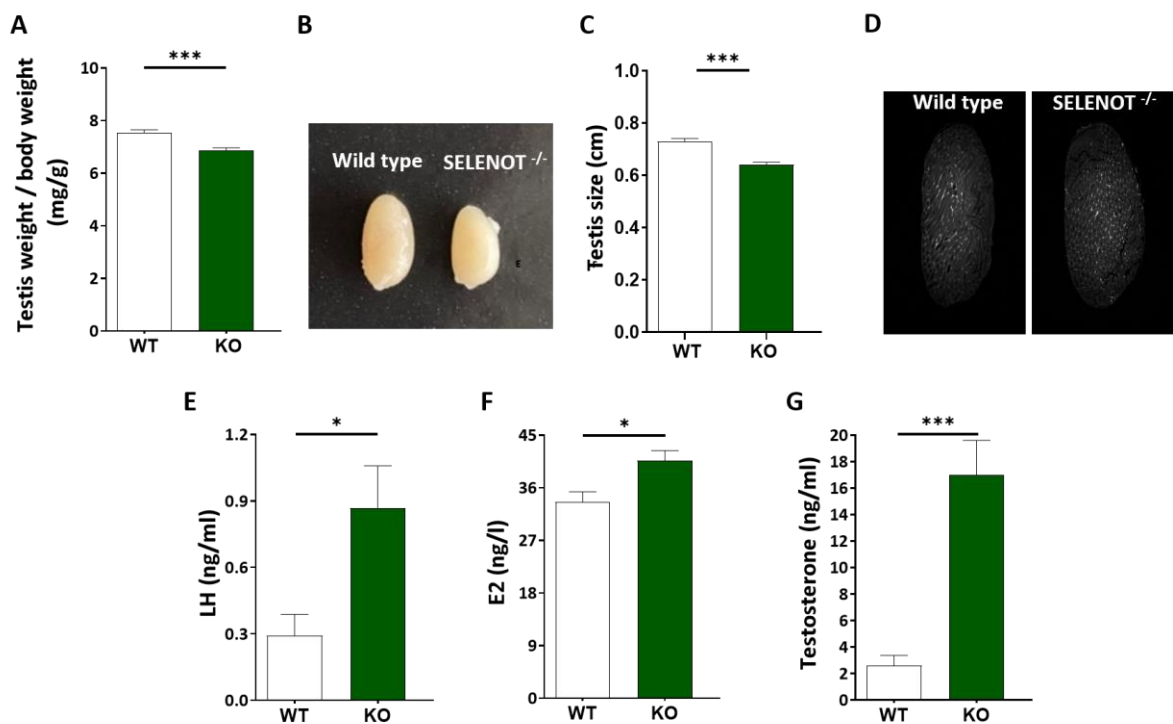
ouvertes, avec ou sans liquide folliculaire, rappelant le syndrome des ovaires polykystiques (Fig. 30E).



**Figure 30 : Morphologie des ovaires et de l'utérus chez les souris femelles SELENOT<sup>-/-</sup> (P120).** (A), rapport du poids des ovaires au poids corporel chez les souris femelles adultes témoin, n =5 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n =5. (B), poids de l'utérus chez les souris femelles adultes. (C), image représentative montrant la taille comparative de l'utérus chez la souris témoin et SELENOT<sup>-/-</sup>. (D), analyse quantitative des follicules primaires (PF), des follicules secondaires (SF), des follicules antraux (AF) et des corps jaunes (CL). (E), évaluation histologique par coloration à l'hématoxyline-éosine du tissu ovarien de souris femelles adultes. Barres d'échelle, 200 μm. Les sections ovariennes contenant différentes classes de follicules sont représentées. PF, SF, AF et CL. Les astérisques indiquent les kystes ovariens. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P< 0,05, \*\*P< 0,01, \*\*\*P< 0,001.

### III. Les souris mâles SELENOT KO cérébrales présentent des perturbations endocriniennes

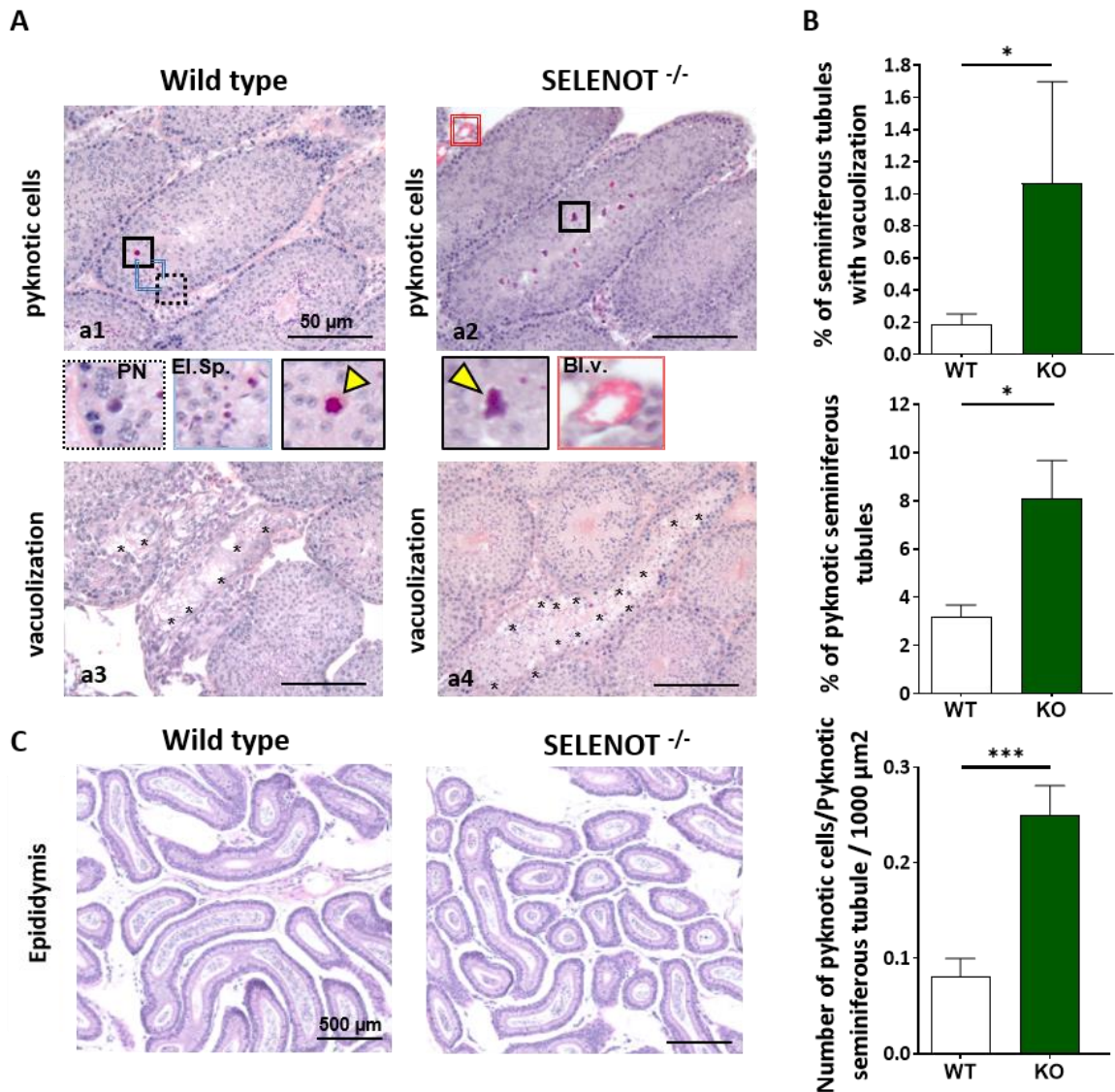
Les résultats des analyses histologiques des testicules des souris SELENOT KO montrent une atrophie testiculaire, le poids et la taille des testicules étaient significativement réduits chez les mâles SELENOT KO par rapport aux mâles WT (Fig. 31, A-C). Une transpiration (un épisode réalisé durant le protocole iDISCO) de testicule a été effectuée afin de visualiser le tissu de son inégalité sans utilisation d'anticorps, la lumière blanche observée n'est qu'une lumière due à l'auto-fluorescence (Fig. 31D). Les taux circulants de LH, d'estradiol et de testostérone étaient nettement plus élevés chez les mâles SELENOT KO par rapport aux mâles témoin (Fig. 31, E-G).



**Figure 31 : Niveaux d'hormones chez les souris mâles SELENOT<sup>-/-</sup> (P90-P120).** (A), rapport du poids des testicules au poids corporel chez les souris mâles adulte témoin, n = 10 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 10. (B), image représentative montrant la taille comparative de testicule chez la souris témoin et SELENOT<sup>-/-</sup>. (C), taille de testicules chez la souris témoin et SELENOT<sup>-/-</sup>. (D), image de tissu testiculaire après transpiration. (E), taux plasmatiques de LH chez les mâles adultes témoin, n = 10 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 10. (F), concentration plasmatique de 17 $\beta$ -estradiol chez les mâles adultes témoin, n = 9 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 10. (G), concentration plasmatique de testostérone chez les mâles adultes témoin, n = 11 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 9. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et comparées à l'aide du test t de Student. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

#### **IV. Les souris mâles SELENOT KO cérébrales présentent une altération testiculaire**

Nous avons observé que les mâles SELENOT KO présentent des taux circulants d'œstradiol et de testostérone très élevés, une situation qui résulte très probablement d'une action centrale induite par l'augmentation des taux de LH. Le testicule est le lieu de production des hormones stéroïdiennes, afin de mieux comprendre l'origine de cette dérégulation hormonale, des examens histologiques ont été réalisés sur des coupes de testicules et d'épididymes colorées à l'hématoxyline-éosine et au safran (Fig. 32A, C). Dans le tissu testiculaire, les noyaux des cellules pyknotiques et les vacuolisations ont été observés dans les tubes séminifères chez les souris mâles témoins (Fig. 32A, a1, a3) et SELENOT KO (Fig. 32A, a2, a4). La vacuolisation représente probablement les espaces laissés par les cellules germinales manquantes et/ou cellule de sertoli. Or, la pyknose est l'origine d'une condensation irréversible de la chromatine dans le noyau d'une cellule en phase de nécrose ou d'apoptose. Par ailleurs, les vacuoles et les cellules pyknotiques accompagnaient souvent la dégénérescence et donc une atrophie. Les analyses stéréologiques des tissus testiculaires des souris témoin et SELENOT KO ont été réalisées afin de déterminer le pourcentage de tubes séminifères avec vacuolisation, le pourcentage de tubes séminifères pyknotiques et le nombre de cellules pyknotiques / 1000  $\mu\text{m}^2$  pour les tubes séminifères contenant au minimum une cellule pyknotique. Notre comptage de noyau des cellules pyknotiques a été effectué en faisant attention de ne pas inclure les spermatides allongées (zoom ligne bleu) ni les cellules polymorphonucléaires (zoom ligne pointillée noire). Les résultats montrent, un pourcentage plus élevé de tubes séminifères avec vacuolisation et de tubes séminifères pyknotiques dans le tissu testiculaire des mâles SELENOT KO par rapport à celui des mâles témoins, un nombre de cellules pyknotiques par zone de tubes séminifères contenant au minimum une cellule pyknotique était plus élevé dans le tissu testiculaire des mâles SELENOT KO par rapport à celui des mâles témoins (Fig. 32B). Cependant, le tissu épидидymaire des souris SELENOT KO ne semble pas être altéré avec la présence d'une spermatogenèse (des spermatides, des spermatocytes et des spermatogonies) conservée (Fig. 32C).

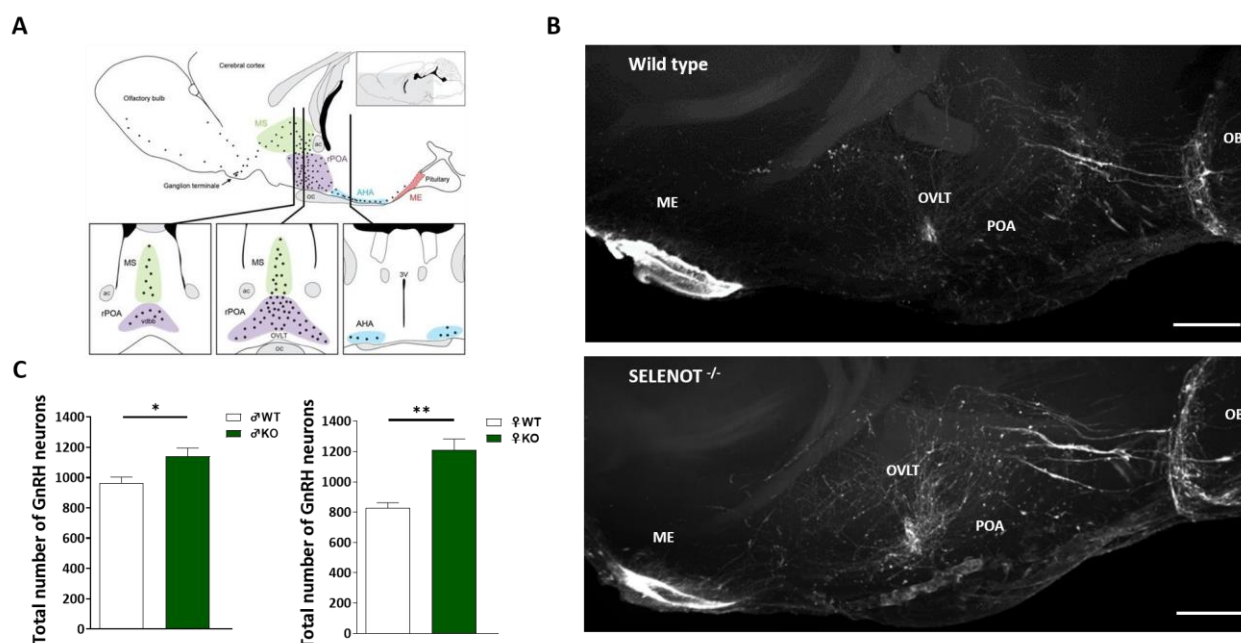


**Figure 32 : Morphologie des testicules chez les souris mâles SELENOT<sup>-/-</sup> (P120).** (A), évaluation histologique par coloration au safran-hématoxyline-éosine du tissu testiculaire de mâles adultes témoin, n=6 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n=6. Des noyaux de cellules pyknotiques (flèche jaune dans le zoom ligne noire), des spermatozoïdes allongés (zoom bleu) et des cellules polymorphonucléaires (zoom ligne pointillée noire) dans les tubes séminifères des souris témoin (a1) et SELENOT<sup>-/-</sup> (a2). Des vacuolisations dans les tubes séminifères (astérisques) ont été observées dans les tissus testiculaires provenant de souris témoin (a3) et SELENOT<sup>-/-</sup> (a4). Barre d'échelle = 50  $\mu$ m. (B), analyses stéréologiques des tissus testiculaires des souris témoin et SELENOT<sup>-/-</sup> (C), image de la morphologie du tissu épидидymaire de souris mâles adultes coloré à l'hématoxyline-éosine. Barres d'échelle, 500  $\mu$ m. Bl.v., vaisseau sanguin ; El.Sp., spermatozoïde allongé ; PN, cellule polymorphonucléaire. Les valeurs sont exprimées en pourcentage moyen  $\pm$  S.E.M, avec n = 6 par condition (un "n" correspondant à 4 morceaux de tissu testiculaire / deux coupes par morceau) et comparées à l'aide du test t de Student. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

## V. Les souris SELENOT KO présentent un grand nombre de neurones à GnRH

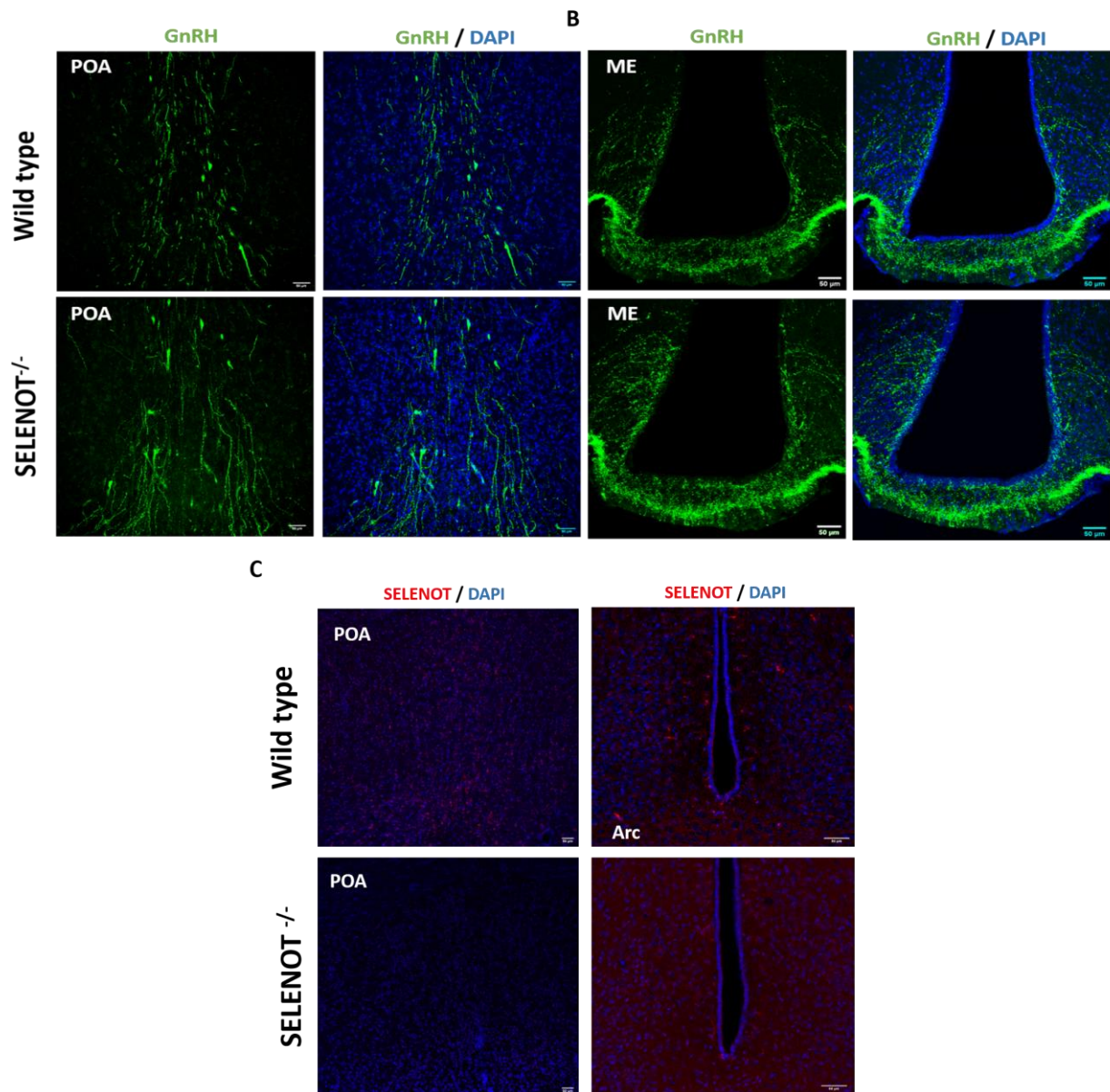
Le modèle de souris SELENOT KO dépourvus de la SELENOT dans le cerveau a permis d'étudier l'implication de cette protéine au niveau central dans la régulation neuroendocrine de différentes fonctions physiologiques, notamment la reproduction. De manière intéressante, cette stratégie permet de préserver l'expression de la SELENOT dans les tissus périphériques, et de ne pas interférer avec sa fonction cruciale dans ces tissus. En effet, la suppression du gène SELENOT dans le cerveau affecte la distribution et la densité des neurones à GnRH, ce qui aurait un impact sur l'axe gonadotrope et par conséquent sur la fonction gonadique, le comportement sexuel et la fertilité. En effet, nous avons analysé l'immunoréactivité de la GnRH et compté le nombre de neurones à GnRH dans le cerveau, de la placode olfactive jusqu'à l'éminence médiane de souris adultes SELENOT KO et témoin, avec une grande majorité des neurones à GnRH sont normalement situés dans l'aire pré-optique (POA), et l'aire hypothalamique antérieure (AHA) (Fig. 33A).

La comparaison des groupes neuronaux à GnRH chez les souris SELENOT KO et WT a été réalisée à l'aide de l'imagerie 3D de cerveaux de souris immunomarkés *in toto*. Cette analyse nous a permis de visualiser entièrement le circuit des neurones à GnRH qui s'étendant du bulbe olfactif (BO) à l'éminence médiane (EM) chez la souris témoin et SELENOT KO (Fig. 33B). Nos résultats montrent que la distribution des neurones à GnRH était différente, les souris SELENOT KO ont une plus forte concentration de neurones à GnRH au niveau de l'OVLT, l'APO et le BO par rapport aux témoins (Fig. 33B). Cette différence de distribution rostro-caudale des neurones à GnRH par rapport aux souris témoins suggèrent également que la migration des neurones à GnRH a probablement été affectée au cours du développement qui nécessite la présence de la SELENOT. Le schéma de distribution rostro-caudal caractéristique des neurones à GnRH et l'arborisation de leurs processus ont été démontrés par la reconstruction de séries de coupes optiques. Les neurones à GnRH ont été quantifiés le long de la voie migratoire du BO vers l'EM, et le nombre des neurones à GnRH était plus élevé chez les souris mâles et femelles SELENOT KO par rapport aux souris témoins (Fig. 33C).



**Figure 33 : Imagerie tridimensionnel de l'immunomarquage de neurones à GnRH dans le cerveau des souris SELENOT<sup>-/-</sup> (P120).** (A), diagrammes schématiques montrant la distribution des neurones à GnRH (points noirs) dans les plans sagittal (en haut) et coronal (en bas). Les zones anatomiques sont agrandies dans les images du bas correspondant au septum médian (MS), l'aire préoptique rostrale (rPOA) et à l'aire hypothalamique antérieure (AHA). ac, commissure antérieure ; oc, chiasme optique ; vdbb, membre vertical de la bande diagonale de Broca ; OVLT, organum vasculosum de la lamina terminalis ; 3V, troisième ventricule. (B), Vue sagittale tridimensionnel du marquage d'anti-GnRH dans le cerveau de souris adultes témoin et SELENOT<sup>-/-</sup>. Barres d'échelle = 500  $\mu$ m. (C), nombre total de neurones hypothalamiques de la GnRH comptés du bulbe olfactif (BO) à l'eminence médiane (ME) de souris adultes témoin, n=4 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n=4 pour chaque sexe.

L'immunoréactivité de la GnRH a également été examinée par immunofluorescence traditionnelle dans des sections coronales de l'hypothalamus de souris adultes SELENOT KO et témoins. Cette analyse a également révélé que les corps cellulaires des neurones à GnRH dans l'POA (Fig. 34A) et les fibres GnRH présentes dans l'EM (Fig. 34B), sont plus intensément marqués chez les souris SELENOT KO par rapport aux souris témoins. Afin de vérifier l'invalidation du gène de la SELENOT dans le cerveau, l'immunoréactivité de la SELENOT a été examinée par immunofluorescence traditionnelle également. En effet l'immunofluorescence de la SELENOT était absente au niveau de l'APO et l'ARC chez les souris adultes SELENOT KO par rapport aux témoins qui expriment la SELENOT dans plusieurs neurones (Fig. 34C).



**Figure 34 : Distribution des neurones à GnRH dans l'APO et l'EM.** Sections coronales au niveau de la POA (A) et de la ME (B), ont été immunomarquées par l'anti-GnRH (vert) et le DAPI (bleu). Grossissement : 10X pour POA et 20X pour ME. Barres d'échelle, 50 μm. (C), sections coronales au niveau de l'POA et l'ARC immunomarquées par l'anti-SELENOT (rouge) et le DAPI (bleu).

## VI. Le traitement par l'antagoniste de la GnRH chez les souris SELENOT KO a normalisé leur phénotype neuroendocrinien

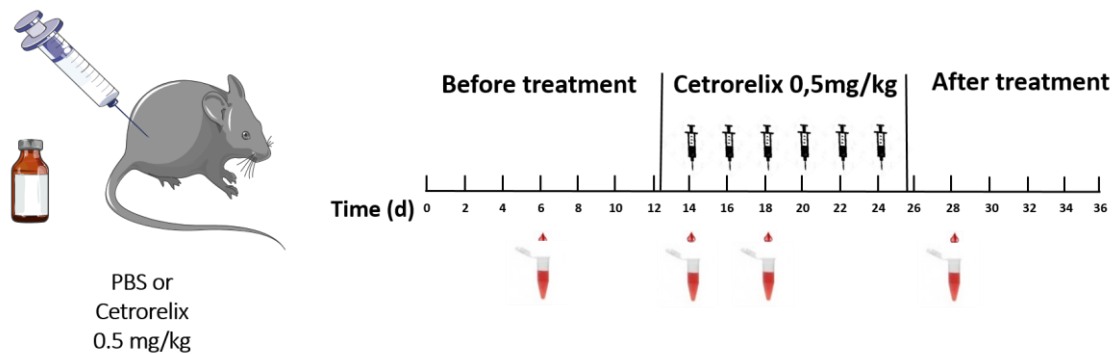
Nous avons cherché à déterminer les mécanismes qui pouvaient être responsables de la dérégulation neuroendocrine observée chez la souris femelles SELENOT KO.



Comme nos résultats ont révélé une hyper-activation persistante des neurones à GnRH chez les souris SELENOT KO, nous avons pensé qu'en entrant partiellement en compétition avec la GnRH endogène pour la liaison aux récepteurs membranaires des cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure, nous pourrions rétablir la cyclicité œstrale et les niveaux physiologiques de LH chez les souris femelles SELENOT KO. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons procédé à l'injection de l'antagoniste de GnRH (Cetrorelix) afin de confirmer que les perturbations observées étaient bien dues à l'hypersécrétion de GnRH.

L'analyse du cycle ovarien chez les souris femelles témoin et SELENOT KO a été réalisée chaque jour pendant toute la période de l'expérience (avant, pendant et après le début du traitement à l'acétate de cetrorelix). Ensuite, cinq femelles SELENOT KO ont reçu tous les deux jours de l'acétate de cetrorelix à 0,5 mg/kg par voie intra-péritonéale pendant 12 jours. En parallèle, cinq femelles SELENOT KO et témoin ont reçu le véhicule. Des échantillons de sang de la queue ont été prélevés pour mesurer le taux plasmatique de LH deux fois (aux jours 2 et 6) pendant le traitement par l'antagoniste de la GnRH, une fois avant et après la période du traitement (Fig. 35A).

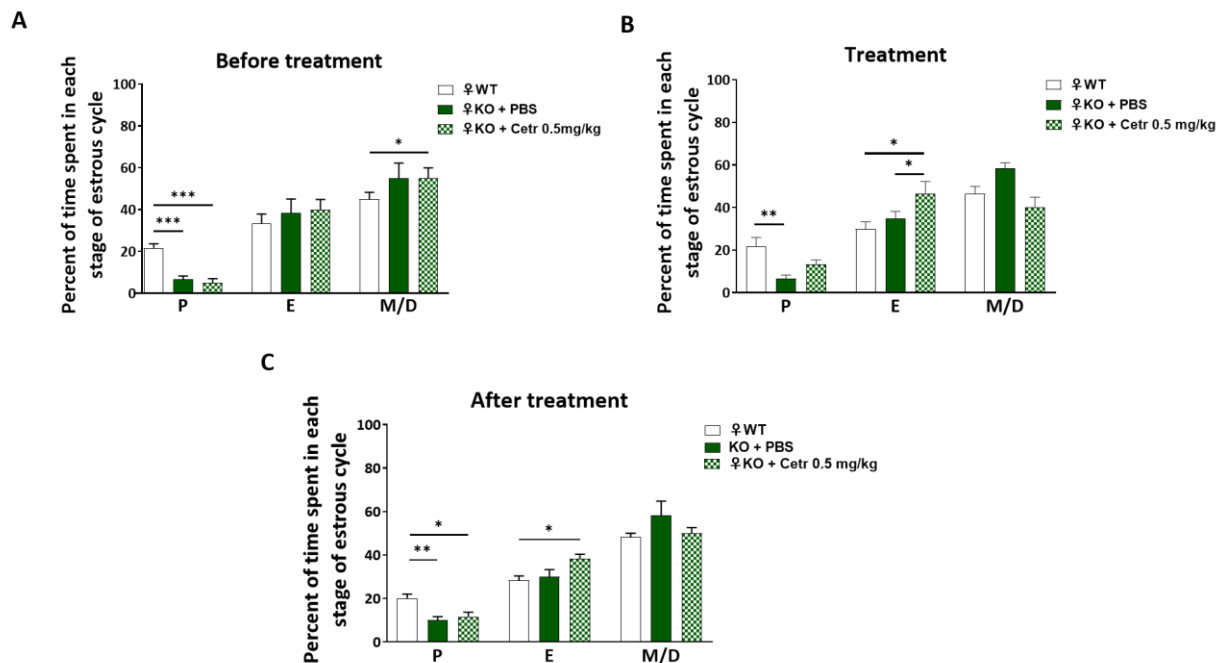
A



**Figure 35 : Protocole du traitement par l'antagoniste de GnRH chez les souris femelles SELENOT<sup>-/-</sup> (P90).** (A), schéma de la conception expérimentale où l'expérience est divisée en trois étapes. Avant, pendant et après l'injection i.p. de 0,5 mg/kg d'acétate de cetrorelix.

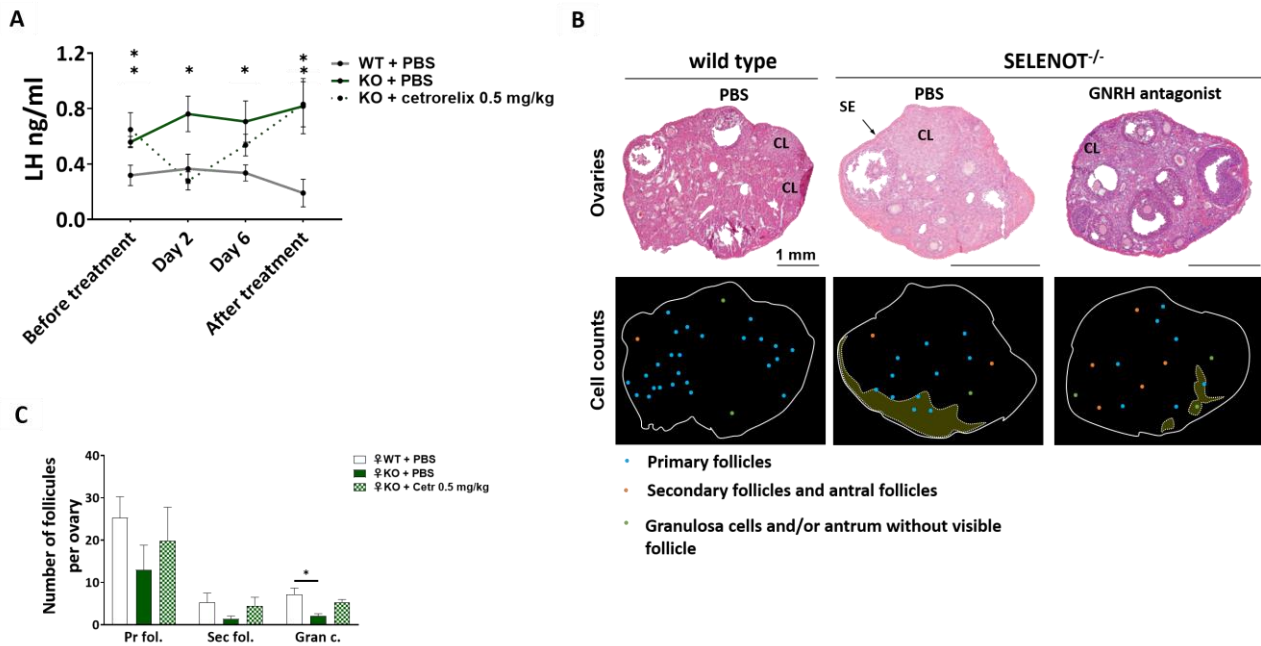
D'après nos résultats, nous avons constaté que les femelles SELENOT KO ont présenté un temps plus long en métœstrus/diœstrus et un temps plus court en proœstrus, par rapport aux femelles témoins (Fig. 36A). Lorsque les femelles SELENOT KO ont reçu une

injection de 0,5 mg/kg d'antagoniste de la GnRH, un cycle ovarien presque régulé a été rétabli (Fig. 36B). Lorsque le traitement a été interrompu, une cyclicité altérée a de nouveau été observée (Fig. 36C).



**Figure 36 : Analyse du cycle ovarien avant, pendant et après le traitement par l'antagoniste de GnRH chez les souris femelles SELENOT<sup>-/-</sup> (P90).** (A, B et C), pourcentage du temps passé à chaque stade du cycle oestral avant, pendant et après le traitement chez les femelles adultes témoins, n = 5, SELENOT<sup>-/-</sup> traitées avec PBS, n = 5 et SELENOT<sup>-/-</sup> traitées avec cetrorelix, n=5. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les comparaisons entre les groupes de traitement ont été effectuées en utilisant le one-way ANOVA. \*P< 0,05, \*\*P< 0,01, \*\*\*P< 0,001.

Le taux circulant élevé de LH initialement observé chez les souris femelles SELENOT KO, a été normalisé après le traitement par l'antagoniste de la GnRH et cet effet n'a plus été observé quelques jours après le traitement (Fig. 37A). Nous avons également examiné le tissu ovarien des souris femelles SELENOT KO, une zone de fibrose similaire a été observée pour les souris SELENOT KO traitées ou non avec l'antagoniste de la GnRH par rapport au souris femelles témoins (Fig. 37B). En outre, une légère augmentation du nombre de follicules secondaires et antraux a pu être observée pour les souris témoins qui reçoivent le véhicule et les femelles SELENOT KO traitées avec l'antagoniste de la GnRH par rapport aux souris SELENOT KO traitées avec le véhicule (Fig. 37C).



**Figure 37 : Le taux circulant de LH et la morphologie des ovaires après traitement par l'antagoniste de GnRH chez les souris femelles SELENOT<sup>-/-</sup> (P90).** (A), l'évolution temporelle de la concentration sérique de LH chez les souris femelles SELENOT<sup>-/-</sup> avant le début du traitement, le jour 2 et 6 après la première injection de cetrorelix et le jour 4 après l'arrêt du traitement. (B), l'analyse histologique des ovaires par coloration au safran-hématoxyline-éosine chez les souris témoin traitées par du PBS (n =3), souris SELENOT<sup>-/-</sup> traitées par du PBS (n =3) et par l'antagoniste de la GnRH (n =3). Des points de différents couleurs montrent la distribution des follicules primaires, secondaires et antraux, et les cellules de granulosa. Les zones fibrotiques entourées de lignes pointillées sont représentées. (C), le nombre de follicules comptés pour l'ensemble de l'ovaire a été évalué pour les souris témoin traitées avec du PBS, les souris SELENOT<sup>-/-</sup> traitées avec du PBS et avec l'antagoniste de la GnRH. Barres d'échelle = 1 mm. CL, corps jaune ; SE, épithélium de surface. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les comparaisons entre les groupes de traitement ont été effectuées en utilisant le one-way ANOVA. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

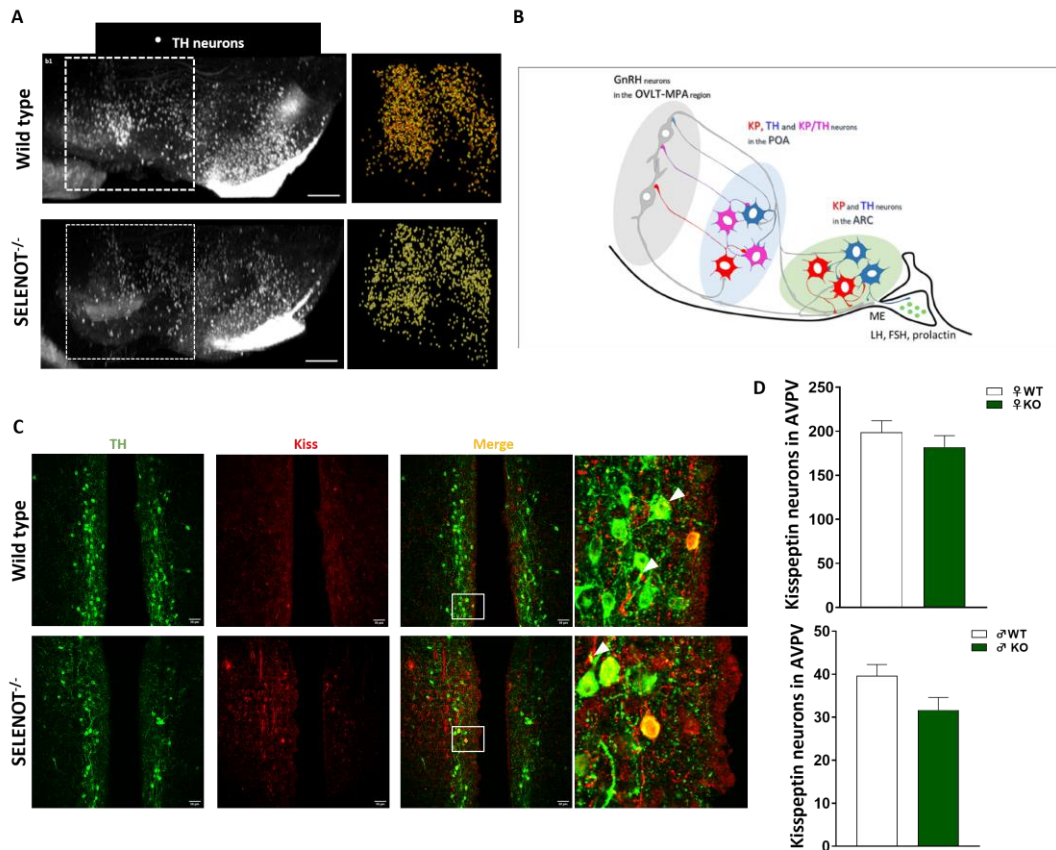
## VII. Distribution des neurones à TH et leur interaction avec les neurones à Kisspeptine

Des recherches menées sur l'impact des catécholamines dans la production de GnRH ont montré que l'activité des neurones à GnRH est inhibée par la dopamine. Cet effet est relayé par des récepteurs de dopamine de type D1 et D2, exprimés dans les neurones à GnRH au niveau de l'AVPV.

La comparaison des groupes neuronaux TH-positifs chez les souris SELENOT KO et WT a été réalisée à l'aide de l'imagerie 3D de cerveaux de souris immunomarqués *in toto*. Cette analyse nous a permis de déterminer la distribution des neurones TH-positifs dans

le cerveau. La figure 36A montre le marquage global du système catécholaminergique central chez les souris adultes SELENOT KO et témoins. La déficience de la SELENOT au niveau central chez les souris mâles et femelles a engendré une baisse de la densité des neurones à TH dans différentes zones du cerveau, y compris l'hypothalamus (Fig. 36A). Cette baisse de la densité des neurones à TH pourrait être responsable de la forte expression de GnRH observée au niveau de l'APO et l'EM.

D'autre part, l'altération de la production de la GnRH pourrait être due à un défaut de régulation par la kisspeptine. Les neurones à kisspeptine sont des acteurs indispensables dans la régulation de l'axe HHG. En effet, les neurones catécholaminergiques et donc de la dopamine régulent l'axe gonadotrope par l'intermédiaire des neurones à kisspeptine au niveau de l'AVPV, ainsi ces neurones interviennent dans la régulation de l'axe HHG par l'action de la testostérone et de l'œstradiol au niveau central. Schéma illustre les interactions neuronales entre les neurones dopaminergiques, GnRH et à kisspeptine dans l'APO et l'ARC avec la présence des neurones à kisspeptine qui expriment la TH (Fig. 36B). Pour cela, un double marquage par immunofluorescence des neurones à Kisspeptine et TH a été effectués sur des coupes coronales en séries dans l'AVPV chez la souris SELENOT KO et témoin (mâle et femelle), l'analyse des coupes par microscopie a révélé la présence des neurones à kisspeptine qui expriment la TH (Fig. 36C). Le comptage des neurones à kisspeptine dans l'AVPV n'a révélé aucune différence significative entre les souris SELENOT KO et témoin mâle et femelle (Fig. 36D).



**Figure 38 : Imagerie tridimensionnel de l'immunomarquage de neurones à TH dans le cerveau et les neurones à Kisspeptine dans l'AVPV de la souris adulte (P90).** (A), Vue sagittale tridimensionnel du marquage des neurones à TH dans le cerveau de souris adultes témoin, n=5 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n=5 pour chaque sexe. Le carré dans l'image représente la zone d'intérêt et les acquisitions ont été réalisées avec l'Ultramicroscope II. Les points de couleurs orange et jaune montrent la distribution des neurones à TH chez la souris témoin et SELENOT<sup>-/-</sup> respectivement. (B), schéma représente l'interaction neuronale entre les neurones à GnRH, TH et kisspeptine dans l'hypothalamus. (C), sections coronales au niveau de l'AVPV, double marquage pour l'anti-TH (vert) et l'anti-Kiss (rouge), barres d'échelle, 50  $\mu$ m. (D), nombre de neurones à Kisspeptine dans l'AVPV de souris adultes témoin, n=3 et SELENOT<sup>-/-</sup>, n=3 pour chaque sexe. Les données sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  SEM et comparées en utilisant le test t de Student. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

# **DISCUSSION**

La reproduction est une caractéristique essentielle des organismes vivants puisqu'elle est indispensable à la survie des espèces. Chez les mammifères, la capacité de reproduction implique une communication coordonnée entre l'hypothalamus, l'antéhypophyse et les gonades. Il a été reconnu depuis les années 1970 qu'une petite population de neurones produisant l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH), localisée dans l'hypothalamus, est essentielle à la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (HHG) des mammifères. Les troubles de la reproduction sont généralement liés à des perturbations neuroendocrines de l'axe HHG, qui peuvent résulter notamment d'un défaut de production et d'action de la neurohormone GnRH. En tant que régulateur clé de la reproduction, l'expression appropriée de la GnRH est cruciale pour assurer une fonction reproductive optimale. La connaissance des facteurs et la compréhension des mécanismes qui contrôlent la synthèse et la libération de la GnRH sont essentielles pour comprendre la régulation neuroendocrine de la fertilité.

Ma thèse s'est concentrée sur la caractérisation du rôle neuroendocrine de la SELENOT dans le contrôle de la reproduction en utilisant comme modèle, les souris transgéniques mâles et femelles dépourvues de la SELENOT au niveau central. La SELENOT est une protéine qui a été décrite pour la première fois suite à son identification par des outils bioinformatiques (Kruyokov et al. 1999), mais dont le rôle a été très peu exploré. Les chercheurs de notre laboratoire ont identifié la SELENOT parmi les gènes dont l'expression est stimulée lors de la différenciation des cellules chromaffines tumorales PC12 induite par le neuropeptide PACAP (Grumolato et al., 2003). Dans cette lignée cellulaire, La SELENOT est impliquée dans le contrôle de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et dans la sécrétion hormonale stimulée par le PACAP (Grumolato et al., 2008). D'autres études ont confirmé le rôle de la SELENOT dans la sécrétion hormonale aussi bien dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Prevost et al., 2013) que dans les cellules corticotropes hypophysaires (Hamieh et al., 2017). En effet, dans ces cellules, l'inhibition de l'expression de la SELENOT entraîne un stress du réticulum endoplasmique, des défauts de glycosylation et une réduction de la production et de la sécrétion basale et stimulée de l'hormone corticotrope (Hamieh et al., 2017).

L'expression de la SELENOT est ubiquiste au cours du développement embryonnaire, alors que chez l'adulte celle-ci est particulièrement restreinte dans la majorité des tissus à

l'exception des tissus endocrines tels que le pancréas, le testicule, la thyroïde ou l'hypophyse (Tableau 4) où sa fonction semble être indispensable (Grumolato et al., 2008 ; Anouar et al., 2018).

Tableau 4 : La distribution spatio-temporelle de la SELENOT chez le rat Wistar aux stades embryonnaires E15 et E20, jeune (P1 à P14) et adulte (3 mois). Tissus à forte expression de la SELENOT, vert ; tissu à faible expression de la SELENOT, rouge ; non déterminé, gris. (D'après Tanguy et al., 2011)

	Embryon	Animal jeune	Adulte
Cortex cérébral	Vert	Vert	Rouge
Bulbe olfactif	Vert	Vert	Vert
Cervelet	Vert	Vert	Vert
Hypophyse	Vert	Gris	Vert
Testicule	Vert	Vert	Vert
Ovaire	Gris	Vert	Vert
Autres organes			

Chez la souris, l'inactivation totale du gène de la SELENOT entraîne une létalité dès les premiers stades développementaux (Boukhar et al., 2016), ce qui rend impossible l'exploration de la fonction physiologique de la SELENOT à l'échelle de tout l'organisme. Par conséquent, un second modèle de souris transgéniques a été développé afin d'obtenir une inactivation restreinte spécifique du SNC grâce au système Cre-Lox. Ainsi, des souris exprimant la recombinaise Cre sous l'action du promoteur de la nestine ont été croisées avec des souris dont le gène de la SELENOT a été floxé. Ce système permet l'inactivation chez la descendance du gène de la SELENOT dans les cellules nerveuses qui expriment la nestine. L'inactivation du gène de la SELENOT a été vérifiée par PCR quantitative, western blot et immunohistochimie. Les souris dépourvues de la SELENOT dans le cerveau sont viables, ce qui a permis d'étudier l'implication de la SELENOT au niveau central dans la régulation neuroendocrine de différentes fonctions physiologiques, notamment la reproduction. En effet, cette stratégie permet de préserver l'expression de la SELENOT dans les tissus périphériques, et de ne pas interférer avec sa fonction cruciale dans ces tissus (Tableau 4). Aucune information n'est encore disponible



sur l'impact de l'expression des sélénoprotéines sur l'activité des principales populations de cellules neuronales et neuroendocrines qui régulent l'axe HHG, y compris les neurones à GnRH.

### **1. L'invalidation de la SELENOT induit des altérations de l'axe gonadotrope**

Afin de faire le lien entre l'axe HHG et le rôle neuroendocrine de la SELENOT, nous avons étudié le profil d'expression et de distribution des neurones à GnRH chez les souris invalidées pour la SELENOT au niveau central. Différentes techniques d'immunofluorescence, y compris l'imagerie 3D de cerveaux transparisés provenant de souris WT et SELENOT KO, ont été utilisées dans la présente étude pour examiner l'influence de la SELENOT sur la distribution et la densité des neurones à GnRH. La quantification des neurones à GnRH de la placode olfactive jusqu'à l'éminence médiane à l'aide d'images tridimensionnelles présente plusieurs avantages par rapport à la quantification sur images 2D. Premièrement, la précision du comptage est améliorée puisque la zone d'intérêt est considérée dans son intégralité, ce qui réduit les difficultés inhérentes aux images provenant de coupes, telles que la forme de la zone en question ou le comptage erroné des mêmes neurones plusieurs fois. Deuxièmement, l'accessibilité aux différentes zones du cerveau, même au sein d'une région donnée, est également améliorée. L'application de cette approche d'imagerie tridimensionnelle au marquage des neurones à GnRH chez les souris SELENOT KO a révélé un nombre de cellules immunomarquées supérieur à celui des souris WT, indépendamment du sexe des animaux, ce qui suggère que la SELENOT peut jouer un rôle essentiel dans le contrôle neuroendocrine de la reproduction chez la souris mâle et femelle. En effet, la SELENOT pourrait être impliquée dans la production et la sécrétion de la GnRH, probablement en contrôlant le stress oxydatif dans les populations neuronales. Plusieurs études antérieures montrent l'importance de la SELENOT pour la protection contre le stress oxydatif. A titre d'exemple, la SELENOT augmente la résistance au stress oxydatif, augmente l'activité de la Tyrosine hydroxylase (TH) et promeut la survie des neurones dopaminergiques (Boukhzar et al., 2016).

D'autres sélénoprotéines, en particulier les TrxR, sont aussi capables de protéger les neurones en général (Arodin et al., 2014).

Au niveau périphérique, la SELENOT protège aussi bien les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Prevost et al., 2013) et les cellules cardiaques (Rocca et al., 2018). Récemment, nous avons montré que la SELENOT est faiblement mais largement exprimée dans le cerveau chez la souris, et que la délétion de son gène chez la souris SELENOT KO a un impact sur la distribution des neurones dopaminergiques dans différentes zones du cerveau, y compris l'hypothalamus, aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Godefroy et al., 2022). Ces données indiquent que la SELENOT joue un rôle dans la survie des neurones dopaminergiques et dans la production hormonale des cellules neuroendocrines, fort probablement en protégeant ces cellules contre les méfaits du stress oxydant lors du développement ou lors des processus métaboliques comme la biosynthèse et la sécrétion des hormones. Pour les neurones à GnRH, on ignore toutefois si l'action observée de la SELENOT est exercée directement dans ces cellules, ou si elle est principalement transmise par des effets sur les circuits afférents régissant la neurosécrétion de GnRH. L'absence de la SELENOT dans le cerveau ne semble a priori pas affecter à la baisse de la survie des neurones à GnRH puisque leur nombre semble être plus élevé dans l'hypothalamus sur la base du marquage à la GnRH, suggérant que l'absence de la SELENOT provoquerait surtout un dysfonctionnement de production de GnRH chez la souris. Toutefois, l'absence de la SELENOT dans d'autres types neuronaux contrôlant l'activité des neurones à GnRH pourrait affecter leur survie qui impacterait ensuite le fonctionnement des neurones à GnRH. Plusieurs études ont montré l'implication de certains neurotransmetteurs et neuropeptides dans la modulation de l'activité des neurones à GnRH (Todman et al., 2005), parmi lesquels le glutamate, le GABA, le NPY, la dopamine et la kisspeptine qui sont apparus comme étant particulièrement importants dans l'activation pubertaire et l'activité des neurones à GnRH chez les mammifères (Terasawa et Fernandez., 2001 ; Han et al., 2005). Il est possible que la SELENOT puisse intervenir dans le contrôle de la production et de la sécrétion de ces neurotransmetteurs et neuropeptides. Des études complémentaires sont nécessaires pour étayer à cette hypothèse.

Des recherches menées sur l'impact des catécholamines dans la production de GnRH ont montré que l'activité des neurones à GnRH est inhibée par la dopamine.

Cet effet est relayé par des récepteurs de dopamine de type D1 et D2, exprimés dans les neurones à GnRH au niveau de l'AVPV (Liu et Herbison, 2013). La déficience de la SELENOT au niveau central chez les souris mâles et femelles a engendré une baisse de la densité des neurones à TH dans différentes zones du cerveau, y compris l'hypothalamus (Godefroy et al., 2022). Cette baisse du nombre de neurones catécholaminergiques et donc de la dopamine pourrait être responsable de la forte expression de GnRH observée au niveau hypothalamique. Il serait donc très intéressant d'analyser l'expression des récepteurs de dopamine de type D1 et D2 au niveau de l'hypothalamus et plus spécifiquement au niveau de l'AVPV (Smith et al., 2005) chez les souris déficientes en SELENOT.

Sur la base des données obtenues sur la distribution des neurones dopaminergique dans le cerveau de souris SELENOT KO mâle et femelle, par la technique d'immunofluorescence et l'imagerie 3D de cerveaux transparisés. Une analyse de la densité des neurones dopaminergique dans différentes zones de l'hypothalamus, notamment l'AVPV et l'ARC chez la souris SELENOT KO male et femelle est en cours. D'autre part, l'altération de la production de la GnRH pourrait être due à un défaut de régulation par la kisspeptine. Ce neuropeptide initialement décrit comme anti-métastatique (Lee et al., 1996), et codé par le gène Kiss1, Son implication dans le contrôle de la fonction de reproduction a été découverte suite aux études menées chez l'homme et chez la souris présentant un hypogonadisme hypogonadotrope isolé (HHI). Ce syndrome est dû à une absence de migration des neurones à GnRH depuis les placodes olfactives au cours de l'embryogenèse. Or, dans les années 2000, il a été montré que cette absence de migration était due à l'absence du récepteur Kiss1R ou GPR54 (De Roux et al., 2006 ; Seminara et al., 2003). La kisspeptine agit principalement comme régulateur des fonctions de reproduction via son récepteur (KissR ou GPR54), exprimé dans les neurones à GnRH (Han et al., 2005). En effet, l'expression du Kiss1R par les neurones à GnRH a été démontrée chez la souris par hybridation *in situ*, révélant que 90% de neurones à GnRH expriment le Kiss1R (Han et al., 2005). De plus, différentes études ont confirmé les effets stimulateurs de la kisspeptine sur l'activité des neurones à GnRH (augmentation de la fréquence des potentiels d'action) et la sécrétion de la neurohormone GnRH (Oakley et al., 2009 ; Ronnekleiv et Kelly., 2013).

Les neurones à kisspeptine sont subdivisés en deux populations chez la souris, au vu de leur localisation au sein de deux noyaux distincts : l'AVPV et l'ARC (Gottsch et al., 2004 ; Irwig et al., 2004).

Les neurones à Kisspeptine de l'ARC sont probablement impliqués dans la sécrétion pulsatile de gonadotrophine via une rétroaction négative exercée par des hormones stéroïdiennes, car la gonadectomie (GDX) augmente les niveaux de Kiss1 dans l'ARC, tandis que le traitement à la testostérone ou à l'œstradiol supprime l'expression de Kiss1 dans l'ARC (Smith et al., 2005a, b ; Kauffman et al., 2007). Contrairement à l'ARC, dans l'AVPV, le GDX diminue l'expression de Kiss1, tandis que le traitement à l'œstradiol augmente l'expression de Kiss1 (Smith et al., 2005a, b ; Kauffman et al., 2007). Pour cela, nous avons quantifié la densité des neurones à Kisspeptine via un marquage immunofluorescent chez les souris SELENOT KO au niveau de l'AVPV. L'immunomarquage des neurones à Kisspeptine chez les souris SELENOT KO a révélé un nombre de cellules immunomarquées relativement identique à celui des souris WT mâle et femelle. Une étude de la distribution des neurones à kisspeptine au niveau de l'ARC serait essentielle pour avoir une image complète sur la distribution des neurones à kisspeptine au niveau central.

Les neurones à TH localisés dans l'AVPV sont connus pour être dopaminergiques (Simerly et al., 1985 ; Scott et al., 2015). Ces neurones dopaminergiques dans l'AVPV ont des projections directes et indirectes vers les neurones à GnRH, indiquant que la dopamine dérivée de l'AVPV peut influencer sur la production de GnRH et donc sur la reproduction (Clarkson et Herbison, 2011 ; Kumar et al., 2015).

Des études réalisées chez la souris montrent que la grande majorité des neurones à kisspeptine de l'AVPV sont dopaminergiques et coexpriment la TH (Semaan et al., 2010), alors que la TH n'est pas localisée avec la kisspeptine dans la région de l'ARC (Szawka et al., 2010). Cependant, la fonction de la dopamine produite dans les neurones à kisspeptine AVPV est actuellement inconnue. Jusqu'à 75 % des neurones à kisspeptine de l'AVPV qui coexpriment TH envoient des projections de fibres qui apposent les neurones à GnRH (Clarkson et Herbison, 2011 ; Kumar et al., 2015), ce qui suggère que la signalisation de la dopamine provenant des neurones à kisspeptine de l'AVPV peut moduler directement la sécrétion de GnRH, et donc l'axe HHG. Un double marquage

immunofluorescent Kisspeptine-TH sur coupes (2D) à été effectué sur les cerveaux des souris SELENOT KO mâle et femelle, nous avons observé la présence de quelques neurones à kisseptine expriment la TH et de nombreux contact entre ces deux neurones (axone-axone ; soma-axone). De ce fait, nous allons augmenter le nombre d'échantillons afin de compter le nombre de contact Kiss/TH et le nombre de neurones à kisseptine qui expriment la TH au niveau de l'AVPV et l'ARC.

Il serait également très intéressant d'analyser le niveau d'expression de Kiss1 et de son récepteur Kiss1R, au niveau central chez les souris déficientes en SELENOT pour, déterminer l'impact du système Kiss dans le phénotype observé.

## **2. Hypofertilité, perturbations endocriniennes et comportement sexuel altéré**

L'augmentation du nombre de neurones à GnRH suite à l'inactivation du gène SELENOT au niveau central pourrait avoir un impact sur les fonctions hypophysaires et gonadiques. De ce fait, nous avons analysé les taux circulants de LH et des hormones stéroïdiennes. Les taux de LH, qui sont directement et étroitement liés aux taux de GnRH, étaient très élevés chez la souris SELENOT KO mâle et femelle, confirmant la forte expression de GnRH observée au niveau central. De plus, l'augmentation des taux circulants de LH a entraîné une perturbation de la fonction endocrine des gonades et un comportement sexuel altéré chez la souris SELENOT KO.

### **2.1. Chez le mâle**

Nous avons observé que les mâles SELENOT KO présentent des taux circulants d'œstradiol et de testostérone très élevés, une situation qui résulte très probablement d'une action centrale exacerbant la stéroïdogénèse testiculaire induite par l'augmentation des taux de LH. Afin de déterminer l'impact de ces changements hormonaux sur la reproduction, les souris mâles SELENOT KO ont été accouplées avec des femelles WT. Les taux de gestation, La taille et le nombre de portée (ou indice de fertilité) ont été quantifiés pendant 5 mois. Les souris mâles SELENOT KO accouplées aux femelles WT ont engendré significativement moins de portées que les souris mâles WT accouplées aux femelles WT.

Cette hypofertilité des mâles SELENOT KO est ainsi liée aux perturbations hormonales observées, qui provoquent également une altération sévère du comportement copulatoire et une baisse de la motivation sexuelle.

Un épisode d'interaction sexuelle est divisé en deux phases, la phase pré-copulatoire (appétitive) et la phase copulatoire (consommatoire) (Georgiadis et al., 2012). Chez la souris, la phase pré-copulatoire est essentielle pour sélectionner un animal mature du sexe opposé. Au cours de cette phase, les deux animaux s'approchent l'un de l'autre et manifestent des comportements rapides de reniflement et de toucher. En fonction de la décision prise pendant la phase d'appétit, les animaux passent à la phase de consommation. Nos analyses du comportement sexuel sont effectuées pendant la phase de consommation, pendant laquelle les animaux déclenchent une série de sorties motrices stéréotypées propres à chaque sexe et qui aboutissent à l'accouplement, et finalement à la fécondation. La phase de consommation commence par des tentatives de montée de la part de la souris mâle. Les femelles répondent à la montée du mâle par une posture réceptive caractéristique aux femelles, appelée lordose, pendant laquelle la femelle présente les quatre pattes au sol, et un dos ou une région postérieure légèrement arquée. En fonction de la réceptivité de la femelle, les souris mâles peuvent procéder à l'intromission suivie de l'éjaculation (Balthazart et Fabre-Nys, 2001 ; Beach et Jordan, 1956). Notre analyse du comportement sexuel des souris mâles SELENOT KO accouplées avec des femelles WT réceptives a montré que ces souris SELENOT KO sont incapables d'initier un accouplement, avec une augmentation des temps de latence de la première montée et d'intromission, et des fréquences de montée et d'intromission plus réduites. Ceci est à comparer aux mâles WT qui s'accouplent facilement avec des femelles WT sexuellement réceptives.

Dans le cerveau, la testostérone peut agir directement sur les neurones régulant l'axe HHG par l'intermédiaire des récepteurs aux androgènes (AR). La testostérone peut également être convertie en œstrogènes par l'aromatase locale et agir par l'intermédiaire des récepteurs aux œstrogènes (Wu et Shah, 2011 ; Yang et Shah, 2014). En effet, les zones cérébrales qui expriment les récepteurs des hormones sexuelles ont été fortement impliquées dans les comportements sexuels masculins (Hull et Dominguez, 2007). Des études ont montré que l'invalidation du récepteur aux androgènes dans le système nerveux

aboutit à une altération de la motivation et de la performance sexuelles (Marie-Luce et al., 2013). Or, les circuits neuronaux activés par les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes contrôlant le comportement sexuel sont peu étudiés. Chez la souris, les neurones à kisspeptine de l'ARC peuvent être des cibles directes des stéroïdes sexuels, car ils expriment les récepteurs aux androgènes (AR) et aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) (Smith et al., 2005). Ces neurones ont été décrits comme des intermédiaires potentiels du rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone sur la libération de GnRH. Nous envisageons de quantifier le niveau d'expression de Kiss1 dans l'hypothalamus chez la souris SELENOT KO afin de vérifier si le défaut du comportement sexuel observé provient d'une altération de l'expression de Kiss1, et qui nécessiterait la présence de la SELENOT dans le cerveau.

De nombreuses études indiquent que la dopamine joue un rôle central dans l'expression du comportement sexuel masculin, tant en termes de motivation que de capacité copulatoire (Hull et al., 2004 ; Veening et Coolen, 2014). D'autres d'études ont également souligné l'importance de la signalisation dopaminergique dans le contrôle des états motivationnels généraux (Wise, 2004), y compris dans les contextes sociaux (Young et al., 2001) et sexuels (Pfaus, 2009). Chez les souris mâles, une libération rapide de dopamine dans l'ARC se produit pendant l'interaction avec une femelle réceptive, mais pas avec une souris mâle (Dominguez et Hull, 2005). Des études menées sur des rats ont révélé que la dopamine est libérée dans l'aire préotique médiane (MPOA) pendant la copulation (Hull et al., 1993). Le MPOA est le site le plus efficace pour les stimulations de l'accouplement chez les rats castrés. Cependant, les implants de testostérone ou d'œstradiol dans le MPOA ne permettent pas de restaurer complètement la copulation, et les implants de dihydrotestostérone (DHT) étaient inefficaces (revue dans Hull et al., 2006). Dans notre étude, la déficience de la SELENOT au niveau central chez les souris mâles a engendré une baisse de la densité des neurones à TH dans différentes zones du cerveau, y compris l'hypothalamus (Godefroy et al., 2022). Cette baisse du nombre de neurones catécholaminergiques et donc de la dopamine pourrait être responsable de la baisse de motivation et de la capacité copulatoire observée chez les souris mâles. De plus, il a été démontré que les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (ventral tegmental area) se projetant vers le NAc, jouent un rôle clé dans la phase pré-

copulatoire et dans la motivation sexuelle (Brom et al., 2014). Il serait donc intéressant de procéder à des injections d'agonistes dopaminergique afin d'analyser l'effets sur les comportements sexuels des mâles SELENOT KO.

## **2.2. Chez la femelle**

L'augmentation du taux de LH pendant la puberté chez la femelle SELENOT KO peut certainement entraîner une altération de la production des hormones stéroïdiennes et des changements dynamiques dans l'ovaire. En effet, les femelles SELENOT KO présentent un faible niveau d'œstradiol et un taux circulant de testostérone élevé par rapport aux femelles WT. La biosynthèse de l'œstradiol nécessite deux types de cellules folliculaires différentes : les cellules thécales qui expriment les récepteurs de la LH (LHR), où sont synthétisés les androgènes, et les cellules de la granulosa qui expriment les récepteurs de la FSH (FSHR), où les androgènes dérivés des cellules thécales sont convertis en œstradiol sous l'action de l'aromatase (Fortune et Eppig, 1979 ; White et Ojeda, 1981 ; O'Shaughnessy et al., 2009). Dans notre étude, la baisse d'œstradiol est probablement la conséquence d'une diminution du nombre de follicules ovariens qui produisent cette hormone. L'augmentation du niveau de testostérone résulte probablement d'une augmentation du taux de la LH. Cette hyperandrogénie peut également être liée à un déséquilibre endocrinien du contrôle de la conversion de la testostérone en œstradiol par l'aromatase. Chez les femelles, la FSH joue un rôle important dans le soutien du développement folliculaire jusqu'au stade terminal de la maturation (Richards et Pangas, 2010). Un certain nombre d'études ont documenté les actions de la FSH dans l'ovaire des femelles sexuellement immatures et matures. En effet, la FSH agit via son récepteur FSHR situé exclusivement sur les cellules de la granulosa pour convertir les androgènes dérivés de la thèque en œstrogènes chez les femelles pré-pubères (Gray et al., 1995 ; White et Ojeda, 1981). Dans notre étude, un dosage de taux de FSH sera nécessaire afin de mieux expliquer l'origine de la baisse du nombre des différents types de follicules ovariens, et éventuellement l'origine de la conversion altérée des androgènes en œstrogènes dans les ovaires des femelles SELENOT KO.

Les taux des hormones ovariennes fluctuent en fonction de l'état de l'ovaire, ce qui génère un rythme cyclique appelé cycle estrien (Goldman et al., 2007).



La cyclicité ovarienne a été analysée via le suivi des frottis vaginaux. Les femelles SELENOT KO montrent un cycle ovarien dérégulé avec un temps prolongé passé en phase diestrus, et moins de temps passé en phase proestrus. La cyclicité œstrale est contrôlée par une cascade d'événements neuroendocriniens, impliquant l'activation de l'axe HHG. Deux modes de sécrétion de GnRH sont bien établis pour réguler le cycle estrien : l'un est un mode de sécrétion tonique ou pulsé qui est responsable de la stimulation du développement folliculaire et de la stéroïdogénèse, l'autre est un mode de poussée, qui est responsable de l'induction des poussées de LH, conduisant finalement à l'ovulation (Maeda et al., 2010). Chez la femelle, les œstrogènes vont exercer des rétrocontrôles au niveau cérébral qui changent au cours du cycle estrien. En fin de phase folliculaire, l'œstradiol exerce un effet stimulateur induisant le pic pré-ovulatoire de GnRH/LH. En revanche, pendant le reste du cycle, l'œstradiol exerce un effet inhibiteur sur la libération de GnRH (Radovick et al, 2012). Cependant, l'expression des récepteurs des hormones stéroïdiennes par les neurones à GnRH dans la région pré-optique reste controversée. En effet, il semble que ces neurones n'expriment ni l'ER $\alpha$ , ni l'AR chez les rongeurs (Oakley et al., 2009) mais expriment l'ER $\beta$  (Hrabovszky et al., 2000). Des résultats de l'inactivation du gène de l'ER $\beta$  dans le SNC ont montré que l'ER $\beta$  ne joue pas de rôle fondamental dans le contrôle de la sécrétion de GnRH (Temple et al., 2003), ce qui suggère l'implication d'une ou plusieurs voies neuronales intermédiaires contrôlant la cyclicité œstrale.

Depuis la découverte des neurones à kisspeptine comme neurones afférents exprimant le récepteur ER $\alpha$  pour gouverner les neurones à GnRH, les mécanismes de médiation de la rétroaction œstrogénique ont été progressivement élucidés (Smith et al., 2006 ; Uenoyama et al., 2021). Les neurones à kissepeptine sont placés en amont des neurones à GnRH, et servent de relai aux informations stéroïdiennes périphériques vers les neurones à GnRH pour contrôler la cyclicité œstrale (Maeda et al., 2010). Des études plus poussées ont constaté que la plupart des neurones à kissepeptine dans l'AVPV coexpriment le gène précoce immédiat Fos au moment de la poussée de LH, alors que l'expression de Fos est minimale au moment du diestrus. En revanche, les neurones à kissepeptine dans l'ARC n'expriment pas Fos pendant la poussée de LH. De plus, il a été montré que la Kiss1 est augmenté dans l'AVPV au moment du pic de LH induit par les œstrogènes, alors que dans

l'ARC, l'œstradiol inhibe l'expression de Kiss1 (Smith et al., 2006). Enfin, il a été montré que la plupart des neurones à kisspeptine dans l'AVPV et l'ARC expriment l'ER $\alpha$  (Smith, 2005), ce qui suggère que l'œstradiol est le médiateur des effets de rétroaction négatifs en inhibant la libération de la kisspeptine de l'ARC pour supprimer la sécrétion de GnRH, et positifs en stimulant la libération de la kisspeptine de l'AVPV afin d'induire la poussée de GnRH/LH lors du proestrus (Smith et al., 2005). De ce fait, nous pouvons constater que les récepteurs des œstrogènes exprimés dans les neurones à kisspeptine sont fortement impliqués dans la régulation du cycle estrien.

La fertilité des femelles SELENOT KO a été étudiée comme chez les mâles SELENOT KO, après accouplement avec des mâles contrôle, pendant une période de 5 mois. Les résultats montrent que la taille et le nombre de portée (ou indice de fertilité) et le taux de gestation étaient très réduits chez les femelles SELENOT KO accouplées aux mâles WT par rapport au groupe témoin. La perturbation des taux sériques des hormones ovariennes contribue certainement à l'hypofertilité observée chez la femelle SELENOT KO.

Tout comme les effets de la testostérone sur le comportement sexuel masculin, les œstrogènes régulent fortement le comportement sexuel féminin. En effet, le facteur le plus critique qui régule le comportement sexuel féminin est le niveau d'œstradiol (Rajendren et Moss, 1993 ; Takeo et al., 1995). Cette hormone montre à la fois des effets organisateurs et activateurs sur l'expression de lordose à l'âge adulte. En effet, il a été montré que la perfusion locale de stéroïdes sexuels dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMH), le MPOA et la substance grise périaqueducal (PAG), zones riches en récepteurs de stéroïdes sexuels, améliore les comportements de lordose (Floody et al., 1986), ce qui indique que la libération d'œstrogènes par l'ovaire affecte directement ces zones du cerveau, entraînant des sorties comportementales réceptives. En plus, d'autres études montrent que les femelles déficientes en récepteur aux androgènes ont des niveaux très bas de lordose et qu'un traitement avec de l'œstradiol durant une période pré-pubère, permet de récupérer les capacités d'expression du comportement sexuel (Bakker et Brock, 2010). Ces données suggèrent donc que le comportement de lordose est bien contrôlé par l'œstradiol. Dans notre étude, la suppression de la SELENOT au niveau central affecte l'activité sexuelle chez la femelle qui se traduit par une baisse du niveau de lordose, et de la préférence envers les souris mâles. Il est possible que des

injection d'œstradiol chez les souris femelles SELENOT KO puisse rétablir leur comportement sexuel.

### **3. L'invalidation de la SELENOT induit des dysfonctionnements gonadiques**

#### **3.1. Chez le mâle**

Les résultats des analyses histologiques des testicules des souris SELENOT KO montrent une atrophie testiculaire et de nombreux tubes séminifères contenant des cellules pycnotiques et des vacuoles. La pyknose est l'origine d'une condensation irréversible de la chromatine dans le noyau d'une cellule en phase de nécrose ou d'apoptose. Or, la vacuolisation représente probablement les espaces laissés par les cellules germinales manquantes et/ou les cellules de sertoli. Il existe une forte corrélation entre la concentration sérique de la FSH et le développement des testicules chez les rongeurs (Allan et al., 2004), l'administration néonatale de la FSH augmente le nombre de cellules de Sertoli et la taille des testicules chez le rat (Sarah et al., 1996). De même, les souris mâles dépourvus de FSH ou de son récepteur ont montré une réduction significative de la taille des testicules, mais ces souris restent fertiles (Kumar et al., 1997). Il serait très intéressant de doser la FSH chez les souris mâles SELENOT KO. La présence des cellules pycnotiques et des vacuoles dans de nombreux tubes séminifères des souris mâles KO indique une mortalité cellulaire qui reste à caractériser notamment pour préciser s'il s'agit de cellules germinales et/ou de cellules de sertoli. En revanche, aucune différence anatomique de l'épididyme n'a été observée entre les mâles SELENOT KO et WT. En effet, l'étude histologique effectuée au niveau de l'épididyme a montré la présence de spermatozoïdes dans la lumière et une spermatogenèse (des spermatides, des spermatocytes et des spermatogonies) conservées chez les deux groupes de souris. Une étude plus spécifique sera néanmoins nécessaire pour déterminer la qualité et le potentiel de fertilisation des spermatozoïdes matures (spermogramme).

#### **3.2. Chez la femelle**

La puberté est une période de développement critique au cours de laquelle la réserve ovarienne subit d'importantes modifications qui ont finalement des conséquences à long terme sur le vieillissement reproductif et la durée de vie fertile.

Dans notre étude, à l'âge adulte, les analyses histologiques effectuées sur les ovaires montrent qu'il existe un épuisement et une déplétion de différents types de follicules (Primaire, secondaire et tertiaire). Les données de la littérature montrent que les taux de FSH et de LH peuvent influencer sur le nombre des follicules (Allan et al., 2006). Notamment, la surexpression de la LH chez des souris juvéniles déclenche une déplétion de la réserve de follicules primaire (Flaws et al., 1997), ce qui est en accord avec les résultats de notre étude où l'augmentation de la LH a pu déclencher une déplétion plus précoce des follicules ovariens. Nous avons également constaté la présence de kystes ovariens chez les femelles SELENOT KO rappelant le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Ce syndrome est la cause la plus courante de l'infertilité féminine, qui touche de 5 à 18 % des femmes dans le monde. Le SOPK est caractérisé par deux des trois critères suivants : l'hyperandrogénie clinique ou biochimique, l'oligo-ovulation ou aménorrhée et des ovaires polykystiques. La déficience centrale en SELENOT induit un phénotype qui présente la majorité des déficits reproductifs observés dans le SOPK, notamment l'hyperandrogénie, la perturbation de la cyclicité œstrale, l'anovulation et la présence de kystes dans les ovaires. Les androgènes sont considérés comme les principaux responsables du SOPK, et par conséquent, l'androgénisation des animaux est l'approche la plus fréquemment utilisée pour induire des symptômes qui ressemblent à ceux du SOPK. Le traitement prénatal ou pré-pubertaire par des androgènes entraîne de nombreuses caractéristiques du SOPK, notamment l'anovulation, des follicules kystiques, des taux élevés d'hormone lutéinisante (LH), une adiposité accrue et une insensibilité à l'insuline (Diamanti-Kandarakis et Dunaif, 2012). Des études du métabolisme énergétique chez les souris SELENOT KO seraient intéressantes pour obtenir une image complète du phénotype observé. Le SOPK a une présentation hétérogène, et il est donc difficile de générer un modèle de souris qui reproduit exactement les phénotypes reproductifs et métaboliques observés chez les femmes atteintes de SOPK. Des chercheurs ont pu déterminer l'étiologie du SOPK en se basant sur deux constatations chez les femmes SOPK enceintes : l'une, déjà connue, est sa corrélation avec une hyperandrogénie, la seconde, inédite, est sa corrélation avec une surproduction d'hormone anti-müllérienne (AMH) pendant la grossesse (Tata et al., 2018). Cette étude a montré que des souris traitées à l'AMH pendant la gestation donnent naissance à des

femelles qui développent les symptômes caractéristiques du SOPK à l'âge adulte. La production de taux anormalement élevés d'AMH pendant la période prénatale pourrait donc être à l'origine d'une hyperandrogénie gestationnelle et d'une imprégnation hormonale anormale du fœtus. Cette équipe a également montré que chez les souris mimant un SOPK, l'exposition *in utero* à des taux d'AMH anormalement élevés, était responsable à l'âge adulte, d'une activité accrue des neurones hypothalamiques sécrétant le neuropeptide GnRH. Cette production intense de GnRH stimule la surproduction de LH, qui elle-même stimule la production d'androgènes (Tata et al., 2018). Dans ce contexte, l'inactivation de la SELENOT au niveau central a dû provoquer une réaction en chaîne chez la femelle SELENOT KO, les neurones hypothalamiques se mettant à sécréter davantage de GnRH, ce qui accroît alors la production de LH par l'hypophyse et provoque au final cette hausse caractéristique d'androgènes dans les ovaires. Pour étayer cette hypothèse nous envisageons d'effectuer un dosage d'AMH et une analyse de l'expression de son récepteur au niveau central.

#### **4. Le traitement de souris SELENOT KO femelles adultes par un antagoniste de la GnRH normalise leur phénotype neuroendocrinien**

Afin de vérifier que le profil d'infertilité observé était bien due à l'hypersécrétion de GnRH, nous avons procédé à l'injection de l'antagoniste de GnRH. De façon fort intéressante, nous avons démontré qu'une administration intermittente de l'antagoniste à GnRH (Cetrorelix) à des souris femelles SELENOT KO, à une concentration qui n'entre que partiellement en compétition avec la GnRH endogène (Tata et al., 2018), est capable de rétablir la cyclicité ovarienne et d'induire une sécrétion normale de LH, de même amplitude que chez le groupe contrôle. Ces données démontrent que l'augmentation de l'activité de la GnRH est responsable des altérations neuroendocriniennes et reproductives observées chez la souris SELENOT KO puisque l'antagoniste de la GnRH corrige le phénotype observé au moins pour la libération de la LH et pour le cycle estrien. Même si ces résultats et nos études en général jettent les bases de la compréhension du rôle de la SELENOT dans le contrôle neuroendocrinien de la reproduction, beaucoup de travail reste à faire pour élucider le mode d'action de la SELENOT dans le SNC et plus particulièrement dans l'hypothalamus.

Les données obtenues peuvent nous fournir de nouvelles informations sur la physiopathologie de la reproduction et ouvrir de nouvelles voies d'investigation pour le traitement des infertilités.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de mieux comprendre l'importance physiologique cruciale de la SELENOT dans la régulation de l'axe HHG.

Dans un premier temps, les expériences que nous avons réalisées ont montré que l'absence de la SELENOT au niveau central conduit à une augmentation de la densité des neurones à GnRH au niveau de l'hypothalamus. Par ailleurs, nous avons montré que cette augmentation de la densité des neurones à GnRH conduit à une élévation du taux de LH et une dérégulation des niveaux de sécrétion des hormones stéroïdiennes. Toutefois, l'effet de la SELENOT dans cette dérégulation neuroendocrine est manifeste, sa fonction précise au sein des neurones à GnRH ou dans les circuits qui régulent l'axe HHG, restent largement inconnus. Ainsi, il serait intéressant de développer un modèle de souris transgéniques invalidées pour l'expression de la SELENOT dans les neurones à GnRH spécifiquement, afin de vérifier son importance au sein de cette population neuronale qui est le chef d'orchestre de la régulation de l'axe HHG. Il serait aussi très intéressant d'invalider spécifiquement le gène de la SELENOT dans les neurones à Kisspeptine ou les neurones dopaminergiques qui contrôlent fortement les neurones à GnRH afin d'identifier le rôle de la SELENOT dans les circuits neuronaux régulant la reproduction. Consécutivement à cette dérégulation neuroendocrine et endocrine, la déficience centrale en SELENOT engendre des défauts au niveau gonadique. Ainsi, nous avons observé une présence de kystes et moins de follicules (primaire, secondaire et tertiaire) et corps jaune dans les ovaires, avec un cycle estrien irrégulier. Au niveau testiculaire, nous avons constaté une atrophie testiculaire et de nombreux tubes séminifères contenant des cellules pycnotiques et des vacuoles.

L'évaluation de la compétence reproductive est essentielle pour comprendre l'impact des dérégulations neuroendocrine et endocrine observée chez les souris SELENOT déficientes. L'axe reproducteur est un intégrateur clé des apports environnementaux et internes adaptant la fertilité à des conditions favorables à la reproduction. Avant d'étudier la fertilité chez les souris SELENOT<sup>-/-</sup>, le comportement sexuel a été analysé. Chez les mâles, nous avons observé une sévère altération du comportement copulatoire et une baisse de la motivation sexuelle. Chez la femelle, nous avons montré une altération du désir d'accouplement qui se traduit par une baisse du niveau des lordoses (baisse de la réceptivité). Ces résultats témoignent encore de l'importance de la SELENOT centrale



pour une fertilité normale chez la souris. Le test de fertilité a porté sur 5 mois. Ceci est important, car une étude de fertilité plus courte, par exemple sur 2 mois, n'aurait pas permis de fournir une description détaillée du phénotype de fertilité chez la souris SELENOT KO. L'hypofertilité des souris SELENOT mutantes a été confirmée en évaluant la taille moyenne des portées engendrées, le nombre de souriceaux par portée et le taux de gestation. En effet, quel que soit l'accouplement réalisé entre une souris SELENOT KO mâle ou femelle avec une souris WT mâle ou femelle, la taille des portées et le taux de gestation étaient très réduits.

Nous avons cherché à déterminer les mécanismes qui pouvaient être responsables de la dérégulation neuroendocrine observée chez la souris SELENOT femelle mutante. Comme nos résultats ont révélé une hyperactivation persistante des neurones à GnRH, nous avons procédé à l'injection de l'antagoniste de GnRH (Cetrorelix) afin de confirmer que les perturbations observées étaient bien dues à l'hypersécrétion de GnRH. Les femelles SELENOT déficientes dans le cerveau ont montré une récupération quasi normale de leur phénotype neuroendocrine après ce traitement. En effet, la cyclicité ovarienne et le taux de libération de la LH ont été rétablis durant la période d'injection de l'antagoniste. Ainsi, la caractérisation du phénotype de fertilité chez la souris SELENOT déficiente a permis de mettre en évidence l'impact de l'augmentation de la densité des neurones à GnRH en absence de la SELENOT sur l'axe gonadotrope, et finalement sur la fertilité. La SELENOT en régulant l'état redox de différents neurones comme cela a été montré dans d'autres études du laboratoire (Castex et al., 2016 ; Boukhzar et al., 2016 ; Alsharif et al., 2020) et les sécrétions hormonales (Prévost et al., 2013 ; Hamieh et al., 2017). Cette protéine assure un fonctionnement du système neuroendocrine contrôlant la fertilité et la reproduction.

Une étude réalisée précédemment au sein de l'équipe a montré une baisse de la densité des neurones dopaminergiques au niveau central, et notamment dans l'hypothalamus chez les souris SELENOT KO mâles et femelles (Godefroy et al., 2022). La dopamine est connue comme étant un inhibiteur de la libération de la GnRH (Liu et Herbison, 2013). Il n'est donc pas exclu que cette augmentation de la densité des neurones à GnRH soit la conséquence d'une baisse de la densité des neurones dopaminergiques chez les souris SELENOT KO. Pour compléter ces données, nous serons amenés à vérifier cette

hypothèse par le biais d'une injection d'agoniste de dopamine (Cabergoline) chez les souris SELENOT-déficientes.

Les résultats obtenus durant cette thèse montrent l'importance de la SELENOT dans les mécanismes centraux impliqués dans la fertilité. Ces résultats établissent un lien entre la SELENOT, connue pour son rôle dans la sécrétion hormonale et dans les mécanismes antioxydants (Hamieh et al., 2017), et l'axe HHG suggérant que l'expression de cette protéine pourrait être altérée dans les troubles de la reproduction, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

..... A .....

- Abbott, D. H. & Bacha, F. Ontogeny of polycystic ovary syndrome and insulin resistance in utero and early childhood. 2013. *Fertil Steril* **100**, 2–11.
- Achilli, C., Ciana, A. & Minetti, G. The discovery of methionine sulfoxide reductase enzymes: An historical account and future perspectives. 2015. *BioFactors* **41**, 135–152.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A. & Gupta, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. 2012. *Reprod Biol Endocrinol* **10**, 49.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A. & Gupta, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. 2012. *Reprod Biol Endocrinol* **10**, 49.
- Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A. & De Iuliis, G. N. Oxidative stress and male reproductive health. 2014. *Asian J Androl* **16**, 31–38.
- Allan CM., Wang Y., Jimenez M., Marshan B., Spaliviero J., Illingworth P. Follicle-stimulating hormone increases primordial follicle reserve in mature female hypogonadal mice. 2006. *J Endocrinol* **188**, 549–557.
- Allan CM, Garcia A., Spaliviero J., Zhang F. P., Jimenez M., Huhtaniemi I., et al. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. 2004. *Endocrinology* **145**, 1587-93.
- Amantana, A., Vorachek, W. R., Butler, J. A., Costa, N. D. & Whanger, P. D. Effect of copper, zinc and cadmium on the promoter of selenoprotein W in glial and myoblast cells. 2002. *Journal of Inorganic Biochemistry* **91**, 356–362.
- Anderson, A. D., Solorzano, C. M. B. & McCartney, C. R. Childhood obesity and its impact on the development of adolescent PCOS. 2014. *Semin Reprod Med* **32**, 202–213.
- Anouar, Y., Lihrmann, I., Falluel-Morel, A. & Boukhzar, L. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. 2018. *Free Radical Biology and Medicine* **127**, 145–152.
- Araki, K., Araki, M. & Yamamura, K. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. 1997. *Nucleic Acids Research* **25**, 868–872.
- Arnér, E. S. J. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine. 2010. *Experimental Cell Research* **316**, 1296–1303.

- Arodin, L., Miranda-Vizuete, A., Swoboda, P. & Fernandes, A. P. Protective effects of the thioredoxin and glutaredoxin systems in dopamine-induced cell death. 2014. *Free Radical Biology and Medicine* **73**, 328–336.

.....B .....

- Baek, I.-J. et al. Expression pattern of cytosolic glutathione peroxidase (cGPx) mRNA during mouse embryogenesis. 2005. *Anat Embryol* **209**, 315–321.
- Baker, B. L., Dermody, W. C. & Reel, J. R. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the mammalian hypothalamus. 1974. *American Journal of Anatomy* **139**, 129–134.
- Bakker, J. and Brock, O. Early Oestrogens in Shaping Reproductive Networks: Evidence for a Potential Organisational Role of Oestradiol in Female Brain Development. 2010. *Journal of Neuroendocrinology* **22**, 728-35.
- Balthazart, J., Fabre-Nys C. Balthazart J., Fabre-Nys C. Le comportement sexuel. La reproduction chez les mammifères et l’homme. 2001. INRA Editions 611-637.
- Barber, T. M., Vojtechova, P. & Franks, S. The impact of hyperandrogenism in female obesity and cardiometabolic diseases associated with polycystic ovary syndrome. 2013. *Horm Mol Biol Clin Investig* **15**, 91–103.
- Barber, T. M. & Franks, S. Genetics of polycystic ovary syndrome. 2013. *Front Horm Res* **40**, 28–39.
- Beach, F. A. & Jordan, L. Sexual exhaustion and recovery in the male rat. 1956. *J. exp. Psychol* **8**, 121-133.
- Beaulieu, M., Labrie, F., Coy, D. H., Coy, E. J. & Schally, A. V. Parellel inhibition of LH-RH-induced cyclic AMP accumulation and LH and FSH release by LH-RH antagonists in vitro. 1975. *J Cyclic Nucleotide Res* **1**, 243–250.
- Bellinger, F. P., Raman, A. V., Reeves, M. A. & Berry, M. J. Regulation and function of selenoproteins in human disease. 2009. *Biochem J* **422**, 11–22.
- Bellinger, F. P. et al. Association of Selenoprotein P with Alzheimer’s Pathology in Human Cortex. 2008. *Journal of Alzheimer’s Disease* **15**, 465–472.
- Blank, S. K., McCartney, C. R. & Marshall, J. C. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. 2006. *Hum Reprod Update* **12**, 351–361.
- Blaustein, J. D. & Erskine, M. S. 2 - Feminine Sexual Behavior: Cellular Integration of Hormonal and Afferent Information in the Rodent Forebrain. 2002. *Hormones, Brain and Behavior, Five-Volume Set* 139–214.

- Brom, M., Both, S., Laan, E., Everaerd, W., Spinhoven, P. The role of conditioning, learning and dopamine in sexual behavior: a narrative review of animal and human studies. 2004. *Neurosci Biobehav Rev* **38**, 38-59.
- Bronstein, J. et al. Age of onset of polycystic ovarian syndrome in girls may be earlier than previously thought. 2011. *J Pediatr Adolesc Gynecol* **24**, 15–20.
- Bronson, F. H. & Maruniak, J. A. Differential effects of male stimuli on follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin secretion in prepubertal female mice. 1976. *Endocrinology* **98**, 1101–1108.
- Bronson, F. H. & Desjardins, C. Endocrine responses to sexual arousal in male mice. 1982. *Endocrinology* **111**, 1286–1291.
- Brown RE. Mammalian social odors: a critical review. 1979. *Advances in the Study of Behavior*. 1;10:103-62.
- Boukhzar, L. et al. Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson’s Disease. 2016 *Antioxidants & Redox Signaling* **24**, 557–574.
- Boutet, M., Roland, L., Thomas, N. & Bilodeau, J.-F. Specific systemic antioxidant response to preeclampsia in late pregnancy: the study of intracellular glutathione peroxidases in maternal and fetal blood. 2009. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **200**, 530.e1-530.e7.
- Burke, M. C., Letts, P. A., Krajewski, S. J. & Rance, N. E. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. 2006. *Journal of Comparative Neurology* **498**, 712–726.
- Burns-Cusato, M., Scordalakes, E. M. & Rissman, E. F. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. 2004. *Physiology & Behavior* **83**, 217–232.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. 1974. *Endocrinology* 1;94(6):1704-8.

.....C.....

- Campbell, R. E. defining the gonadotrophin-releasing hormone neuronal network: transgenic approaches to understanding neurocircuitry. 2007. *Journal of Neuroendocrinology* **19**, 561–573.
- Capela, D., Dombret, C., Poissenot, K. et al. Adult male mice exposure to nonylphenol alters courtship vocalizations and mating. 2018. *Sci Rep* **8**, 2988.

- Caraty, A., Locatelli, A. & Martin, G. B. Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. 1989. *Journal of Endocrinology* **123**, 375–382.
- Caron, E., Ciofi, P., Prevot, V. & Bouret, S. G. alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. 2012. *J. Neurosci.* **32**, 11486–11494.
- Castex, M. T. et al. Selenoprotein T deficiency leads to neurodevelopmental abnormalities and hyperactive behavior in mice. 2016. *Mol Neurobiol* **53**, 5818–5832.
- Castellano S, Lobanov AV, Chapple C, Novoselov SA, Albrecht M, Hua D, Lescure A, Lengauer T, Krol A, Gladyshev VN, Guigò R. Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. 2005. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:16188–93.
- Ching, M. & Lin, Y. C. Ethanol acutely reduces LH and prolactin secretion: possible involvement by dopamine. 1994. *Alcohol* **11**, 105–112.
- Christian, C. & Moenter, S. differential synaptic mediation of estradiol negative and positive feedback effects on gnRH neuron firing activity. 2007. *Biology of Reproduction* **77**, 184.
- Chung, Y. W. et al. Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death. 2009. *Mol Cells* **27**, 609–613.
- Clarke, I. J. & Cummins, J. T. GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. 1985. *Reproduction* **73**, 425–431.
- Clarkson, J., Tassigny, X. d'Anglemont de, Moreno, A. S., Colledge, W. H. & Herbison, A. E. Kisspeptin–GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. 2008. *J. Neurosci* **28**, 8691–8697.
- Clarkson, J., & Herbison, A. E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. 2006. *Endocrinology*, **147**, 5817–5825.
- Clarkson, J., & Herbison, A. E. Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. 2011. *Journal of neuroendocrinology*, **23**(4), 293–301.
- Clarkson, J., Shamas, S., Mallinson, S. & Herbison, A. E. Gonadal steroid induction of kisspeptin peptide expression in the rostral periventricular area of the third ventricle during postnatal development in the male mouse. 2012. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 907–915
- Conrad, M. et al. essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. 2004. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9414–9423.

- Conrad, M. Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1790**, 1575–1585.
- Constantin, S., Iremonger, K. J. & Herbison, A. E. In Vivo recordings of GnRH neuron firing reveal heterogeneity and dependence upon GABAA receptor signaling. 2013. *J. Neurosci.* **33**, 9394–9401.
- Corbould, A. Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. 2007. *J Endocrinol* **192**, 585–594.
- Cottrell, E. C., Campbell, R. E., Han, SK. & Herbison, A. E. postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. 2006. *Endocrinology* **147**, 3652–3661.
- Cox, D., Selig, E., Griffin, M. D. W., Carver, J. A. & Ecroyd, H. Small heat-shock proteins prevent  $\alpha$ -synuclein aggregation via transient interactions and their efficacy is affected by the rate of aggregation. 2016. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 22618–22629.
- Czieselsky, K. et al. Pulse and surge profiles of luteinizing hormone secretion in the mouse. 2016. *Endocrinology* **157**, 4794–4802

..... D .....

- De Croft, S. et al. Spontaneous Kisspeptin Neuron Firing in the Adult Mouse Reveals Marked Sex and Brain Region Differences but No Support for a Direct Role in Negative Feedback. 2012. *Endocrinology* **153**, 5384–5393.
- DeFazio, R. A., Heger, S., Ojeda, S. R. & Moenter, S. M. Activation of a-type  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. 2002. *Molecular Endocrinology* **16**, 2872–2891.
- Derouin-Tochon, F., Beltramo, M. ., Decourt, C., Fleurot, R., Gérard, N., Pinet-Charvet, C., Martinet, S., Robert, V., Taragnat, C., Tillet, Y., & Duittoz, A. L’ovulation chez les mammifères: (Full text available in English). 2019. *INRAE Productions Animales*, 32(3), 445–460.
- De Roux, N. GnRH receptor and GPR54 inactivation in isolated gonadotropic deficiency. 2006. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **20**, 515–528.
- Diamanti-Kandarakis, E., Dunaif, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. 2012. *Endocr Rev* **33**, 981-1030.
- Dierschke, D. J. et al. Blockade by Progesterone of Estrogen—Induced LH and FSH Release in the Rhesus Monkey. 1973. *Endocrinology* **92**, 1496–1501.



- Dikiy, A. et al. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: Genomics and Molecular Insights into the Functions of Selenoproteins of a Novel Thioredoxin-like Family. 2007. *Biochemistry* **46**, 6871–6882.
- Dominguez, J.M. and Hull, M.E. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. 2005. *Physiology & Behavior* **86**, 356-368.
- Donath, J., Michna, H. & Nishino, Y. The antiovarian effect of the antiprogestin onapristone could be related to down-regulation of intraovarian progesterone (receptors). 1997. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **62**, 107–118.
- Dorling, A. A., Todman, M. G., Korach, K. S. & Herbison, A. E. Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. 2003. *Neuroendocrinology* **78**, 204–209.
- Downey, C. M. et al. Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, *Trsp*, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: a putative model for Kashin-Beck disease. 2009. *PLoS Genetics* **5**, (8): e1000616.
- Dubois, S. L. et al. Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor  $\alpha$  in kisspeptin neurons. *Endocrinology* **156**, 1111–1120 (2015).
- Dufour, S. et al. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. 2005. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1040**, 9–21.
- Dumalska, I. et al. Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. 2008. *J. Neurosci.* **28**, 8003–8013.
- Dupont, S. et al. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**, 4277–4291 (2000).

..... E .....

- Eisthen, H. L., Delay, R. J., Wirsig-Wiechmann, C. R. & Dionne, V. E. Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. 2000. *J. Neurosci.* **20**, 3947–3955.
- Esworthy, R. S., Mann, J. R., Sam, M. & Chu, F.-F. Low glutathione peroxidase activity in *Gpx1* knockout mice protects jejunum crypts from  $\gamma$ -irradiation damage. 2000 *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**, G426–G436.

- Eyigor, O., Lin, W. & Jennes, L. Identification of neurones in the female rat hypothalamus that express oestrogen receptor-alpha and vesicular glutamate transporter-2. 2004. *Journal of Neuroendocrinology* **16**, 26–31.

..... F .....

- Fauser, B. C. J. M. et al. Consensus on women’s health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. 2012. *Fertil Steril* **97**, 28-38.
- Finkel, T. Reactive oxygen species and signal transduction. 2001. *IUBMB Life* **52**, 3–6.
- Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH, Hirshfield AN. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod* 1997; **57**: 1233–1237
- Flohé, L. Selenium in mammalian spermiogenesis. 2007. *Biol Chem* **388**, 987–995.
- Floody, O.R., Lisk, R.D., Vomachka, A.J. Facilitation of lordosis by estradiol in the mesencephalic central gray. 1986. *Physiol Behav* **37**, 587–595.
- Forman, H. J. & Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. 2002. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, S4-8.
- Fortune, J.E., Eppig, J.J. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. 1979. *Endocrinology* **105**, 760-8.
- Fradejas, N., Del Carmen Serrano-PÉREZ, M., Tranque, P. & Calvo, S. Selenoprotein S expression in reactive astrocytes following brain injury. 2011. *Glia* **59**, 959–972.
- Franks, S. Polycystic ovary syndrome. 1995. *N Engl J Med* **333**, 853–861.
- Franks, S. Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. 2002. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **16**, 263–272.
- Franks, S., Mason, H. & Willis, D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. 2000. *Mol Cell Endocrinol* **163**, 49–52.
- Fredericks, G. J. & Hoffmann, P. R. Selenoprotein K and protein palmitoylation. 2015. *Antioxidants & Redox Signaling* **23**, 854.
- Franks, S., Gilling-Smith, C., Watson, H. & Willis, D. Insulin action in the normal and polycystic ovary. 1999. *Endocrinol Metab Clin North Am* **28**, 361–378.
- Funes, S. et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**, 1357–1363.

..... G .....

- García-Galiano, D., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory Actions. 2012. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 22–33.
- Georgiadis, J. R., Kringelbach, M. L. & Pfaus, J. G. Sex for fun: a synthesis of human and animal neurobiology. 2012. *Nat. Rev. Urol.* 9, 486–498.
- Gill, S., Sharpless, J. L., Rado, K. & Hall, J. E. Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. 2002. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 2290–2296.
- Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., & Labunsky, V. M. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. 2014. *Physiological Reviews* **94**, 739.
- Godefroy, D., Boukhzar, L., Mallouki, B.Y., Carpentier, E., Dubessy, C., Chigr, F., Tillet, Y., Anouar, Y. SELENOT Deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: An immunohistochemical, in situ hybridization and 3D Light-Sheet Imaging Study. 2022. *Journal of Neuroendocrinology* **10**, 1159.
- Goldman, J.M., Murr, A.S., Cooper, R.L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. 2007. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **80**, 84-97.
- Goodman, R. L., Parfitt, D. B., Evans, N. P., Dahl, G. E. & Karsch, F. J. Endogenous opioid peptides control the amplitude and shape of gonadotropin-releasing hormone pulses in the ewe. 1995. *Endocrinology* **136**, 2412–2420.
- Gottsch, M. L. et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. 2004. *Endocrinology* **145**, 4073–4077.
- Gray, S.A., Mannan, M.A., O'Shaughnessy, P.J. Development of cytochrome P450 aromatase mRNA levels and enzyme activity in ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. 1995. *J Mol Endocrinol* **14**, 295-301.
- Greco, T. L. & Payne, A. H. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. 1994. *Endocrinology* **135**, 262–268.
- Green, E. D. & Baenziger, J. U. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. 1988. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 36–44.
- Greenwald-Yarnell, M. L. et al. ER $\alpha$  in Tac2 Neurons Regulates Puberty Onset in Female Mice. 2016. *Endocrinology* **157**, 1555–1565.

- Gromer, S. et al. Active sites of thioredoxin reductases: Why selenoproteins. 2003. PNAS **100**, 12618–12623.
- Grumolato, L. et al. Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion. 2003. Endocrinology **144**, 2368–2379.
- Grumolato, L. et al. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion. 2008. The FASEB Journal **22**, 1756–1768.

..... H .....

- Hahn, J. D. & Coen, C. W. Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats. 2006. Journal of Comparative Neurology **494**, 190–214.
- Hahn, J. D. & Coen, C. W. Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats. 2006. J Comp Neurol **494**, 190–214.
- Hamieh, A. et al. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. 2017. EMBO Rep **18**, 1935–1946.
- Han, S.-K. et al. Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. 2005. J. Neurosci. **25**, 11349–11356.
- HEAPE, W. Memoirs: The ‘Sexual Season’ of Mammals and the Relation of the ‘Pro-œstrum’ to Menstruation. 1900. Journal of Cell Science **s2-44**, 1–70.
- Herbison, A. E. & Moenter, S. M. Depolarising and hyperpolarising actions of GABAA receptor activation on Gonadotrophin-Releasing Hormone neurones: towards an emerging consensus: GABAA modulation of GnRH neurones. 2011. Journal of Neuroendocrinology **23**, 557–569.
- Herbison, A. E. & Theodosis, D. T. Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. 1992. Neuroscience **50**, 283–298.
- Herbison, A. E., Chapman, C. & Dyer, R. G. Role of medial preoptic GABA neurones in regulating luteinising hormone secretion in the ovariectomised rat. 1991. Exp Brain Res **87**, 345–52.
- Herbison, A. E. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). 2008. Brain Research Reviews **57**, 277–287.

- Hillier, S. G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. 2001. *Mol Cell Endocrinol* **179**, 39–46.
  - Hill, K. E., McCollum, G. W., Boeglin, M. E. & Burk, R. F. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. 1997. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 293–295.
  - Hill, K. E. et al. Deletion of Selenoprotein P Alters Distribution of Selenium in the Mouse. 2003. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 13640–13646.
  - Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K. & Burk, R. F. Neurological Dysfunction Occurs in Mice with Targeted Deletion of the Selenoprotein P Gene. 2004. *The Journal of Nutrition* **134**, 157–161.
  - Hrabovszky, E. et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. 2010. *European Journal of Neuroscience* **31**, 1984–1998.
  - Hrabovszky, E. et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Express Estrogen Receptor- $\beta$ . 2007. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 2827–2830.
  - Hrabovszky, E. et al. Detection of Estrogen Receptor- $\beta$  Messenger Ribonucleic Acid and 125I-Estrogen Binding Sites in Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons of the Rat Brain. 2000. *Endocrinology* **141**, 3506–3509.
  - Huber, L., Squires, E. J. & de Lange, C. F. M. Dynamics of nitrogen retention in entire male pigs immunized against gonadotropin-releasing hormone1. 2013. *Journal of Animal Science* **91**, 4817–4825.
  - Hull, E.M., Muschamp, J.W., Sato S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. 2004. *Physiol Behav* **15**;83(2):291-307.
  - Hull, E. M. & Dominguez, J. M. Sexual behavior. in male rodents. 2007. *Hormones and behavior*, **52**, 45–55.
  - Hull, E. M., et al. Copulation increases dopamine activity in the medial preoptic area of male rats. 1993. *Life sciences* **52**, 935-940.
- .....I .....
- Ikematsu, K., Tsuda, R., Tsuruya, S. & Nakasono, I. Identification of novel genes expressed in hypoxic brain condition by fluorescence differential display. 2007. *Forensic Science International* **169**, 168–172.
  - Ingold, I. et al. Expression of a catalytically inactive mutant form of glutathione peroxidase 4 (GPx4) confers a dominant-negative effect in male fertility. 2005. *J Biol Chem* **290**, 14668–14678.

- Iremonger, K. J., Benediktsson, A. M. & Bains, J. S. Glutamatergic synaptic transmission in neuroendocrine cells: Basic principles and mechanisms of plasticity. 2010. *Frontiers in Neuroendocrinology* **31**, 296–306.
- Irwig, M. S. et al. Kisspeptin Activation of Gonadotropin Releasing Hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. 2004. *NEN* **80**, 264–272.

..... J .....

- Jakupoglu, C. et al. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. 2005. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 1980–1988.
- Jarry, H., Leonhardt, S., Schwarze, T. & Wuttke, W. Preoptic rather than mediobasal hypothalamic amino acid neurotransmitter release regulates GnRH secretion during the estrogen-induced LH surge in the ovariectomized rat. 1995. *NEN* **62**, 479–486.
- Jasoni, C. L., Porteous, R. W. & Herbison, A. E. Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. 2009. *Developmental Dynamics* **238**, 524–531.
- Jean-Faucher, C., Berger, M., de Turckheim, M., Veyssiere, G. & Jean, C. Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in mice from birth to adulthood. 1978. *Acta Endocrinol (Copenh)* **89**, 780–788.
- Jiang, F., Zhang, Y. & Dusting, G. J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. 2011. *Pharmacol Rev* **63**, 218–242.
- Johansson, L., Gafvelin, G. & Arnér, E. S. J. Selenocysteine in proteins—properties and biotechnological use. 2005. *BBA - General Subjects* **1726**, 1–13.
- Jurynek, M. J. et al. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. 2008. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **105**, 12485.

..... K .....

- Kah, O. et al. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology* **153**, 346–364 (2007).
- Kalló, I. et al. Co-Localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones. 2012. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 464–476.
- Karsch, F. J. Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. 1987. *Annual Review of Physiology* **49**, 365–382.
- Karsch, F. J. et al. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. 1984. *Recent Prog Horm Res* **40**, 185–232.

- Karsch, F. J., Legan, S. J., Ryan, K. D. & Foster, D. L. Importance of Estradiol and Progesterone in Regulating LH Secretion and Estrous Behavior During the Sheep Estrous Cycle. 1980. *Biology of Reproduction* **23**, 404–413.
- Kasa-Vubu, J. Z. et al. Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. 1992. *Endocrinology* **131**, 208–212.
- Kasaikina, M. V., Hatfield, D. L. & Gladyshev, V. N. Understanding selenoprotein function and regulation through the use of rodent models. 2012. *BBA - Molecular Cell Research* **1823**, 1633–1642.
- Kauffman, A. S. Sexual differentiation and the Kiss1 system: Hormonal and developmental considerations. 2009. *Peptides* **30**, 83–93.
- Kawakami, S.-I., Hirunagi, K., Ichikawa, M., Tsukamura, H. & Maeda, K.-I. Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: A dual immunoelectron microscopic study. 1998. *Endocrinology* **139**, 1458–1461.
- Kelly, M. J. & Rønnekleiv, O. K. A selective membrane estrogen receptor agonist maintains autonomic functions in hypoestrogenic states. 2013. *Brain Res* **1514**, 75–82.
- Kim, T. et al. SRXN1 Is Necessary for Resolution of GnRH-Induced Oxidative Stress and Induction of Gonadotropin Gene Expression. 2019. *Endocrinology* **160**, 2543–2555.
- Kim, Y.-J., Chai, Y.-G. & Ryu, J.-C. Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. 2005. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**, 1095–1102.
- Kiss, J., Kocsis, K., Csáki, Á. & Halász, B. Evidence for vesicular glutamate transporter synapses onto gonadotropin-releasing hormone and other neurons in the rat medial preoptic area. 2003. *European Journal of Neuroscience* **18**, 3267–3278.
- Kiss, J., Csaba, Z., Csáki, Á. & Halász, B. Demonstration of estrogen receptor  $\alpha$  protein in glutamatergic (vesicular glutamate transporter 2 immunoreactive) neurons of the female rat hypothalamus and amygdala using double-label immunocytochemistry. 2013. *Exp Brain Res* **226**, 595–602.
- Kourides, I. A., Hoffman, B. J. & Landon, M. B. Difference in glycosylation between secreted and pituitary free  $\alpha$ -Subunit of the glycoprotein hormones. 1980. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **51**, 1372–1377.
- Krajewski, S. J. et al. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. 2005 *Journal of Comparative Neurology* **489**, 372–386.

- Krege, J. H. et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor. 1998. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 15677–15682.
- Kryukov, G. V., Kryukov, V. M. & Gladyshev, V. N. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. 1999. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 33888–33897.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. 1997. *Nat Genet.* **15**, 201-4.
- Kumar, D. et al. Specialized Subpopulations of Kisspeptin Neurons Communicate With GnRH Neurons in Female Mice. 2015. *Endocrinology* **156**, 32–38.

..... L .....

- La, H. M. & Hobbs, R. M. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. 2019. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 4071–4102.
- Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L. & Gladyshev, V. N. The Sep15 protein family: roles in disulfide bond formation and quality control in the endoplasmic reticulum. 2007. *IUBMB Life* **59**, 1–5.
- Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L. & Gladyshev, V. N. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. 2014. *Physiological Reviews* **94**, 739–777.
- Lamprecht, S. A., Kohen, F., Ausher, J., Zor, U. & Lindner, H. R. Hormonal stimulation of oestradiol-17 beta release from the rat ovary during early postnatal development. 1976. *J Endocrinol* **68**, 343–344.
- Lee, J.-H. et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. 1996. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **88**, 1731–1737.
- Lee, B. C. et al. MsrB1 and MICALs Regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation. 2013. *Molecular Cell* **51**, 397–404.
- Lee, S.-R. et al. Spatiotemporal expression of the selenoprotein P gene in postimplantational mouse embryos. 2004. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 1005–1011.
- Lehman, M. N., Coolen, L. M. & Goodman, R. L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. 2010. *Endocrinology* **151**, 3479–3489.
- Leranath, C., MacLusky, N. J., Sakamoto, H., Shanabrough, M. & Naftolin, F. Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. 1985. *NEN* **40**, 536–539.



- Lescure, A., Rederstorff, M., Krol, A., Guicheney, P. & Allamand, V. Selenoprotein function and muscle disease. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1790**, 1569–1574.
- Levine JE. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. 2015. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 2:1199-257.
- Li, S. et al. Induction of stress signaling in vitro and suppression of gonadotropin secretion by free fatty acids in female mouse gonadotropes. 2018. *Endocrinology* **159**, 1074–1087.
- Lindenau, J., Noack, H., Asayama, K. & Wolf, G. Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. 1998. *Glia* **24**, 252–256.
- LIPNER, H. & GREEP, R. O. Inhibition of steroidogenesis at various sites in the biosynthetic pathway in relation to induced ovulation. 1971. *Endocrinology* **88**, 602–607.
- Liu, H. & Zhang, J. Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: The pathogenic role of vascular oxidative stress. 2012. *International Journal of Neuroscience* **122**, 494–499.
- Liu, J. & Zhang, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. 2012. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **43**, 187–190 (2012).
- Liu, M. et al. A double signal amplification platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen based on a nanocomposite of ferrocene thiolate stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles with graphene sheet. 2013. *Biosensors and Bioelectronics* **48**, 75–81.
- Liu, X. et al. Frequency-Dependent recruitment of fast amino acid and slow neuropeptide neurotransmitter release controls gonadotropin-releasing-hormone neuron excitability. 2011. *J. Neurosci* **31**, 2421–2430.
- Liu, X. & Herbison, A. E. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female Mice. 2013. *Endocrinology* **154**, 340–350.
- Lovell, M. A., Xie, C., Gabbita, S. P. & Markesbery, W. R. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in alzheimer's disease brain. 2000. *Free Radical Biology and Medicine* **28**, 418–427.
- Lydon, J. P. et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. 1995. *Genes Dev* **9**, 2266–2278.

..... M .....

- Maeda, K. et al. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. 2010. *Brain Research* **1364**, 103–115.

- Marie-Luce, C. et al. Effects of neural androgen receptor disruption on aggressive behavior, arginine vasopressin and galanin systems in the bed nucleus of stria terminalis and lateral septum. 2013. *General and Comparative Endocrinology* **188**, 218–225.
- Marino, M. et al. SEPN1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity. 2015. *Hum Mol Genet* **24**, 1843–1855.
- Mariotti, M. et al. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. 2012. *PLOS ONE* **7**, e33066.
- Martin, J. L. Thioredoxin--a fold for all reasons. 1995. *Structure* **3**, 245–250.
- Mayer, C. et al. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor  $\alpha$ -signaling in kisspeptin neurons. 2010. *PNAS* **107**, 22693–22698.
- Mazza, R. et al. Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus*. 2019. *Journal of Experimental Biology* **222**.
- McCartney, C. R. & Marshall, J. C. Polycystic Ovary Syndrome. 2016. *N Engl J Med* **375**, 54–64.
- McGill, T. E. Sexual behavior in three inbred strains of mice. 1962. *Behaviour* **19**, 341–350.
- McQuillan, H. J., Han, S. Y., Cheong, I. & Herbison, A. E. GnRH Pulse Generator Activity Across the Estrous Cycle of Female Mice. 2019. *Endocrinology* **160**, 1480–1491.
- Mehdi, Y. & Dufrasne, I. Selenium in Cattle: A Review. *Molecules* **21**, 545 (2016).
- Millar, R.P. et al. Gonadotropin releasing hormone receptors. 2004. *Endocrine Reviews* **25**, 235–275.
- Miller, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. 1988. *Endocrine Reviews* **9**, 295–318.
- Moenter, S. M., Brand, R. M., Midgley, A. R. & Karsch, F. J. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. 1992. *Endocrinology* **130**, 503–510.
- Moenter, S. M. & DeFazio, R. A. Endogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. 2005. *Endocrinology* **146**, 5374–5379.
- Moghadaszadeh, B. et al. Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. 2001. *Nat Genet* **29**, 17–18.
- Montero-Hadjadje, M. et al. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. 2009. *J Biol Chem* **284**, 12420–12431.

- Moore, A. M., Prescott, M. & Campbell, R. E. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic ovarian syndrome. 2013. *Endocrinology* **154**, 796–806.
- Moskovitz, J. et al. Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. 1996. *PNAS* **93**, 3205–3208.
- Moustafa, M. E. & Antar, H. A. A Bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. 2012. *Biochem Genet* **50**, 736–747.
- Msaouel, P., Diamanti, E., Tzanela, M. & Koutsilieris, M. Luteinising hormone-releasing hormone antagonists in prostate cancer therapy. 2007. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **12**, 285–299.
- Müller, W. E. & Pedigo, N. W. Brain aging: a risk factor of neurodegenerative disorders and a target for therapeutic intervention. 1994. *Life Sci* **55**, 1975–1976.

..... N .....

- Navarro, V. M. et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. 2011. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **300**, E202–E210.
- Navarro, V. M. et al. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by Kisspeptin/Dynorphin/Neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. 2009. *J. Neurosci.* **29**, 11859–11866.

..... O .....

- O’Shaughnessy, P. J., Morris, I. D., Huhtaniemi, I., Baker, P. J. & Abel, M. H. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: Data from mutant and genetically modified mice. *Molecular and Cellular* 2009. *Endocrinology* **306**, 2–8.
- Oakley, A. E., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Kisspeptin signaling in the brain. 2009. *Endocrine Reviews* **30**, 713–743.
- Ooishi, Y. et al. Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen. 2012. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **131**, 37–51.
- Ottem, E. N., Godwin, J. G., Krishnan, S. & Petersen, S. L. Dual-Phenotype GABA/Glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. 2004. *J. Neurosci* **24**, 8097–8105.

- Park, S. et al. Dopaminergic differentiation of neural progenitors derived from placental mesenchymal stem cells in the brains of Parkinson’s disease model rats and alleviation of asymmetric rotational behavior. 2012. *Brain Research* **1466**, 158.
- Parkash, J. et al. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. 2015. *Nat Commun* **6**, 6385.
- Pastor, C. L., Griffin-Korf, M. L., Aloji, J. A., Evans, W. S. & Marshall, J. C. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. 1998. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 582–590.
- Paszkowski, T., Traub, A. I., Robinson, S. Y. & McMaster, D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. 1995. *Clin Chim Acta* **236**, 173–180.
- Penatti, C. A. A., Davis, M. C., Porter, D. M. & Henderson, L. P. Altered GABAA receptor-mediated synaptic transmission disrupts the firing of gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice under conditions that mimic steroid abuse. 2010. *J. Neurosci* **30**, 6497–6506.
- Pfaff, D. W. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. 1973. *Science* **182**, 1148–1149.
- Pfaus, J.G. Pathways of Sexual Desire. 2009. *Journal of Sexual Medicine* **6**, 1506–33.
- Picot, M. et al. Vulnerability of the neural circuitry underlying sexual behavior to chronic adult exposure to oral bisphenol A in male Mice. 2014. *Endocrinology* **155**, 502–512.
- Pierce, J. G. & Parsons, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. 1981. *Annual Review of Biochemistry* **50**, 465–495.
- Pitts, M. W. et al. Deletion of Selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. 2013. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 26121–26134.
- Plant, T. M. Neurobiological Bases Underlying the Control of the Onset of Puberty in the Rhesus Monkey: A Representative Higher Primate. 2001. *Frontiers in Neuroendocrinology* **22**, 107–139.
- Plant, T. M. & Zeleznik, A. J. *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*. 2014. Academic Press.
- Pothion, H. et al. Selenoprotein T: An essential oxidoreductase serving as a guardian of endoplasmic reticulum homeostasis. 2020. *Antioxidants & Redox Signaling* **33**, 1257–1275.
- Prevost, G. et al. The PACAP-Regulated Gene Selenoprotein T Is Abundantly Expressed in Mouse and Human  $\beta$ -Cells and Its Targeted Inactivation Impairs Glucose Tolerance. 2013. *Endocrinology* **154**, 3796–3806.

..... R .....

- Radovick, S., Levine, J.E., Wolfe, A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. 2012. *Front Endocrinol* **3**, 52.
- Rajendren, G., & Moss, R. L. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: The interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. 1993. *Brain Research* **617**, 81–86.
- Rayman, M. P. Selenium and human health. 2012. *Lancet* **379**, 1256–1268.
- Raskin, K. et al. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. 2009. *J. Neurosci* **29**, 4461–4470.
- Reeves, M. A., Bellinger, F. P. & Berry, M. J. The neuroprotective functions of selenoprotein M and its role in cytosolic calcium regulation. 2010. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 809.
- Rhee, S. G. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. 2006. *Science* **312**, 1882–1883.
- Richards, J.S. and Pangas, S.A. The ovary: basic biology and clinical implications. 2010. *J Clin Invest* **120**, 963-972.
- Roland, A. V. & Moenter, S. M. Prenatal androgenization of female mice programs an increase in firing activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that is reversed by metformin treatment in adulthood. 2011. *Endocrinology* **152**, 618–628 .
- Ronnekleiv, O. K., Kelly, M. J. Kisspeptin excitation of GnRH neurons. 2013. *Advances in experimental medicine and biology* **784**, 113-31.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. 2004. *Fertil Steril* **81**, 19–25.
- Roux, N. de et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1- derived peptide receptor GPR54. 2003. *PNAS* **100**, 10972–10976.
- Rueli, R. H. L. H. et al. Increased selenoprotein P in choroid plexus and cerebrospinal fluid in alzheimer’s disease brain. 2015. *Journal of Alzheimer’s Disease* **44**, 379–383.
- Ruka, K. A., Burger, L. L. & Moenter, S. M. Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and κ-opioid receptors in adult male mice. 2013. *Endocrinology* **154**, 2761–71.
- Ruka, K. A., Burger, L. L. & Moenter, S. M. Both estrogen and androgen modify the response to activation of neurokinin-3 and κ-Opioid receptors in arcuate kisspeptin neurons from male mice. 2016. *Endocrinology* **157**, 752–763.

- Saijoh, K. et al. Molecular cloning of cDNA encoding a bovine selenoprotein P-like protein containing 12 selenocysteines and a (His-Pro) rich domain insertion, and its regional expression. 1995. *Brain Res Mol Brain Res* **30**, 301–311.
- Saito, Y. & Takahashi, K. Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. 2002. *Eur J Biochem* **269**, 5746–5751.
- Sarah J. Meachem, Robert I. McLachlan, David M. de Kretser, David M. Robertson, Nigel G. Wreford, neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult sertoli and spermatogenic Cell Numbers. 1996. *Biology of Reproduction* **54**, 36–44.
- Savaskan, N. E., Borchert, A., Bräuer, A. U. & Kuhn, H. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: Specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. 2007. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 191–201.
- Scaramuzzi, R. J., Tillson, S. A., Thorneycroft, I. H. & Caldwell, B. V. Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioral estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized Ewe. 1971. *Endocrinology* **88**, 1184–1189.
- Schally, A. V. et al. Gonadotropin-Releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and Follicle-Stimulating hormones. 1971. *Science* **173**, 1036–1038.
- Scharpf, M. et al. Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. 2007. *J Neural Transm* **114**, 877–884.
- Schoenmakers, E. et al. Mutations in the selenocysteine insertion sequence--binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. 2010. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 4220.
- Schoenmakers, E. et al. Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis. 2016. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 992.
- Seeburg, P. H., Mason, A. J., Stewart, T. A. & Nikolics, K. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. 1987. *Recent Prog Horm Res* **43**, 69–98.
- Seeher, S. et al. Impaired selenoprotein expression in brain triggers striatal neuronal loss leading to co-ordination defects in mice. 2014. *Biochem J* **462**, 67–75.
- Seiler, A. et al. Glutathione Peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-Mediated Cell Death. 2008. *Cell Metabolism* **8**, 237–248.
- Seminara, S. B. et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. 2003. *The New England Journal of Medicine* **349**, 1614–1627.

- Seminara, S. B. & Kaiser, U. B. New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1. 2005. *Endocrinology* **146**, 1686–1688.
- Shchedrina, V. A., Zhang, Y., Labunskyy, V. M., Hatfield, D. L. & Gladyshev, V. N. Structure–Function Relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-Resident Selenoproteins. 2010. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 839–849.
- Silva, M., Decoster, L., Trova, S., Mimouni, N., Delli, V., Chachlaki, K., Yu, Q., Boehm, U., Prevot, V., & Giacobini, P. Female sexual behavior is disrupted in a preclinical mouse model of PCOS via an attenuated hypothalamic nitric oxide pathway. 2022. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2203503119.
- Silverman, A. J., Krey, L. C. & Zimmerman, E. A. A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. 1979. *Biol Reprod* **20**, 98–110.
- Skinner, D. C. et al. Effects of Gonadotrophin-Releasing Hormone Outside the Hypothalamic-Pituitary-Reproductive Axis. 2009. *Journal of Neuroendocrinology* **21**, 282–292.
- Skorupskaite, K., George, J. T. & Anderson, R. A. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. 2014. *Human Reproduction Update* **20**, 485–500.
- Skynner, M. J., Sim, J. A. & Herbison, A. E. Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic Acids in adult Gonadotropin-Releasing Hormone neurons1. 1999. *Endocrinology* **140**, 5195–5201.
- Smith, J. T., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. 2006. *Reproduction* **131**, 623–630.
- Smith, J. T. et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by Sex steroids in the brain of the male mouse. 2005. *Endocrinology* **146**, 2976–2984.
- Soerensen, J. et al. The role of thioredoxin reductases in brain development. 2008. *PLOS ONE* **3**, e1813.
- Soules, M. R. et al. Progesterone Modulation of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Normal Women. 1984. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **58**, 378–383.
- Stamatiades, G. A. & Kaiser, U. B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. 2008. *Molecular and Cellular Endocrinology* **463**, 131–141.
- Sullivan, S. D. & Moenter, S. M. Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropinreleasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7129–7134.

- Sun, Y., Butler, J. a. & Whanger, P. d. Glutathione peroxidase activity and selenoprotein W levels in different brain regions of selenium-depleted rats. 2001. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **12**, 88–94.

..... T .....

- Tada, H. et al. Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the generation of the luteinizing hormone surge in female rats. 2013. *Neuroscience* **248**, 664–669.
- Tata, B., Mimouni, N., Barbotin, A.L., Malone, S.A., Loyens, A., Pigny, P., Dewailly, D., Catteau-Jonard, S., Sundström-Poromaa, I., Piltonen, T.T., Dal Bello, F., Medana, C., Prevot, V., Clasadonte, J., Giacobini, P. Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. 2018. *Nat Med.* **24**, 834-846.
- Takeo, K., Tanaka, R., Miyaji, M., & Nishimura, K. Unbudded G2 as well as G1 arrest in the stationary phase of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans*. 1995. *FEMS Microbiol Lett* **129**, 231–236.
- Tanguy, Y. et al. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. 2011. *Endocrinology* **152**, 4322–4335.
- Teede, H. J. et al. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: summary of an evidence-based guideline. 2011. *Med J Aust* **195**, S65-112.
- Temple, J. L., Scordalakes, E. M., Bodo, C., Gustafsson, J.-Å. & Rissman, E. F. Lack of functional estrogen receptor  $\beta$  gene disrupts pubertal male sexual behavior. 2003. *Hormones and Behavior* **44**, 427–434.
- Terasawa, E. & Fernandez, D. L. Neurobiological Mechanisms of the Onset of Puberty in Primates. 2001. *Endocrine Reviews* **22**, 111–151.
- Thompson, E. L. et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal Axis. 2004. *Journal of Neuroendocrinology* **16**, 850–858.
- Todman, M. G., Han, S.-K. & Herbison, A. E. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. 2005. *Neuroscience* **132**, 703–712.
- Trifonov, S., Yamashita, Y., Kase, M., Maruyama, M. & Sugimoto, T. Glutamic acid decarboxylase 1 alternative splicing isoforms: characterization, expression and quantification in the mouse brain. 2014. *BMC Neuroscience* **15**, 114.



➤ Tronche, F. et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. 1999. *Nat Genet* **23**, 99–103.

True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K. L. & Smith, M. S. Characterisation of arcuate nucleus Kisspeptin/Neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the Rat. 2011. *Journal of Neuroendocrinology* **23**, 52–64.

..... U .....

➤ Uenoyama, Y., Inoue, N., Nakamura, S., Tsukamura, H. kisspeptin neurons and estrogen-receptor  $\alpha$  signaling: unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. 2021. *Int J Mol Sci* **22**, 9229.

➤ Uenoyama, Y., Nagae, M., Tsuchida, H., Inoue, N., & Tsukamura, H. Role of KNDy neurons expressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin A as a GnRH Pulse Generator Controlling Mammalian Reproduction. 2021. *Frontiers in endocrinology* **12**, 724632.

..... V .....

➤ Vacher, C., Ferrière, F., Marmignon, M.-H., Pellegrini, E. & Saligaut, C. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. 2002. *General and Comparative Endocrinology* **127**, 198–206.

➤ Valentine, W. M., Abel, T. W., Hill, K. E., Austin, L. M. & Burk, R. F. Neurodegeneration in mice resulting from loss of functional Selenoprotein P or its receptor a polipoprotein E receptor 2. 2008. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **67**, 68–77.

➤ Van Goor, F., Goldberg, J. I. & Chang, J. P. Dopamine-D2 actions on voltage-dependent calcium current and gonadotropin-II secretion in cultured goldfish gonadotrophs. 1998. *Journal of Neuroendocrinology* **10**, 175–186.

➤ Veening, J. G., & Coolen, L. M. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. 2014. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **121**, 170–183.

..... W .....

➤ Wallace, J. G., Potts, R. H., Szamosi, J. C., Surette, M. G. & Sloboda, D. M. The murine female intestinal microbiota does not shift throughout the estrous cycle. 2018. *PLoS One* **13**, e0200729.

➤ Wang, L., DeFazio, R. A. & Moenter, S. M. Excitability and burst generation of AVPV kisspeptin neurons are regulated by the estrous cycle via multiple conductances modulated by estradiol action. 2016. *eNeuro* **3**, 0094-16.

➤ Wintermantel, T. M. et al. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. 2006. *Neuron* **52**, 271–280.

- Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, Schomburg L, Ko`hrle J, Hatfield DL, and Schweizer U. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. 2010. *FASEB J* 24:844–852
- Wirth, E. K. et al. Cerebellar hypoplasia in mice lacking selenoprotein biosynthesis in neurons. 2014. *Biol Trace Elem Res* **158**, 203–210.
- Wise, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev.* 2004. *Neurosci* **5**, 483–494.
- Witham, E. A., Meadows, J. D., Shojaei, S., Kauffman, A. S. & Mellon, P. L. Prenatal exposure to low levels of androgen accelerates female puberty onset and reproductive senescence in mice. 2012. *Endocrinology* **153**, 4522–4532.
- White, S.S. and Ojeda, S.R. Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat. 1981. *Endocrinology* **109**, 152-61.
- Wu, M.V., and Shah, N.M. Control of masculinization of the brain and behavior. 2011. *Curr. Opin. Neurobiol* **21**, 116–123.

..... Y .....

- Yang, C.F., and Shah, N.M. Representing sex in the brain, one module at a time. 2014. *Neuron* **82**, 261–278.
- Yeo, S. H., & Herbison, A. E. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. 2011. *Endocrinology*, **152**, 2387–2399.
- Yip, S. H., Boehm, U., Herbison, A. E. & Campbell, R. E. conditional viral tract tracing delineates the projections of the distinct kisspeptin neuron populations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. 2015. *Endocrinology* **156**, 2582–2594.
- Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*. 2005 Nov **18**, 123(4):669-82.
- Young, L. et al. Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. 2001. *Science* **291**, 2135-8.

..... Z .....

- Zarczynska, K., Sobiech, P., Radwinska, J. & Rękawek, W. Effects of selenium on animal health. 2012. *Journal of Elemntology* **18**.
- Zhang, C., Bosch, M. A., Rønnekleiv, O. K. & Kelly, M. J. Kisspeptin activation of TRPC4 channels in female GnRH neurons requires PIP2 depletion and cSrc kinase activation. 2013. *Endocrinology* **154**, 2772–2783.



# **Annexe**

# Central SELENOT expression regulates gonadotrope axis function, sexual behavior and fertility

BenYamine Mallouki<sup>a,b,c</sup>, Loubna Boukhzar<sup>a,b</sup>, David Godefroy<sup>a,b</sup>, *Maria Manfredi-Lozano*<sup>d</sup>, Ludovic Dumont<sup>a,b</sup>, Marjorie Gras<sup>a,b</sup>, Yves Tillet<sup>e</sup>, Nathalie Rives<sup>a,b</sup>, Fatiha Chigr<sup>c</sup>, Vincent Prévot<sup>d</sup>, Youssef Anouar<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>UNIROUEN, Inserm U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Laboratory, Rouen Normandie University, 76821, Mont-Saint-Aignan, France

<sup>b</sup>Institute for Research and Innovation in Biomedicine, 76000, Rouen, France

<sup>c</sup>Laboratory of Biological Engineering, Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco

<sup>d</sup>Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, INSERM U1172, Lille University, Lille, France

<sup>e</sup>PRC, INRA Val de Loire, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, IFCE, Tours University, 37380, Nouzilly, France.

Corresponding author: Youssef Anouar, INSERM U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication Laboratory, Rouen-University, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

Email address: Youssef.anouar@univ-rouen.fr

## **Abstract**

Reproductive disorders are associated with neuroendocrine disturbances of the hypothalamic-hypophysis-gonadal (HHG) axis, which can result from a defective production and action of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH). We have recently shown that SELENOT, a new thioredoxin highly expressed in neuroendocrine and endocrine cells, plays a crucial role in hormone secretion by controlling ER stress. Interestingly, the conditional knockout of the SELENOT gene in the central nervous system resulted in a very strong decline in fertility and disturbance of sexual behavior in mice. Therefore, we sought to characterize the relationship between SELENOT gene disruption and alteration of the HHG axis. To this end, we performed mating tests and sexual behaviour recordings to probe the degree of fertility in KO mice. We also carried out histological studies, immunohistochemistry and hormonal assays to examine the morphology of the gonads and to assess the levels of hormones and neurohormones produced in mice. The results showed that female animals exhibit severe estrous cycle disorders and a phenotype similar to polycystic ovary syndrome (PCOS), with an increase in LH and testosterone levels and a decrease in estradiol levels. In male mice, a marked increase in LH, testosterone and estradiol levels were observed. In the hypothalamus, SELENOT KO mice showed increased density of GnRH neurons in the preoptic area, and in their terminals in the median eminence. These results demonstrate the instrumental role of SELENOT in the function of the HHG axis.

## **Abbreviation:**

GnRH, gonadotropin-releasing hormone; SELENOT, selenoprotein T; ER, endoplasmic reticulum; KO, knockout; HHG, hypothalamic-hypophysis-gonadal; PCOS, polycystic ovary syndrome; LH, luteinizing hormone; FSH, *follicle-stimulating hormone*

## Introduction

Fertility and reproduction are vital physiological functions that ensure species maintenance. In mammals, these functions are under the control of the gonadotrope axis whose chef d'orchestre is the neuropeptide GnRH produced in the preoptic area of the hypothalamus. This neuropeptide stimulates the anterior pituitary to release the gonadotropin hormones LH and FSH, the principal hormones that regulate the activity of the gonads. GnRH-producing neurons themselves receive inputs from various brain regions to control reproduction. Indeed, the function of the GnRH network, which includes GnRH neurons but also the glial tanycytes and astrocytes, is tightly regulated through the action of different neurotransmitters and neuropeptides, but also steroid hormones released by the gonads, which collectively control our ability to procreate. Although several recent major discoveries have illuminated the pathways and mechanisms involved in the central control of the reproductive function, the neuronal networks that fine-tune the GnRH neuron activity and the intracellular relays required for the proper function of these neuronal components are only partially elucidated.

As secretory neuroendocrine cells, the metabolism of hypothalamic neurons involved in the control of the gonadotrope axis is highly and constantly active to enable them to produce the appropriate amounts of neuropeptides and neurotransmitters necessary for their function. To avoid proteostasis disruption, these cells ought to express supportive mechanisms that allow them to produce and release their secretory products in a regulated and timely manner.

A particular class of ER proteins named selenoproteins which incorporates the essential micronutrient selenium (Se) as the 21st amino acid selenocysteine (Sec; U) has recently emerged as a central player in ER homeostasis and hormone production in neuroendocrine cells. In particular, selenoprotein T (SELENOT) is a thioredoxin-like enzyme with a CXXU catalytic site, which is up-regulated during neuroendocrine cell differentiation [1-2]. It is widely expressed during development [16-17], and its genetic ablation in mice results in embryonic lethality before embryonic day (E)8 [2]. SELENOT is able to reduce free radical

level and to prevent ER stress [3-4], most probably by reducing disulfide bridges during glycoprotein synthesis and folding although its precise mechanism of action in nerve cells is still unknown.

We have previously shown that central SELENOT gene disruption in the central nervous system leads to altered density of neurotransmitter-producing neurons [5], impaired neuroprotection [2] and altered animal behavior [6]. However, the role of SELENOT in the neuroendocrine brain remains largely unexplored. In fact, we observed in the present study that SELENOT gene disruption in the brain leads to impaired fertility and altered sexual behavior, which are associated to abnormal levels of the gonadotrope axis components. Further investigations allowed to relate these alterations to perturbed GnRH production which is most likely due to a default in the mechanisms that control GnRH production including kisspeptin and dopaminergic neurons. These data revealed a hitherto unknown function of a selenoptotein in the control of fertility and reproduction in mammals.

## **METHODS**

### **Animals**

Mice were housed under a 12-h light/dark cycle (light on at 07:00 am) and had access to food and water ad libitum. Ambient temperature was maintained at 22°C ± 2°C. To generate transgenic mice, the SELENOT gene was floxed by homologous recombination in the genome of C57BL/6J mice to delete the sequence region encoding the thioredoxin-like domain (exons 2 and 3). Mice with SELENOT<sup>fl/fl</sup> allele were generated in the Mouse Clinical Institute (Strasbourg, France). They were then bred with Cre recombinase-expressing mice to promote the genetic deletion of the thioredoxin-like motive. The brain conditional mutant Nes-Cre/SELENOT<sup>fl/fl</sup> [6] was generated by mating SELENOT<sup>fl/fl</sup> mice with animals expressing the Cre recombinase under the control of the rat nestin (*Nes*) promoter (*Tg [Nestin-Cre]1 Kln<sup>+/-</sup>* knockin mice), which were acquired from the Jackson Laboratory [7]. The genotypes were determined by PCR with the following primers: forward, 5'GGCTTTATGTAAGCAGTTCTAAACTGTTTCTGC-3', and reverse, 5'-



CGCCCCATTTTATAAACTTTGTATGTTTATGCCC-3', for WT (211 bp) and *SELENOT<sup>fl</sup>* (261 bp) alleles; forward, 5'-ATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATAC-3', and reverse, 5'-GCCAGATTACGTATA TCCTGGCAGC-3', for *Cre* allele (387 bp); and forward, 5'-GGCTTTATGTAAGCAGTTCTAAACTGTTTCTGC-3', and reverse, 5'-GCCTAGGTTTTACCTGAGAAACCAAAG G-3', for *SELENOT<sup>-</sup>* allele (409 bp).

### **Estrous cycle determination and fertility**

The estrous cycle stage was assessed through cytological analysis of vaginal smears [8]. The reproductive competency of the animals was determined by mating animals, for a period of 5 months. Fertility index (number of litters per female over 5 months) and number of pups/litter (number of pups) were determined, and pregnancy rate was calculated as the ratio of the number of females with pregnancy to the number of females with successful mating.

### **Sexual behavior**

Three-months-old, sex-experienced male and female mice were individually housed for 1 week before being used. To evaluate sexual behavior, each male was placed into a cage for 10 min for adaptation before a female was introduced into the cage. Female mice that were in natural estrus phase were used. The test lasted 2 h and was conducted under red light illumination during the dark phase of the light/dark cycle. It was videotaped and scored manually as previously described [9]. The following targeted measures were recorded and scored: mount latency defined as the time between introduction of the female mice and the first mount; intromission latency considered as the time between introduction of the female mice and the first intromission; mount frequency, which is the number of mounts; intromission frequency, which is the number of intromissions and copulatory efficacy which is calculated as intromission frequency divided by mount frequency + intromission frequency [10]. Mount was defined as a male using both fore paws to climb onto a female from behind for copulation. Intromission was

defined as a male pelvic thrust with a stable frequency continuously, and demonstration of the female anogenital area elevated over the ground when finished. Behavioral ejaculations were marked when an intromission was accompanied with longer lasting thrusting.

The lordosis response was defined as a female with all four paws grounded, with the hind region elevated from the floor of the test chamber, and no evidence of attempt to escape or exhibition of a defensive upright posture, and the back slightly arched [10]. A lordosis quotient (LQ) was calculated by dividing the number of lordosis responses displayed by the female subjects by the number of mounts received [11].

### **Tissue perfusion and immunohistochemistry**

Adult mice were anesthetized using a solution of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and then perfused transcardially with 0.9% NaCl in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). Brains and gonads were removed and postfixed in the same fixative at 4°C, which was changed to PBS azide after 24 h. Tissues were sectioned into 40- $\mu$ m slices with a vibratome. The sections were incubated with 1% donkey serum diluted in 1% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100 in PBS for 2 h at room temperature, and then exposed overnight at 4°C to primary antibodies, including anti-SELENOT diluted 1:200 [1], and anti-GnRH diluted 1:5000 (gift of Dr Y. Tillet). Immunostaining was visualized using Alexa Fluor 488 or 594-conjugated secondary antibodies diluted 1:200 (Invitrogen, Saint Aubin, France) Counterstaining with 1  $\mu$ g/ml 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) in PBS for 1 min was performed before mounting the slides with PBS/glycerol 50/50. Samples were analyzed with a Leica SP8 confocal laser-scanning microscope (DMRAX-UV, Leica Microsystems, Nanterre, France).

### **LH, testosterone and estradiol Levels**

LH levels were determined by a sandwich ELISA, as described previously [12]. Briefly, a 96- well high-affinity binding microplate (Corning) was coated with a bovine LH $\beta$ 518B7 monoclonal antibody (1:1000 in PBS; 50  $\mu$ L per well), and circulating hormone levels were determined using a mouse LH-RP reference provided by Albert F. Parlow (National Hormone & Pituitary Program, Torrance, CA, USA), a rabbit polyclonal primary antibody for LH (1:10,000; rabbit antiserum AFP240580Rb; National Hormone and Peptide Program, USA) and a polyclonal goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000; DAKO). Commercially available mouse testosterone and estradiol ELISA kits were used to measure plasma testosterone (DEV9911; Demeditec Diagnostics, GmnH) [13] and estradiol (Cayman Chemical, Catalog no. 582251, USA). Control levels were in accordance with the manufacturer's instructions.

### **Ovarian histology and analysis**

Ovaries were collected from 5-6-month-old diestrus females, immersion-fixed in 4% PFA solution and stored at 4°C. Paraffin-embedded ovaries were sectioned at a thickness of 5  $\mu$ m (histology facility, University of Lille 2, France) and stained with hematoxylin-eosin (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier). Sections were visualized with a light microscope (Zeiss Axioscope, BrightField Germany) and examined throughout the ovary. Total number of follicles at different developmental stages and corpora lutea (CL) were classified and quantified as previously reported [14].

### **Testis histology and analysis**

Testicular tissue was fixed for 12 h in Bouin's fixative (Sigma-Aldrich®) at room temperature, then dehydrated in graded baths of ethanol and embedded in paraffin. Sections (3- $\mu$ m thick) were cut using a microtome (Leica Microsystems® GmbH, Wetzlar, Germany). Serial tissue sections were mounted on each Polysine® slide (Thermo Fisher Scientific Inc). Two slides (n° 1 and 5) were examined to obtain an accurate and global assessment of the tissue. Slides were

coded for blinded analysis and stained with hemalun-eosin-saffron to have an accurate appreciation of seminiferous tubule architecture, as previously described [15]. Serial digital images were obtained with a light microscope (Leica Microsystem GmbH) equipped with Leica Application Suite software (Leica Microsystem GmbH). A ratio between the number of pyknotic cell nuclei to the total surface area of each seminiferous tubule was evaluated for a total of 100 seminiferous tubules per testis. The number of pyknotic cells per seminiferous tubule presenting at least one pyknotic cell nuclei (number of pyknotic cell/ 1000  $\mu\text{m}^2$ ) was assessed. In addition, the percentage of seminiferous tubules with vacuolization was also evaluated.

## **IDISCO**

### **- Whole brain immunostaining**

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg  $\text{kg}^{-1}$  body weight) and xylazine (10 mg  $\text{kg}^{-1}$  body weight) injected i.p., and PBS followed by PFA 4%. Brains were extracted and post-fixed in PFA 4% overnight at 4°C. Fixed brains were washed in PBS for 1 h twice, then in 20-40-60-80% methanol (in H<sub>2</sub>O) and 100% methanol twice for 1 h. They were then bleached with 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% methanol overnight at 4°C in the dark without shaking. Brains were rehydrated successively in 80-60-40-20% methanol, and PBS, each step lasting 1 h before staining procedures. Pretreated brains were incubated in a permeabilization solution containing 0.2% Triton X-100, 20% DMSO, 0.3M Glycine in PBS at 37°C for 2 days with shaking. Then, the brains were transferred in a blocking solution (0.2% Triton X-100, 6% donkey serum, 10% DMSO in PBS) at 37°C for 2 days with shaking. The brains were then washed in a solution of PBS containing 0.2% Tween-20, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparin for 1 day and half, and incubated with the primary antibody (rabbit anti-GnRH, monoclonal antibodies raised in the mouse – Sternberger Monoclonals, USA) diluted 1:5000 in the incubation solution containing 0.2% Tween-20, 5% DMSO, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin, 3% donkey serum in PBS, for 7 days at 37°C with shaking. The brains were then washed with the washing solution described above for 1 day, and then incubated with secondary

antibody (donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch, Interchim, Montluçon, France) diluted 1:500 in the incubation solution containing 0.2% Tween-20, 10 µg/mL heparin, 3% donkey serum in PBS, for 7 days at 37°C with shaking. The brains were then washed in the washing solution during 1 day.

#### - **Clearing procedure**

First, the brains were dehydrated in methanol/ H<sub>2</sub>O solution (20%, 40%, 60%, and 80% 1 h each) and 100% methanol for 1 h twice with shaking. The brains were then incubated overnight in 1 volume of 100% methanol and 2 volumes of 100% dichloromethane anhydrous (Sigma-Aldrich) at room temperature, and washed twice for 15 min in 100% dichloromethane with shaking. Finally, the brains were incubated in 100% dibenzyl ether (Sigma-Aldrich) for at least 3 h with shaking before imaging.

#### - **Light sheet imaging**

Cleared samples were imaged with an Ultramicroscope II (LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) using the InspectorPro software (LaVision BioTec, Bielefeld Germany). The light sheet was generated by a laser at wavelengths of 561 nm or 640 nm (Coherent Sapphire Laser, LaVision BioTec) and six cylindrical lenses. A binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus, Bielefeld Germany) with a 2x objective (MVPLAPO, Olympus, Bielefeld Germany) was used at 0.63x magnification.

Three-dimensional image was constructed from a Z-series of Ultramicroscope II fluorescence images using the Imaris software, version 9.0.0\_64 (<http://bitplane.com>, Zürich, Switzerland). Three-D pictures and tiff series were obtained using the « Snapshot » and the « animation » tools of the Imaris software. Semi-automatic counting of GnRH neurons was done with the « spot detection » tool of the Imaris software, a manual verification was used with the “clipping plan” tool.

## **GnRH antagonist treatment**

Adult females were cycled for 12 days before the onset of GnRH antagonist treatment. Vaginal cytology was analyzed under an inverted microscope to record the specific day of the estrous cycle. Animals were injected i.p. with 200  $\mu$ L of a solution containing 0.5 mg/kg of the GnRH antagonist cetrorelix acetate (Sigma, cat. #C5249) in 0.01 M PBS (pH 7.4), every second day. Tail-blood samples were collected for LH measurements one time before the beginning of the treatment and at day 2 and 6 during treatment, as well as day 4 after the last injection (no treatment). Estrous cyclicity was monitored daily at the same time before, during and after treatment with GnRH antagonist.

## **Results**

### **Brain SELENOT deficiency causes infertility and exhibit abnormal sexual behavior**

We performed a fertility assessment of brain SELENOT-deficient adult mice in comparison to WT mice for a five-month period. We performed mating of WT (WT groups) and SELENOT<sup>-/-</sup> (SELENOT<sup>-/-</sup> groups) males and females. As shown in Fig. 1A, the percentage of pregnant females was significantly reduced in SELENOT<sup>-/-</sup> group compared to the WT group. In continuous mating, SELENOT<sup>-/-</sup> group showed impaired fertility, as indicated by fewer litters with fewer pups per litter produced over a 5-month period (Fig. 1B, C). We tested the fertility of brain SELENOT<sup>-/-</sup> males after mating with a WT female. As shown in Fig. 1D, the number of WT females becoming pregnant was significantly lower when mated with SELENOT<sup>-/-</sup> males in comparison to the WT group. In continuous mating, these females had fewer litters than in the WT group (Fig. 1E), and the number of pups per litter produced over 5 months was significantly lower (Fig. 1F). The fertility of SELENOT<sup>-/-</sup> females was also assessed with a WT male. In comparison to control WT females which showed normal reproductive behavior, the number of SELENOT<sup>-/-</sup> females that became pregnant was significantly reduced (Fig. 1G). In continuous mating, SELENOT<sup>-/-</sup> females had fewer litters and the number of pups per litter produced over 5 months was significantly lower

compared to control WT females (Fig. 1H, I). SELENOT<sup>-/-</sup> mice exhibited longer mount and intromission latencies compared to control WT group littermates (Fig. 2A). This was accompanied by decreased frequency of mount and intromission in SELENOT<sup>-/-</sup> group compared to the WT group (Fig. 2B). Brain SELENOT<sup>-/-</sup> males showed an increase of mount and intromission latencies (Fig. 2C), and a decrease of mount and intromission frequencies (Fig. 2D). As could be expected, mount and intromission latencies which are dependent on the male efficacy were not modified in the presence of female SELENOT<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2E). However, intromission frequency, was markedly decreased with female SELENOT<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2F). This finding was confirmed by the analysis of the ordosis quotient, which is also significantly decreased in SELENOT<sup>-/-</sup> females compared to WT females (Fig. 2G). Also, a significant decrease in the copulatory efficacy was found for SELENOT<sup>-/-</sup> males compared to WT males (Fig. 2H).

### **Brain SELENOT<sup>-/-</sup> female mice exhibit abnormal steroidogenesis and defective follicular development**

The majority of SELENOT<sup>-/-</sup> females exhibited severely disrupted estrous cyclicity (oligo-ovulation). SELENOT<sup>-/-</sup> females rarely reached the preovulatory stage of the estrous cycle and exhibited prolonged duration of metestrus and diestrus, compared to control WT females (Fig. 3A, B). Hormone measurements revealed that LH levels were higher in SELENOT<sup>-/-</sup> females (Fig. 3C), while E2 concentration was lower (Fig. 3D), and testosterone concentration was higher (Fig. 3E) in female SELENOT<sup>-/-</sup> mice. These data suggest that the subfertility of brain SELENOT-deficient female mice is due to defective follicular development and maturation in response to altered gonadotrope function. We also measured blood glucose in the knockout animals, and found that glycemia is higher in these mice compared to control littermates (Fig. 3F).

To evaluate whether the subfertility and abnormal sexual behavior observed in brain SELENOT<sup>-/-</sup> female mice were also associated with follicle maturation defect. The ratio of ovary weight to body weight and uterine weight, markers of circulating estrogen levels, were significantly lower in SELENOT<sup>-/-</sup> female mice

than in control littermates (Fig. 4, A-C). Ovarian histology was examined and showed that brain SELENOT<sup>-/-</sup> females have ovarian histological abnormalities consistent with their anovulatory phenotype, with fewer normal pre-ovulatory follicles (primary, secondary and antral follicles) and less post-ovulation corpora lutea compared to control WT females (Fig. 4D). Cysts were identified in the ovaries of brain SELENOT-deficient female mice as open cavities, with or without follicular fluid, lined by not more than one layer of non-luteinized granulosa cells (Fig. 4E).

### **Brain SELENOT<sup>-/-</sup> male mice exhibit testicular alterations and abnormal steroidogenesis**

Testis weight and size were significantly reduced in SELENOT<sup>-/-</sup> males compared to WT male littermates (Fig. 5A, B). Circulating LH, estradiol and testosterone levels were markedly elevated in SELENOT<sup>-/-</sup> males compared to control WT males (Fig. 5, C-E).

Histologic examinations were carried out on hematoxylin-eosin and safran stained sections of testis (Fig. 5F). The overall histology of the testicular tissue in SELENOT<sup>-/-</sup> males does not seem to be altered with the presence of a complete spermatogenesis. However, important vacuolizations in seminiferous tubules were observed in the testicular tissue of SELENOT<sup>-/-</sup> males (Fig. 5G). In addition, a higher percentage of pyknotic seminiferous tubules was observed in SELENOT<sup>-/-</sup> testicular tissue compared to that of control WT males. The number of pyknotic cells per area of seminiferous tubules containing minima a pyknotic cell was higher in SELENOT<sup>-/-</sup> testicular tissue compared to that of control WT males (Fig. 5G), with nevertheless conserved spermatids, spermatocytes and spermatogonia.

### **Brain SELENOT<sup>-/-</sup> mice exhibit increased GnRH neuron number**

To determine whether disruption of the SELENOT gene in the brain affects GnRH neuron distribution and density which would impact the gonadotrope axis, we analyzed GnRH immunoreactivity, and we compared the number of the GnRH neurons in the brain of adult SELENOT<sup>-/-</sup> with that in control WT mice. We used



the iDISCO- based 3D immunohistochemistry to wholly visualize the GnRH neuron continuum extending from the olfactory bulb through the median eminence (ME), with the great majority of GnRH neurons located in the medial septal (MS) region, the rostral preoptic area (rPOA), and the caudal-most anterior hypothalamic area (AHA) (Fig. 6A). The characteristic rostro-caudal distribution pattern of the GnRH neurons and the arborization of their processes were demonstrated by reconstructing series of optical slices (Fig. 6B). GnRH neurons were quantified along the migratory path from the nose to ME, showing that the number of GnRH neurons was higher in SELENOT<sup>-/-</sup> male and female mice compared to control WT mice (Fig. 6C). GnRH immunoreactivity was also examined by traditional immunohistochemistry in coronal sections of the hypothalamus from adult SELENOT<sup>-/-</sup> and WT mice. This analysis also revealed that GnRH neuron cell bodies, which exhibit an intense staining in the POA and GnRH fibres present in the ME are more intensely labeled in SELENOT<sup>-/-</sup> compared to control WT mice (Fig.8D).

### **GnRH antagonist treatment of brain SELENOT<sup>-/-</sup> mice normalized their neuroendocrine phenotype**

Since our results uncovered a persistent hyperactivation of GnRH neurons in SELENOT<sup>-/-</sup> mice, we reasoned that partially competing with endogenous GnRH for binding to membrane receptors on gonadotrope cells and thus decreasing the rate of LH release in female mutant mice would restore the estrous cyclicity and physiological LH levels in these animals. To assess this hypothesis, we first monitored estrous cyclicity and LH levels in SELENOT<sup>-/-</sup> female for 12 days before the beginning of cetorelix treatment to ascertain the neuroendocrine alterations of these animals. Then, the mice received every second day cetorelix acetate at 0.5 mg/kg, i.p. for 12 d, followed by treatment with the vehicle (after treatment period). Tail-blood samples were collected for LH measurements twice during the GnRH antagonist treatment, once before and after the treatment period (Fig. 9A). As expected, SELENOT<sup>-/-</sup> females displayed a longer time in metestrus/diestrus and a shorter time in proestrus, as compared to WT females (Fig.9B). When

SELENOT<sup>-/-</sup> females were injected with 0.5 mg/kg of GnRH antagonist, almost normal estrous cyclicity was recovered (Fig. 9C). When the treatment was interrupted, altered cyclicity was observed again (Fig. 9D). LH concentrations were also measured in brain SELENOT<sup>-/-</sup> and WT females before the beginning of treatment, at days 2 and 6 of treatment, and after treatment (Fig. 9E). The high mean LH values initially observed in SELENOT<sup>-/-</sup> female mice, were normalized following intermittent GnRH antagonist treatment (0.5 mg/kg), and this effect was no longer observed a few days after the treatment (Fig. 9E). We also examined ovarian tissue of mutant mice, which still displayed numerous cysts and did not appear to differ in its ability to ensure basal follicular growth compared to control WT mice (Fig. 9F). Besides, a similar fibrosis area was observed for SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated or not with the antagonist. However, a greater number of secondary and antral follicles could be observed for control WT mice and SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with the GnRH antagonist compared to SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with the vehicle (Fig. 9G).

## Discussion

In this report, we characterized for the first time the neuroendocrine role of SELENOT in the control of reproduction using male and female transgenic animals with SELENOT gene disruption in the brain. SELENOT is a thioredoxin-like enzyme initially identified *in silico* [16] and then as a PACAP-stimulated gene during neuroendocrine cell differentiation [1]. SELENOT whose global gene knockout is embryonic-lethal has been shown to play a prominent role in dopaminergic neuron distribution and protection [2-17]. However, the impact of central SELENOT gene disruption on vital functions involving neuroendocrine circuits has not been explored yet.

Although brain-specific SELENOT knockout mice are viable, these animals failed to reproduce at normal level. This intriguing result prompted us to investigate the gonadotrope axis of male and female knockout mice. Because GnRH is the master regulator of this axis, we examined its expression and distribution pattern in SELENOT-deficient and WT mice using 3D-light sheet imaging after

transparisation of cerebral tissue. Quantification of 3D images revealed a higher number of GnRH neurons in SELENOT knockout mice compared to WT littermates in both sexes. This finding suggested that SELENOT plays a major role in the central control of reproduction. Indeed, SELENOT could be involved in the synthesis and secretion of GnRH probably through the regulation of oxidative stress in neuronal populations as has been previously shown for catecholaminergic neurons [2-5]. In fact, SELENOT gene disruption impaired TH-positive neurons, including those present at the level of the hypothalamus in both males and females. These data suggest that SELENOT is required locally in the hypothalamus or in other afferent neurons to regulate GnRH output.

Indeed, SELENOT deficiency may impact the function of different neurons that impact GnRH output. It is well known that different neurotransmitters and neuropeptides regulate GnRH neuron activity [18]. These include glutamate, GABA, dopamine, NPY and kisspeptin, which play a critical role in pubertal activation of GnRH neurons in mammals [19- 20]. SELENOT might play a role in the availability of some of these regulatory cues. Further studies are warranted to address this issue. In particular, the fact that dopaminergic pathways are affected in SELENOT-deficient mice could explain the increase in GnRH observed in the knockout mice since dopamine, acting at the D1 and D2 receptors expressed in GnRH neurons of the AVPV, has been shown to inhibit GnRH neuron activity [21]. Because the higher number of GnRH neurons compared to WT could impact the gonadotrope axis at the pituitary and gonadal levels, we analyzed the circulating hormones produced by these tissues. LH levels which are tightly correlated to those of GnRH are also significantly augmented in male and female SELENOT knockout mice, thus confirming the higher GnRH output to the pituitary. This increase in LH levels will certainly impinge on the function of the gonads and the sexual behavior of SELENOT knockout mice.

In males, we found high circulating levels of testosterone but also of estradiol, a condition that could be ascribed to a central effect exacerbating testicular steroidogenesis through increased LH levels. In order to assess the effects of these hormonal alterations on the reproductive function of the mutant animals,

males with central SELENOT deficiency were mated with WT females. These animals had severely reduced litter number and size, indicating that the hormonal perturbations observed lead to marked hypofertility in knockout mice. This reproductive failure was also associated with altered mating behavior and a decrease in sexual maturation of male SELENOT knockout mice. Indeed, when placed with receptive WT females, these males were unable to initiate mating, with longer latencies for mounting and intromission as compared to WT mice. It has been shown that disruption of androgen receptor in the brain alters male sexual motivation and performance [22]. Testosterone could also be converted to estrogens by a local aromatase to act through estrogen receptors [23-24]. It is thought that sex hormones affect kisspeptin neuron activity in the ARC where steroid hormone receptors are present [25]. These neurons have been described as a target for the negative feedback exerted by steroid hormones. Obviously, this neuroendocrine circuit is altered in SELENOT knockout mice. However, the mechanism involved remains to be elucidated. Quantifying Kiss1 expression levels in the hypothalamus may help to determine whether the sexual alterations observed are related to Kiss1 expression alteration, which could depend on SELENOT gene integrity in the brain.

Dopamine also exerts a central role in male sexual behavior [26-27]. Rapid dopamine release in the nucleus Accumbens (NAc) is observed in male mice during interaction with receptive females, but not with other males [28]. Other studies have shown that dopamine is released in the median preoptic area during copulation in rat [29]. In addition, it has been shown that dopaminergic neurons of the ventral tegmental area projecting to the NAc play a central role in the pre-copulatory phase and in sexual motivation [30]. Alteration of these pathways in SELENOT-deficient male mice could account for the sexual deficits observed, and if this were the case administration of dopaminergic agonists could revert this phenotype. This hypothesis remains to be investigated.

In SELENOT-deficient females, LH increase during puberty most likely leads to alteration of sex hormone production and dynamic changes in ovaries. Indeed, these females exhibited low levels of estradiol but high circulating levels of

testosterone. These findings indicate that exacerbated stimulation of the ovarian tissue by increased LH leads to increased production of testosterone. This increase could also be due to an altered conversion of androgens to estradiol by the aromatase in the thecal tissue [31-32-33]. Conversely, estradiol levels are decreased in SELENOT knockout mice, which is associated with a decrease in the number of ovarian follicles producing this hormone. The origin of this decrease is not clear but may arise from an altered production of FSH, which is known to control follicular development and estrogen production via testosterone aromatization [34- 32-35]. Quantitation of this gonadotropin in SELENOT-mutant mice is warranted to test this hypothesis.

As a consequence of ovarian hormone fluctuations and the global perturbation of the gonadotrope axis, ovarian cyclicity was deregulated since SELENOT mutant mice spent more time in diestrus and less time in proestrus compared to WT littermates.

The fertility of SELENOT-knockout female mice was also investigated during 5 months, by mating with WT males. These female mice displayed a very low gestation rate and gave birth to a low number of litters which were smaller in size compared to WT females. This hypofertility phenotype could be accounted for by the altered hormonal status observed in these mice. As in males, sex hormones strongly regulate female sexual behavior. Indeed, estradiol level is the most critical factor regulating female sexual behavior [36-37]. The so-called lordosis reflex of receptive females, which is stimulated by mounting of a male rodent [38-39] is regulated by estradiol. Indeed, it has been shown that local infusion of estrogens in the ventromedian nucleus of the hypothalamus, the median preoptic area and the periaqueducal grey, areas with abundant sex hormone receptors increases the lordosis reflex [40], indicating that estrogen release from the ovary directly affects the brain and promotes receptive behaviors. Low levels of estradiol levels observed in SELENOT-deficient mice are probably at the origin of the altered sexual behavior and hypofertility observed in these mice. This phenotype could be reverted by estradiol replacement, an experiment that remains to be conducted on the mutant mice.

Central SELENOT deficiency also led to anatomical modifications of the gonads. In males, histological analyses revealed a testicular atrophy and pycnotic as well as vacuolar cells in seminiferous tubules. This could be ascribed to altered production of FSH which is known to regulate testis development [41-42]. In females, histological examination of ovaries revealed a depletion of the different types of follicles, which is probably related to LH overexpression [43-44]. We also found several cysts in the ovary of female mice centrally-depleted in SELENOT, which recall polycystic ovary syndrome. This frequent cause of infertility in women is characterized by higher androgen levels and oligoovulation, features also found in SELENOT KO mice in addition to the presence of cysts. It is now well established that the central reproductive neuroendocrine system is affected in this pathology. Indeed, the typical cyclical changes in frequency of GnRH release are often absent in PCOS, resulting in a persistent high-frequency drive inducing gonadotropin changes (*i.e.* high LH and low FSH levels) that are responsible of hyperandrogenemia and ovulatory dysfunction. These alterations are reminiscent of the SELENOT knockout phenotype described in the present study. Although FSH levels were not examined in the present study, the atrophied testes in male knockouts and the low levels of estradiol found in female knockouts suggest that FSH levels are rather low in brain SELENOT-deficient mice. Because the specific mechanisms underlying the GnRH neuron dysfunction in PCOS remain unclear, alteration of the SELENOT gene expression in this pathology and the associated ER and oxidative stress that are known to be regulated by this thioredoxin-like enzyme should be further considered and investigated as a possible etiological element of the disease.

In order to confirm the involvement of GnRH overproduction in the hypofertile phenotype of SELENOT conditional knockout, we attempted to reverse the hormonal alterations observed by administering a GnRH antagonist. Interestingly, intermittent administration of the GnRH antagonist cetrorelix at a concentration that competes partially with endogenous GnRH [45] was able to restore the estrous cyclicity and to induce a release of LH at a concentration comparable to that of controls. These data demonstrate that GnRH overexpression is

responsible for the neuroendocrine and reproductive disturbances observed in SELENOT-deficient mice. Additional studies will be required to determine whether SELENOT is required for the fine production of GnRH by acting in GnRH neurons or through its effects in other neuronal populations such as dopaminergic or kisspeptidergic neurons for instance which are known to control GnRH neuron activity.

Overall, the data obtained in the present study uncover an unprecedentedly known role of a selenoprotein, *i.e.* SELENOT, in the central control of reproduction in mammals, thus offering an opportunity to unveil unexplored pathological mechanisms underpinning fertility disorders that could be targeted by novel therapies.

### **Statistical analysis**

In the experiments with mice, matched controls from the same litters were used. Results are expressed as mean – SEM and represent data from a minimum of three independent experiments. Statistical analysis of the data was performed with GraphPad Prism 9 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistical significance of difference between groups was determined by the two-tailed unpaired Student's t-test. For GnRH antagonist treatment, statistical comparisons between groups were made using one-way ANOVA.

## References

1. Grumolato L, Ghzili H, Montero-Hadjadje M, Gasman S, Lesage J, Tanguy Y, Galas L, Ait-Ali D, Leprince J, Guérineau NC, Elkahloun AG, Fournier A, Vieau D, Vaudry H, Anouar Y. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and neuroendocrine secretion. *FASEB J*. 2008 Jun;22(6):1756-68. doi: 10.1096/fj.06-075820. Epub 2008 Jan 15. pmid: 18198219
2. Boukhzar L, Hamieh A, Cartier D, Tanguy Y, Alsharif I, Castex M, Arabo A, El Hajji S, Bonnet JJ, Errami M, Falluel-Morel A, Chagraoui A, Lihrmann I, Anouar Y. Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Apr 10;24(11):557-74. doi: 10.1089/ars.2015.6478. Epub 2016 Mar 16. pmid: 26866473
3. Anouar Y, Lihrmann I, Falluel-Morel A, Boukhzar L. Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med*. 2018 Nov 1;127:145-152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.076. Epub 2018 May 22. pmid: 29800653
4. Hamieh A, Cartier D, Abid H, Calas A, Burel C, Bucharles C, Jehan C, Grumolato L, Landry M, Lerouge P, Anouar Y, Lihrmann I. Selenoprotein T is a novel OST subunit that regulates UPR signaling and hormone secretion. *EMBO Rep*. 2017 Nov;18(11):1935-1946. doi: 10.15252/embr.201643504. Epub 2017 Sep 19. pmid: 28928140
5. Godefroy D, Boukhzar L, Mallouki BY, Carpentier E, Dubessy C, Chigr F, Tillet Y, Anouar Y. SELENOT deficiency in the mouse brain impacts catecholaminergic neuron density: an immunohistochemical, in situ hybridization and 3D light-sheet imaging study. *Neuroendocrinology*. 2022 Jan 21. doi: 10.1159/000522091. Epub ahead of print. pmid: 35066506
6. Castex MT, Arabo A, Bénard M, Roy V, Le Joncour V, Prévost G, Bonnet JJ, Anouar Y, Falluel-Morel A. Selenoprotein T Deficiency Leads to Neurodevelopmental Abnormalities and Hyperactive Behavior in Mice. *Mol Neurobiol*. 2016 Nov;53(9):5818-5832. doi: 10.1007/s12035-015-9505-7. Epub 2015 Oct 26. pmid: 26497036
7. Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system



- results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 1999 Sep;23(1):99-103. doi: 10.1038/12703. pmid: 10471508.
8. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp.* 2012 Sep 15;(67):e4389. doi: 10.3791/4389. pmid: 23007862
  9. Zang ZJ, Tang HF, Tuo Y, Xing WJ, Ji SY, Gao Y, Deng CH. Effects of velvet antler polypeptide on sexual behavior and testosterone synthesis in aging male mice. *Asian J Androl.* 2016 Jul-Aug;18(4):613-9. doi: 10.4103/1008-682X.166435. pmid: 26608944
  10. Bodo C, Rissman EF. The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):4142-50. doi: 10.1210/en.2008-0183. Epub 2008 May 8. pmid: 18467440
  11. Kow LM, Pfaff DW. The membrane actions of estrogens can potentiate their lordosis behavior-facilitating genomic actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12354-7. doi: 10.1073/pnas.0404889101. Epub 2004 Aug 9. pmid: 15302933
  12. Vidal A, Zhang Q, Médigue C, Fabre S, Clément F. DynPeak: an algorithm for pulse detection and frequency analysis in hormonal time series. *PLoS One.* 2012;7(7):e39001. doi: 10.1371/journal.pone.0039001. Epub 2012 Jul 3. pmid: 22802933
  13. Moore AM, Prescott M, Marshall CJ, Yip SH, Campbell RE. Enhancement of a robust arcuate GABAergic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of polycystic ovarian syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jan 13;112(2):596-601. doi: 10.1073/pnas.1415038112. Epub 2014 Dec 30. pmid: 25550522
  14. Caldwell ASL, Edwards MC, Desai R, Jimenez M, Gilchrist RB, Handelsman DJ, Walters KA. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Apr 18;114(16):E3334-E3343. doi: 10.1073/pnas.1616467114. Epub 2017 Mar 20. pmid: 28320971
  15. Dumont L, Arkoun B, Jumeau F, Milazzo JP, Bironneau A, Liot D, Wils J, Rondanino C, Rives N. Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-

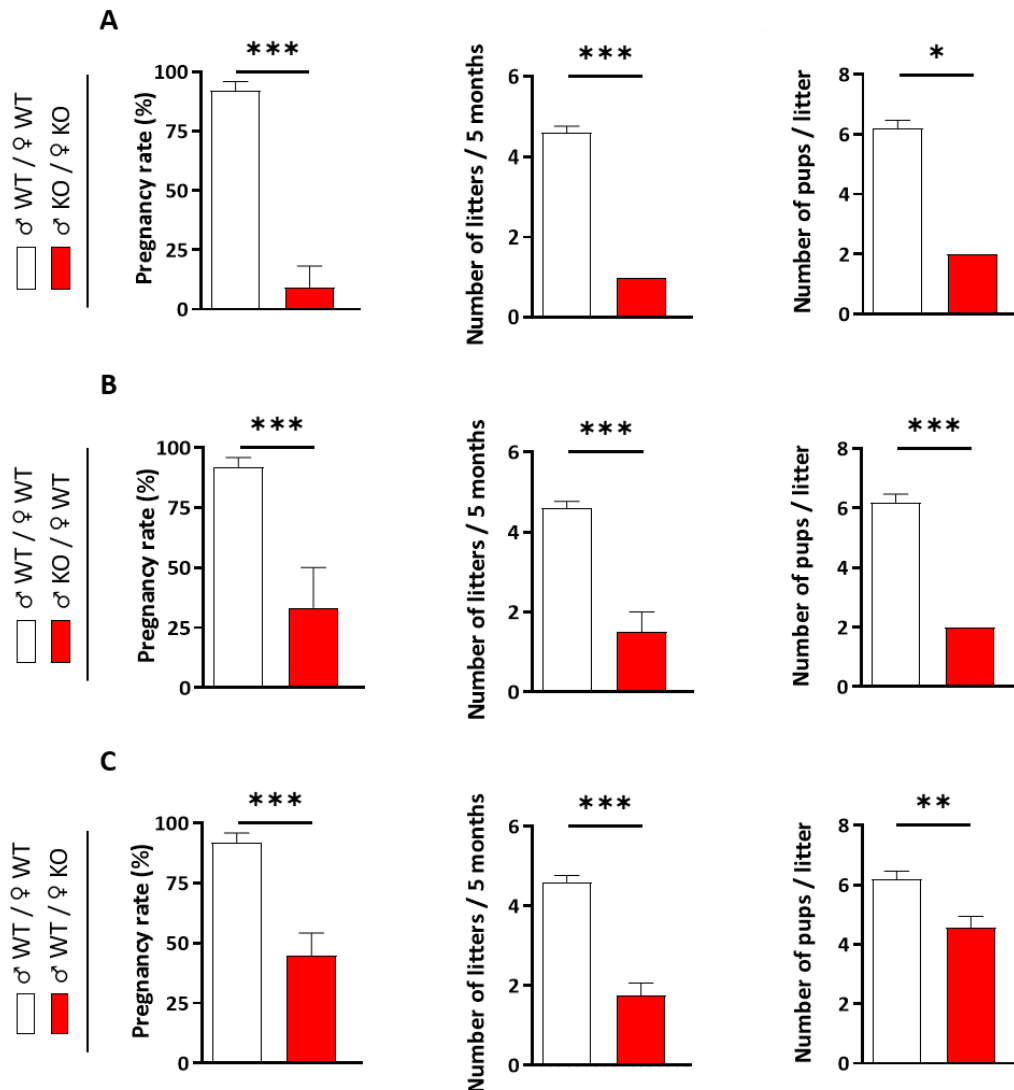
- pubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa. *Andrology*. 2015 May;3(3):611-25. doi: 10.1111/andr.12042. pmid: 26013105
16. Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem*. 1999 Nov 26;274(48):33888-97. doi: 10.1074/jbc.274.48.33888. pmid: 10567350
17. Alsharif I, Boukhzar L, Lefranc B, Godefroy D, Aury-Landas J, Rego JD, Rego JD, Naudet F, Arabo A, Chagraoui A, Maltête D, Benazzouz A, Baugé C, Leprince J, Elkahoun AG, Eiden LE, Anouar Y. Cell-penetrating, antioxidant SELENOT mimetic protects dopaminergic neurons and ameliorates motor dysfunction in Parkinson's disease animal models. *Redox Biol*. 2021 Apr;40:101839. doi: 10.1016/j.redox.2020.101839. Epub 2020 Dec 28. pmid: 33486153
18. Todman MG, Han SK, Herbison AE. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience*. 2005;132(3):703-12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.035. PMID: 15837132
19. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*. 2001 Feb;22(1):111-51. doi: 10.1210/edrv.22.1.0418. pmid: 11159818
20. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005 Dec 7;25(49):11349-56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005. pmid: 16339030
21. Liu X, Herbison AE. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology*. 2013 Jan;154(1):340-50. doi: 10.1210/en.2012-1602. Epub 2012 Dec 13. pmid: 23239814
22. Marie-Luce C, Raskin K, Bolborea M, Monin M, Picot M, Mhaouty-Kodja S. Effects of neural androgen receptor disruption on aggressive behavior, arginine vasopressin and galanin systems in the bed nucleus of stria terminalis and lateral septum. *Gen Comp Endocrinol*. 2013 Jul 1;188:218-25. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.03.031. Epub 2013 Apr 10. pmid: 23583766

23. Wu MV, Shah NM. Control of masculinization of the brain and behavior. *Curr Opin Neurobiol.* 2011 Feb;21(1):116-23. doi: 10.1016/j.conb.2010.09.014. Epub 2010 Oct 20. pmid: 20970320
24. Yang CF, Shah NM. Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron.* 2014 Apr 16;82(2):261-78. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.029. PMID: 24742456
25. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology.* 2005 Jul;146(7):2976-84. doi: 10.1210/en.2005-0323. Epub 2005 Apr 14. pmid: 15831567
26. Hull EM, Muschamp JW, Sato S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol Behav.* 2004 Nov 15;83(2):291-307. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.08.018. pmid: 15488546.
27. Veening JG, Coolen LM. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014 Jun;121:170-83. doi: 10.1016/j.pbb.2013.12.017. Epub 2013 Dec 22. pmid: 24368305
28. Dominguez JM, Hull EM. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiol Behav.* 2005 Oct 15;86(3):356-68. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.006. Epub 2005 Aug 30. pmid: 16135375
29. Hull EM, Eaton RC, Moses J, Lorrain D. Copulation increases dopamine activity in the medial preoptic area of male rats. *Life Sci.* 1993;52(11):935-40. doi: 10.1016/0024-3205(93)90528-b. pmid: 8445987
30. Brom M, Both S, Laan E, Everaerd W, Spinhoven P. The role of conditioning, learning and dopamine in sexual behavior: a narrative review of animal and human studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Jan;38:38-59. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.014. Epub 2013 Nov 6. pmid: 24211372
31. Fortune JE, Eppig JJ. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. *Endocrinology.* 1979 Sep;105(3):760-8. doi: 10.1210/endo-105-3-760. pmid: 467333
32. White SS, Ojeda SR. Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat. *Endocrinology.* 1981 Jul;109(1):152-61. doi: 10.1210/endo-109-1-152. pmid: 6263582

33. O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Huhtaniemi I, Baker PJ, Abel MH. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Jul 10;306(1-2):2-8. doi: 10.1016/j.mce.2008.11.005. Epub 2008 Nov 18. pmid: 19059463
34. Gray SA, Mannan MA, O'Shaughnessy PJ. Development of cytochrome P450 aromatase mRNA levels and enzyme activity in ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. *J Mol Endocrinol.* 1995 Jun;14(3):295-301. doi: 10.1677/jme.0.0140295. pmid: 7669221
35. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010 Apr;120(4):963-72. doi: 10.1172/JCI41350. Epub 2010 Apr 1. pmid: 20364094
36. Rajendren G, Moss RL. The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Brain Res.* 1993 Jul 16;617(1):81-6. doi: 10.1016/0006-8993(93)90616-u. pmid: 8374748
37. Takeo K, Tanaka R, Miyaji M, Nishimura K. Unbudded G2 as well as G1 arrest in the stationary phase of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Jun 15;129(2-3):231-5. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07585.x. pmid: 7607405.
38. Balthazart, J., Fabre-Nys C. Balthazart J., Fabre-Nys C., 2001. Le comportement sexuel. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA Editions 611-637 (2001).
39. Beach FA, Jordan L. Sexual Exhaustion and Recovery in the Male Rat. *Quarterly Journal of Experimental Psychology.* 1956;8(3):121-133. doi: 10.1080/17470215608416811
40. Floody OR, Lisk RD, Vomachka AJ. Facilitation of lordosis by estradiol in the mesencephalic central gray. *Physiol Behav.* 1986;37(4):587-95. doi: 10.1016/0031-9384(86)90291-x. pmid: 3749324
41. Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod.* 1996 Jan;54(1):36-44. doi: 10.1095/biolreprod54.1.36. pmid: 8837998

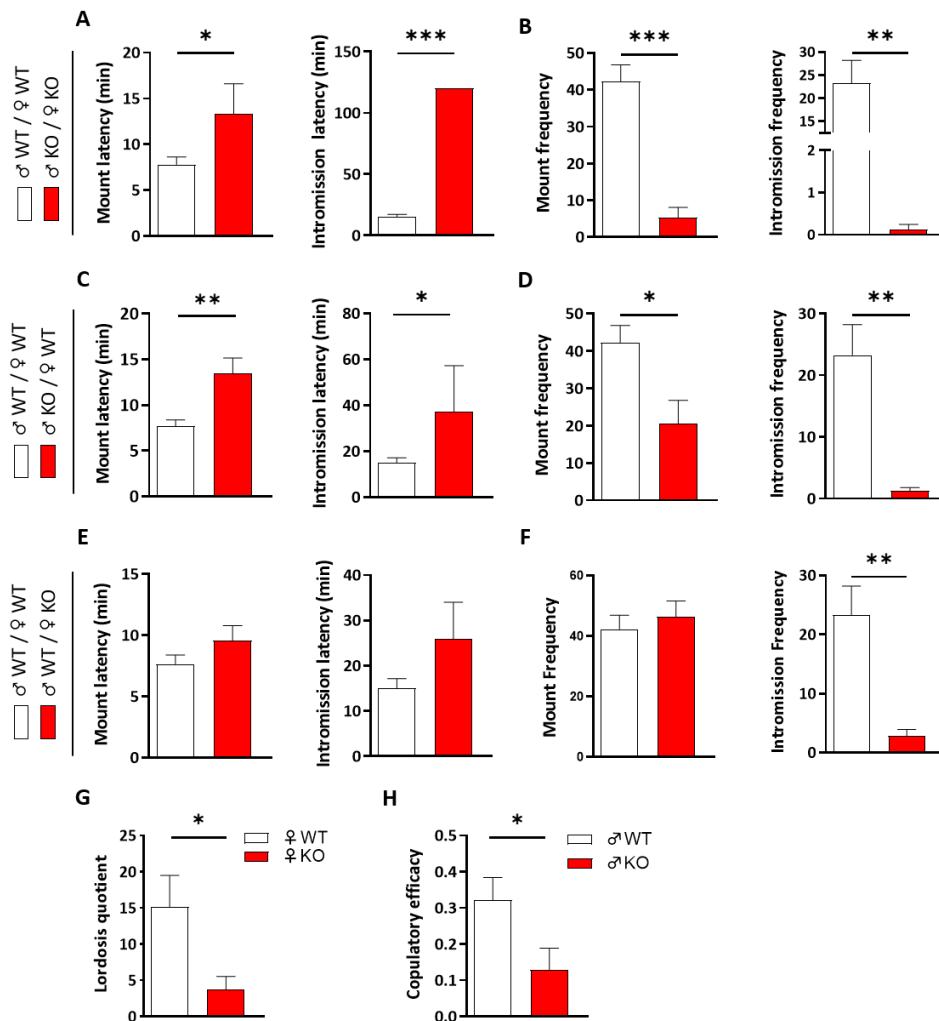
42. Allan CM, Garcia A, Spaliviero J, Zhang FP, Jimenez M, Huhtaniemi I, Handelsman DJ. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology*. 2004 Apr;145(4):1587-93. doi: 10.1210/en.2003-1164. Epub 2004 Jan 15. pmid: 14726449
43. Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH, Hirshfield AN. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod*. 1997 Nov;57(5):1233-7. doi: 10.1095/biolreprod57.5.1233. pmid: 9369192
44. Allan CM, Wang Y, Jimenez M, Marshan B, Spaliviero J, Illingworth P, Handelsman DJ. Follicle-stimulating hormone increases primordial follicle reserve in mature female hypogonadal mice. *J Endocrinol*. 2006 Mar;188(3):549-57. doi: 10.1677/joe.1.06614. pmid: 16522734
45. Tata B, Mimouni NEH, Barbotin AL, Malone SA, Loyens A, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S, Sundström-Poromaa I, Piltonen TT, Dal Bello F, Medana C, Prevot V, Clasadonte J, Giacobini P. Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nat Med*. 2018 Jun;24(6):834-846. doi: 10.1038/s41591-018-0035-5. Epub 2018 May 14. pmid: 29760445

**Fig. 1.**



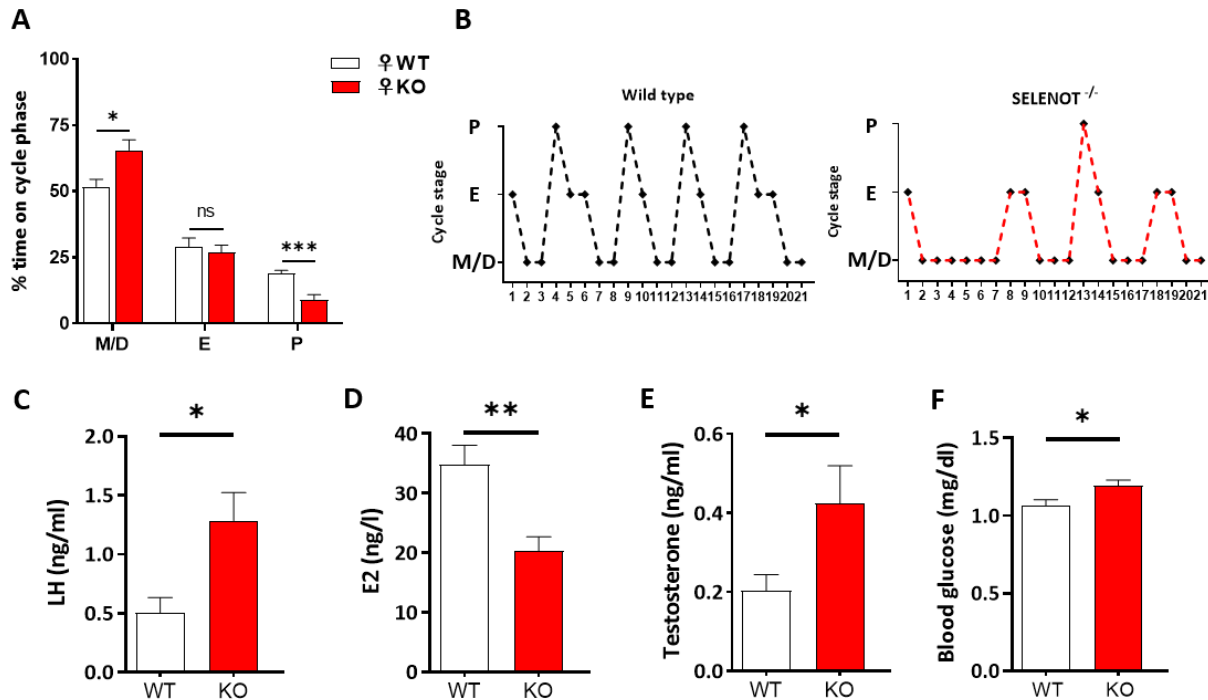
**Fertility assessment of brain SELENOT<sup>-/-</sup> mice (P90).** WT females were paired with WT males, n =10 for each sex. SELENOT<sup>-/-</sup> females were paired with SELENOT<sup>-/-</sup> males, n =8. SELENOT<sup>-/-</sup> females were paired with WT males, n = 8. WT females were paired with SELENOT<sup>-/-</sup> males, n = 8. Mating was performed for 5 months. (A), percentage of mating for SELENOT<sup>-/-</sup> male / SELENOT<sup>-/-</sup> female resulting in pregnancy, litter sizes and number of pups per litter. (B), percentage of mating for SELENOT<sup>-/-</sup> male / WT female resulting in pregnancy, litter sizes and number of pups per litter. (C), percentage of mating for WT male / SELENOT<sup>-/-</sup> female resulting in pregnancy, litter sizes and number of pups per litter. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM and are compared using Student's t test. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001.

**Fig. 2.**



**Sexual behavior of brain SELENOT<sup>-/-</sup> mice (P90).** Mount latency was determined as the time between introduction of the female mice and the first mount. Intromission latency was determined as the time between introduction of the female mice and the first intromission. Mount frequency was calculated as the number of mounts during the test session. Intromission frequency was calculated as the number of intromissions during the test session. (A, B), measures of sexual behavior of SELENOT<sup>-/-</sup> male mated with SELENOT<sup>-/-</sup> female, n = 8. WT group, n = 11. (C, D), measures of sexual behavior of SELENOT<sup>-/-</sup> male mated with WT female, n = 8. WT group, n = 11. (E, F) measures of sexual behavior of WT male mated with SELENOT<sup>-/-</sup> female, n = 8. WT group, n = 11. (G). lordosis quotient was calculated as the lordosis number/number of mounts. (H). copulatory efficacy, calculated as intromission frequency divided by mount frequency + intromission frequency. The data are expressed as mean ± SEM and are compared using Student's t test. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

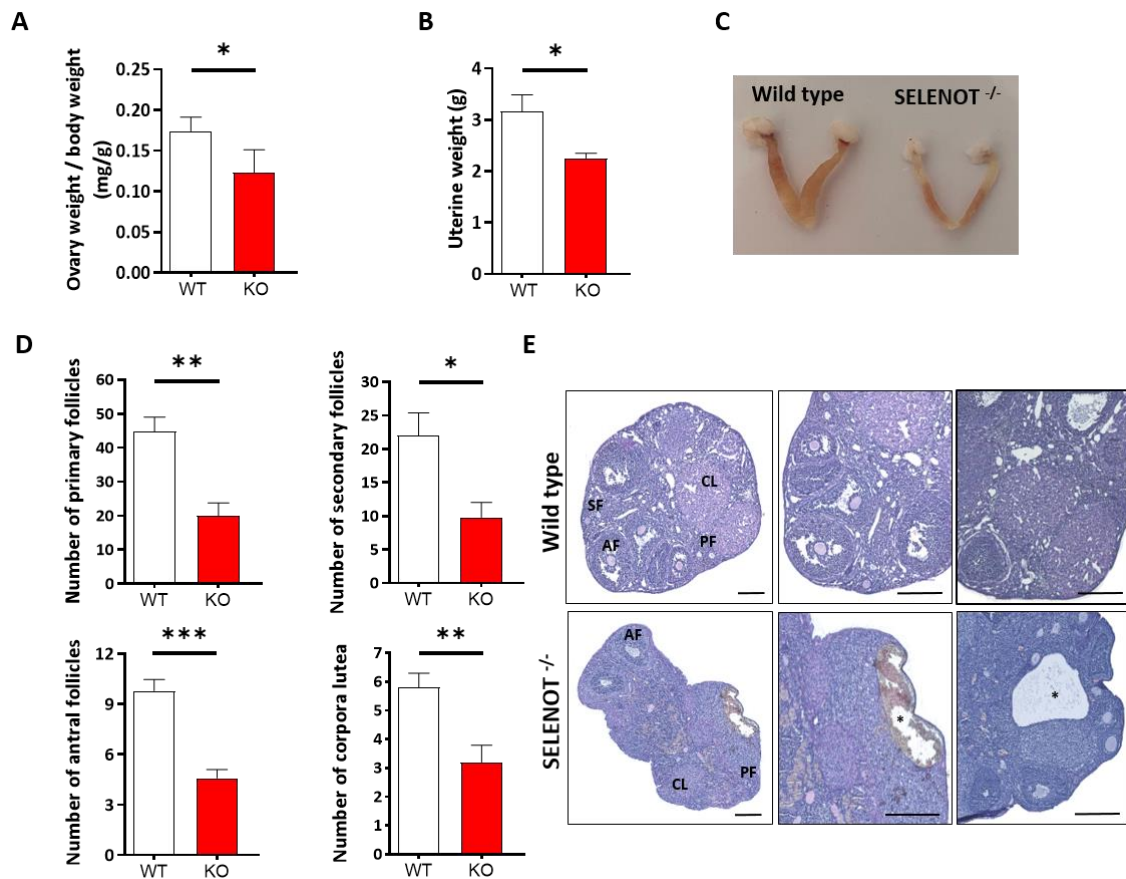
**Fig. 3.**



**Estrous cyclicity and levels of circulating hormones of brain SELENOT<sup>-/-</sup> females (P90-P120).** (A), percentage of time spent in each estrous cycle stage (E, estrus; M/D, metestrus/diestrus; P, proestrus) in adult females (WT: n = 7 and SELENOT<sup>-/-</sup>: n = 7). (B), representative estrous cyclicity of 7 mice per group during 21 consecutive days. (C), plasma LH levels in adult females WT, n = 7 and SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. (D), plasma 17 $\beta$ -estradiol concentration in adult females WT, n = 6 and SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 8. (E), plasma testosterone levels measured in adult females at diestrus WT, n = 8 and SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. (F), plasma blood glucose levels were measured in fasted adult females WT, n = 7 and SELENOT<sup>-/-</sup>, n = 7. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM and are compared using Student's t test. \*P < 0.05, \*\*P  $\leq$  0.005, \*\*\*P  $\leq$  0.0001.



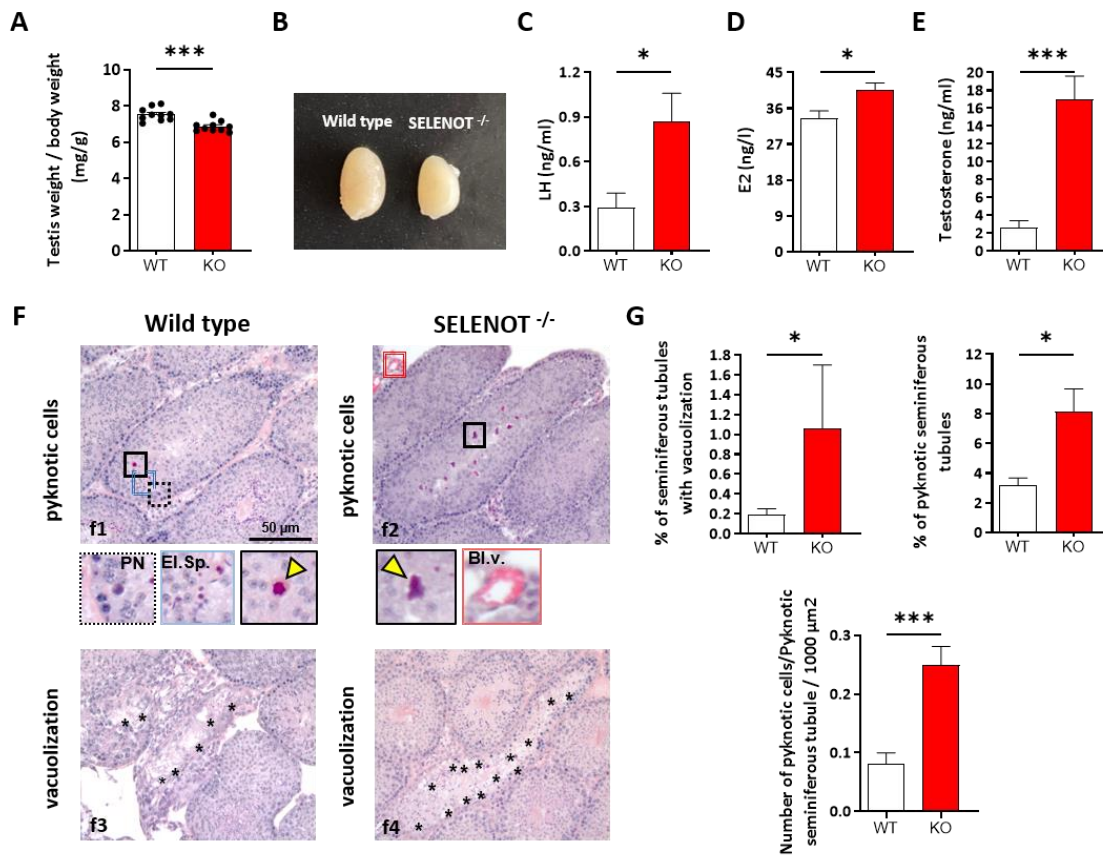
**Fig. 4.**



**Ovarian and uterine morphology in brain deficient SELENOT<sup>-/-</sup> female mice (P120).**

(A), ratio of ovary weight to body weight in female mice WT, n =5 and SELENOT<sup>-/-</sup>, n =5. (B), uterine weight in female mice. (C), gross structure of the ovaries and uteri is shown (D), quantitative analysis of primary follicles (PF), secondary follicles (SF), antral follicles (AF) and corpora lutea (E), morphological images of the mouse ovarian tissue from female. Hematoxylin eosin staining of ovaries from adult female. Scale bars, 200  $\mu$ m. Ovarian sections containing different classes of follicles are shown. PF, Primary follicles, SF, Secondary follicles, AF, Antral follicles, CL, corpora lutea. Asterisks denote ovarian cysts. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM and are compared using Student's t test. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

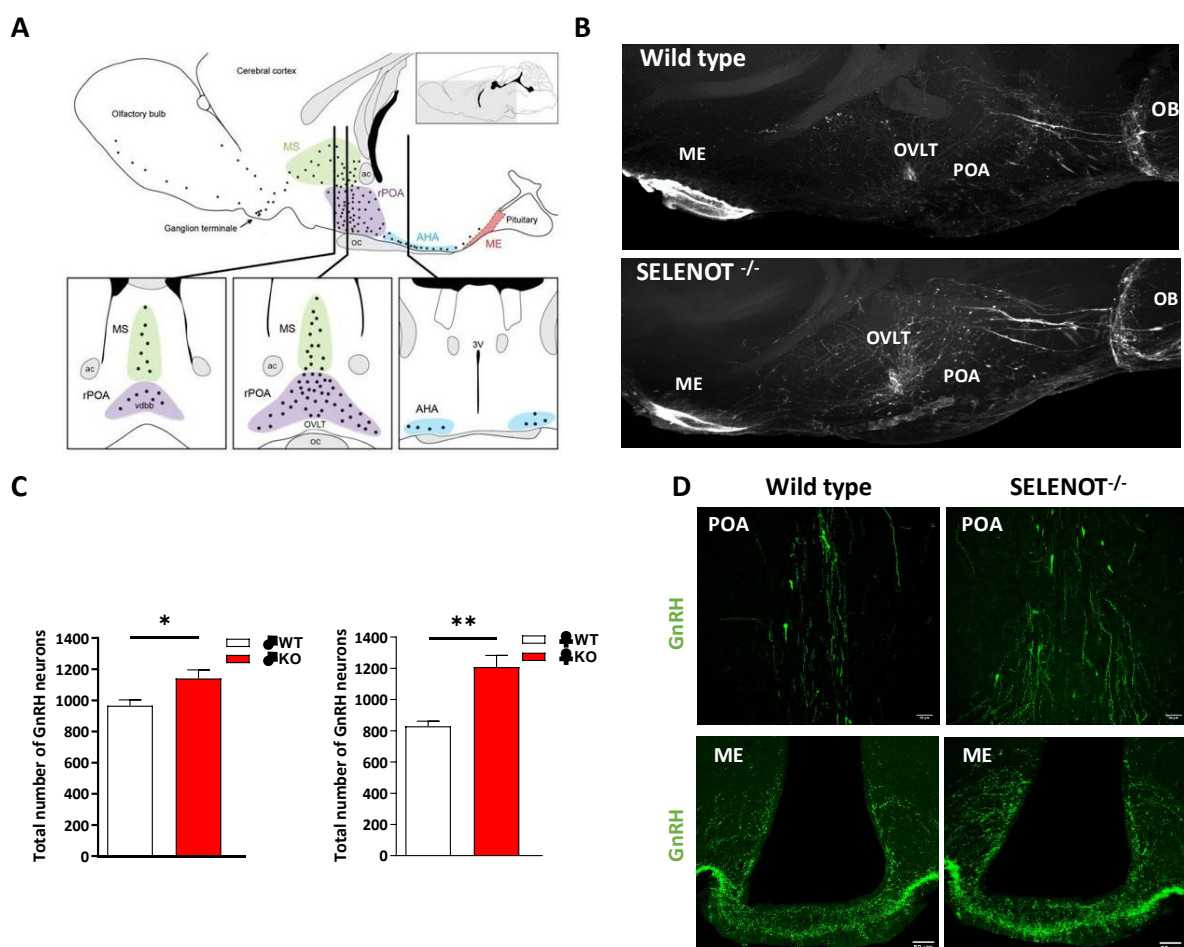
**Fig. 5.**



**Hormone levels and testis morphology in brain deficient *SELENOT*<sup>-/-</sup> male mice (P120).** (A), ratio of testis weight to body weight in male mice WT, n = 10 and *SELENOT*<sup>-/-</sup>, n = 10. (B), representative image showing comparative size of testis in WT and *SELENOT*<sup>-/-</sup>. (C), plasma LH levels in adult males WT, n = 10 and *SELENOT*<sup>-/-</sup>, n = 10. (D), plasma 17β-estradiol concentration in adult males, WT n = 9 and *SELENOT*<sup>-/-</sup>, n = 10. (E), plasma testosterone concentration in adult males WT, n = 11 and *SELENOT*<sup>-/-</sup>, n = 9. (F), histological evaluation with Hematoxylin eosin saffron staining of testicular tissue from adult male WT and *SELENOT*<sup>-/-</sup>. Pyknotic cell nuclei (yellow arrowhead in the black dotted lines zoom) were observed in seminiferous tubules for WT (f1) and *SELENOT*<sup>-/-</sup> mice (f2). Counts of pyknotic cell nuclei were carried out taking care not to include elongated spermatids (blue zoom) nor polymorphonuclear cell (black line zoom). Vacuolizations in seminiferous tubules (asterisks) were observed for testicular tissues originated from WT (f3) and *SELENOT*<sup>-/-</sup> (f4). Scale bar = 50 μm. (G), stereological analyses of testicular tissues from WT and *SELENOT*<sup>-/-</sup> mice to determined the

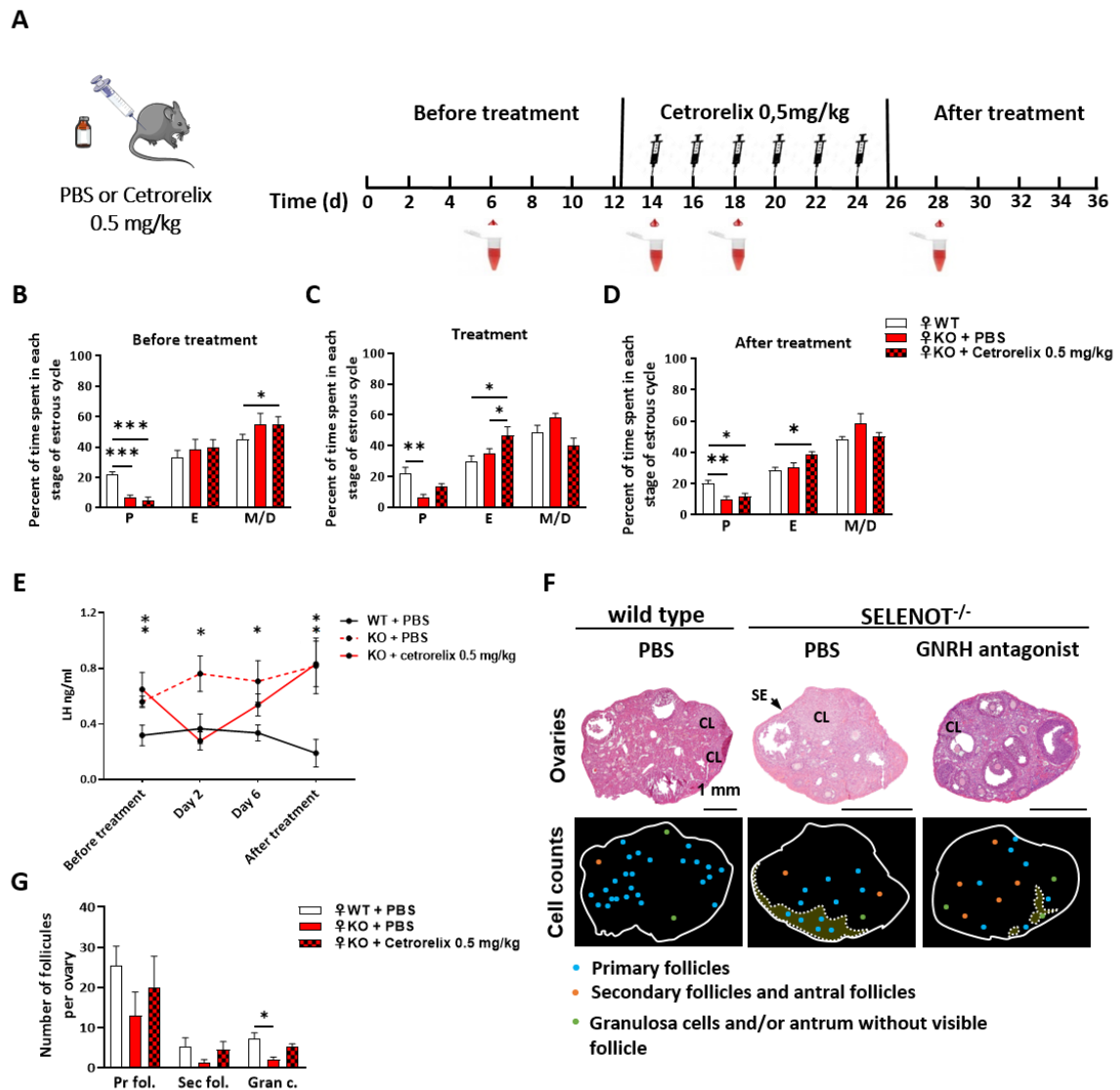
percentage of seminiferous tubules with vacuolization, the percentage of pyknotic seminiferous tubules and the number of pyknotic cells / 1000  $\mu\text{m}^2$  for seminiferous tubules containing minima a pyknotic cell. The values are expressed as the mean percentage  $\pm$  s.e.m, with  $n = 6$  per condition (a “n” corresponding to 4 testicular tissue pieces and 2 slices). Bl.v., blood vessel; El.Sp., elongated spermatid; PN, polymorphonuclear cell. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM and are compared using Student’s t test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**Fig. 6 .**



**Distribution of GnRH neurons in the brain of SELENOT<sup>-/-</sup> mice (P120).** (A), schematic diagrams showing the distribution of GnRH neurons (black dots) in the sagittal (top) and coronal (bottom) planes. Anatomical zones are magnified in the images at the bottom corresponding to the medial septal (MS), the rostral preoptic area (rPOA), and the anterior hypothalamic area (AHA). ac, anterior commissure; oc, optic chiasm; vdbb, vertical limb of the diagonal band of Broca; OVLT, organum vasculosum of the lamina terminalis; 3V, third ventricle. Source: Diagram courtesy of Dr Michel Herde. (B), 3D sagittal view of GnRH labeling with anatomical references in adult WT and SELENOT<sup>-/-</sup> mice brain. Scale bars = 500um. (C), total number of hypothalamic GnRH neurons counted from olfactory bulb to ME of adult WT, n=4 and SELENOT<sup>-/-</sup>, n=4 for each sex. (D), coronals sections at the POA and ME, respectively were immunostained for GnRH (green). Magnification: 10X for POA and 20X FOR ME. Scale bars, 50 um. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM and are compared using Student's t test. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001.

**Fig. 7.**



**Treatment with a GnRH antagonist of SELENOT<sup>-/-</sup> female mice (P90) restored the neuroendocrine phenotype.** (A), schematic of the experimental design where the experiment is divided into three steps. Before, during and after i.p. injection of 0.5 mg/kg of cetorelix acetate. SELENOT<sup>-/-</sup> female mice were injected i.p. for 12 days with cetorelix acetate (every other day). Tail blood samples were collected for measurement of LH, once before the start of the treatment and then on days 2 and 6 of treatment, as well as on day 4 after the last injection. (B-D), percentage of time spent in each estrous cycle in adult females was determined in WT, n = 5, SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with PBS, n = 5 and SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with cetorelix, n=5. (E), time course of serum LH concentration in SELENOT<sup>-/-</sup> female mice before the beginning of the treatment, 2 and 6 days after the first injection of cetorelix and after discontinuation of the drug

antagonist. In WT and SELENOT<sup>-/-</sup> female received a PBS injection, the tail blood was collected during the same temporal windows as for cetrorelix treatment. (F), histological analysis of ovary samples obtained from WT mice treated with PBS and SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with PBS or the GnRH antagonist (n =3). An example of cell counts is shown for primary, secondary and antral follicles, and granulosa cells and/or antrum without a visible follicle. Fibrotic areas surrounded by dotted lines are shown. (G), number of follicles counted for the whole ovary was assessed for WT mice treated with PBS, SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with PBS and SELENOT<sup>-/-</sup> mice treated with GnRH antagonist. Scale bars = 1 mm. with n = 3 per condition (a “n” corresponding to 1 ovary and 2-4 slices). CL, corpus luteum; HES, hematoxylin eosin saffron staining; SE, surface epithelium. The data are expressed as mean ± SEM. Comparisons between treatment groups were performed using one-way ANOVA. \*P< 0.05, \*\*P< 0.01, \*\*\*P< 0.001.