



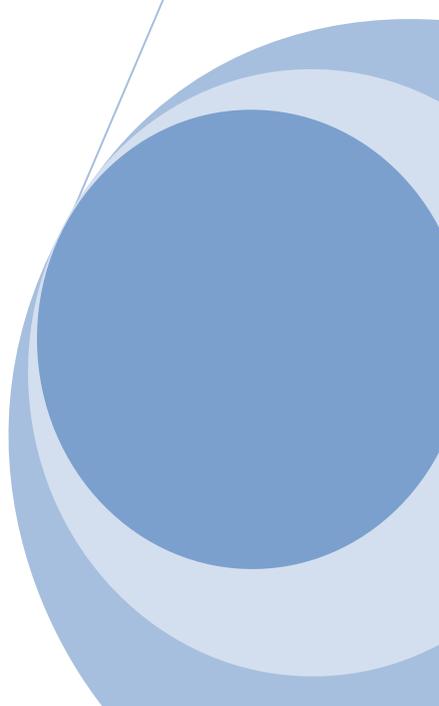
# ROLE DES OESTROGENES DANS LE DEVELOPPEMENT DU CERVEAU ET DU COMPORTEMENT

OLIVIER BROCK

Thèse rédigée en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences  
Année académique 2010-2011

## Membres du Jury :

Dr. Julie Bakker, Faculté de Médecine, ULg, Directrice de Thèse  
Prof. Pierre Vandewalle, Faculté des Sciences, ULg (Président)  
Prof. Michael J. Baum, Université de Boston, USA  
Prof. Jacques Balthazart, Faculté de Médecine, ULg  
Prof. Bernard Rogister, Faculté de Médecine, ULg  
Prof. Marc Thiry, Faculté des Sciences, ULg  
Prof. Ezio Tirelli, Faculté de Psychologie, ULg  
Dr. Sakina Mhaouty-Kodja, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France



## Remerciements

---

Au cours de ces 4 années, j'ai été plus qu'agréablement surpris de trouver ma « Mama » scientifique. Julie, merci infiniment de m'avoir aussi vite intégré au sein de ton équipe, de t'être impliquée autant dans notre projet (un Chef à la paillasse est chose rare à notre époque) tout en m'accordant une grande confiance et une indépendance, éléments clés selon moi pour un épanouissement quotidien dans la recherche scientifique. Encore merci mille fois pour ton soutien et toutes tes démarches ; j'espère de tout cœur que notre collaboration perdurera au-delà des « Grants »...

Un merci tout particulier au Professeur Baum pour ses commentaires pertinents et ses nombreuses relectures de mes articles.

Je tiens également à remercier Jacques pour tous ses conseils avisés et pour toujours avoir laissé sa porte grande ouverte à un doctorant émanant du Côté Obscur de la Souris.

Cette thèse n'aurait pas été aussi fructueuse sans la collaboration des nombreux « post-doc » : merci « Grande » pour ton enseignement de la stéréotaxie et nos virées mémorables dans le petit labo d'irréductibles de Gosselies ; merci Matthieu pour toutes ces discussions enrichissantes et ton accueil à Tours ; merci Alex pour m'avoir fait découvrir les méandres de la neurogenèse et du féminisme ; merci Sylvia pour ton énergie et tes leçons de vie (sachez qu'il est tout à fait possible de compter au microscope en ayant des contractions, même s'il y a peu de chances que cela m'arrive), merci Anne pour ta bonne humeur et tes expressions outre-Atlantique (...tabernacle !!).

Christelle, merci pour ton renfort, certes de (trop) courte durée mais qui restera d'une efficacité « legen...wait for it...dary » ! Merci pour ta disponibilité, ta générosité et ton professionnalisme. J'espère pouvoir relancer une collaboration aussi tôt que possible.

Majesté, ce fût un plaisir, que dis-je, un honneur, de travailler à tes côtés. Tu m'as appris qu'on pouvait allier rigueur et « déconne »...rien de tel qu'une bonne journée animalerie pour s'en rendre compte ! Je me réjouis de nos collaborations futures.

Cha & Tché, merci pour m'avoir épaulé dans toutes les situations, du Mont-Rigi à Toronto. J'espère pouvoir atteindre votre niveau un jour.

# Remerciements

---

Je ne peux oublier mon « Sexy Boy », celui qui dans un sens m'a tout appris, Couenne. Merci pour ton enseignement, ta patience, ton grain (pas si petit que cela) de folie. Nous aurons une pensée émue pour le « Zeste de Citron », Mylène, « Je suis la Blonde », et bien d'autres que je n'oserais énumérer. Une toute dernière chose : merci pour tout le génotypage effectué, car maintenant, je comprends !

Un tout grand merci également à Ber El Magnifico (*LL Cool Ber* pour les intimes) pour son aide précieuse dans mes périodes de dilution en détresse. Et vive le Blind test !

Spéciale dédicace à la Bétaillère, lieu de grande production scientifique mais aussi de démo de Tektonik et délires en tout genre : merci Andrew, Céline, Karen, Aurore et Laura.

Merci à tous les membres du Giga-Neurosciences et à nos longs vendredis soirs très spirituels (voire spiritueux).

Merci au « FC NCM » pour cette 3<sup>ème</sup> place gagnée à la sueur de nos corps...mais certainement pas au détriment de la science, entendons-nous bien !

Merci à Davian (le frère que je n'ai jamais eu), au Quartier, aux frères Mickey, pour leur amitié qui vaut plus que tout au monde.

Merci Maman, Papa, sources intarissables de discussions et de conseils qui ont fait de ma vie ce qu'elle est aujourd'hui, une belle réussite.

Enfin, le meilleur pour la fin...mon « courtship behavior » m'a permis de rencontrer au cours de ce doctorat, une scientifique scandaleusement jolie, qui contribue désormais à mon bonheur quotidien. Merci, Malou, pour ta présence précieuse et pour avoir mis tout en œuvre afin que ce mois de rédaction soit un long fleuve tranquille. J'espère pouvoir te rendre la pareille dans un an !

## Liste des articles

---

**Brock, O.**, Keller, M., Veyrac, A., Douhard, Q. & Bakker, J. (2010a) Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience*, **166**, 368-376.

**Brock, O.**, Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2010b) Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology*, **151**, 1814-1821.

Keller, M., Pawluski, J.L., **Brock, O.**, Douhard, Q. & Bakker, J. (2010c) The alpha-fetoprotein knock-out mouse model suggests that parental behavior is sexually differentiated under the influence of prenatal estradiol. *Horm Behav*, **57**, 434-440.

Bakker, J. & **Brock, O.** (2010d) Early oestrogens in shaping reproductive networks: evidence for a potential organisational role of oestradiol in female brain development. *J Neuroendocrinol*, **22**, 728-735.

**Brock, O.** & Bakker, J. (2010e) Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice. *Horm Behav*. In Press.

### Manuscrits en cours

**Brock, O.**, Keller, M., Douhard, Q. & Bakker, J. (2010) Female mice deficient in alpha-fetoprotein show a female-typical neural processing of male-derived pheromones.

**Brock, O.** & Bakker, J. (2010) Prepubertal estradiol rescues female sexual behavior in aromatase knockout mice: new evidence for a role of estradiol in the differentiation of female-typical courtship behaviors.

### Article présenté en annexe

Keller, M., Baum, M.J., **Brock, O.**, Brennan, P.A. & Bakker, J. (2009) The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behav Brain Res*, **200**, 268-276.

# Lexique des abréviations

---

3CB : test comportemental de l'enceinte à trois compartiments

AFP : alpha-foetoprotéine

AFP-KO : souris knockout pour le gène de l'alpha-foetoprotéine

AOB : bulbe olfactif accessoire

AR : récepteurs aux androgènes

ArKO : souris knockout pour le gène de l'aromatase

ATD : 1,4,6-androstatriène-3,17-dione

AVPv : noyau périventriculaire antéroventral de l'hypothalamus

BnST : noyau du lit de la strie terminale

BrdU : 5-bromo-2-déoxyuridine

DHT : dihydrotestostérone

DHTP : propionate de dihydrotestostérone

DG : gyrus dentelé

E<sub>2</sub> : 17-beta-oestradiol

EB : benzoate d'oestradiol

ER<sub>α/β</sub> : récepteurs aux oestrogènes de type α/β

Ex : x<sup>ème</sup> jour embryonnaire

FSH : hormone folliculo-stimulante

LH : hormone lutéinisante

GnRH : gonadolibérine

GR : cellule granulaire du bulbe olfactif

HPG : axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

MIF : hormone antimüllérienne

MOB : bulbe olfactif principal

MOE : épithélium olfactif principal

MPOA : aire préoptique médiane

NO : oxyde nitrique

NOS : enzyme NO-synthase

OB : bulbe olfactif

OT : ocytocine

P0 : jour de la naissance

PG : cellule périglomérulaire du bulbe olfactif

PNx : x<sup>ème</sup> jour postnatal

PR : récepteur à la progestérone

RMS : courant de migration rostral

SDN-POA : noyau sexuellement dimorphique de l'aire préoptique

SVZ : zone sous-ventriculaire

T : testostérone

TP : propionate de testostérone

TH : tyrosine hydroxylase

VMH<sub>(l)</sub> : (partie latérale) du noyau hypothalamique ventromédian

VNO : organe voméronasal

WT : wild-type (sauvage)

# Tables des Matières

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>1</b>  |
| <b>I. La différenciation sexuelle</b> .....   | <b>2</b>  |
| I.1 La détermination sexuelle .....   | 2         |
| I.2 L'hypothèse organisationnelle/activationnelle de la différenciation sexuelle du<br>cerveau .....  | 7         |
| I.3 L'hypothèse de l'aromatisation .....  | 16        |
| I.4 L'hypothèse progressive .....   | 21        |
| I.5 Révision de la théorie classique de la différenciation sexuelle cérébrale et<br>comportementale .....                                       | 25        |
| <b>II. Le modèle de souris « aromatase knockout » ou ArKO</b> .....   | <b>29</b> |
| II.1 Caractéristiques physiologiques .....  | 32        |
| II.2 Etudes comportementales .....  | 36        |
| <b>III. Le modèle de souris « alpha-foetoprotéine knockout » ou AFP</b> .....   | <b>42</b> |
| III.1 Caractéristiques physiologiques .....   | 44        |
| III.2 Etudes comportementales .....   | 45        |
| <b>IV. L'olfaction : une composante primordiale du comportement reproducteur</b> .....  | <b>50</b> |
| IV.1 Voies neuronales du traitement des stimuli olfactifs .....   | 51        |
| IV.2 Implication différentielle des systèmes olfactifs principal et accessoire dans les<br>composantes comportementales de la reproduction..... | 54        |
| IV.3 Différenciation sexuelle des systèmes olfactifs principal et accessoire .....  | 56        |
| <b>V. La neurogenèse adulte : modulateur de l'olfaction et du comportement reproducteur</b> .....   | <b>58</b> |
| V.1 Neurogenèse adulte olfactive .....  | 59        |
| V.2 Rôle fonctionnel de la neurogenèse adulte olfactive.....  | 63        |
| V.3 Régulation hormonale de la neurogenèse adulte.....  | 65        |
| <b>VI. Objectifs de la thèse</b> .....  | <b>68</b> |

# Tables des Matières

---

## RESULTATS

### OESTROGENES & OLFACTION

|  |            |
|--|------------|
| <b>I. Effets d'un traitement oestrogénique sur la prolifération cellulaire de la SVZ et sur la survie cellulaire au sein de l'OB chez des souris femelles C57BL/6.....</b> | <b>71</b>  |
| I.1 Introduction.....  | 71         |
| Article 1 : Brock et al., 2010a.....   | 73         |
| I.2 Principaux résultats & discussion .....  | 83         |
| <b>II. Rôle des oestrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle des préférences sexuelles chez la souris.....</b>   | <b>87</b>  |
| II.1 Introduction.....   | 87         |
| Article 2 : Brock et al., 2010e.....   | 89         |
| II.2 Principaux résultats & discussion .....   | 97         |
| <b>III. Rôle des oestrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle du traitement des stimuli socio-sexuels chez la souris.....</b>                                    | <b>99</b>  |
| III.1 Introduction.....  | 99         |
| Article 3 : Brock et al., 2010 (manuscrit en cours) .....  | 100        |
| III.2 Principaux résultats & discussion .....  | 116        |
| <b>IV. Rôle des oestrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle du comportement maternel chez la souris.....</b>  | <b>119</b> |
| IV.1 Introduction.....   | 119        |
| Article 4 : Keller et al., 2010 .....  | 121        |
| IV.2 Principaux résultats & discussion.....  | 129        |

### OESTROGENES & FEMINISATION

|   |            |
|---|------------|
| <b>I. Détermination d'une période d'influence oestrogénique postnatale chez la souris femelle .....</b> | <b>131</b> |
| I.1 Introduction.....   | 131        |
| Article 5 : Brock et al., 2010b .....   | 133        |

# Tables des Matières

---

|   |            |
|---|------------|
| I.2 Principaux résultats & discussion .....   | 141        |
| <b>II. Restauration du phénotype WT suite à un traitement oestrogénique pré-pubère chez des femelles ArKO .....</b>   | <b>143</b> |
| II.1 Introduction.....  | 143        |
| Article 6 : Brock et al., 2010 (manuscrit en cours) .....   | 145        |
| II.2 Principaux résultats & discussion .....  | 165        |
| <b>III. Evidence du rôle organisateur de l'oestradiol dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale de type femelle chez la souris.....</b> | <b>170</b> |
| III.1 Introduction.....   | 170        |
| Article 7 : Bakker and Brock, 2010d .....   | 171        |

## **DISCUSSION GENERALE**

|   |            |
|---|------------|
| <b>I. Effets organisateurs <i>versus</i> activateurs des hormones gonadiques sur le comportement.....</b> | <b>180</b> |
| I.1 Le comportement sexuel.....   | 181        |
| I.2 Le comportement de monte.....   | 182        |
| I.3 Les préférences sexuelles.....  | 183        |
| <b>II. Système neuronal sous-tendant le comportement sexuel femelle.....</b>                              | <b>185</b> |
| <b>III. Effets de la progestérone sur le développement du cerveau femelle.....</b>                        | <b>189</b> |
| <b>IV. Différenciation sexuelle &amp; facteurs génétiques.....</b>  | <b>191</b> |

**CONCLUSION** **197**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **201**

**ANNEXE** **225**

# **Introduction**

Pendant des décennies, le public s'est accordé à croire que les différences comportementales observées entre hommes et femmes étaient minimales, et relevaient essentiellement d'expériences de vie pré- et post-pubères différentes. Ces théories ont longuement enflammé le débat de l'inné et de l'acquis. Toutefois, au fil des ans, des données expérimentales se sont accumulées suggérant que les hormones gonadiques pouvaient agir très précocement sur l'organisation cérébrale, de telle sorte que l'environnement hormonal pourrait déjà jouer un rôle prépondérant sur un cerveau différemment programmé dès les premiers jours de vie d'un garçon et d'une fille, c'est-à-dire dès le stade fœtal. A ce jour, les bases biologiques de la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement humain sont de mieux en mieux documentées ; cependant, de nombreuses zones d'ombres subsistent encore, notamment à la compréhension exacte des mécanismes hormonaux responsables d'une différenciation neuronale prononcée entre hommes et femmes.

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif principal était donc d'éclaircir ces zones d'ombres grâce à une meilleure interprétation du rôle des stéroïdes sexuels dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale chez la souris. Sur base de travaux menés sur deux modèles de souris transgéniques, nous avons tenté de mettre en évidence une fenêtre d'influence oestrogénique, qu'elle soit prénatale, postnatale ou pré-pubère<sup>1</sup>, au cours de laquelle des substrats neuronaux pouvaient être organisés afin d'induire spécifiquement un comportement de type mâle ou femelle à l'âge adulte. In fine, nous espérons que cette recherche puisse aider à éclairer les mécanismes hormonaux/génétiques contrôlant la différenciation sexuelle du cerveau humain.

---

<sup>1</sup> Période pré-pubère : désigne la période comprise entre la période néonatale (du jour de la naissance au jour 10) et le début de la puberté (jours 35-40) chez la souris.

# **I. La différenciation sexuelle**

## **I.1 La détermination sexuelle**

Le parallélisme entre la ségrégation des particules héréditaires décrites par Mendel et le comportement des chromosomes en méiose fut souligné par Sutton et Boveri en 1902. Ils postulèrent que les particules héréditaires (gènes) étaient localisées sur les chromosomes. Cette hypothèse fut longtemps controversée car, à cette époque, il était difficilement envisageable que des chromosomes morphologiquement identiques puissent être génétiquement différents. Cependant, un argument décisif fut apporté suite à la découverte de l'hérédité liée au sexe. En 1910, Morgan découvrit une différence fondamentale entre les deux sexes de la drosophile : la femelle présentait deux chromosomes identiques, les chromosomes X, alors que le mâle ne présentait qu'un seul chromosome X, et un chromosome plus petit, le Y. En 1912, Winiwater constata que la femme présentait un chromosome X en double exemplaire alors que celui-ci n'était présent qu'en simple exemplaire chez l'homme. Il fallut attendre 1923 pour que Painter découvre le chromosome Y chez l'homme, passé inaperçu jusqu'alors, et 1956, pour déterminer le nombre exact de nos chromosomes, soit 23 paires.

Le système XY de détermination sexuelle est donc un système génétique de détermination du sexe présent chez l'humain, la plupart des mammifères (dont la souris), certaines espèces d'insectes (diptères) et de plantes (Ginkgo). Il est basé sur la présence de chromosomes sexuels différents entre les différents individus de l'espèce. Ainsi, les mâles possèdent un chromosome X et un chromosome Y, alors que les femelles possèdent deux chromosomes X. Le sexe hétérogamique (possédant donc deux chromosomes sexuels différents) est donc le sexe mâle. Cette différence génétique permet ensuite la différenciation sexuelle des différents individus au cours du développement. Pour chaque croisement entre un mâle et une femelle, la femelle transmettra un chromosome X, et le mâle soit un chromosome X, soit un chromosome Y. Ainsi, le descendant sera soit XX, soit XY, c'est-à-dire femelle ou mâle, avec une

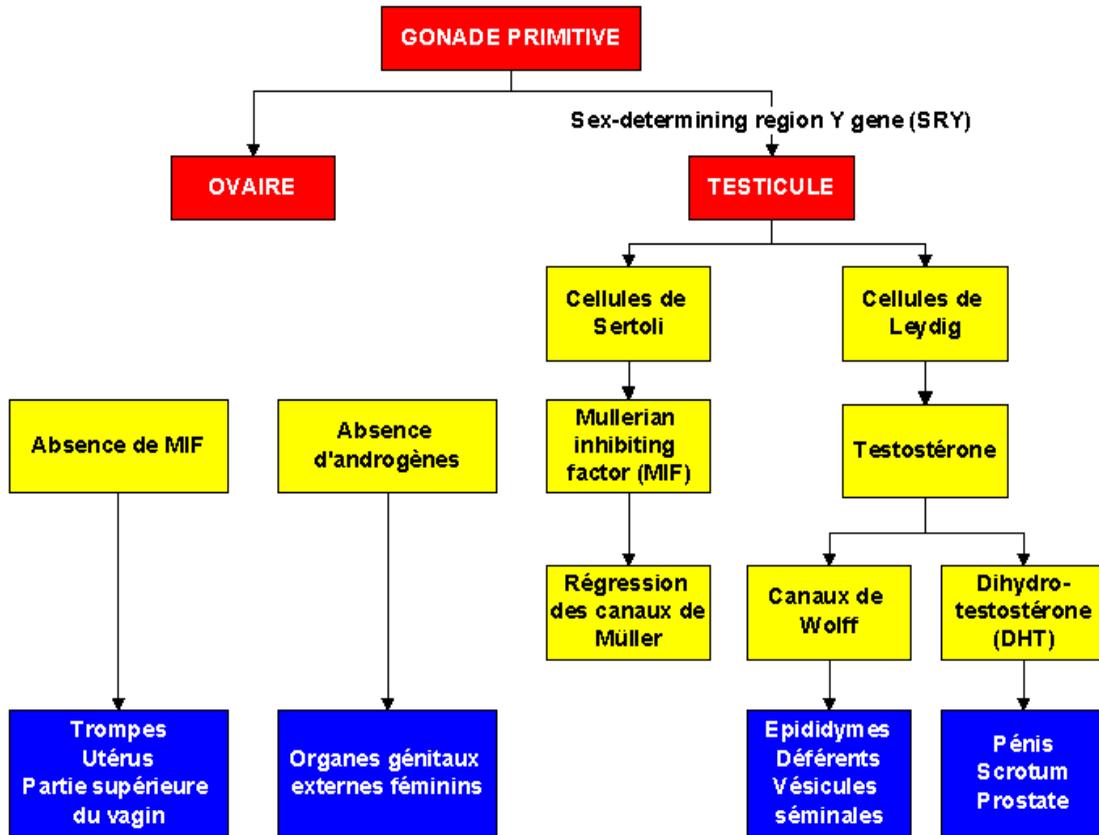
chance sur deux pour chaque sexe. Chez les oiseaux et certains papillons, il existe un système similaire, mais inversé appelé le système WZ de détermination sexuelle, où les femelles sont hétérogamiques (WZ) et les mâles homogamiques (ZZ). Enfin, chez les poissons, les amphibiens et les reptiles, on peut trouver l'un ou l'autre de ces deux systèmes de déterminisme chromosomique ZZ/ZW et XX/XY, mais bon nombre de ces espèces ne présentent pas de chromosomes sexuels hétéromorphes. De plus, dans ces classes, la détermination du sexe peut être influencée par la température.

Chez les insectes, le nombre de chromosomes X par rapport au nombre d'autosome détermine le sexe, alors que le chromosome Y exerce un contrôle génétique dominant chez les mammifères. De nombreuses études menées sur l'homme et la souris dotés de chromosomes anormaux ont mis en évidence que, quelque soit le nombre de chromosomes X, les embryons porteurs d'un chromosome Y deviennent obligatoirement mâles tandis que son absence engendre des individus de type femelle. Chez certains sujets, le phénotype sexuel ne correspond pas aux chromosomes sexuels : les individus XX (= syndrome de la Chapelle, mâles stériles avec des testicules sans spermatogonies) ou XY (= syndrome de Swyer, femmes stériles avec des ovaires dysgénésiques). Ces individus sont dits « intersexués » (c.à.d, présentant une inversion sexuelle). L'étude de leurs chromosomes a permis en grande partie de déterminer les gènes impliqués dans la détermination du sexe. Ainsi, en 1989, le gène *SRY* (Sex-determining region of Y chromosome) responsable de l'établissement du sexe gonadique fut découvert. Le sexe génétique est donc déterminé à la fécondation, selon le chromosome sexuel apporté par le spermatozoïde. L'établissement du sexe gonadique sous contrôle génétique dépend ainsi de la présence du gène *SRY* (Koopman et al., 1990 ; Haqq et al., 1995). En l'absence de *SRY* et en présence de deux chromosomes X, la gonade se différencie en ovaire.

La différenciation sexuelle fœtale dépend donc d'un ensemble de signaux cellulaires et hormonaux agissant selon un ordre précis pour contribuer à la mise en place de l'appareil génital et à l'établissement d'un phénotype mâle ou femelle (**Figure**

1). Chronologiquement, celle-ci se déroule en quatre étapes séquentielles majeures (Morel et al., 2005) :

1. Etablissement du sexe génétique au moment de la fécondation. L'association d'un ovocyte (souris, 19, X) maternel et d'un spermatozoïde paternel, soit (souris, 19, X) soit (souris, 19 Y), résultera en un œuf homogamétique (souris, 40, XX) de sexe génétique femelle ou hétérogamétique (souris, 40, XY) de sexe génétique mâle.
2. Mise en place du sexe gonadique représentant la voie de différenciation des gonades. Elle englobe la détermination puis la différenciation de la gonade fœtale bipotentielle en testicule ou en ovaire régulées respectivement par la présence ou l'absence du gène *SRY*. Subséquemment, suit la mise en place des structures internes à partir de deux systèmes de canaux parallèles présents chez l'embryon : les canaux de Wolff et de Müller.
3. Production hormonale par le testicule différencié de deux hormones capitales pour la virilisation du fœtus mâle : a. l'hormone antimüllérienne (MIF) produite par les cellules de Sertoli, induisant la régression rapide et complète des canaux de Müller ; b. la testostérone (T) produite par les cellules de Leydig, entraînant la différenciation des canaux de Wolff en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales.
4. Développement du sexe phénotypique. Celui-ci résulte en la différenciation des organes génitaux externes et du sinus urogénital. Cette dernière étape de la différenciation sexuelle est induite par la T et la dihydrotestostérone (DHT, produite à partir de la T par l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase) via le récepteur aux androgènes, permettant essentiellement le développement de l'appareil génital mâle externe.



**Figure 1** : Différenciation sexuelle fœtale contribuant à la mise en place de l'appareil génital et à l'établissement d'un phénotype mâle ou femelle. La gonade bipotentielle embryonnaire se différencie soit en testicule (suite à l'influence du gène *SRY*) soit en ovaire (suite à l'absence du gène *SRY*). Le testicule sécrète alors d'une part, une hormone antimüllérienne (MIF) engendrant la régression des canaux de Müller, et d'autre part, la testostérone, et son métabolite, la dihydrotestostérone (DHT), permettant la formation respectivement des structures internes du testicule à partir des canaux de Wolff et des structures externes de l'appareil génital mâle. De l'autre côté, l'ovaire se forme spontanément en l'absence de toute production hormonale, avec une régression des canaux de Wolff, un développement des canaux de Müller (en absence d'hormone antimüllérienne) et des organes génitaux externes (en absence de testostérone).

En présence d'ovaires (ou en l'absence totale de gonades), les canaux de Müller se développent spontanément en trompes de Fallope, en utérus et en vagin, alors que les canaux de Wolff régressent totalement. Chez les mammifères, aucune production hormonale n'est donc requise pour le développement normal de l'appareil reproducteur de type femelle. Sur base de cette simple observation, le sexe de type femelle est généralement considéré comme se développant « par défaut ».

En résumé, la différenciation sexuelle fœtale comporte quatre processus essentiels à partir d'organes précurseurs embryonnaires communs :

- a. La déféminisation<sup>2</sup> induite par le MIF, provoquant la régression des canaux de Müller, et la masculinisation<sup>3</sup> induite par la T, provoquant la croissance des canaux de Wolff, permettent le développement normal du sexe de type mâle.
- b. La féminisation<sup>4</sup>, provoquant la croissance des canaux de Müller, et la démasculinisation<sup>5</sup>, provoquant la régression des canaux de Wolff (processus ne dépendant à priori d'aucune production hormonale), permettent le développement normal du sexe de type femelle.

La détermination du sexe représente donc un processus conduisant au développement de toutes les caractéristiques (anatomiques, physiologiques) nous permettant de distinguer un mâle d'une femelle. En revanche, la différenciation sexuelle du cerveau représente un processus bien distinct, largement influencé par les stéroïdes gonadiques au cours d'une période plus tardive du développement. L'impact de ces stéroïdes se restreint à une fenêtre sensible, couvrant la dernière moitié de la gestation chez les primates, et la période périnatale chez les rongeurs (McCarthy, 2008). Ce processus est dit multidirectionnel, agissant à la fois sur la physiologie et le

---

<sup>2</sup> Défémnisation : englobe tous les processus aboutissant à la perte du potentiel à exprimer des caractéristiques de type femelle.

<sup>3</sup> Masculinisation : englobe tous les processus aboutissant à l'acquisition de caractéristiques de type mâle.

<sup>4</sup> Féminisation : englobe tous les processus aboutissant à l'acquisition de caractéristiques de type femelle.

<sup>5</sup> Démasculinisation : englobe tous les processus aboutissant à la perte du potentiel à exprimer des caractéristiques de type mâle.

comportement reproducteur adulte, et d'autre part sur de nombreux aspects non reproducteurs, via des mécanismes différents au sein de régions cérébrales distinctes, et cela au cours de périodes sensibles variables selon l'aspect étudié. Parmi les nombreuses variables complexifiant le processus de la différenciation sexuelle du cerveau, les stéroïdes sexuels constituent une catégorie à part entière.

## **I.2 L'hypothèse organisationnelle/activationnelle de la différenciation sexuelle du cerveau**

La notion d'une action précoce des stéroïdes au cours du développement afin d'élaborer la morphologie du cerveau (c.à.d. le réseau neuronal) dictant les comportements sexuels adultes est devenu un des concepts les plus largement acceptés au sein du domaine de la neuroendocrinologie du comportement.

Lors de la copulation chez les rongeurs, nous pouvons observer des comportements très spécifiques liés au sexe de l'animal. Ainsi, la femelle sexuellement réceptive adopte une position de lordose<sup>6</sup> en réponse aux tentatives de montes du mâle (**Figure 2**). Ces réponses comportementales sont spécifiques au sexe et dépendent fortement du taux circulant d'hormones stéroïdes gonadiques. Par exemple, la castration d'un mâle adulte engendre la disparition des tentatives de monte tandis qu'une administration de T exogène rétablit complètement le comportement reproducteur chez des mâles castrés. De la même manière, une ovariectomie à l'âge adulte réduit fortement l'expression de la lordose chez la femelle tandis qu'un traitement oestrogénique combiné à de la progestérone rétablit la réceptivité sexuelle chez des femelles ovariectomisées. Ces traitements hormonaux exogènes induisent des effets appelés activateurs. Cependant, un traitement oestrogénique combiné à de la

---

<sup>6</sup> Lordose : chez le rongeur, elle se manifeste par une courbure concave dorsale suite à une stimulation des flancs de la femelle et traduit la réceptivité sexuelle. Cette dernière dure une douzaine d'heures, et débute lorsque les concentrations plasmatiques d'oestradiol et de progestérone ont atteint leurs valeurs maximales. Le réflexe de lordose est essentiellement médié par le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMH) (Demotes-Mainard and Vincent, 2001).



**Figure 2** : Position de lordose. La ratte adopte une courbure concave dorsale en réaction à la monte réalisée par le rat mâle afin de faciliter l'intromission.

progestérone administré à l'âge adulte à un mâle, intact ou castré, n'induit jamais un comportement sexuel de type femelle chez cet animal. Ces dernières observations indiquent que le potentiel comportemental d'un mâle a été déféminisé lors de son développement embryonnaire suite à une action spécifique de stéroïdes gonadiques. Dans ce cas précis, ce type d'effets hormonaux est appelé organisationnel.

Les premiers auteurs ayant suggéré cette hypothèse organisationnelle/activationnelle de la différenciation sexuelle du cerveau furent Phoenix et ses collaborateurs (1959). Sur base des modèles proposés pour la différenciation sexuelle du tractus génital (Jost, 1947 ; 1953), ils postulèrent que les hormones gonadiques pouvaient agir sur le développement des tissus afin de les « organiser » de telle sorte qu'ils puissent activer le comportement reproducteur de type mâle à l'âge adulte. Parallèlement, ils postulèrent que les tissus supportant le comportement reproducteur typiquement femelle à l'âge adulte s'organisaient en l'absence de toute production hormonale gonadique, c.à.d. « par défaut ». Afin de tester cette hypothèse, Phoenix a mené une expérience sur les effets de l'administration d'un traitement androgénique (propionate de testostérone, TP) sur le comportement reproducteur de jeunes issus d'une femelle cobaye<sup>7</sup> traitée lors de sa gestation. Brièvement, il démontra que, chez les femelles, l'administration précoce d'androgènes lors du développement embryonnaire diminuait la probabilité d'exprimer la lordose à l'âge adulte malgré un traitement hormonal sensé induire leur réceptivité sexuelle. De manière plus surprenante, ces femelles exposées aux androgènes lors du développement pouvaient exprimer un comportement copulatoire de type mâle en présence d'une femelle réceptive suite à l'administration de T à l'âge adulte. Phoenix en conclut donc que l'exposition prénatale aux androgènes était responsable chez ces femelles d'une déféminisation et d'une masculinisation des substrats neuronaux responsables de l'expression du comportement copulatoire à l'âge adulte.

---

<sup>7</sup> Cobaye : ce modèle animal a été abandonné dans la recherche sur la différenciation sexuelle, car la fenêtre sensible est entièrement prénatale compliquant ainsi les manipulations hormonales afin d'étudier des effets organisateurs.

Sur base de ces résultats, il proposa pour la première fois dans l'histoire de la neuroendocrinologie du comportement, la dichotomisation de la différenciation sexuelle du cerveau en :

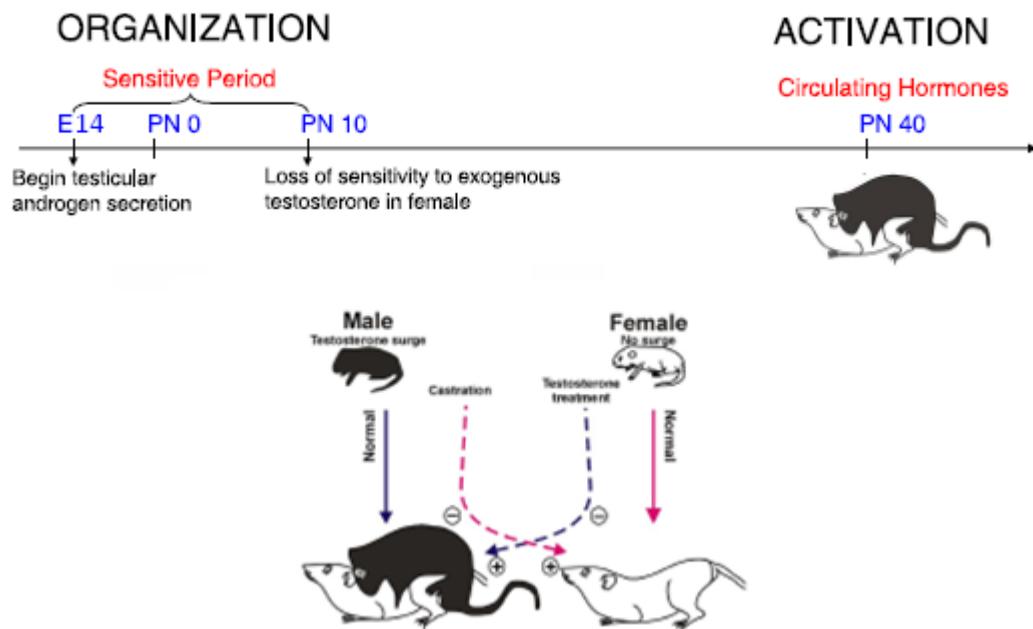
- effets organisateurs des stéroïdes gonadiques : effets permanents dont l'action est limitée à des périodes critiques au cours du développement (généralement, avant la maturité sexuelle). Ils impliquent des changements structurels cellulaires dans le cerveau et sont dits « asymétriques » par rapport au sexe, c.à.d. qu'en règle générale, l'action hormonale semble être requise pour le développement d'un comportement typique chez un sexe donné, mais pas chez l'autre.
- effets activateurs des stéroïdes gonadiques : effets transitoires (de quelques heures à peut-être quelques mois) se manifestant habituellement à l'âge adulte et ne se restreignant pas à une période strictement définie. Ils se produisent via des processus neurochimiques subtils, n'engendrant pas de conséquences à long-terme. Ils sont dits « symétriques » par rapport au sexe, c.à.d. qu'en règle générale, l'activation hormonale est requise pour stimuler les comportements reproducteurs chez le mâle et la femelle.

En d'autres termes, Phoenix suggérait que, durant le développement, les hormones sexuelles organiseraient les composantes du système nerveux central responsables du registre comportemental spécifique au sexe envisagé. Par la suite, à l'âge adulte, ces mêmes hormones activeraient ou réguleraient le fonctionnement de ces substrats neuronaux pré-existants. L'organisation cérébrale de type femelle se développerait par contre « par défaut », indépendamment de toute production hormonale (les ovaires ne débutant leurs sécrétions hormonales qu'au 7<sup>ème</sup> jour postnatal chez la souris ; Mannan, 1991).

Les expériences de Phoenix ont été suivies par une multitude d'études attestant que le comportement sexuel observé à l'âge adulte était fortement modulé par l'action

spécifique de certaines hormones gonadiques durant des périodes particulières du développement (Whalen and Nadler, 1965; Whalen and Edwards, 1967; Bronson and Desjardins, 1968; Edwards and Herndon, 1970; Edwards and Thompson, 1970; Dunlap et al., 1973; Stewart et al., 1979; Stewart and Cygan, 1980; Pang and Tang, 1983; Tobet and Baum, 1987; Bloch et al., 1995). Toutes ces données mettent en évidence une période néonatale critique pour le développement du cerveau durant laquelle l'administration d'androgènes et/ou d'oestrogènes à des jeunes rattes résulte en une déféminisation et une masculinisation des comportements reproducteurs et non-reproducteurs à l'âge adulte. La durée de cette période critique varie selon le comportement étudié, mais en règle générale, semble s'étendre de la naissance (P0) au 10<sup>ème</sup> jour postnatal (PN10) (**Figure 3**).

Etant dorénavant admis que les substrats neuronaux sont différemment organisés par les hormones gonadiques pendant une période critique du développement de telle sorte qu'ils puissent générer des comportements typiques à un sexe donné à l'âge adulte en réponse à ces mêmes hormones gonadiques, il semblerait donc logique de penser trouver quelques différences structurelles au niveau du système nerveux central. Malheureusement, les modifications cérébrales façonnées par les stéroïdes sexuels sont généralement plus subtiles que celles observées au niveau du système génital. Cependant, des études menées sur une région antérieure de l'hypothalamus appelée aire préoptique (POA), ont montré que cette dernière était le siège du contrôle du comportement sexuel mâle. En effet, une lésion complète de l'aire préoptique médiane (MPOA) abolit l'expression du comportement copulatoire mâle chez bon nombre d'espèces sans qu'un traitement androgénique ne puisse rétablir l'expression de ce comportement (Larsson and Heimer, 1964). Au sein de cette région, un noyau 5 à 7 fois plus volumineux chez le mâle que chez la femelle a été mis en évidence chez le rat (Gorski, 1978 ; Meisel and Sachs, 1994). Le noyau sexuellement dimorphique de l'aire préoptique (SDN-POA) représente un très bon modèle pour valoriser les principes de l'hypothèse organisationnelle/activationnelle. En effet, le volume du SDN-POA de femelles exposées aux androgènes durant le développement périnatal est comparable à



**Figure 3** : Hypothèse organisationnelle/activationnelle de la différenciation sexuelle du cerveau. Initialement proposée par Phoenix et ses collaborateurs (1959), cette hypothèse a instauré le principe selon lequel les effets précoces des hormones gonadiques organisaient les substrats neuronaux de telle sorte que les effets hormonaux adultes ne pouvaient se manifester que suite à cette exposition antérieure. La mise en place de différences sexuelles au niveau physiologique et comportemental est donc fonction de l'influence différentielle des hormones gonadiques au cours d'une période sensible périnatale. Chez le rat mâle, la production d'androgènes testiculaires commence avant la naissance, au jour embryonnaire 14 définissant ainsi le début de la période sensible. Chez la ratte, l'ovaire reste quiescent et l'absence d'exposition aux androgènes est primordiale pour le développement normal du cerveau de type femelle. L'administration de T exogène à des jeunes femelles résulte en une déféminisation et une masculinisation du cerveau et du comportement sexuel adulte. Le moment du développement correspondant à l'insensibilité de la femelle aux effets de la masculinisation par la T exogène définit la fin de la période sensible (adapté de McCarthy, 2008).

celui observé chez des mâles intacts tandis qu'il est fortement réduit chez des mâles castrés (Gorski, 1984). Il semblerait que les androgènes et leurs métabolites exercent leurs effets organisateurs en augmentant la neurogenèse<sup>8</sup> (Jacobson and Gorski, 1981) ou en réduisant la mort cellulaire lors du développement de cette région cérébrale (Forger, 1988). Le SDN-POA a été largement étudié mais sa véritable fonction reste à ce jour une énigme (De Jonge et al., 1989 ; Houtsmuller et al., 1994). Par exemple, si de vastes lésions du POA affectent d'une manière drastique l'expression du comportement copulatoire mâle, une telle destruction du SDN-POA n'altère pas ce comportement, ou de manière faible et temporaire (Arendash and Gorski, 1983). Cependant, le SDN-POA pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de l'expression du comportement sexuel de type femelle chez le rat mâle. Par exemple, un traitement oestrogénique combiné à de la progestérone induit l'expression de la lordose chez un mâle castré ayant subi une lésion du SDN-POA alors qu'un tel effet n'est nullement observé chez un mâle castré uniquement (Hennessey et al., 1986). De manière surprenante, de telles différences sexuelles morphologiques n'ont jamais été observées dans le noyau ventromédian hypothalamique (VMH) déterminé comme le siège du contrôle du comportement sexuel femelle (MacCarthy et al., 2008).

Contrairement au SDN-POA, il existe chez le rongeur un autre noyau cérébral plus volumineux chez la femelle : le noyau périventriculaire antéroventral de l'hypothalamus (AVPv). Celui-ci offre deux avantages par rapport au SDN-POA pour la recherche menée sur la différenciation sexuelle : premièrement, il est présent chez la souris, et deuxièmement, sa fonctionnalité exacte est bien définie (= contrôle de l'augmentation de la sécrétion de gonadotropines requise pour l'ovulation). Ainsi, ce noyau comporte une population de cellules, les neurones à Kisspeptine, plus importante chez la femelle que chez le mâle (Clarkson and Herbison, 2006 ; Kauffman et al., 2007). Cette protéine particulière (Kisspeptine) jouerait un rôle prépondérant dans la génération du pic d'hormone lutéinisante (LH) apparaissant chez la femelle avant l'ovulation. Cette

---

<sup>8</sup> Neurogenèse : création par mitose de nouvelles cellules neuronales dans le cerveau.

population de neurones diminue fortement chez des femelles ayant reçu un traitement androgénique postnatal suggérant que cette caractéristique sexuelle est bel et bien organisée par les hormones gonadiques périnatales (Kauffman et al., 2007).

Enfin, Spring et ses collaborateurs (2007) ont récemment montré chez la souris un dimorphisme sexuel important au niveau de certaines structures cérébrales grâce à la technique d'imagerie tridimensionnelle. Outre un volume cérébral général 2.5 fois plus large chez le mâle, cette équipe a également mis en évidence que le thalamus, le cortex moteur primaire et l'hippocampe postérieur étaient plus volumineux chez les mâles tandis que les femelles montraient un hypothalamus, un cortex entorhinal et un hippocampe antérieur plus important.

De manière très intéressante, une étude récente a démontré que les hormones modulaient, au cours de la puberté, l'apport de nouvelles cellules aux régions cérébrales sexuellement dimorphiques, telles que l'AVPv et le SDN-POA. Une gonadectomie pré-pubère entraîne chez des rattes, mais pas chez des rats mâles, une diminution du nombre de nouvelles cellules (marquée par la bromodéoxyuridine, BrdU, mettant en évidence les cellules en prolifération) arrivant dans l'AVPv, résultant en une réduction significative du volume total du noyau et du nombre de neurones (Ahmed et al., 2008). Parallèlement, elle engendre le même phénomène au niveau du SDN-POA chez des rats mâles, mais pas chez des rattes. Premièrement, ces données suggèrent un apport de nouvelles cellules, différent selon le sexe envisagé, au sein de noyaux cérébraux spécifiques durant la puberté chez le rat, reflétant les différences sexuelles morphologiques cérébrales observées à l'âge adulte. Deuxièmement, les hormones gonadiques semblent influencer ce flux de nouvelles cellules au cours de la puberté, vraisemblablement en favorisant la prolifération et/ou la survie cellulaire de manière spécifique au sexe. Ainsi, cette modulation hormonale postnatale semble constituer un mécanisme organisationnel permettant de maintenir des différences sexuelles fonctionnelles durant la puberté et à l'âge adulte.

Outre ces différences sexuelles morphologiques, l'exposition hormonale prénatale peut également moduler l'établissement de la connectivité entre des noyaux cérébraux soutenant le comportement sexuel reproducteur. Ainsi, les projections afférentes entre le noyau du lit de la strie terminale (BnST) et l'AVPv, deux noyaux inclus dans la circuiterie neuronale sexuellement dimorphique supportant la reproduction chez les rongeurs, sont jusqu'à 10 fois plus importantes chez le sujet mâle que chez le sujet femelle (Polston and Simerly, 2004).

Finalement, les hormones gonadiques prénatales peuvent aussi moduler des substrats neuronaux supportant des comportements non-reproducteurs mais jouant un rôle primordial dans l'établissement d'un comportement sexuel approprié. Par exemple, la discrimination individuelle est d'une importance capitale pour toute interaction sociale : elle est essentielle tant pour la reconnaissance de la progéniture et l'émergence des comportements maternels et territoriaux que pour l'émission de réponses comportementales appropriées face aux partenaires sexuels. Chez les rongeurs mâles, une interaction très étroite a pu être mise en évidence entre la reconnaissance sociale et le système vasopressinergique (Engelmann and Landgraf, 1994 ; Everts and Koolhaas, 1997, 1999). Chez le rat, une partie de ce système neuronal est sexuellement différenciée : les taux d'ARN messenger pour la vasopressine au sein des corps cellulaires des neurones de l'amygdale médiane (MeA) et du BnST sont beaucoup plus importants chez les sujets mâles que femelles. Parallèlement, les projections allant de ces noyaux au septum latéral sont nettement plus denses chez les individus mâles (Van Leeuwen et al., 1985 ; Miller et al., 1989 ; De Vries and Al-Shamma, 1990 ; De Vries et al., 1994 ; Wang and De Vries, 1995). Une administration de T lors de la période néonatale induit l'expression d'une distribution vasopressinergique de type mâle chez des rattes (Han and De Vries, 2003) suggérant que les stéroïdes sexuels exercent certains effets lors de l'organisation de ce système peptidergique. Chez la souris, il a été récemment prouvé que les oestrogènes exerçaient des effets activateurs sur le système vasopressinergique (Bakker et al., 2006 ; Pierman et al., 2008) et que le développement

de système sexuellement dimorphique pourrait nécessiter plutôt l'action de métabolites non-aromatisables de la T (Allieri et al., 2005).

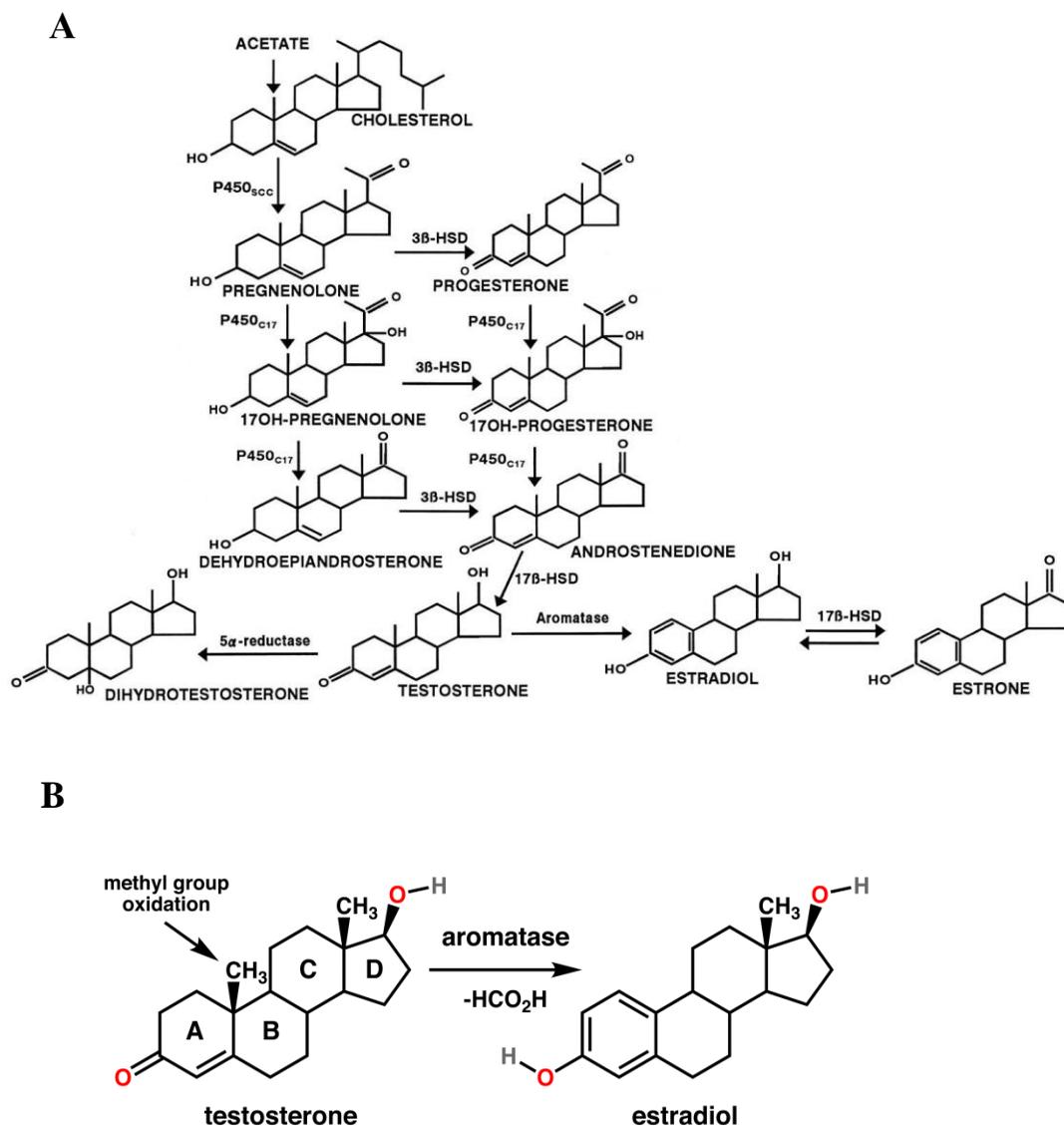
### **I.3 L'hypothèse de l'aromatisation**

Les hormones gonadiques influencent donc la différenciation sexuelle cérébrale ainsi que les comportements à l'âge adulte suite à une activation ultérieure par ces mêmes hormones des substrats neuronaux préétablis.

A l'âge adulte, les ovaires sécrètent principalement des œstrogènes (œstradiol ou  $E_2$ , oestriol et œstrone) et des progestatifs (progestérone). Les testicules, quant à eux, représentent la principale source d'androgènes (androsténédione, dihydrotestostérone ou DHT, testostérone ou T). Ces hormones, appelées hormones stéroïdes sexuelles, ne contiennent pas d'acides aminés, contrairement aux hormones protéiques telles que l'insuline, mais sont constituées de quatre chaînes cycliques d'atomes de carbone reliées entre elles. Cette conformation particulière rend les stéroïdes sexuels liposolubles, leur permettant ainsi de diffuser aisément au travers des membranes cellulaires afin de se fixer à leurs récepteurs nucléaires (récepteurs aux œstrogènes ou ER, récepteurs aux androgènes ou AR, récepteurs à la progestérone ou PR). Chez les vertébrés, les stéroïdes sexuels sont produits à partir d'un précurseur commun : le cholestérol (molécule constituée de 27 atomes de carbone) (**Figure 4A**). Cette molécule est successivement transformée en prégnénolone et en progestérone, éléments de base à la fabrication des androgènes, appelés également stéroïdes  $C_{19}$  en raison de leur nombre d'atomes de carbone. Les androgènes sont eux-mêmes les précurseurs des œstrogènes, appelés aussi stéroïdes  $C_{18}$ . T et  $E_2$  ne diffèrent donc entre eux que par une seule molécule de carbone. Le processus chimique permettant la conversion des androgènes en œstrogènes est appelé l'aromatisation<sup>9</sup> (Lephart, 1996) (**Figure 4B**).

---

<sup>9</sup> Aromatisation : réaction chimique complexe engendrée par le complexe enzymatique « aromatase cytochrome » (P450arom ou aromatase) et se traduisant par l'oxydation du carbone 19 des androgènes, l'aromatisation d'un cycle (l'anneau A) par enlèvement d'un groupement méthyl et la transformation d'une fonction cétone en fonction phénol.



**Figure 4** : **A.** Biosynthèse des androgènes et des œstrogènes à partir du cholestérol. P450<sub>scc</sub> (cytochrome P450 side-chain cleavage) ; 3β-HSD (3β-hydroxystéroïde déshydrogénase) ; 17β-HSD (17β-hydroxystéroïde déshydrogénase) (Adapté de Mensah-Nyagan et al., 1999). **B.** Processus d’aromatation de la testostérone en œstradiol.

Au moment où les différences sexuelles morphologiques cérébrales trouvaient une explication chez les oiseaux et les mammifères, une autre zone d'ombre de la différenciation sexuelle s'éclaircissait. Dans les premières études mettant à l'épreuve l'hypothèse organisationnelle/activationnelle, la T était administrée à des rattes nouveau-nées afin de masculiniser leur cerveau. Parallèlement, d'autres rattes nouveau-nées recevaient un traitement oestrogénique, considéré comme un contrôle valable pour l'injection de stéroïdes sexuels. A la grande surprise des expérimentateurs, le traitement avec l'E<sub>2</sub> masculinisait non seulement le cerveau femelle, mais cette masculinisation était plus marquée comparativement à un traitement androgénique (Feder and Whalen, 1965). De plus, une administration néonatale de DHT, androgène non-aromatisable et réputé pour montrer une haute affinité avec les AR, s'avérait en grande partie inefficace en terme de masculinisation (Stewart et al., 1979 ; Whalen and Olsen, 1981). Successivement, la majorité des études ont donc investigué les effets d'un traitement androgénique (TP) *versus* oestrogénique (benzoate d'oestradiol ou EB), administré entre P0 et PN10, sur le comportement sexuel à l'âge adulte. Tous les auteurs ont alors observé une diminution de la lordose à l'âge adulte chez les femelles traitées précocement, et ce quel que soit le traitement administré à la naissance, suggérant ainsi qu'un traitement oestrogénique néonatal mimait parfaitement les effets masculinisants d'un traitement androgénique néonatal (Whalen and Nadler, 1965; Whalen and Edwards, 1967; Edwards and Thompson, 1970). Parallèlement, Stewart et ses collaborateurs ont démontré que des rats mâles nouveau-nés traités de P0 à PN10 avec un inhibiteur de l'aromatase (1,4,6-androstatriene-3,17-dione ou ATD), empêchant donc la conversion de T en E<sub>2</sub>, exprimaient à l'âge adulte des niveaux significatifs de lordose. Ces observations suggéraient donc que le métabolite de la T, à savoir l'E<sub>2</sub>, était le facteur responsable de la déféminisation du comportement sexuel de type femelle chez le rat mâle.

Le fait que des stéroïdes tels que les œstrogènes, considérés comme des hormones « féminines », puissent avoir une influence déféminisante et masculinisante aussi prononcée sur le développement du comportement reproducteur constitua une

véritable énigme pendant de nombreuses années. La découverte du processus de l'aromatation a donc permis de résoudre ce mystère. Suite à cela, il a été communément admis que, contrairement à la différenciation de l'appareil reproducteur, bon nombre des effets déféminisants et masculinisants de la T prénatale sur le système nerveux central étaient produits par l'E<sub>2</sub> dérivé de l'aromatation locale de la T (Naftolin et al., 1975 ; McEwen et al., 1977 ; Baum, 1979 ; MacLuksy and Naftolin, 1981).

Chez les mammifères, l'aromatase est donc présente dans les gonades, principalement au niveau des ovaires représentant une source majeure d'œstrogènes à l'âge adulte. Chez la souris, les testicules expriment peu d'activité aromatasique, bien que la production de T commence dès le 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire, suivi de 2 pics de sécrétion au 16<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jour embryonnaire pour atteindre un pic maximal à la naissance, pour ensuite chuter fortement et atteindre des concentrations peu fluctuantes dès la phase pré-pubère (Bakker and Brock, 2010). Contrairement aux testicules, les ovaires ne produisent aucune sécrétion hormonale détectable avant le 7<sup>ème</sup> jour postnatal (Mannan et al., 1991). La sécrétion d'E<sub>2</sub> augmente alors continuellement jusqu'à atteindre un plateau durant la puberté (jours 30-45), puis devient cyclique à l'âge adulte (Bakker & Brock, 2010).

Chez de nombreuses espèces, dont l'homme, l'aromatase est donc présente dans les gonades mais également au sein de divers tissus tels que le foie (Smuk and Schwers, 1977), le placenta (Hall et al., 1987), les glandes surrénales (Conley et al., 1996 ; Baquedano et al., 2007) et les tissus adipeux (Mendelson et al., 1982). De manière plus intéressante, l'aromatase est également exprimée dans les neurones du cerveau et ses niveaux d'expression les plus hauts sont atteints spécifiquement dans les régions cérébrales sexuellement dimorphiques du POA et de l'hypothalamus au cours de la période sensible périnatale (George and Ojeda, 1982 ; Roselli and Resko, 1993 ; Lauber and Lichtensteiger, 1994 ; Wagner and Morell, 1995 ; Ivanova and Beyer, 2000). L'activité aromatasique dans des homogénats hypothalamiques de sujets mâles est en

effet plus importante que celle observée chez des sujets femelles (Hutchison et al., 1995). L'aromatase montre une nette augmentation d'expression en fin de période embryonnaire, particulièrement chez le mâle, atteignant son activité maximale à la naissance pour ensuite chuter aux taux exprimés à l'âge adulte (Harada and Yamada, 1992 ; Karolczak et al., 1998). A l'âge adulte, l'expression hypothalamique de l'aromatase est indétectable chez la souris mâle et femelle. Cependant, des différences sexuelles peuvent être observées en réponse à de la T exogène se traduisant par une activité aromatasique plus importante chez le sujet mâle que chez le sujet femelle adultes (Bakker et al., 2004). De telles différences ont par ailleurs été reportées chez d'autres espèces (Balthazart et al., 1996 ; Roselli et al., 1996 ; Gilmore, 2002). L'aromatase est également observée dans le télencéphale, mais à des niveaux beaucoup plus bas que dans le diencephale (MacLusky et al., 1994).

Au vu de toutes les données présentées ci-dessus, oestrogènes et androgènes sont généralement qualifiés d'hormones stéroïdes « sexuelles » ; cependant, il est inapproprié de les considérer comme hormone exclusivement femelle ou mâle, respectivement. En effet, les individus adultes des deux sexes produisent à la fois des oestrogènes et des androgènes ; seule la concentration relative de ces deux types d'hormones varie entre les sexes, dépendant de l'activité d'enzymes spécifiques au sein de leurs gonades. En effet, à l'âge adulte, les ovaires sécrètent d'importantes quantités d'androgènes tout comme les testicules, à la seule exception qu'il existe une forte concentration locale d'aromatase au sein de l'ovaire convertissant directement ces androgènes en oestrogènes avant leur entrée dans la circulation sanguine.

Considérés dans leur ensemble, tous ces résultats constituent la base de l'hypothèse de l'aromatation. Au cours de la période sensible périnatale, la T sécrétée par les testicules diffuse par la circulation sanguine jusqu'au cerveau où elle est localement aromatisée en E<sub>2</sub>, métabolite initiant alors le processus de déféminisation/masculinisation cérébrale. Naftolin et ses collaborateurs furent les

premiers à soumettre cette hypothèse au monde scientifique (1975) qui l'a ensuite développée (McEwen et al., 1977 ; Vreeburg et al., 1977).

#### **I.4 L'hypothèse progressive**

Chez la femelle, la sécrétion d'oestrogènes par les ovaires est indétectable avant le 7ème jour postnatal (Mannan et al., 1991). Cette observation collait parfaitement avec la théorie de l'aromatisation combinée à l'hypothèse organisationnelle/activationnelle : chez le mâle, seule la T pouvait exercer ses effets déféminisants et masculinisants sur la différenciation du cerveau via son principal métabolite, l'E<sub>2</sub>, alors que chez la femelle, aucun de ces effets spécifiques ne se produisaient au vu de l'absence de sécrétion hormonale, aboutissant ainsi à une différenciation « par défaut ». Cependant, les embryons des deux sexes sont, de manière indiscutable, exposés à une certaine quantité d'oestrogènes maternels passant la barrière placentaire, et susceptible donc de modifier les structures neuronales. Comment dès lors expliquer que les femelles ne subissent pas les effets déféminisants et masculinisants de ces oestrogènes maternels lors du développement cérébral ?

Döhler et Hancke émirent alors la théorie progressive de la différenciation sexuelle cérébrale (1978) en postulant que les hormones maternelles et /ou placentaires diffusant dans le fœtus s'avéraient critiques pour la différenciation sexuelle de type femelle. Ils ont tout d'abord mis en évidence qu'une ovariectomie fœtale ou néonatale n'éliminait pas toute influence oestrogénique chez la femelle en développement (Döhler et al., 1984). En effet, les sources oestrogéniques surrénaliennes, maternelles et fœtales subsistaient. L'hypothèse progressive proposait donc que la différenciation sexuelle des substrats neuronaux et du comportement était contrôlée par la concentration en oestrogènes présente lors du développement. Ainsi, en présence de faibles concentrations en oestrogènes (correspondant à la diffusion des stéroïdes maternels combinée à une absence de sécrétion stéroïdienne par les ovaires de l'embryon), le

cerveau subissait un processus de féminisation, tandis qu'en présence de fortes concentrations en oestrogènes (correspondant à la diffusion des stéroïdes maternels combinée à l'aromatisation locale de la T produite par les testicules de l'embryon), il subissait un processus de masculinisation.

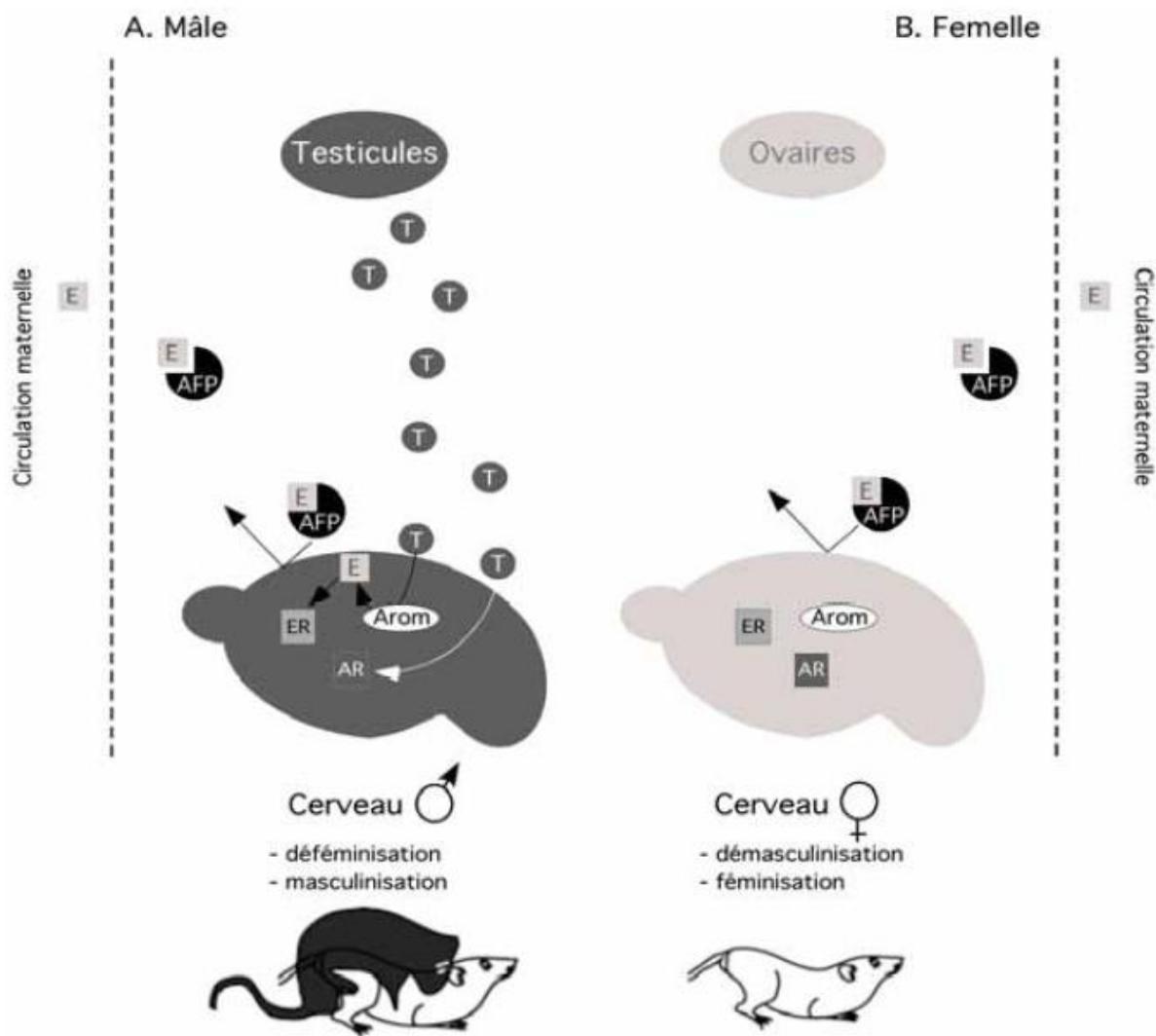
Cependant, l'étude du comportement sexuel de rats mâles et femelles mis au monde par une femelle ovariectomisée dès le 10<sup>ème</sup> jour de sa gestation, et maintenue alors à terme par un traitement exogène de progestérone (Witcher and Clemens, 1987), réfuta totalement l'hypothèse progressive de la différenciation sexuelle cérébrale. En effet, l'expression du comportement reproducteur des mâles issus de cette portée n'était nullement affectée par l'ovariectomie de la mère gestante (et conséquemment, par un taux d'oestrogènes diffusant moins élevé). De plus, l'expression de la lordose chez les femelles issues de cette portée semblait fortement facilitée à l'âge adulte. Ces données réfutaient donc totalement la possibilité qu'une influence féminisante des oestrogènes maternels puisse se produire chez les embryons.

Par ailleurs, à la même époque, la découverte de l'alpha-foetoprotéine (AFP) permit de mieux répondre à la question de l'influence des oestrogènes maternels sur le développement cérébral. Cette protéine plasmatique, produite par les hépatocytes de l'embryon (Andrews et al., 1982 ; Tilghman and Belayew, 1982), est présente en forte concentration dans la circulation sanguine pendant le développement embryonnaire et chute rapidement après la naissance (Raynaud, 1973). En se fixant spécifiquement à l'E<sub>2</sub>, l'AFP empêche cette hormone gonadique de pénétrer au sein du système nerveux central (Raynaud et al., 1971 ; Lieberburg and McEwen, 1975 ; McEwen et al., 1975), protégeant donc les embryons, femelles plus spécifiquement, d'une exposition excessive aux oestrogènes maternels (McCall et al., 1981). Dans son hypothèse progressive, Döhler avait suggéré que l'AFP, plutôt que de protéger le cerveau des embryons femelles, attirait en réalité les oestrogènes vers des sites cérébraux subissant la différenciation sexuelle. De plus, Toran-Allerand (1980, 1987) avait suggéré, suite à l'observation de l'AFP au sein même des neurones combinée à l'absence d'ARNm pour

cette protéine indiquant l'absence d'une synthèse locale, que cette protéine ne jouait pas un rôle de barrière discriminative mais pourrait plutôt constituer un système de distribution sélective de l'E<sub>2</sub>. Toutefois, l'importance de l'AFP pour la protection des foetus femelles envers la déféminisation/masculinisation comportementale due à une surexposition aux oestrogènes maternels, a été récemment démontrée par l'examen du phénotype comportemental exprimé par des souris femelles transgéniques ne pouvant synthétiser cette protéine (AFP-KO ; Gabant et al., 2002). Ces sujets femelles n'expriment pas de lordose à l'âge adulte en réponse aux montes d'un mâle, tandis qu'un traitement prénatal avec de l'ATD permet de restaurer complètement le comportement de lordose chez ces mêmes femelles (Bakker et al., 2006). Ces données confirment donc que l'AFP empêche bien les oestrogènes maternels d'exercer leurs actions déféminisantes et masculinisantes sur le système nerveux central des embryons femelles.

A ce moment précis, l'hypothèse organisationnelle/activationnelle de la différenciation sexuelle cérébrale admise par les scientifiques peut se résumer comme suit (**Figure 5**) :

- a. chez le sujet mâle : la T produite par les testicules embryonnaires n'est pas fixée par l'AFP et peut donc atteindre le système nerveux central. Elle y est localement aromatisée en E<sub>2</sub>, et se fixe à des ER spécifiques engendrant une cascade d'évènements cellulaires et moléculaires menant à la déféminisation et à la masculinisation des substrats neuronaux en développement (**Figure 5A**).
- b. chez le sujet femelle : la différenciation sexuelle cérébrale se manifeste sans aucune exposition hormonale. En effet, les sécrétions ovariennes commencent dès le 7<sup>ème</sup> jour postnatal (Mannan et al., 1991) et les oestrogènes maternels n'ont aucun effet en raison de leur couplage avec l'AFP embryonnaire (**Figure 5B**).



**Figure 5** : Représentation schématique simplifiée de la théorie classique de la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale lors du développement d'embryons mâles (A) et femelles (B). AFP : alpha-foetoprotéine ; AR : récepteur aux androgènes ; Arom : aromatisation ; E : oestradiol ; ER : récepteurs aux oestrogènes (adapté de Pierman et al., 2008b).

## **I.5 Révision de la théorie classique de la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale**

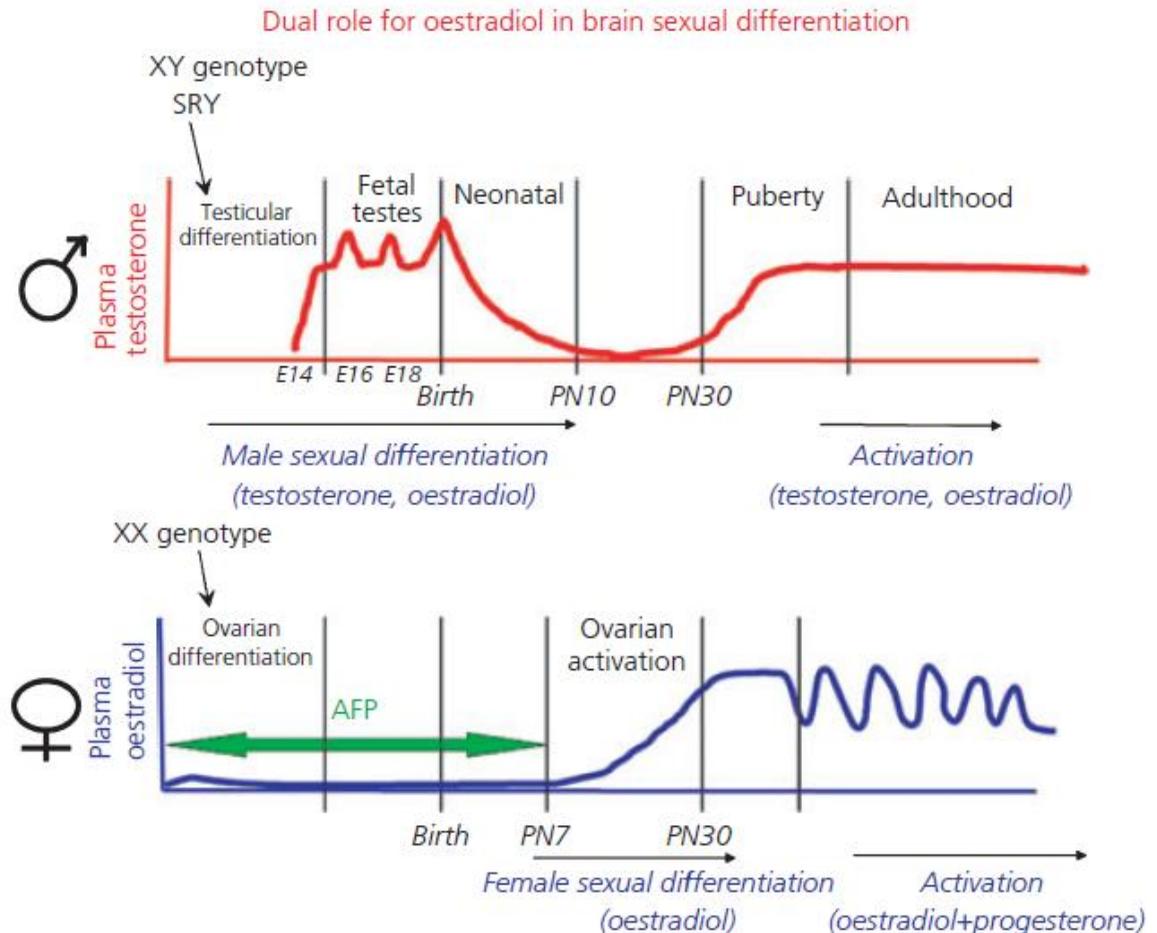
La majorité des études rapportées jusqu'à présent était menée chez le rat et ciblait spécifiquement le rôle d'une exposition hormonale périnatale sur la masculinisation cérébrale et comportementale chez les sujets mâles et femelles (Whalen and Nadler, 1965; Whalen and Edwards, 1967; Bronson and Desjardins, 1968; Edwards and Herndon, 1970; Edwards and Thompson, 1970; Dunlap et al., 1973; Stewart et al., 1979; Stewart and Cygan, 1980; Pang and Tang, 1983; Tobet and Baum, 1987; Bloch et al., 1995). Cependant, ces expérimentations n'ont jamais été menées chez la souris, et par conséquent, la période critique pour la différenciation sexuelle cérébrale chez cet espèce n'a jamais été clairement établie. De plus, la différenciation sexuelle de type femelle, ou les processus de féminisation, n'ont suscité aucun réel intérêt depuis l'apparition de l'hypothèse organisationnelle/activationnelle. Néanmoins, la découverte d'une concentration en AFP chutant brutalement après la naissance, et n'empêchant plus ainsi les oestrogènes d'agir au niveau cérébral, a amené à penser que les oestrogènes pourraient agir sur la différenciation sexuelle cérébrale de type femelle dès le début de la phase postnatale, c.à.d. dès que les ovaires débutaient leurs productions hormonales.

La contribution des hormones ovariennes à la différenciation sexuelle cérébrale de type femelle a tout d'abord été suggérée par des études comportementales observant que des rattes ovariectomisées dès la naissance montraient des niveaux d'expression de lordose plus faibles en réponse à un traitement oestrogénique combiné à de la progestérone à l'âge adulte comparativement à des femelles intactes (Lisk, 1969) ou ovariectomisées dès la naissance mais implantées avec d'autres ovaires jusque PN60 (Gerall et al., 1973). Cependant, les effets observés d'une ovariectomie néonatale sur le potentiel d'expression du comportement de lordose à l'âge adulte n'étaient seulement que transitoires au vu des différences inter-groupes disparaissant progressivement au cours de tests de copulation successifs (Gerall et al., 1973). De plus, certaines expériences ne démontrent aucun déficit majeur de réceptivité sexuelle à l'âge adulte

chez des rattes ovariectomisées dès la naissance (Whalen and Edwards, 1967). Parallèlement, Toran-Allerand (1976) montrait que l'E<sub>2</sub> favorisait la croissance neuronale à partir d'explants hypothalamiques de fœtus des deux sexes suggérant que l'E<sub>2</sub> pouvait jouer un rôle dans la différenciation neuronale. Par la suite, une expérience de Stewart et Cygan (1980) a mis en évidence que des rattes femelles ovariectomisées à la naissance et exposées ensuite à un traitement oestrogénique entre PN10 et PN20, ou PN30 et PN40, étaient plus actives, comme des femelles intactes, lors d'un test comportemental d'« open-field » comparativement à des femelles ovariectomisées et traitées avec le véhicule. Ces résultats suggéraient donc que l'E<sub>2</sub> pouvait exercer des effets féminisants sur un comportement non-reproducteur à partir du 10<sup>ème</sup> jour postnatal. Ces mêmes animaux furent ensuite testés pour leur comportement sexuel ; les rattes traitées avec de l'E<sub>2</sub> entre PN10 et PN20 montraient une forte diminution d'expression de lordose comparativement à celles traitées entre PN30 et PN40. Ces données confirmaient donc les effets masculinisants d'un traitement oestrogénique administré jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour postnatal. Cependant, l'absence d'un groupe contrôle approprié, c.à.d des femelles intactes permettant de fournir des valeurs de référence pour l'expression de lordose, dévalorise l'argument d'un effet féminisant d'un traitement oestrogénique pré-pubère (PN30-PN40) sur le comportement sexuel adulte. Une autre étude dévoile qu'un traitement néonatal au tamoxifène, un antagoniste des ER, administré à des rattes diminue l'expression de lordose à l'âge adulte, tandis qu'une injection néonatale combinée de tamoxifène et d'une faible dose d'EB prévient cet effet (Dohler et al., 1984). Cependant, le tamoxifène est un inhibiteur sélectif des ER mais pouvant exercer des effets mimant ceux des oestrogènes au sein de certains tissus cibles (Mathews et al., 1988). Ainsi, paradoxalement, les déficits d'expression de lordose observés pourraient provenir d'une déféminisation partielle des substrats neuronaux supportant ce comportement plutôt qu'à l'absence d'influences oestrogéniques lors de l'organisation de ces substrats. Finalement, Baum et Tobet (1986) ont découvert que des furets femelles traitées avant la naissance avec de l'ATD (inhibiteur d'aromatase) montraient également une diminution de l'expression de lordose à l'âge

adulte. Néanmoins, ces sujets femelles expriment des niveaux de lordose comparables à ceux exprimés par des sujets contrôles suite à l'administration d'une forte dose d'E<sub>2</sub> à l'âge adulte.

Tous ces différents résultats comportementaux suggèrent qu'une exposition à des taux faibles d'E<sub>2</sub> entre la naissance et le début de la puberté faciliterait l'expression du comportement reproducteur femelle à l'âge adulte. Cependant, ils ne fournissent nullement la preuve indéniable que les oestrogènes contribuent de manière naturelle à la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale des mammifères femelles. Le milieu des années nonante a vu l'avènement de nouveaux modèles expérimentaux permettant de cibler de manière plus rigoureuse l'éventuelle contribution des oestrogènes au développement femelle. Le modèle de souris « aromatase knockout ou ArKO » (décrite plus en détails dans la section suivante), incapable de convertir les androgènes en oestrogènes suite à une mutation ciblée du gène codant pour l'aromatase, peut être utilisé afin de dissocier spécifiquement les effets organisateurs et activateurs de l'E<sub>2</sub> sur la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale de type femelle. Parallèlement, l'utilisation du modèle de souris « alpha-foetoprotéine knockout ou AFP-KO » (décrite plus en détail dans la section suivante), incapable de lier les oestrogènes circulants suite à une mutation ciblée du gène codant pour l'AFP, a permis de mieux cerner les effets d'une surexposition prénatale à l'E<sub>2</sub>, et donc d'une déféminisation, sur l'organisation cérébrale et comportementale de type femelle. L'étude spécifique des ces deux modèles nous a permis d'affiner la théorie de différenciation sexuelle cérébrale chez les deux sexes (**Figure 6**), et par la même occasion, de remettre en cause la théorie classique d'un phénotype femelle se développant « par défaut » (Bakker and Brock, 2010).



**Figure 6** : Comme base de notre travail, nous avons postulé que l'oestradiol pouvait à la fois générer des effets déféminisants et féminisants selon la période de vie étudiée. Ainsi, la différenciation cérébrale et comportementale de type mâle se déroule sous l'influence de la testostérone et de l'oestradiol au cours de la période prénatale chez le mâle ; ce processus est inhibé chez les fœtus femelles suite à l'action neuroprotectrice de l'alpha-foetoprotéine. La différenciation sexuelle cérébrale et comportementale de type femelle se déroule sous l'influence de l'oestradiol, vraisemblablement produit par les ovaires, au cours de la période postnatale (et plus particulièrement pré-pubère) durant laquelle l'alpha-foetoprotéine ne joue plus aucun rôle neuroprotecteur (Bakker and Brock, 2010).

## **II. Le modèle de souris « aromatase knockout ou ArKO »**

Grâce aux progrès relativement récents de la biologie moléculaire et du décryptage complet du génome de la souris en 2003, bon nombre de manipulations génétiques sont dorénavant réalisables chez ce rongeur. Les scientifiques peuvent notamment inactiver ou hyperactiver un gène codant pour une protéine particulière telle qu'une enzyme, une hormone ou un récepteur spécifique à cette hormone. Ces souris transgéniques, appelées « knockout (KO) » permettent désormais d'étudier les effets produits, respectivement, par l'absence ou la surexpression d'une molécule ciblée sur le développement et le comportement d'un sujet expérimental.

Pour les expériences exposées dans cette thèse, nous avons utilisé des souris « aromatase knockout ou ArKO » ayant subi une délétion des exons 1 et 2 du gène *Cyp19* codant pour l'enzyme aromatase (Honda et al., 1998). Les animaux homozygotes de ce modèle sont donc incapables de synthétiser l'aromatase permettant la conversion de la T en E<sub>2</sub>. Il existe plusieurs modèles de souris ArKO selon la partie du gène mutée ; notre modèle présente une mutation au niveau des exons 1 et 2, alors qu'un autre modèle privilégie une mutation de l'exon 9 du gène *Cyp19* (Fisher et al., 1998 ; Robertson et al., 1999). L'exon 1 comprend le site d'initiation ainsi que plusieurs fragments d'ADN nécessaires à la transcription, tandis que l'exon 2 renferme le codon d'initiation de la traduction et certaines séquences d'acides aminés essentiels à la topologie transmembranaire (Terashima et al., 1991). Dans le cas du modèle ArKO, les embryons hôtes, ayant reçu les cellules portant le gène mutant et permettant la création des individus chimères, étaient issus de la souche C57Bl/6. Selon Honda (1998), l'analyse génotypique de la progéniture issue d'accouplements hétérozygotes indique la présence de 25% d'individus « wild-type » (WT), 50% d'individus hétérozygotes (HET) et 25% d'individus knockout (KO). Plus récemment (2008), nous avons décidé de transférer le modèle ArKO dans un fond génétique CD1 pour deux raisons : a/ La productivité : en effet, les portées des souris provenant de la ligné CD1 sont en règle générale deux fois plus importantes que celles observées chez les souris C57Bl/6

(respectivement, entre 15-20 contre 5-10 souriceaux) ; b/ La facilitation de l'induction du pic de LH : nous avons énormément de difficultés à obtenir un pic de LH chez les femelles ArKO C57BL/6 suite à l'administration d'un traitement oestrogénique combiné à de la progestérone à l'âge adulte. En règle générale, ce transfert n'a en rien modifié les caractéristiques physiologiques et phénotypiques du modèle et nous a permis de réduire fortement le nombre d'accouplements nécessaires pour composer des batch expérimentaux représentatifs.

Chez la souris, le gène codant pour l'aromatase est principalement exprimé au niveau des gonades et de certaines régions du diencephale (Harada and Yamada, 1992). Chez les animaux WT, l'expression cérébrale de l'ARN messenger codant pour ce complexe enzymatique est détectable dès le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire. Elle croît rapidement lors du développement, atteignant son maximum à PN4 ( $0.068 \pm 0.008$  chez le mâle et  $0.059 \pm 0.006$  chez la femelle d'attomoles/ $\mu\text{g}$  d'ARN total), pour ensuite chuter à des taux exprimés à l'âge adulte ( $0.022 \pm 0.004$  chez le mâle et  $0.014 \pm 0.003$  chez la femelle d'attomoles/ $\mu\text{g}$  d'ARN total ; Harada and Yamada, 1992). Chez les individus homozygotes (ArKO), l'absence d'ARN messenger spécifique à l'aromatase dans les différents tissus ciblés a été confirmée par la technique de réaction en chaînes par polymérase à différents âges (PCR ; Honda et al., 1998). En effet, l'expression de cet ARN messenger au sein des gonades et du système nerveux central est réduite chez les sujets HET et indétectable chez les sujets ArKO. De plus, ces analyses suggéraient également que la synthèse d'aromatase dans les différents tissus et chez les deux sexes dépendait donc du même gène chez la souris, contrairement à d'autres espèces comme le poisson ou le cochon (Piferrer and Blazquez, 2005). La conversion des androgènes en oestrogènes dépendait donc bien du même mécanisme d'aromatation, que cela soit au niveau cérébral ou d'autres tissus tels que les gonades.

Avant l'apparition d'un tel modèle, d'autres expérimentateurs se sont essayés à la caractérisation des effets engendrés par l'absence d'oestrogènes en examinant le profil physiologique et comportemental de souris KO incapables de synthétiser les récepteurs

spécifiques de type  $\alpha$  aux oestrogènes ( $ER_{\alpha}KO$ ). Ces animaux montrent des taux normaux circulants d'oestrogènes mais l'absence de récepteurs spécifiques les rend insensibles aux actions de ces hormones. Cependant, la découverte d'un autre type de ER, appelé  $ER_{\beta}$  (Kuiper et al., 1996) indique que les souris  $ER_{\alpha}KO$  ne sont en fait que partiellement insensibles aux oestrogènes, leur synthèse de  $ER_{\beta}$  n'étant pas altérée. Un moyen plus spécifique d'étudier les effets de l'absence d'oestrogènes sur le développement était de créer une souche « double knockout » inactivant simultanément les  $ER_{\alpha}$  et les  $ER_{\beta}$  (Couse et al., 1999). Ce modèle peut être considéré comme fonctionnellement équivalent au modèle ArKO car l'action des oestrogènes est supprimée en empêchant respectivement soit leur fixation aux ER spécifiques, soit leur production. Cependant, l'utilisation du modèle ArKO présente quelques avantages non négligeables :

- L'inhibition de la synthèse d'oestrogènes prévient la fixation de ces hormones à d'autres types de récepteurs spécifiques ou non, empêchant ainsi tout effet hormonal indirect.
- Les animaux ArKO restent sensibles aux oestrogènes (par apport exogène) au vu de leurs ER fonctionnels. Cette caractéristique singulière nous permet donc de distinguer les effets de l'absence totale et précoce d'oestrogènes lors de la mise en place des substrats neuronaux, des effets de cette absence permanente lors de l'activation de ses substrats à l'âge adulte. Ainsi, un changement affectant le phénotype des animaux ArKO, quel qu'il soit, comparativement aux sujets WT, peut être défini comme résultant de l'absence d'effets produits par les oestrogènes. Si ce changement ne peut être compensé suite à l'administration d'un traitement oestrogénique à l'âge adulte, nous pouvons suggérer qu'il dépend de l'absence des effets des oestrogènes durant le développement, c.à.d. des effets organisateurs de ces hormones. Dans le cas contraire, cette modification peut être définie comme résultant de l'absence des effets activateurs des oestrogènes à l'âge adulte.

La souche ArKO fournit donc un outil d'investigation exceptionnel permettant de dissocier clairement les effets organisateurs *versus* activateurs des oestrogènes sur la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale.

### **II.1 Caractéristiques physiologiques**

Les souris ArKO, mâles et femelles, ne montrent aucune modification morphologique significative de l'appareil génital externe comparativement aux sujets WT. A la naissance, les animaux ArKO ne peuvent donc pas être distingués de leurs conspécifiques WT sur base de critères anatomiques externes. Cependant, dès l'âge de trois mois, les animaux ArKO développent une obésité provenant essentiellement d'une augmentation substantielle du nombre et du volume des adipocytes au niveau des gonades et des reins, et de modifications de transcription de la leptine (Misso et al., 2003). Ce surpoids ne serait pas associé à une hyperphagie, mais plutôt à une diminution de l'activité physique spontanée combinée à une réduction de l'oxydation glucosidique (Jones et al., 2000 ; Murata et al., 2002). Ces données confirment le rôle plus qu'important des oestrogènes dans la régulation du métabolisme lipidique (Mayes et al., 2004).

D'autres auteurs ont analysé les taux d'hormones circulants ainsi que les phénotypes ovariens et testiculaires chez les souris ArKO. Outre des taux indétectables d'E<sub>2</sub>, ces études ont également révélé une augmentation significative du taux de T plasmatique, spécialement chez les femelles, ainsi que des taux de gonadotropines (LH et FSH) particulièrement élevés par rapport aux animaux WT du sexe envisagé (Fisher et al., 1998). Ces différences de concentrations hormonales se maintiennent au cours des âges chez des souris ArKO et WT observées entre 10 et 52 semaines (Britt et al., 2000, 2001). Récemment, lors d'une étude préliminaire (en collaboration avec le Prof. Melcangi, Université de Milan, Italie), nous avons réussi à doser des stéroïdes sexuels directement à partir de tissus hypothalamiques frais par une analyse combinant les techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse. Chez des souris

ArKO femelles PN15 ou adultes, nous avons pu ainsi démontrer une augmentation du taux de T « cérébral » mais également une diminution du taux de progestérone « cérébral » comparativement à des femelles WT. Ces deux hormones stéroïdes semblent donc suivre le même profil d'expression à la fois dans l'hypothalamus et dans la circulation sanguine.

Les taux d'hormone lutéinisante (LH) et folliculo-stimulante (FSH) montrent une nette augmentation chez les femelles ArKO, tandis que seul le taux de LH diffère entre mâle ArKO et WT (Robertson et al., 1999). Chez l'homme, comme chez la souris, le lobe antérieur de l'hypophyse des individus mâles et femelles libère les gonadotropines (LH et FSH) sous l'influence de la gonadolibérine (GnRH) sécrétée par l'hypothalamus. Ainsi :

- chez la femelle, la FSH stimule le développement des follicules ovariens et la LH favorise l'ovulation, la conversion du follicule en corps jaune (sécrétant la progestérone) et la production d'oestrogènes par les ovaires.
- chez le mâle, la FSH induit la croissance des tubes séminifères tandis que la LH stimule la production de T par les cellules de Leydig.

D'un autre côté, les stéroïdes sexuels exercent une rétroaction négative au niveau de l'hypothalamus et du lobe antérieur de l'hypophyse permettant la régulation des taux de gonadolibérine et de gonadotropines circulants. Chez les sujets ArKO, l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) est perturbé suite à l'absence totale et permanente d'oestrogènes. En effet, aucune rétroaction ne peut avoir lieu, expliquant les taux importants de FSH et de LH observés chez ces animaux. La forte concentration de T reflète sans aucun doute une stimulation excessive par la LH des cellules de la gonade sécrétant la T, c.à.d. les cellules de la theca interna chez les femelles et les cellules interstitielles des testicules chez les mâles.

Les femelles ArKO présentent également une stérilité due à un arrêt précoce de la folliculogénèse, antérieur à l'ovulation (Fischer et al., 1998). Ainsi, les œstrogènes ne sont pas indispensables à l'apparition des formes primaires des follicules, mais sont nécessaires pour leur développement normal et pour les étapes ultérieures de la folliculogénèse menant à l'ovulation. L'absence de follicule au stade de corps jaune, produisant la progestérone, a été également mise en évidence, expliquant le faible taux de cette hormone détecté chez les souris ArKO femelles (Fisher et al., 1998 ; Britt et al., 2000, 2001). De plus, les ovaires de ces dernières développent, à la puberté, certains types cellulaires normalement exprimés au niveau testiculaire soulignant l'importance des oestrogènes pour le développement mais aussi le maintien du phénotype ovarien chez la souris femelle (Britt et al., 2004).

Concernant le phénotype testiculaire des mâles ArKO, les données diffèrent quelque peu selon les exons ciblés lors de la mutation. Dans notre cas précis (mutation des exons 1 et 2), aucune différence n'est détectée entre le poids des testicules des mâles ArKO et WT âgés de 12 à 16 semaines (Honda et al., 1998). Malgré une fertilité fortement réduite (Bakker et al., 2002 ; Matsumoto et al., 2003), les mâles ArKO montrent tout de même une population active de spermatozoïdes au sein de leurs épидидymes. Cependant, l'expression des différentes composantes du comportement reproducteur est fortement altérée (voir paragraphe suivant). Les mâles ArKO mutés au niveau de l'exon 9, montrent quant à eux une réduction du poids testiculaire, une interruption de la spermatogénèse et le développement progressif d'une infertilité alors que ces animaux ne présentent apparemment aucune modification d'expression du comportement copulatoire face à une femelle réceptive (Fisher et al., 1998 ; Robertson et al., 1999). Les résultats contrastés entre ces deux modèles de mâles ArKO peuvent s'expliquer par l'absence complète de synthèse de l'aromatase chez les souris où les exons 1 et 2 (sites prépondérants de la transcription) ont été mutés contrairement à celle où seul l'exon 9 est cible de la mutation.

Un dernier aspect caractérisant le modèle ArKO se traduit par une augmentation considérable du nombre d'ER exprimés au sein de certaines régions cérébrales. Chez la souris, les ER $_{\alpha}$  et les ER $_{\beta}$  montrent des distributions cérébrales relativement similaires à quelques exceptions près : les ER $_{\alpha}$  sont prépondérants au niveau de l'hippocampe, du POA et des différents noyaux de l'hypothalamus tandis que seuls les ER $_{\beta}$  sont exprimés dans le cortex et le cervelet (Mitra et al., 2003 ; Merchenthaler et al., 2004). Certains auteurs ont mis en évidence, par des techniques d'immunohistochimie, que l'expression hypothalamique des ER $_{\alpha}$  doublait chez la souris ArKO mâle comparativement à des sujets WT mâles (Argarwal et al., 2000) suggérant donc un rôle régulateur des oestrogènes sur leurs récepteurs spécifiques. Ces données confirment celles observées précédemment chez de jeunes rats mâles. Des chercheurs ont démontré qu'une administration de T chez des mâles castrés réduisait l'expression des ER $_{\alpha}$  (Clancy et al., 1995) tandis qu'un traitement simultané avec de la T et de l'ATD n'avait aucun effet chez ces mêmes sujets (Clancy and Michael, 1994), prouvant que le métabolite de la T, c.à.d. l'E $_2$ , régulait bien l'expression des ER. Parallèlement, des rats mâles traités avec de l'ATD au cours de la période néonatale montrent une distribution relativement élevée de ER $_{\alpha}$  au sein du POA et du VMH (Bakker et al., 1997). Chez la souris, l'exposition aux oestrogènes durant le développement module l'expression des ER de manière spécifique selon la région cérébrale étudiée (Kudwa et al., 2007). Ainsi, les souris ArKO mâles montrent une plus grande expression des ER $_{\alpha}$  et des ER $_{\beta}$  au sein du VMH, mais une distribution réduite au sein du POA comparativement aux sujets WT. Par contre, un traitement oestrogénique exogène à l'âge adulte diminue fortement l'expression des ER dans les deux régions cérébrales chez des mâles castrés ArKO et WT (Kudwa et al., 2007). Aucune étude sur l'expression des ER n'a jamais été menée chez des individus femelles normaux ou ArKO. Une expérience est actuellement en cours au sein de notre laboratoire afin d'investiguer le profil d'expression pré-pubère et adulte des ER $_{\alpha}$  au sein de l'hypothalamus de femelles WT et ArKO.

## II.2 Etudes comportementales

Contrairement aux processus observés au niveau de la différenciation sexuelle de l'appareil génital, la plupart des effets déféminisants et masculinisants de la T prénatale sur l'organisation cérébrale et comportementale se manifeste suite à sa conversion locale en  $E_2$  (Naftolin et al., 1975 ; McEwen et al., 1977 ; Baum, 1979 ; MacLusky and Naftolin, 1981). Ainsi, une déficience précoce en  $E_2$  engendrée par l'absence de l'enzyme responsable de sa synthèse (modèle ArKO) pourrait fortement affecter l'expression des comportements sexuellement dimorphiques tels que le comportement reproducteur.

Les composantes habituellement étudiées lors de la caractérisation du comportement reproducteur mâle sont la fréquence des tentatives de monte d'une femelle, le nombre d'intromissions effectuées, l'éjaculation ainsi que la latence observée avant l'expression de ces premiers comportements. Chez la femelle, le quotient de lordose<sup>10</sup> sert généralement d'indice de réceptivité sexuelle.

De nombreuses études ont été menées au sein de notre laboratoire afin de caractériser le comportement reproducteur à l'âge adulte chez des sujets ArKO mâles et femelles ayant subi une mutation des exons 1 et 2 du gène codant pour l'aromatase. D'une manière générale, toutes ces expériences ont démontré qu'une absence permanente de production oestrogénique altérait fortement l'expression du comportement sexuel, et menait plus particulièrement à une absence de l'expression de la lordose chez la femelle ArKO, et à une nette diminution des tentatives de monte face à une femelle sexuellement réceptive combinée à un faible taux d'intromissions et d'éjaculation chez le mâle ArKO (Bakker et al., 2002 ; Matsumoto et al., 2003 ; Bakker et al., 2004). Ces résultats ont été observés de manière similaire chez le modèle  $ER_{\alpha\beta}$ KO (Ogawa et al., 2000). Dans leur ensemble, ces expériences confirment le rôle primordial

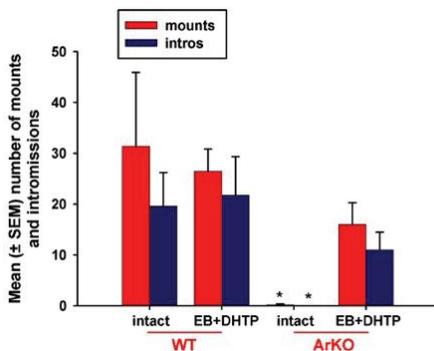
---

<sup>10</sup> Quotient de lordose : ou coefficient de lordose (LQ) traduit le rapport entre le nombre de lordose adoptée par la femelle en réponse aux montes d'un mâle et le nombre total de montes réalisées par le mâle sur cette même femelle.

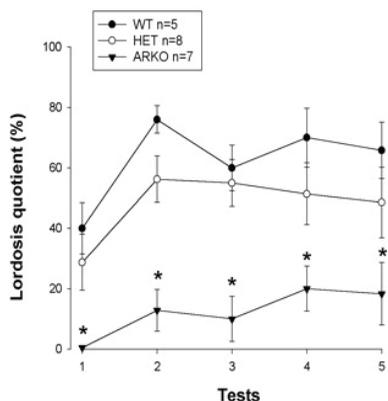
des oestrogènes dans l'expression normale du comportement reproducteur, y compris mâle, chez la souris. De plus, ils prouvent que les métabolites androgéniques de la T ne sont pas suffisants pour permettre l'expression complète des différentes composantes du comportement copulatoire chez le mâle au vu de leurs altérations chez les mâles ArKO et ER $\alpha$  $\beta$ KO possédant pourtant des AR tout à fait fonctionnels (Ogawa et al., 2000).

De manière très intéressante, une injection combinée d'EB et de propionate de dihydrotestostérone (DHTP, un métabolite non-aromatisable de la T) administrée à l'âge adulte permet de corriger, au moins partiellement, les déficits de montes et d'intromissions observés chez les mâles ArKO (**Figure 7** ; Bakker et al., 2004). Cette expérience suggère donc que les oestrogènes exercent principalement des effets activateurs sur l'expression du comportement sexuel chez la souris mâle, contrairement aux effets organisateurs de ces mêmes stéroïdes mis en évidence au cours d'études pharmacologiques réalisées précédemment chez d'autres espèces telles que le rat ou le furet (Naftolin et al., 1975 ; Baum, 1979 ; MacLuksy and Naftolin, 1981 ; Bakker et al., 1993). D'un autre côté, l'absence d'expression de la lordose chez la femelle ArKO ne peut être corrigée suite à l'administration d'E $_2$  et de progestérone à l'âge adulte, induisant pourtant la réceptivité sexuelle chez des femelles WT (**Figure 8** ; Bakker et al., 2002). Ainsi, l'expression normale du comportement reproducteur de type femelle requiert la présence d'oestrogènes à la fois à l'âge adulte (comme chez le sujet mâle) et lors du développement des substrats neuronaux sous-tendant l'expression de ce comportement. Ces observations infirment donc la théorie classique selon laquelle un sujet de type femelle se développe de manière constitutive, c.à.d. sans qu'aucune production hormonale ne soit nécessaire à l'organisation des comportements exprimés à l'âge adulte par cet individu femelle (Bakker et al., 2002 ; Bakker et al., 2003 ; Bakker and Baum, 2007).

Les animaux ArKO mâles et femelles montrent également de sévères déficits affectant leur niveau d'investigation et de préférences olfactives envers des odeurs



**Figure 7** : Nombre moyen de montes et d’intromissions réalisées par des mâles WT et ArKO face à une femelle sexuellement réceptive lors d’un test de copulation de 15 minutes. Ces animaux sont testés après administration d’un traitement avec du benzoate d’oestradiol (EB) et du propionate de dihydrotestostérone (DHTP) (respectivement 5 et 500 µg/souris/jour) ou sans traitement hormonal exogène (intact). \* Significativement différent des valeurs mesurées chez les mâles WT intacts (adapté de Bakker et al., 2004).



**Figure 8** : Indice de réceptivité sexuelle chez des femelles WT, HET ou ArKO lors de 5 tests successifs de copulation avec un mâle sexuellement expérimenté. Les femelles sont ovariectomisées et reçoivent un implant d’E<sub>2</sub>. Trois heures avant chaque test, chaque femelle reçoit une injection sous-cutanée de progestérone (1mg/souris) afin de stimuler leur réceptivité sexuelle. \* Significativement différent des femelles WT et HET.

provenant de conspécifiques des deux sexes (Bakker et al., 2002a, 2002b ; Bakker et al., 2004). Ces animaux ont été testés dans un labyrinthe en Y renfermant au bout de chacun des deux bras, des indices olfactifs de nature différente (mâle intact *versus* femelle sexuellement réceptive) présentés sous des formes spécifiques (odeurs volatiles provenant d'un sujet anesthésié ou d'un aliquot d'urine, odeurs non-volatiles provenant de litière souillée). Les individus WT mâles et femelles gonadectomisés et traités avec de la T à l'âge adulte investiguent très activement ces différentes odeurs, et montrent une nette préférence envers les indices olfactifs provenant d'une femelle sexuellement réceptive (Bakker et al., 2002a, 2002b ; Bakker et al., 2004). Contrairement aux animaux WT, les individus ArKO mâles et femelles soumis aux mêmes conditions investiguent très peu les stimuli olfactifs volatiles et ne montrent que de faibles préférences envers des odeurs de femelles sexuellement réceptives (Bakker et al., 2002a, 2002b). L'administration d'un traitement oestrogénique à l'âge adulte chez ces sujets ArKO ne parvient pas à rétablir des niveaux d'investigation des indices olfactifs comparables à ceux exprimés par des sujets WT suggérant que ces déficits d'investigation et de préférence olfactive sont relatifs à l'absence d'effets organisateurs des oestrogènes chez ces animaux (Bakker et al., 2002b ; Bakker et al., 2004).

En utilisant le paradigme d'habituation/déshabitude<sup>11</sup>, Pierman et ses collaborateurs (2006a) ont démontré que l'absence d'oestrogènes chez les individus ArKO n'était responsable d'aucun déficit sensoriel majeur pouvant les empêcher de détecter ou de discriminer les odeurs volatiles provenant de conspécifiques de sexe différent. En effet, mâles et femelles ArKO gonadectomisés sont capables de détecter des dilutions urinaires comparables à celles détectées par leurs homologues WT. Ces données suggèrent donc que les altérations de l'expression du comportement reproducteur observées chez les sujets ArKO résulteraient d'une incapacité à répondre de manière

---

<sup>11</sup> Test d'habituation/déshabitude : Test comportemental basé sur la motivation intrinsèque d'un animal à investiguer tout nouveau stimulus présent dans son environnement. En règle générale, le temps passé par l'animal à investiguer un stimulus olfactif tend à décroître suite à des expositions répétées et son intérêt pour ce stimulus diminue progressivement alors que celui-ci devient familier (= processus d'habituation). Par la suite, la présentation d'un nouveau stimulus induit une augmentation du temps d'investigation si l'animal le perçoit comme distinct du premier (= processus de déshabitude)

adéquate à des stimuli olfactifs plutôt que d'une incapacité à détecter ce type d'indices olfactifs. En effet, une étude examinant les patrons d'activité neuronale (traduite par l'expression de la protéine Fos, produite suite à l'activation d'un gène immédiat précoce *c-Fos*) au sein des bulbes olfactifs de souris ArKO mâles et femelles a démontré que les indices olfactifs socio-sexuels induisaient une augmentation de l'expression de la protéine Fos sans déficit manifeste par rapport aux sujets WT (Pierman et al., 2008). L'absence d'oestrogènes lors du développement ne semble donc pas affecter l'activité neuronale au sein des bulbes olfactifs. La présence de déficits altérant la détection d'indices olfactifs socio-sexuels chez les animaux ArKO est dès lors improbable. Cependant, aucune différence significative concernant les patrons d'activité neuronale au sein des noyaux hypothalamiques tels que le POA, le VMH-l, et l'amygdale, n'a été relevée entre des sujets ArKO d'un sexe donné et leurs homologues WT (Pierman et al., 2008). Ces observations suggèrent donc que l'absence d'oestrogènes durant le développement n'interférerait ni avec la détection des indices olfactifs socio-sexuels au sein des bulbes olfactifs, ni avec l'intégration de leur valeur reproductive au sein des noyaux hypothalamiques. Ainsi, l'altération du traitement des indices olfactifs socio-sexuels engendrant des perturbations du comportement reproducteur chez les animaux ArKO pourrait se faire au niveau de l'intégration ultérieure au sein d'un autre système neuronal tel que le système Kisspeptine/GnRH ; ce dernier pouvant à son tour contrôler certaines réponses comportementales.

Comme expliqué précédemment, l'axe HPG et le système GnRH (responsable de la régulation de la production de LH et FSH) jouent un rôle très important dans le contrôle de la reproduction. De plus, l'AVPv (un noyau hypothalamique) abrite certains neurones exprimant un neuropeptide, la Kisspeptine (produit du gène *Kiss1*), représentant le stimulant le plus puissant du système GnRH connu à l'heure actuelle (Han et al., 2005). La présence de ces neurones à Kisspeptine est sexuellement différenciée, se traduisant par un nombre beaucoup plus important chez les individus femelles (Clarkson and Herbison, 2006 ; Kauffman et al., 2007). De plus, ces cellules sont présentes en faibles nombres au niveau de l'AVPv chez des souris ArKO femelles

(Clarkson et al., 2009; Bakker et al., 2010) suggérant donc que les hormones gonadiques périnatales organisent ce système Kisspeptine (système Kiss-1). Parallèlement, des odeurs provenant d'individus de sexe opposé modifient l'activité du système GnRH en induisant la libération d'une importante quantité de LH chez certaines espèces de mammifères (Bronson and Maruniak, 1976 ; Coquelin and Bronson, 1979 ; Yoon et al., 2005 ; Gelez and Fabre-Nys, 2006). Par ailleurs, chez la souris femelle WT, des odeurs urinaires émises par des individus mâles semblent capables d'induire fortement l'activation du système Kiss-1 alors qu'aucune réponse n'est observée chez le sujet mâle et qu'une faible activation est détectée chez la femelle ArKO (Bakker et al., 2010). Ces données récentes suggèrent donc que le système sexuellement différencié de la Kisspeptine pourrait jouer un rôle essentiel dans l'intégration des informations de nature olfactive susceptibles de réguler le fonctionnement neuroendocrinien sous-tendant la reproduction chez la souris. Les animaux ArKO mâles et femelles montrant des altérations à la fois au niveau des différentes composantes de leur comportement reproducteur et au niveau de leur population neuronale à Kisspeptine, constituent un argument de poids en faveur de cette hypothèse.

Aucune corrélation évidente n'a été observée à ce jour entre la population de neurones à Kisspeptine et le comportement de lordose chez la femelle rongeur. Cependant, une expérience récente a démontré que la GnRH stimulerait l'expression du comportement de lordose. En effet, une simple injection sous-cutanée de GnRH permet de rétablir partiellement les déficits d'expression de lordose observés chez des femelles présentant un organe voméronasal<sup>12</sup> lésé (Keller et al., 2006). La Kisspeptine étant considérée comme un activateur potentiel du système GnRH (Kauffman et al., 2007), nous avons testé l'hypothèse que cette protéine pourrait stimuler la lordose suite à une injection d'une haute dose de Kisspeptine-10 chez des femelles ovariectomisées et traitées

---

<sup>12</sup> Organe voméronasal : aussi appelé organe de Jacobson, est situé sous la surface intérieure nasale et intervient dans la détection des phéromones. Il est présent chez les mammifères et les reptiles ; chez l'humain, cet organe est atrophié et son rôle fonctionnel n'est pas clairement établi.

chroniquement avec de l'E<sub>2</sub>. Des résultats préliminaires montrent que la kisspeptine induit le comportement de lordose chez ces femelles, et que ces effets stimulateurs sont inhibés suite à un traitement simultané avec un antagoniste de la GnRH (antide ; données non-publiées). Des études supplémentaires sont cependant nécessaires afin de spécifier le rôle des neurones à Kisspeptine et leurs mécanismes d'influence sur le comportement reproducteur.

### **III. Le modèle de souris « alpha-foetoprotéine knockout » ou AFP-KO**

Etre au bon endroit, au bon moment, est un facteur clé pour l'alpha-foetoprotéine (AFP). En effet, elle intervient dans des processus primordiaux durant des fenêtres de temps assez réduites tels que la différenciation sexuelle cérébrale, et montre également une expression typiquement onco-fœtale.

L'AFP est une protéine hautement glycosylée (65-70 kDA) produite massivement durant la vie fœtale par les hépatocytes du foie et l'endoderme du sac vitellin, et dans une proportion moindre, par les intestins, le pancréas et le rein (Sell and Becker, 1978 ; Andrews et al., 1982 ; Belayew and Tilghman, 1982). Elle représente la principale protéine fœtale avec une concentration de l'ordre du mg/ml.

L'AFP produite par l'embryon est répartie dans le liquide amniotique mais peut traverser la barrière placentaire afin d'atteindre la circulation sanguine maternelle. De cette façon, son dosage permet de dépister des anomalies développementales fœtales. L'AFP fait partie du quadruple test réalisé pour la détection prénatale (entre 14 et 22 semaines) du syndrome de Down (ou trisomie 21). Ainsi, des niveaux anormalement bas d'AFP, combinés avec des taux anormaux d'E<sub>2</sub> non-liés, indiquent un risque élevé pour le développement de cette maladie (Wald et al., 2003). D'un autre côté, des taux anormalement élevés d'AFP détectés dans le sérum maternel sont indicateurs d'un

risque élevé d'anomalies au niveau du tube neural du fœtus pouvant conduire à un Spina Bifida ou une anencéphalie (Leighton et al., 1975). D'autres pathologies fœtales sont également associées à des taux aberrants d'AFP circulants (Mizejewski, 2004). Cependant, la corrélation exacte entre l'AFP et ces pathologies, n'est toujours pas élucidée à l'heure actuelle. La transcription du gène *Afp* (famille du gène de l'albumine) chute fortement à la naissance, entraînant une réduction d'un facteur 10000 du taux de mRNA dans le foie en quelques semaines (Tilghman and Belayew, 1982). Dans des conditions de vie normale, l'AFP est seulement présente à l'état de trace à l'âge adulte, et produite uniquement par le foie. Cependant, sa synthèse peut redémarrer suite à des pathologies du foie (cirrhose, hépatite) ou à des tumeurs (carcinome hépatocellulaire, tumeurs pancréatiques et rénales) (Abelev and Erasler, 1999 ; Yuen and Lai, 2005).

Chez le rat, la concentration fœtale en AFP diminue de 50% au cours des 24 heures suivant la naissance ; cette protéine ne se retrouve qu'à l'état de trace (0.01% du niveau fœtal) à partir de trois semaines postnatales (De Mees et al., 2006). Chez le rongeur, l'AFP peut inhiber la sensibilité fœtale aux oestrogènes. En effet, cette protéine est capable de lier les oestrogènes (mais pas les androgènes) à leurs extrémités C-terminale ( $KD = 10^{-8}$  M), jouant ainsi un rôle de transporteur d'oestrogènes dans la circulation sanguine (Uriel et al., 1976 ; Savu et al., 1981). Il semblerait également que l'AFP puisse exercer des effets anti-oestrogéniques indépendamment de ses propriétés de couplage à l'E<sub>2</sub> (Mizejewski et al., 1983). Bien qu'il n'ait jamais été prouvé que l'AFP humaine lie également les oestrogènes, les peptides de l'AFP humaine montrent une telle capacité de couplage et l'AFP humaine possède également une activité anti-oestrogénique (De Mees et al., 2006).

Comme expliqué précédemment, au cours de la période prénatale, les métabolites de la T, et plus spécifiquement l'E<sub>2</sub>, exercent des effets déféminisants et masculinisants sur le développement cérébral chez le mâle. En fixant spécifiquement l'E<sub>2</sub>, l'AFP empêcherait cette hormone gonadique de pénétrer au sein du système nerveux central (Raynaud et al., 1971 ; Lieberburg and McEwen, 1975 ; McEwen et al.,

1975), protégeant donc les embryons femelles d'une exposition excessive aux oestrogènes et de leurs effets masculinisants.

Afin de mieux comprendre le rôle exact de l'AFP et de confirmer cette hypothèse, un modèle de souris alpha-foetoprotéine knockout (AFP-KO) a été généré en remplaçant un fragment génomique du gène *Afp*, s'étendant soit de l'exon 1 à l'intron 3 (KO1, allèle *Afp<sup>tm11bmm</sup>*), soit de l'exon 2 à l'intron 3 (KO2, allèle *Afp<sup>tm21bmm</sup>*), par une cassette IRES-LacZ-neo. Chaque construction génère un allèle nul, signifiant que la production d'AFP est totalement supprimée à la fois au niveau mRNA et protéique. La différence entre les deux modèles réside dans le fait que le KO2 place le gène lacZ sous le contrôle des deux promoteurs AFP (le promoteur principal et celui situé dans le premier intron) tandis que le KO1 détruit le promoteur « intronique ». Cependant, les deux modèles suppriment efficacement l'expression du gène *Afp*, et sont donc d'utilité similaire dans l'étude fonctionnelle de l'AFP. La lignée de souris AFP-KO1 est couramment utilisée au sein de notre laboratoire.

### III.1 Caractéristiques physiologiques

L'invalidation du gène *Afp* engendre des animaux homozygotes parfaitement viables et ne présentant aucune anomalie phénotypique apparente (Gabant et al., 2002). Tout comme les animaux ArKO, les sujets AFP-KO ne peuvent donc être distingués de leurs conspécifiques WT à la naissance sur base de critères morphologiques externes.

Les femelles AFP-KO sont stériles et montrent une anovulation tandis que les mâles AFP-KO restent fertiles. Cependant, une transplantation réciproque d'ovaires a démontré que les organes génitaux des femelles AFP-KO étaient parfaitement fonctionnels (Gabant et al., 2002): les ovaires d'AFP-KO transplantés chez une souris normale montrent une ovulation normale et les femelles transplantées peuvent générer des jeunes à partir des oocytes parentaux mutés. De plus, les ovaires d'AFP-KO contiennent des follicules à différents stades de maturation, incluant les follicules de De Graaf. Cependant, aucun corps jaune (marqueur d'ovulation) n'a pu être détecté,

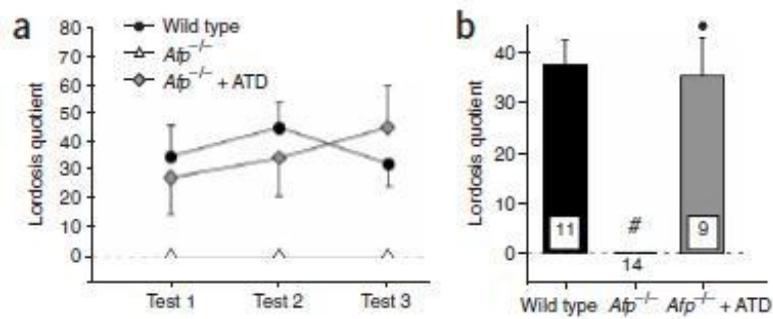
correspondant au taux de progestérone anormalement bas observés dans le sérum. L'ovulation peut-être induite chez les femelles AFP-KO par l'injection de gonadotropines, mais bien que l'ovule puisse être fertilisé, il ne s'implante pas dans la corne utérine. L'anovulation chez les sujets AFP-KO résulte donc d'une altération de l'axe HPG. En effet, ces individus présentent essentiellement une déficience au niveau des neurones à GnRH (De Mees et al., 2006 ; Gonzalez-Martinez et al., 2008). Un traitement combiné d'EB et de progestérone n'induit aucune activation des neurones à GnRH, et conséquemment, n'engendre aucun pic pré-ovulatoire de LH chez les femelles mutantes (Gonzalez-Martinez et al., 2008). De plus, le système potentiellement régulateur (système Kiss-1) du système GnRH semble également altéré au vu de la population de neurones à Kisséptine fortement amoindrie chez les souris AFP-KO femelles (Gonzalez-Martinez et al., 2008). La distribution de ces neurones est semblable à celle observée chez des mâles WT suggérant donc une déféminisation de ce système chez les femelles AFP-KO. Ce phénomène est également observé au niveau d'autres populations neuronales montrant habituellement des distributions sexuellement dimorphiques telles que les neurones à tyrosine hydroxylase (TH), plus nombreux au niveau de l'AVPv de femelles normales comparativement à des mâles. Les femelles AFP-KO montrent quant à elles un profil d'expression de ces neurones TH typiquement mâle à l'âge adulte (Bakker et al., 2006).

### **III.2 Etudes comportementales**

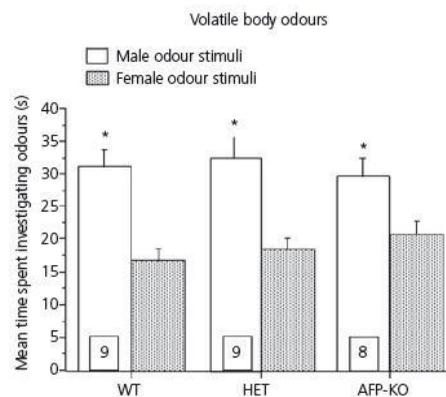
Ce modèle de souris knockout, uniquement disponible au sein de notre laboratoire et au sein du laboratoire de Biologie du Développement de l'Université Libre de Bruxelles (ULB, Prof. Szpirer), nous a permis de se focaliser entièrement sur le phénotype comportemental des sujets AFP-KO. Cependant, une étude phénotypique complète (commandée par l'ULB) a été réalisée chez ce modèle KO, mettant en évidence que seules les composantes comportementales liées à la reproduction s'avéraient altérées (German Mouse Clinic, communication personnelle).

Le principal déficit observé chez les femelles AFP-KO est une absence totale de l'expression du comportement de lordose en présence d'un mâle sexuellement actif à l'âge adulte (**Figure 9**) et d'une augmentation du nombre de montes (comportement typiquement mâle) envers une femelle sexuellement réceptive (Bakker et al., 2006), et ce malgré un traitement hormonal ( $E_2$  combiné à de la progestérone) induisant la réceptivité sexuelle. Cependant, le phénotype comportemental normal peut être complètement rétabli chez ces femelles AFP-KO suite à un traitement prénatal avec de l'ATD. En effet, une mère gestante injectée avec l'inhibiteur d'aromatase au cours de la 2<sup>ème</sup> moitié de sa gestation, donnera naissance à des jeunes femelles AFP-KO dont la fertilité sera restaurée à l'âge adulte. Cette fertilité ne doit être aucunement soutenue par un quelconque traitement hormonal à l'âge adulte, et ces femelles peuvent elles-mêmes donner naissance à plusieurs portées prouvant, par ce fait, que la cause d'anovulation découle bien d'un effet organisateur déféminisant dû à une surexposition aux oestrogènes. En outre, un tel traitement avec de l'ATD sur les mères gestantes rétablit également, chez les femelles AFP-KO, un comportement reproducteur de type femelle normal (restauration de la lordose et suppression des comportements de monte), ainsi qu'une distribution des neurones à TH comparable aux femelles WT et un axe HPG entièrement fonctionnel (Bakker et al., 2006 ; De Mees et al., 2006), suggérant donc que toutes ces altérations phénotypiques résultaient également d'une déféminisation prénatale chez ces individus AFP-KO.

De manière plus surprenante, une exposition prénatale aux oestrogènes ne semble pas interférer avec le développement des préférences olfactives typiquement femelles. Ainsi, les femelles AFP-KO investissent plus activement les indices olfactifs socio-sexuels provenant d'un mâle sexuellement actif comparativement à ceux d'une femelle sexuellement réceptive lorsqu'ils sont présentés dans un labyrinthe en Y (**Figure 10** ; Bakker et al., 2007). Ces animaux KO se comportent donc exactement comme des sujets WT suggérant premièrement, que le système olfactif reste fonctionnel chez ces femelles AFP-KO et, deuxièmement, que l'absence de comportement de lordose chez ces animaux ne peut être expliquée par une diminution de la motivation à



**Figure 9** : Indice de réceptivité sexuelle chez des femelles WT, AFP-KO (*Afp*<sup>-/-</sup>) et AFP-KO traitées avec un inhibiteur d'aromatase (*Afp*<sup>-/-</sup> + ATD) lors de 3 tests successifs de copulation avec un mâle sexuellement expérimenté (a) et leur moyenne (b). Les femelles sont ovariectomisées et reçoivent un implant d'E<sub>2</sub>. Trois heures avant chaque test, chaque femelle reçoit une injection sous-cutanée de progestérone (1mg/souris) afin de stimuler leur réceptivité sexuelle. # Significativement différent des femelles WT. • Significativement différent des femelles AFP-KO (adapté de Bakker et al., 2006).



**Figure 10** : Temps moyen passé par des femelles WT, HET et AFP-KO à investiguer des indices olfactifs socio-sexuels volatiles (pas d'accès direct) provenant d'un mâle intact et d'une femelle sexuellement réceptive présentés simultanément dans un labyrinthe en Y. Les femelles sont ovariectomisées et reçoivent un implant d'E<sub>2</sub>. \* Significativement différent du temps passé à explorer les odeurs femelles (adapté de Bakker et al., 2007).

investiguer les phéromones mâles. Ces résultats sont surprenants dans le sens où, chez les souris ArKO mâles, nous avons mis en évidence une incapacité à développer une préférence pour une femelle sexuellement réceptive (Bakker et al., 2004) suggérant qu'une action oestrogénique précoce interférerait avec le développement de ces préférences olfactives. Cependant, il est évident que ces études ne spécifient pas la période périnatale au cours de laquelle les oestrogènes moduleraient le système nerveux central mâle afin d'induire une préférence olfactive pour les femelles. Combinées aux expériences récentes menées sur les individus AFP-KO, ces données suggèrent donc plutôt une contribution postnatale des oestrogènes au développement des préférences olfactives.

Le modèle AFP-KO supporte donc la théorie selon laquelle la T prénatale, via son aromatisation en  $E_2$  exercent des effets déféminisants et masculinisants sur l'organisation cérébrale. De plus, il dévalorise l'hypothèse alternative avançant que l'AFP délivre spécifiquement les oestrogènes au niveau de régions cérébrales cibles afin d'assurer une différenciation de type femelle ; en effet, des souris AFP-KO femelles se développant dans un environnement embryonnaire dépourvu d'oestrogènes (suite à un traitement de la mère gestante avec de l'ATD) montrent une restauration de la fertilité à l'âge adulte. Cependant, ce modèle de souris transgéniques ne permet pas d'expliquer la présence d'AFP au sein de certains neurones alors que cette protéine n'est pas produite localement, comme l'atteste l'absence de mRNA pour l'AFP au sein du cerveau (Schachter and Toran-Allerand, 1982). Ainsi, une réserve intracellulaire d'AFP (dont la fonction reste à ce jour inexpliquée) a été détectée dans le cytosol de neurones mâles et femelles à tous les stades développementaux du système nerveux central allant du neuroblaste post-mitotique au neurone différencié (Toran-Allerand, 1984), mais jamais à l'âge adulte. Ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'AFP pourrait délivrer des oestrogènes à des cellules cérébrales spécifiques par un processus d'endocytose via l'intermédiaire d'un récepteur. Au vu des différences de constantes d'affinité pour l' $E_2$  lié par l'AFP (KD  $10^{-8}$ M) et par l'ER (KD  $10^{-11}$ M) (Lemire and Fausto, 1991), la dissociation intracytoplasmique du complexe AFP/ $E_2$  au niveau de

[48]

neurones présentant des ER pourrait libérer l'hormone, se liant alors directement à son récepteur spécifique. L'AFP pourrait ainsi agir comme un réservoir d'oestrogènes. Bien que plausible, ce mécanisme n'est certainement pas crucial pour la différenciation sexuelle cérébrale de type femelle, du moins pour les aspects liés à la reproduction. Premièrement, les résultats obtenus suite au traitement prénatal des mères gestantes avec de l'ATD contestent cette hypothèse « de réservoir d'oestrogènes ». Deuxièmement, on observe une divergence entre les régions cérébrales renfermant les neurones contenant de l'AFP et celles présentant des neurones exprimant des ER ; suite à une immunohistochimie dirigée contre l'AFP, aucun marquage n'a été mis en évidence au niveau des différents noyaux cérébraux sous-tendant le comportement sexuel mâle et femelle tels que le POA, l'amygdale, le VMH-l et le noyau arqué (Toran-Allerand, 1980 ; Trojan and Uriel, 1980). A ce jour, aucune preuve indéniable ne soutient la théorie alternative du rôle fonctionnel de l'AFP en tant que réservoir d'oestrogènes. Cependant, l'AFP est capable, tout comme l'albumine, de lier d'autres stéroïdes que les oestrogènes mais également des substances endogènes et exogènes telles que des acides gras, la bilirubine ou autres agents pharmaceutiques divers (Gillespie and Uversky, 2000). L'AFP pourrait donc jouer un rôle actif dans le développement neuronal en liant des acides gras polyinsaturés tératogènes tels que l'acide arachidonique, docosahexaénoïque et eicosatétraénoïque, tous importants pour un développement cérébral normal. Finalement, la libération intracellulaire d'oestrogènes par endocytose du complexe AFP/E2 pourrait également être importante dans d'autres fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire (Bakker and Baum, 2008). D'autres études sont donc nécessaires afin de spécifier le rôle exact de l'AFP dans le développement cérébral ainsi que ces mécanismes spécifiques d'action.

#### **IV. L'olfaction : une composante primordiale du comportement reproducteur**

Afin d'assurer leur survie et la transmission de leur patrimoine génétique, les animaux se doivent de reconnaître leurs conspécifiques et de s'engager dans des interactions sociales et sexuelles appropriées. Chez les rongeurs, les indices olfactifs représentent la principale source d'informations relatives au statut individuel, social et reproducteur de leurs conspécifiques (Brown, 1979). La perception de ces signaux spécifiques peut engendrer des modifications physiologiques et hormonales, pouvant induire à leur tour des réponses comportementales appropriées à la stimulation perçue. En ce sens, ces indices olfactifs peuvent être qualifiés de phéromones<sup>13</sup> (Karlson and Luscher, 1959).

L'existence de projections neuronales provenant des noyaux cérébraux responsables du traitement des stimulations olfactives vers le système GnRH, soutient fortement l'hypothèse d'une influence de ces stimulations sur le fonctionnement du système reproducteur (Boehm et al., 2005 ; Yoon et al., 2005). Par exemple, la perception de stimuli olfactifs mâles engendre une activation du système GnRH (Gelez and Fabres-Nys, 2006) et l'apparition d'un pic de LH chez la femelle (Bronson and Maruniak, 1976). Ces mêmes informations olfactives peuvent également déclencher certains mécanismes responsables de l'accélération de l'avènement de la maturité sexuelle chez des femelles pré-pubères (effet Vandenberg ; Lombardi and Vandenberg, 1977), de la synchronisation des cycles ovariens (effet Whitten ; Whitten, 1959), et de l'avortement spontané chez une femelle exposée à des odeurs émises par un autre mâle que le fécondateur (effet Bruce ; Bruce, 1959). Parallèlement, la perception de stimuli olfactifs femelles engendre une activation des neurones à GnRH (Yoon et al., 2005) et un pic de LH chez le mâle (Johnston and Bronson, 1982).

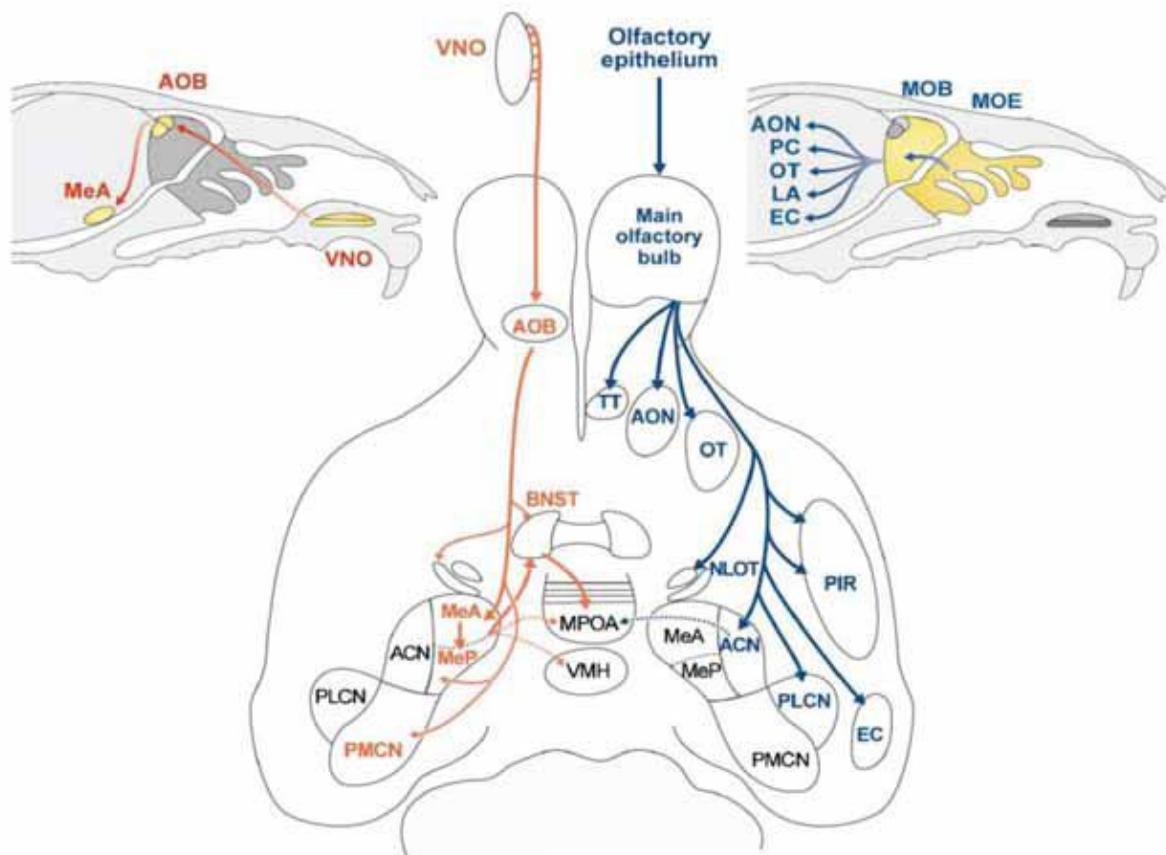
---

<sup>13</sup> Phéromone : substance sécrétée par des individus et qui, reçue par d'autres individus de la même espèce, provoque une réaction spécifique, un comportement ou une modification biologique.

## IV.1 Voies neuronales du traitement des stimuli olfactifs

Chez de nombreuses espèces de mammifères, la cavité nasale renferme deux groupes anatomiquement distincts de neurones chemosensoriels détectant les indices olfactifs provenant de l'environnement (**Figure 11**).

L'épithélium olfactif principal (MOE) se situe dans la partie postérieure de cette cavité et est sensible aux différentes molécules volatiles inhalées lors de l'inspiration (odeurs dites volatiles). Il se constitue de plus de 5 millions de neurones sensoriels bipolaires possédant une dendrite ciliée recouvrant la surface externe de l'épithélium et un axone projetant vers les glomérules du bulbe olfactif principal (MOB) (Ressler et al., 1993). Chaque neurone du MOE exprime un seul des nombreux récepteurs olfactifs couplés à une protéine G (Zhang and Firestein, 2002) ; les axones de tous les neurones exprimant le même récepteur convergent vers un nombre restreint de glomérules au sein du MOB (Buck and Axel, 1991 ; Buck, 2000). L'information olfactive est donc transmise des cellules réceptrices du MOE vers les cellules mitrales du MOB au niveau des glomérules, lieu de jonction synaptique entre les terminaisons axonales et dendritiques de ces cellules. Le MOB contient également deux types de neurones : les cellules périglomérulaires (PG) modulant la transmission des signaux olfactifs au niveau du glomérule, et les cellules granulaires (GR) régulant l'activité neuronale des cellules mitrales. L'information olfactive est ensuite relayée vers des régions cérébrales plus centrales du système olfactif principal, incluant différents noyaux constituant le cortex olfactif primaire comme le cortex piriforme (PIR), le cortex entorhinal (EC), le tubercule olfactif (OT), le noyau olfactif antérieur (AON) et l'amygdale latérale (Price, 1985 ; Scott, 1986 ; Shipley and Ennis, 1996). Ces structures cérébrales sont connectées au cortex olfactif secondaire, véritable centre d'intégration des informations d'origine olfactive, soulignant ainsi le rôle prépondérant du système olfactif principal pour la perception et le traitement de ces informations. Outre cet envoi massif d'informations vers les centres supérieurs d'intégration, le MOB projette également vers certaines régions spécifiques du système limbique (le noyau du tract olfactif latéral et les noyaux



**Figure 11** : Epithélia sensoriels et circuits neuronaux responsables de la détection des indices olfactifs chez la souris. Le système olfactif accessoire (orange) comprend le bulbe olfactif accessoire (AOB) recevant des afférences de l'organe voméronasal (VNO) et projetant vers la partie postérieure du noyau lit de la strie terminale (BnST), les parties antérieures et postérieures de l'amygdale médiale (MeA et MeP) et le noyau cortical postéro-médian de l'amygdale (PMCN). Le système olfactif principal (bleu) comprend le bulbe olfactif principal (MOB) recevant des afférences de l'épithélium olfactif (MOE) et projetant vers le noyau du tract olfactif latéral (NLOT), le noyau olfactif antérieur (AON), le tubercule olfactif (OT), le tecta tenia (TT), le cortex piriforme (PIR) et entorhinal (EC) ainsi que vers les noyaux corticaux antérieur (ACN) et postéro-latéral (PLCN) de l'amygdale latérale (LA). Ces deux systèmes projettent ensuite vers certaines régions hypothalamiques telles que l'aire préoptique médiane (MPOA) et l'hypothalamus ventromédian (VMH) (Adapté de Dulac and Wagner, 2006).

corticaux antérieur et postérolatéral de l'amygdale) qui, finalement, relaient l'information vers l'hypothalamus.

L'organe voméronasal (VNO) est inséré dans la capsule osseuse située entre la paroi palatine et la face ventrale de la cavité nasale. Il constitue l'organe périphérique du système olfactif accessoire spécialisé dans le traitement des informations provenant des molécules contenues dans les diverses sécrétions corporelles émises par les conspécifiques (odeurs dites non-volatiles). Celles-ci induisent des modifications physiologiques et hormonales modulant l'expression de certaines réponses comportementales liées à la reproduction et à l'agressivité territoriale (Keverne, 1999). Actuellement, deux types de récepteurs exprimés au sein du VNO des rongeurs ont pu être identifiés : les V1Rs, exprimés dans la partie apicale du VNO (Dulac and Axel, 1995 ; Del Punta et al., 2000 ; Pantages and Dulac, 2000), et les V2Rs au niveau de la région basale (Herrada and Dulac, 1997 ; Matsunami and Buck, 1997). Ces deux types de neurones sensoriels projettent leurs axones vers les cellules glomérulaires du bulbe olfactif accessoire (AOB) qui transmettent l'information aux cellules mitrales de l'AOB qui, finalement, la relaient vers les régions cérébrales plus centrales du système olfactif accessoire. Contrairement aux voies de propagation observées dans le système olfactif principal, l'information olfactive provenant de l'AOB n'atteint pas les structures corticales mais parvient directement au sein de certains noyaux du système limbique incluant le BnST, le noyau du tract olfactif accessoire (NAOT), les noyaux antérieur et postérieur de l'amygdale (Mea et MeP) ainsi que le noyau postéromédial de l'amygdale corticale (PMCN). Les neurones de ces différentes régions projettent ensuite vers plusieurs noyaux hypothalamiques tels que l'aire préoptique médiale (MPOA), l'hypothalamus ventromédial (VMH) et les noyaux prémammillaires et supraoptique, modulant des processus liés à la reproduction, l'agression et aux comportements parentaux (Scalia and Winans, 1975 ; Kevetter and Winans, 1981 ; Petrovich et al., 2001).

Les systèmes olfactifs principal et accessoire projettent tous deux vers certaines régions de l'amygdale et de l'hypothalamus, essentielles à l'intégration des informations environnementales, assurant ainsi l'homéostasie de l'organisme, la coordination de ses fonctions viscérales et la régulation de certaines composantes de son comportement reproducteur.

Cependant, le fait que les projections provenant de l'AOB atteignent directement les régions limbiques et hypothalamiques, alors que le système olfactif principal établit de nombreuses connections vers les centres supérieurs de traitement de l'information, suggère un rôle fonctionnellement distinct, bien que complémentaire, de ces deux systèmes lors du traitement des stimuli olfactifs.

### **IV.2 Implication différentielle des systèmes olfactifs principal et accessoire dans les composantes comportementales de la reproduction**

Lors de la rencontre d'un partenaire sexuel potentiel, les odeurs volatiles corporelles et urinaires émises par celui-ci constituent une source d'information directement interprétable pour l'animal concernant le statut individuel, sexuel et endocrinien de l'individu les émettant. Des stimuli olfactifs différents activent des groupes distincts de glomérules au sein du MOB (Sharp et al., 1975 ; Xu et al., 2000 ; Firestein et al., 2001) ainsi que différents groupes de neurones au sein du cortex olfactif (Zou et al., 2001). Ces différents patrons d'activation au sein du système olfactif principal constituent une représentation neuronale spécifique d'une information olfactive donnée permettant ainsi sa discrimination, et dans un sens plus général, la reconnaissance individuelle (Xu et al., 2000)

De nombreuses expériences ont démontré l'importance prépondérante du système olfactif principal pour la détection et le traitement des odeurs volatiles permettant la reconnaissance du partenaire sexuel, alors que le VNO et le système olfactif accessoire seraient principalement impliqués dans le traitement des stimuli olfactifs régulant le fonctionnement neuroendocrinien et reproducteur (Lloyd-Thomas

and Keverne, 1982 ; Schaefer et al., 2001 ; Wysocki et al., 2004 ; Lin et al., 2005 ; Keller et al., 2006a,b,c). Cependant, certains auteurs ont observé que l'intégrité du VNO était nécessaire pour l'expression de l'effet Bruce (Bellringer et al., 1980 ; Rajendren and Dominic, 1984), suggérant ainsi qu'une participation du système olfactif accessoire à la reconnaissance individuelle ne soit pas totalement exclue (Leinders-Zufall et al., 2004 ; Kelliher, 2007). En effet, l'effet Bruce nécessite que la femelle gestante soit capable de reconnaître les odeurs du mâle qu'elle perçoit comme étant différentes de celles du mâle fécondateur. De plus, d'autres études utilisant des animaux knockout pour l'expression d'un canal spécifique du VNO (TRP2) ont mis en évidence que leurs comportements agressifs et sexuels (impliquant une reconnaissance du partenaire) étaient affectés (Leypold, et al., 2002 ; Stowers et al., 2002) ; cependant, ces deux dernières études restent hautement controversées en raison de l'utilisation de tests de discriminatifs olfactifs non appropriés pour évaluer ce genre de comportement. En règle générale, ces données fournissent encore une évidence en faveur d'une potentielle contribution du système olfactif accessoire dans la discrimination d'odeurs sexuelles.

Ainsi, le système olfactif principal semble prépondérant pour le traitement de l'information provenant de certains composés volatiles menant à la reconnaissance du statut individuel et endocrinien de l'animal qui les émet. Cependant, dans certains contextes, l'information olfactive parvenant au VNO (notamment par l'intermédiaire de MUPs<sup>14</sup>) peut également jouer un rôle dans l'émission de certaines réponses endocriniennes et comportementales nécessitant la reconnaissance individuelle.

Des expérimentations lésant le MOE et le VNO ont permis de préciser leurs rôles respectifs. En effet, le système olfactif principal jouerait un rôle essentiel dans l'expression du comportement sexuel mâle ; des lésions du MOE chez un mâle conduisent à une réduction considérable du nombre de montes et d'intromissions

---

<sup>14</sup> MUP : protéine urinaire majeure contenue dans l'urine et servant de réservoir aux différents composés volatiles contenus dans l'urine d'un individu. Elles permettraient de « transporter » les indices olfactifs volatiles jusqu'aux cellules chemosensorielles du VNO (Hurst et al., 1998, 2001). Elles serviraient notamment de signature olfactive pour un animal, favorisant ainsi la reconnaissance individuelle (Robertson et al., 1997).

réalisées envers une femelle sexuellement réceptive (Mandiyan et al., 2005 ; Yoon et al., 2005 ; Keller et al., 2006a) tandis qu'une ablation du VNO n'engendre aucun effet (Pankevich et al., 2004). D'un autre côté, cette dernière altère sévèrement la réceptivité sexuelle des femelles (Lepri and Wysocki, 1987 ; Curtis et al., 2001 ; Keller et al., 2006c) suggérant ainsi un rôle spécifique du système olfactif accessoire dans le comportement reproducteur de type femelle. Cependant, certaines études avancent que, chez l'animal sexuellement expérimenté, un système olfactif pourrait prendre le relais en cas de perte des afférences provenant du second système, soulignant ainsi la complémentarité fonctionnelle des systèmes olfactifs principal et accessoire pour l'expression du comportement sexuel mâle et femelle (Winans and Powers, 1977 ; Meredith, 1986 ; Pfeiffer and Johnston, 1994).

### **IV.3 Différenciation sexuelle des systèmes olfactifs principal et accessoire**

Très peu d'études ont tenté de mettre en évidence l'existence potentielle de différences sexuelles affectant le système olfactif principal tant au niveau anatomique que fonctionnel. Certains auteurs ont quand même rapporté des différences sexuelles de sensibilité olfactive chez certaines espèces telles que le cochon (Dorries et al., 1995) et la souris (Baum and Keverne, 2002). En effet, il semblerait qu'en règle générale, les femelles détecteraient de plus faibles concentrations de stimuli olfactifs comparativement aux mâles. Ces données suggèrent dès lors une influence probable des stéroïdes sexuels sur le fonctionnement et/ou le développement du système olfactif principal.

Par contre, bon nombre d'études ont permis de mettre en évidence des différences sexuelles affectant la physiologie et le fonctionnement du système olfactif accessoire tant au niveau périphérique (Segovia et al., 1984 ; Valencia et al., 1986 ; Roos et al., 1988) que central (Segovia and Guillamon, 1993 ; Guillamon and Segovia, 1997). Tout comme pour le SDN-POA (expliqué précédemment), la différenciation

sexuelle mâle de certaines régions du système olfactif accessoire telles que l'AOB, le NAOT et la MeA semble dépendre de l'action des oestrogènes provenant de l'aromatisation cérébrale de la T gonadique lors du développement embryonnaire (Mizukami et al., 1983 ; Collado et al., 1993). En effet, chez le rat mâle, une gonadectomie néonatale réduit le nombre de cellules mitrales présentes au sein de l'AOB à des niveaux généralement observés chez la femelle, tandis qu'une simple injection d'E<sub>2</sub> (mais pas de DHTP) rétablit leur nombre aux niveaux exprimés par des mâles non-castrés (Pérez-Laso et al., 1997). Le développement du système olfactif accessoire est donc soumis aux effets organisateurs des stéroïdes sexuels, aboutissant à l'expression de caractéristiques morphologiques sexuellement différenciées.

Les réponses comportementales émises face à une odeur socio-sexuelle spécifique diffèrent également entre mâles et femelles, suggérant des différences sexuelles quant au traitement de ces indices olfactifs par le système olfactif accessoire. Certaines études ont donc démontré que les indices chemosensoriels émis par des conspécifiques mâles induisent un patron sexuellement dimorphique de l'expression de la protéine Fos (marqueur de l'activité neuronale) dans certaines régions centrales du système olfactif accessoire chez les rongeurs mâles et femelles (Bakker et al., 1996 ; Kelliher et al., 1998 ; Halem et al., 1999). En règle générale, ces stimuli olfactifs mâles induisent une nette augmentation de l'expression de la protéine Fos dans des régions cibles telles que le MPOA chez les femelles ; les individus mâles ne montrent par contre aucune activation neuronale en réponse à ces indices olfactifs. Le traitement des stimuli olfactifs semblerait être organisé par les oestrogènes postnataux chez le rat (Bakker et al., 1996) et par les androgènes prénataux chez la souris (Bodo and Rissman, 2007). Par ailleurs, le patron d'activation neuronale induit par la perception de stimuli olfactifs émis par des conspécifiques femelles est très faible à la fois chez des rongeurs mâles et femelles (Bressler and Baum, 1996 ; Aste et al., 2003). Ceci suggère que le traitement des indices olfactifs émis par des femelles sexuellement réceptives est très peu différencié et donc peu influencé par les sécrétions hormonales embryonnaires.

## **V. La neurogenèse adulte : modulateur de l'olfaction et du comportement reproducteur**

Tous les mammifères possèdent des cellules qui se répliquent au sein de différents organes, et des cellules souches qui persistent toute la vie, notamment au niveau du sang, de la peau et de l'intestin, afin de contribuer au remplacement cellulaire. En outre, les insectes, poissons et amphibiens, peuvent répliquer leurs cellules neurales au cours de leur vie entière. Le cerveau et la moelle épinière des mammifères ont longtemps été considérés comme échappant à cette règle d'« auto-réparation » et de croissance continue. En réalité, sachant que la microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes se divisent normalement chez l'adulte, et pallient aux dommages cellulaires en se divisant également, les scientifiques pensaient que seuls les neurones étaient réfractaires à la réplication. La complexité de la majorité de ces cellules rendait la réplication neuronale à l'âge adulte difficilement envisageable ; comment un neurone avec tous ces branchements dendritiques et ses combinaisons axonales polysynaptiques pouvait-il se diviser et intégrer de manière fonctionnelle un réseau cérébral adulte sans le court-circuiter (Gage, 2002) ? De nos jours, nous savons que cette « exception neuronale » était erronée car un nombre impressionnant d'études ont mis en évidence deux régions cérébrales spécifiques, le bulbe olfactif (OB) et le gyrus dentelé (DG), où des nouveaux neurones sont continuellement générés au cours de la vie et s'intègrent au sein de la circuiterie fonctionnelle. Ce processus appelé neurogenèse adulte, est hautement modulé par divers facteurs, suggérant un mécanisme plastique par lequel les performances cérébrales d'un individu peuvent être optimisées pour un environnement donné (pour revue : Lledo et al., 2006).

La plasticité cérébrale réfère aux capacités du cerveau à modifier sa structure et sa fonction au cours de la croissance, de l'apprentissage, des pressions environnementales ou des pathologies. Ainsi, dans deux régions spécifiques du cerveau des mammifères, des nouveaux neurones fonctionnels sont constitutivement générés à

partir d'un réservoir de cellules souches neurales endogènes tout au cours de la vie, permettant ainsi, dans une certaine mesure, la modulation cérébrale. Il faut cependant souligner que le degré de neurogenèse postnatale diminue de manière inversement proportionnelle avec la complexité du cerveau au sein du règne animal (Lledo et al., 2006). En effet, chez les mammifères, la neurogenèse adulte se restreint donc à la zone sous-granulaire (SGZ) du DG de l'hippocampe et à la zone sous-ventriculaire (SVZ) projetant vers l'OB ; elle a été observée premièrement chez le rat (Kaplan and Hinds, 1977) mais également chez la souris (Kempermann et al., 1997), le hamster (Huang et al., 1998), le campagnol (Ormerod and Galéa, 2001), la musaraigne (Gould et al., 1997), les primates (Gould et al., 1999) et même les humains (Eriksson et al., 1998). Le nombre de nouveaux neurones incorporés dans le cerveau adulte est non négligeable ; par exemple, les nouveaux neurones « adultes » représentent 10 à 20% de la population neuronale totale au sein du DG (Jacobs et al., 2000). D'autres évidences suggèrent également la présence d'une neurogenèse constitutive au sein d'autres régions cérébrales telles que l'épithélium olfactif (Kempermann, 2006), l'amygdale et l'hypothalamus (Fowler et al., 2008). Au vu du lien entre l'olfaction et le comportement reproducteur précédemment mentionné, nous nous focaliserons donc sur la neurogenèse adulte autour de l'axe SVZ/OB, appelée neurogenèse olfactive.

## **V.1 Neurogenèse adulte olfactive**

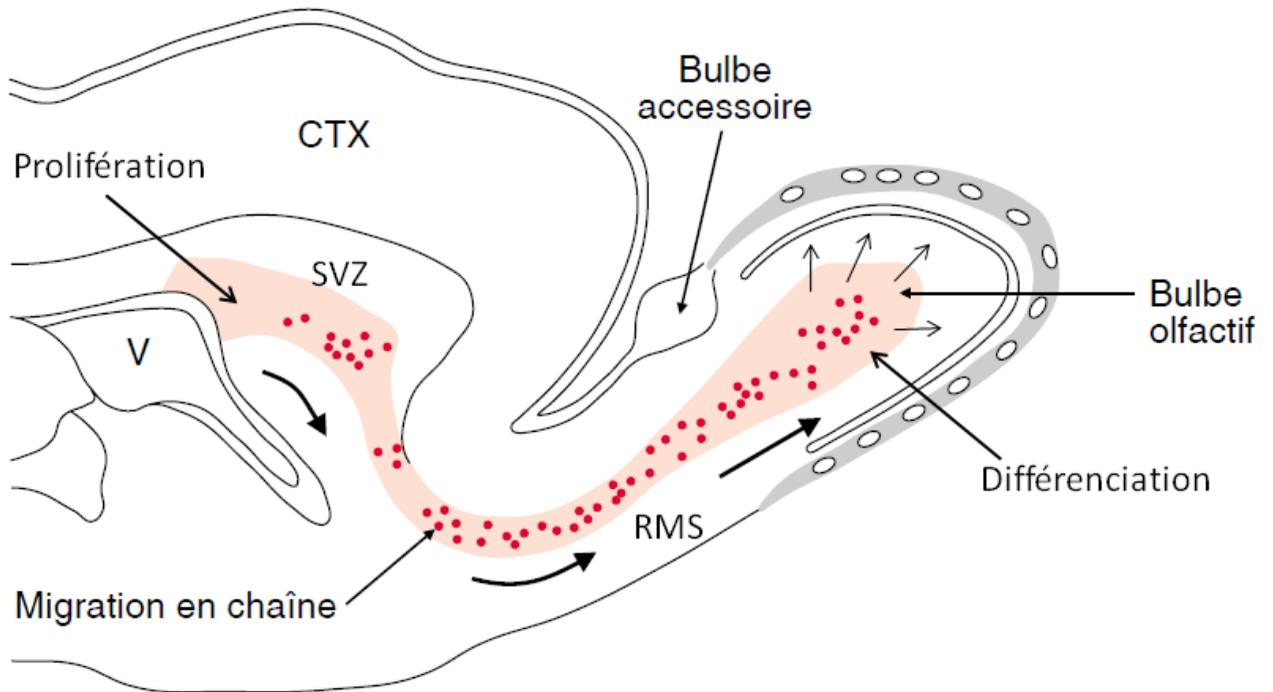
Fait exceptionnel dans le système nerveux central de l'adulte, le système olfactif conserve une capacité de neurogenèse tant au niveau des entrées (cellules sensorielles de l'épithélium olfactif) qu'au niveau des interneurons bulbares. Si la régénération des neurorécepteurs localisés dans la muqueuse olfactive peut s'expliquer par la nécessité d'un remplacement des neurones détruits par les agressions du monde extérieur (virus, agents chimiques,...), la raison du renouvellement des interneurons situés dans les couches les plus profondes de l'OB n'est toujours pas entièrement élucidée. L'hypothèse la plus formulée repose sur l'idée d'un support d'une forme de mémoire

similaire à celle décrite dans le cas de l'apprentissage du chant chez l'oiseau (Alvarez-Buylla et al., 1990).

Les nouveaux neurones « adultes » destinés à atteindre l'OB dérivent d'une population de cellules souches astrocytaires située au niveau de la SVZ<sup>15</sup>. Ces cellules nouvellement formées migrent vers l'OB le long d'un trajet appelé le courant de migration rostral (RMS ; Altman, 1969). Celui-ci s'étend le long des bords dorsal et rostral de la corne antérieure du ventricule latéral pour finir au cœur même de l'OB (**Figure 12**). Les précurseurs neuronaux forment donc des chaînes orientées selon l'axe longitudinal du ventricule latéral et sont doués de migration sur un plan tangentiel (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996). Chez la souris, la distance parcourue par les neuroblastes avant d'atteindre leur cible est d'environ 8mm et en quelques heures, 10000 à 20000 cellules se joignent au RMS (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). La vitesse moyenne de migration y est de 30µm par heure, c.à.d. 4 à 5 fois plus rapide que la migration radiale du cortex cérébral (Jacobson, 1991). Après s'être détachées des chaînes de migration tangentielle, les cellules nouvellement formées migrent ensuite de façon radiale du RMS dans l'OB. Une grande majorité des cellules migratrices (70 à 80%) donnent naissance aux cellules granulaires (GR), les autres produisant des interneurons périglomérulaires (PG) et des cellules gliales ; les cellules GR et PG représentent les deux catégories d'interneurones inhibiteurs (type GABAergique) bulbaires incorporées respectivement dans la couche granulaire et glomérulaire du bulbe olfactif homolatéral (Luskin, 1993 ; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Ainsi, plus de 30000 nouvelles cellules GR atteignent l'OB chaque jour chez le rongeur (Nissant et al., 2009). Ces deux types cellulaires (GR et PG) établissent des liaisons locales au sein du bulbe, modulant ainsi directement ou indirectement le traitement des informations sensorielles par les projections neuronales de l'OB, c.à.d. les cellules mitrales et tuftées.

---

<sup>15</sup> Zone sous ventriculaire (SVZ) : région cérébrale d'une largeur d'une ou deux cellules, bordant le striatum et le ventricule latéral (Lledo et al., 2006).



**Figure 12 :** Coupe sagittale du cerveau de souris adulte. Des cellules de la zone sous-ventriculaire (SVZ), bordant le ventricule latéral (V), continuent de proliférer chez les individus adultes pour migrer vers le bulbe olfactif. Cette migration suit une voie appelée courant de migration rostral (RMS). CTX : cortex (adapté de Lledo et al., 1998).

Petreau et Alvarez-Buylla (2002) ont identifié 5 stades distincts au cours de la maturation des cellules GR suite à leur départ de la SVZ (jour 1) : a. des neuroblastes migrant tangentiellement entre les jours 2 et 7 ; b. des jeunes neurones migrant de façon radiale entre les jours 5 et 7 ; c. des cellules GR avec une dendrite non-ramifiée ne s'étendant pas au-delà de la couche de cellules mitrales entre les jours 9 et 13 ; d. des cellules GR avec une dendrite ramifiée dans la couche plexiforme externe entre les jours 11 et 22 ; e. des cellules GR matures entre les jours 15 et 30. Le nombre maximal de cellules nouvellement formées atteignant l'OB est relevé au jour 15 tandis qu'entre les jours 15 et 45, ce nombre diminue de moitié suggérant que les entrées sensorielles sont critiques pour la survie de ces interneurons spécifiques. En effet, chez des souris anosmiques (dépourvues d'odorat), le manque de stimulation n'altère ni la prolifération, ni la migration, ni la différenciation précoce des cellules GR, mais bien leur survie au sein de l'OB ; dès que les jeunes cellules GR deviennent matures et acquièrent des connections synaptiques, leur survie dépend alors du niveau d'activité reçue et donc de l'intensité du traitement d'indices olfactifs (Petreau and Alvarez-Buylla, 2002).

Depuis les prémices de la neurogenèse adulte, il est communément admis que la SVZ constitue une source, pour l'OB, d'interneurones de type GABAergiques (pour revue : Abrous et al., 2005). En effet, de nombreuses études ont démontré que, chez la souris adulte, la SVZ contenait des populations hétérogènes de précurseurs neuronaux (dépendant de leur origine embryonnaire) capables de générer différents sous-types d'interneurones GABAergiques (Merkle et al., 2007 ; Young et al., 2007). Cependant, tout récemment, Brill et ses collaborateurs (2009) ont élevé la complexité du débat en démontrant que certains de ces progéniteurs neuronaux pouvaient générer un sous-type de neurone glutamatergique dans l'OB, caractérisé comme un interneurone juxtagloméculaire présentant un court axone. Ces données surprenantes soulignent ainsi que la plasticité de la circuiterie olfactive n'est pas restreinte exclusivement aux neurones inhibiteurs. Reste dorénavant à comprendre le rôle physiologique exact de ces deux types d'interneurones nouvellement formés à l'âge adulte.

## V.2 Rôle fonctionnel de la neurogenèse adulte olfactive

Les études se sont focalisées pendant de nombreuses années sur la fonction de la neurogenèse adulte au sein de l'hippocampe chez le rongeur (Kempermann et al., 1997 ; Gould et al., 1999) et du noyau du contrôle du chant chez l'oiseau (Alvarez-Buylla, 1994, 1997) ; elles suggèrent que, dans ces deux cas différents, l'incorporation de nouveaux neurones participent activement à la plasticité mnésique et à l'apprentissage. Plus récemment, les hypothèses concernant la neurogenèse adulte au niveau de l'OB avancent qu'un renouvellement continu des neurones et de leurs connections synaptiques favoriserait une meilleure adaptation du système face aux signaux olfactifs environnementaux (Cecchi et al., 2001 ; Lledo et al., 2006). Bon nombre d'évidences viennent supporter cette théorie. Premièrement, le taux de prolifération neuronale dans la SVZ semble être sensible à des situations requérant des prédispositions olfactives bien spécifiques telles que la gestation ou l'exposition aux phéromones. En effet, chez le rongeur, sous l'influence de la prolactine, une augmentation de la prolifération neuronale au niveau de la SVZ est observée lors de la gestation ou de la lactation, conduisant ainsi à une augmentation du nombre de nouveaux neurones dans l'OB favorisant une meilleure reconnaissance des nouveau-nés et un comportement maternel avancé (Shingo et al., 2003 ; Larsen et al., 2008). Un phénomène similaire est observé lorsqu'une femelle est exposée à des phéromones d'un mâle dominant ; la neurogenèse olfactive activée permet à cette femelle de mieux sélectionner son partenaire sexuel et augmenter ainsi son succès reproducteur (Mak et al., 2007). Deuxièmement, deux à trois semaines suivant leur genèse, les neurones « adultes » nouvellement formés subissent une mort cellulaire massive, négativement corrélée avec l'activité olfactive de l'animal (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002 ; Rochefort et al., 2002 ; Yamaguchi and Mori, 2005) et sensible à l'activité afférente des régions cérébrales en amont (Mouret et al., 2008). Ceci reflète un processus sélectionnant quels neurones nouveau-nés doivent survivre et ainsi, quels nouveaux modèles de connectivité doivent être ajoutés à la circuiterie olfactive permettant de s'ajuster au mieux à un nouvel environnement. De plus, les cellules GR nouvellement incorporées dans l'OB sont fonctionnellement

distinctes des cellules GR formées pendant le développement (Lemasson et al., 2005) et expriment un patron de plasticité synaptique unique (Nissant et al., 2009). Finalement, chez la souris, l'occlusion des narines diminue le recrutement de nouveaux neurones au sein de l'OB (Corotto et al., 1994).

D'autres études se sont également attelées à démontrer une corrélation entre la neurogenèse adulte olfactive et le traitement des indices olfactifs. Chez la souris mâle, les nouvelles cellules de l'OB peuvent être activées suite à une stimulation olfactive émise par une femelle sexuellement réceptive (Huang and Bittman, 2002). De plus, des souris exprimant des déficits au niveau de la migration des précurseurs neuronaux le long du RMS (modèle NCAM-KO ; Gheusi et al., 2000) montrent une discrimination olfactive altérée, tandis qu'une augmentation du nombre d'interneurones au sein de l'OB suite à un enrichissement olfactif est associée à une amélioration de la mémoire olfactive à court-terme (Rochefort et al., 2002). Récemment, des chercheurs ont inhibé de manière spécifique la neurogenèse adulte au niveau de la SVZ par des techniques d'irradiation ciblée (Lazarini et al., 2009 ; Valley et al., 2009) ou pharmacologiques (injections d'AraC, drogue antimitotique ; Breton-Provencher et al., 2009 ; Moreno et al., 2009) et ont observé que des souris présentant un blocage de l'intégration de nouveaux neurones au sein de l'OB réalisent toujours des performances élevées dans les tests d'apprentissages olfactifs, de discrimination olfactive et de détection de seuil olfactif. Cependant, si ces tests sont répétés ultérieurement chez les mêmes sujets afin de tester la rétention à long-terme des stimuli olfactifs, les performances chutent radicalement, suggérant ainsi que le stockage de l'information olfactive au sein de la mémoire dépend de la neurogenèse adulte (Imayoshi et al., 2008 ; Bardy and Pallotto, 2010).

Actuellement, nous pouvons avancer que la neurogenèse adulte semble contribuer aux fonctions mnésiques et d'apprentissage sous-tendues par l'hippocampe, et aux fonctions mnésiques et perceptuelles sous-tendues par l'OB. La fonction ultime de la neurogenèse adulte serait donc de participer au stockage mnésique d'informations

spatiales et olfactives, mais également de conférer un réseau dont la principale caractéristique est de pouvoir s'adapter aux futures demandes environnementales. Elle pourrait ainsi représenter une forme de métaplasticité, c.à.d. un changement cérébral facilitant un changement ultérieur dans le cerveau. Ainsi, une augmentation de neurogenèse induite par une forme particulière d'apprentissage pourrait-elle faciliter la rétention mnésique d'une autre tâche future ?

### **V.3 Régulation hormonale de la neurogenèse adulte**

Bien que de nombreux facteurs modulant la division, la migration et la différenciation des précurseurs neuronaux aient été identifiés, les mécanismes exacts contrôlant le destin neuronal dans le système nerveux adulte constituent toujours actuellement une énigme à part entière. La neurogenèse adulte est ainsi régulée au sein de chaque site neurogénique par une liste croissante de facteurs épigénétiques (pour revue : Abrous et al., 2005) tels que les hormones (corticostérone, oestradiol, prolactine), les neurostéroïdes (DHEA, sulfate de pregnenolone, allopregnanolone), les neurotransmetteurs (glutamate, sérotonine, norépinéphrine, oxyde nitrique), les facteurs trophiques (bFGF, EGF, BDNF,...), les facteurs morphogéniques (sonic hedgehog), la vitamine E et l'acide rétinoïque.

La structure et la fonction de certaines régions cérébrales dépendent du taux d'hormones circulantes l'âge adulte (Garcia-Segura et al., 1994 ; McEwen and Alves, 1999) ; ainsi, leur influence, et plus particulièrement celle des oestrogènes, sur la neurogenèse adulte a été fortement documentée. En effet, outre la régulation de comportements tels que la reproduction, les oestrogènes sont également impliqués dans le développement du cerveau, la neuroprotection et la cognition. Au niveau cellulaire, ils jouent aussi un rôle dans la prolifération (Fowler et al., 2005), la survie (Leranth et al., 2000) et l'activation (Insel, 1990) des neurones.

Ainsi, le rôle des oestrogènes a été étudié principalement sur la neurogenèse adulte se déroulant au sein de l'hippocampe. La majorité des ces recherches mettent en

évidence une nette influence du sexe et du cycle menstruel (Galéa et al., 2006). Cependant, ces données sont limitées aux rats et aux campagnols. De plus, il n'est pas aisé d'en tirer des conclusions d'ordre général au vu de leur variabilité en fonction de l'âge ou de l'espèce envisagée. En effet, chez de jeunes rats âgés de 5 semaines, les mâles montrent plus de prolifération que les femelles (Perfilieva et al., 2001), alors que la tendance s'inverse complètement chez des sujets âgés de 2-3 mois (Tanapat et al., 1999). Cependant, la survie des neurones nouveau-nés ne diffère pas entre les rats mâles et femelles, quelque soit leur âge (Tanapat et al., 1999 ; Perfilieva et al., 2001). Ces données suggèrent que la SGZ peut compenser des altérations de la prolifération cellulaire, soulignant indirectement l'importance d'évaluer les deux composantes (prolifération et survie cellulaires) de la neurogenèse avant d'extrapoler des résultats. La spécificité liée à l'espèce concernant les effets du cycle menstruel sur la neurogenèse hippocampique est comparable à l'âge. Chez des rattes adultes, les hautes concentrations d'E<sub>2</sub> circulant observées durant le proestrus sont corrélées avec une augmentation de la prolifération cellulaire (Tanapat et al., 1999). Chez le campagnol, cette dernière est associée à de faibles concentrations d'E<sub>2</sub> circulant correspondant aux périodes de non-accouplement (Galéa and McEwen, 1999). Chez la souris (souche C57BL/6), la prolifération cellulaire au niveau de la SGZ ne varie pas entre les individus mâles et femelles quelque soit leur âge, et une ovariectomie n'altère pas la production de nouvelles cellules suggérant donc que les niveaux endogènes d'E<sub>2</sub> ne modulent pas la neurogenèse adulte hippocampique (Lagace et al., 2007).

D'autres données conflictuelles quant aux effets des œstrogènes sur cette neurogenèse ont également été relevées. Ainsi, l'E<sub>2</sub> stimule la prolifération cellulaire hippocampique 4 heures après un traitement oestrogénique chez la ratte adulte tandis qu'après 48h, il la supprime totalement (Tanapat et al., 1999 ; Ormedod and Galea, 2001 ; Ormerod et al., 2003). De plus, des agonistes des récepteurs oestrogéniques  $\alpha$  et  $\beta$  stimulent séparément le nombre de cellules nouvellement formées dans le DG de rattes adultes, alors qu'une activation simultanée de ces deux types d'ER engendre une diminution de prolifération cellulaire (Mazzucco et al., 2006). Finalement, le protocole d'ovariectomie semble

également influencer fortement les résultats obtenus suite à un traitement oestrogénique ; si celui-ci est administré, en aigu comme en chronique, 4 semaines après l'ovariectomie d'une ratte adulte, aucune stimulation de la prolifération au niveau de la SGZ n'est observée (Tanapat et al., 2005). Toutes ces données suggèrent que les effets des oestrogènes sur la prolifération cellulaire hippocampique dépendent à la fois de l'espèce, du sexe et de l'âge du sujet, du traitement oestrogénique (durée, dose) et du temps écoulé après gonadectomie, empêchant ainsi une généralisation théorique du processus.

Comparativement à la neurogenèse hippocampique, les effets des oestrogènes sur la neurogenèse olfactive sont bien moins documentés, et à ce jour, aucune étude n'a été conduite chez la souris. Hoyk et ses collaborateurs (2006) ont démontré qu'un traitement oestrogénique engendrait une diminution du nombre de cellules nouvellement formées dans l'OB chez le rat. Toutefois, l'absence d'analyse de la prolifération cellulaire au sein de la SVZ empêche toute extrapolation quant aux mécanismes modulateurs des oestrogènes sur la neurogenèse olfactive. Par ailleurs, une autre étude a établi que la production de nouvelles cellules dans la SVZ n'était nullement affectée par un traitement oestrogénique (Suzuki et al., 2007) ; cependant, ces auteurs ont administré des doses très faibles d'E<sub>2</sub> (correspondant aux concentrations circulantes durant la période de diestrus), et il se pourrait donc qu'un traitement avec une dose plus élevée (correspondant aux concentrations circulantes durant la période de proestrus) puisse affecter différemment la prolifération cellulaire au sein de la SVZ.

Bon nombre d'études sont donc encore nécessaires afin d'établir le rôle exact des oestrogènes sur la neurogenèse olfactive ; dès lors, à ce jour, il s'avère clairement impossible d'énoncer une théorie corrélant à la fois la production oestrogénique, la neurogenèse olfactive, l'olfaction et le comportement reproducteur.

## **VI. Objectifs de la thèse**

Au cours de ce doctorat, nous avons tenté d'éclaircir certaines zones d'ombre concernant le rôle des oestrogènes dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale chez la souris. Ce travail peut se diviser en deux grandes parties :

**1/ Les oestrogènes et l'olfaction** : dans cette première approche, nous nous sommes attelés à déterminer si un lien potentiel existait entre la production oestrogénique et la caractérisation du traitement d'indices olfactifs chez l'animal du niveau cellulaire au niveau comportemental.

- ❖ Suite aux lacunes relevées au sein de la littérature concernant la neurogenèse olfactive chez la souris, nous avons étudié les effets d'un traitement oestrogénique à la fois sur la prolifération cellulaire au niveau de la SVZ et sur la survie cellulaire au sein de l'OB chez des femelles C57BL/6 (**Article 1** ; Brock et al., 2010a).
- ❖ Sachant que les femelles APF-KO exprimaient des déficits de lordose, malgré des capacités de discrimination olfactive apparemment intactes, nous avons réétudié les préférences sexuelles de ces animaux en utilisant cette fois le paradigme de la chambre à 3 compartiments, faisant intervenir à la fois des stimulations visuelles, olfactives et auditives (**Article 2** ; Brock and Bakker, 2010e).
- ❖ Suite à ces observations comportementales, nous avons voulu déterminer si le traitement d'indices olfactifs socio-sexuels émis par des mâles pouvait activer différemment les substrats neuronaux sous-tendant les comportements reproducteurs chez les femelles surexposées aux oestrogènes durant leur développement embryonnaire (AFP-KO) comparativement à des individus WT (**Article 3**).

- ❖ Dans un contexte plus social que sexuel, nous avons étudié les effets d'une modification de l'environnement hormonal prénatal sur un comportement primordial au développement postnatal et à la survie, c.à.d. le comportement maternel (**Article 4** ; Keller et al., 2010)

**2/ Les oestrogènes et la féminisation** : cette approche se voulait renforçatrice par rapport à la réfutation de la théorie classique de la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale, selon laquelle les caractéristiques de type femelle se développaient « par défaut ». En effet, par le passé, plusieurs études ont essayé d'apporter des évidences concernant l'influence féminisante postnatale des oestrogènes, mais sans réel succès. Avec l'apparition du modèle de souris ArKO, nous étions à même de fournir des preuves indéniables d'un tel processus.

- ❖ Afin de pallier à l'absence d'une définition théorique d'une période critique sensible chez la souris, nous avons étudié le profil d'expression d'un gène régulé par l'oestradiol, c.à.d. le récepteur à la progestérone (PR), à différents stades postnataux (P0 à PN25) chez des individus ArKO et WT mâles et femelles (**Article 5** ; Brock et al., 2010b).
- ❖ Grâce à l'étude de l'expression des PR, nous avons pu mettre en évidence une fenêtre de temps (PN10 à PN25) au cours de laquelle l'oestradiol féminiserait le cerveau chez des individus femelles. Afin d'apporter une preuve indéniable pour la définition de cette période, nous avons tenté de rétablir un phénotype comportemental de type « sauvage » chez des individus ArKO en traitant ces derniers avec de l'oestradiol au cours de la période sensible précédemment identifiée (**Article 6**).
- ❖ Dans le but de clarifier l'avancée des résultats permettant d'affiner la théorie de la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale, nous avons résumé les expériences importantes menées avec les modèles de souris transgéniques ArKO et AFP-KO (**Article 7** ; Bakker and Brock, 2010d).

**Estradiol  
&  
Olfaction**

# **I. Effets d'un traitement oestrogénique sur la prolifération cellulaire de la SVZ et sur la survie cellulaire au sein de l'OB chez des souris femelles C57BL/6**

## **I.1 Introduction**

Précédemment, nous avons étudié les capacités de discrimination olfactive chez des souris mâles et femelles, WT et ArKO, en les soumettant à une tâche automatisée d'olfactométrie (Wesson et al., 2006 ; Keller et al., 2009 : voir ANNEXE 1). Brièvement, au cours de cette procédure opérante dite « go / no-go », l'animal est récompensé par l'obtention d'une solution sucrée en léchant un détecteur suite à la présentation d'une odeur (propulsée par un flux d'air), dite  $S^+$  ; par contre, si l'animal lèche le détecteur lors de la présentation d'une autre odeur, dite  $S^-$ , il ne reçoit aucune récompense et l'odeur lui est représentée. Ainsi, au fil des essais, l'individu apprend à distinguer les 2 odeurs présentées afin de lécher le détecteur uniquement suite aux présentations  $S^+$ . Grâce à ce paradigme, nous voulions déterminer si les capacités de discrimination olfactives étaient sexuellement différenciées, et si l' $E_2$  périnatal pouvait jouer un rôle dans cette différenciation. Nous avons donc observé que les performances des mâles WT étaient supérieures à celles des femelles WT, suggérant une différence sexuelle quant aux capacités de discriminations d'indices socio-sexuels. De plus, nous avons remarqué que les femelles ArKO parvenaient à discriminer des odeurs urinaires très similaires, que même les mâles ne distinguaient pas. Tous les animaux étant gonadectomisés et traités avec de l'EB à l'âge adulte, nous avons émis l'hypothèse que les performances discriminatives renforcées des femelles ArKO pouvaient provenir d'une sensibilité accrue du système nerveux olfactif principal face à un traitement oestrogénique adulte ; en effet, chez le mâle ArKO, une privation permanente en œstrogènes engendre une modulation du nombre d' $ER_\alpha$  et  $ER_\beta$  différente selon le noyau cérébral considéré (Kudwa et al., 2007).

Cependant, les hormones gonadiques, et plus particulièrement l'E<sub>2</sub>, peuvent fortement influencer la neurogenèse adulte (Abrous et al., 2005 ; Lledo et al., 2006). Au vu de la pauvreté des données quant aux influences de l'E<sub>2</sub> sur la neurogenèse olfactive, nous n'étions pas à même de corrélérer les performances discriminatives renforcées des souris ArKO avec une éventuelle modulation de la production de nouvelles cellules au sein de leur OB. En effet, nous pourrions postuler que l'absence chronique d'oestrogènes, ou au contraire un traitement chronique d'EB, puisse induire une modulation spécifique de la prolifération et/ou de la survie cellulaire, aboutissant in fine à une modification fonctionnelle de la circuiterie de l'OB. Cette dernière pourrait alors expliquer l'affinement des performances discriminatives olfactives observées chez les souris ArKO femelles.

Dès lors, nous avons étudié les effets d'un traitement oestrogénique à la fois sur la prolifération cellulaire au niveau de la SVZ et sur la survie cellulaire au niveau de l'OB. Comme il a été précédemment démontré que le mode d'administration d'un traitement hormonal pouvait moduler différemment la neurogenèse adulte (Tanapat et al., 2005), nous avons donc utilisé deux protocoles différents, c.à.d. une administration d'E<sub>2</sub> par simple injection sous-cutanée *versus* un implant sous-cutané.

## SHORT TERM TREATMENT WITH ESTRADIOL DECREASES THE RATE OF NEWLY GENERATED CELLS IN THE SUBVENTRICULAR ZONE AND MAIN OLFACTORY BULB OF ADULT FEMALE MICE

O. BROCK,<sup>a</sup> M. KELLER,<sup>b</sup> A. VEYRAC,<sup>c</sup> Q. DOUHARD<sup>a</sup> AND J. BAKKER<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>GIGA-Neurosciences, University of Liege, Avenue de l'Hôpital 4 (B36), 4000 Liege, Belgium

<sup>b</sup>Behavioral and Reproductive Physiology, UMR 6175 INRA/CNRS/University of Tours, Nouzilly, France

<sup>c</sup>Laboratoire de Neurobiologie de l'Apprentissage, de la Mémoire et de la Communication, CNRS UMR 8620, University Paris-Sud XI, Orsay, France

**Abstract**—Adult neurogenesis occurs most notably in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus and in the olfactory bulb (OB) where new neurons are generated from neural progenitor cells produced in the subventricular zone (SVZ) of the forebrain. As it is well known that gonadal steroid hormones, primarily estradiol, modulate neurogenesis in the hippocampus of adult female rodents, we wanted to determine whether estradiol would also affect the proliferation of progenitor cells in the SVZ and by consequence the rate of newly generated cells in the main OB. Thus a first group of adult female C57Bl6/J mice was ovariectomized and received a short term treatment with estradiol (single injection of 1 or 10  $\mu$ g 17 $\beta$ -estradiol or Silastic capsule of estradiol during 2 days) before receiving a single injection with BrdU to determine whether estradiol would modulate the cell proliferation in the SVZ. A second group of adult ovariectomized female mice was submitted to the same estradiol treatment before receiving four BrdU injections, and was sacrificed 21 days later to determine whether a modulation in cell proliferation actually leads to a modulation in the number of newborn cells in the main OB. We observed a decrease in cell proliferation in the SVZ following either dose of estradiol compared to the controls. Furthermore, 21 days after their generation in the SVZ, the number of BrdU labeled cells was also lower in the main OB, both in the granular and periglomerular cell layers of estradiol-treated animals. These results show that a short term treatment with estradiol actually downregulates cell proliferation leading to a decreased number of newborn cells in the OB. © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** main olfactory bulb, cell proliferation, cell survival, 5-bromo-2-deoxyuridine, estrogens, female mice.

In mammals, constitutive neurogenesis mainly occurs in the adult brain in two regions: the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) and the olfactory

bulb (OB) (Zhao et al., 2008). Concerning olfactory neurogenesis, most cells born in the anterior portion of the subventricular zone (SVZ) give rise to neuroblasts that migrate along the rostral migratory stream (RMS) to the OB, where they differentiate into functional granular and periglomerular olfactory interneurons (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). It has been shown, mostly with regard to neurogenesis in the DG, that cell proliferation as well as the survival of many newborn neurons are affected by a number of growth factors, neurotransmitters (Abrous et al., 2005) as well as steroid hormones (Brannvall et al., 2002; Lee et al., 2002; Perez-Martin et al., 2003; Mechawar et al., 2004; Suzuki et al., 2004; for review see: Galea et al., 2006; Galea, 2008; Pawluski et al., 2009). The most extensively studied neurosteroid in a variety of animal models is estradiol which has been shown to prevent cell death, promote neuronal survival, enhance neurite outgrowth, stimulate synaptogenesis and regulate synthesis of neurotransmitters and their receptors (Wise et al., 2001). In rodents, effects of estradiol on neurogenesis (cell proliferation and newborn cell survival) in the DG depend on the strain, gender, dose or regimen of hormone administration, timing of gonadectomy and age of the subjects (Galea and McEwen, 1999; Tanapat et al., 1999; Ormerod and Galea, 2001; Tanapat et al., 2005; Lagace et al., 2007; Barker and Galea, 2008; Galea, 2008). Surprisingly, the effects of steroid hormones on adult olfactory neurogenesis are relatively unknown (Abrous et al., 2005). Although estrogen action in the CNS is extensively studied, evidence is still lacking on its effect on neurogenesis in those brain areas that might be fundamental in regulating sexual behavior, such as regions related to olfaction (Gheusi et al., 2009). Moreover, as the ability to detect and to discriminate pheromones plays an important role in mate selection and in reproductively related events, it seems reasonable to hypothesize that hormones modulate neurogenesis in the SVZ and by consequence in the OB (Shingo et al., 2003). In this context, Mak et al. (2007) showed that male pheromones stimulated cell proliferation in the SVZ of adult female mice and also led to a higher rate of surviving newborn neurons in the OB. Furthermore, by using aromatase knockout (ArKO) male and female mice (which carry a targeted mutation in the aromatase gene and as a result cannot convert androgens to estrogens) or ER $\alpha$ KO male mice (which lack estrogen receptors binding estradiol), it has been observed that these mice never showed a preference for an opposite-sex partner when tested in a Y-maze paradigm suggesting that estradiol might be important for mate recognition (Wersinger and Rissman,

\*Corresponding author. Tel: +32-4-366-59-78; fax: +32-4-366-59-53. E-mail: jbakker@ulg.ac.be (J. Bakker).

**Abbreviations:** AOB, accessory olfactory bulb; ArKO, aromatase knockout; DG, dentate gyrus; EB, estradiol-benzoate; GrL, granular cell layer; MOB, main olfactory bulb; OB, olfactory bulb; PgL, periglomerular cell layer; SGZ, subgranular zone; SVZ, subventricular zone.

0306-4522/10 \$ - see front matter © 2010 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.050

2000; Bakker et al., 2002, 2004). It can thus be hypothesized that estradiol could affect mate selection by a possible modulation of neurogenesis in the SVZ and by consequence the recruitment of newborn cells in the OB and hence olfactory discrimination. To date there have been two studies investigating the role of estradiol on neurogenesis in the OB of rodents (Hoyk et al., 2006; Suzuki et al., 2007). One study demonstrated that estradiol can act to decrease the number of newborn cells in the accessory OB (AOB) (Hoyk et al., 2006) and the other study found no effect of estradiol treatment on cell proliferation in the SVZ (Suzuki et al., 2007). However, Suzuki et al. (2007) used a very low dose of estradiol (equivalent to a diestrous state) and it is possible that higher levels of estradiol (equivalent to a proestrous state) may affect more efficiently the rate of olfactory neurogenesis.

Therefore, the aim of the present study was to determine whether estradiol would affect cell proliferation in the SVZ and subsequently the number of newborn neurons in the OB. As it was previously shown that different regimens of hormone replacement could lead to different effects on neurogenesis (Tanapat et al., 2005), we used two different approaches of estradiol treatment (a single injection vs. an implant of a Silastic capsule) to determine whether estradiol modulates cell proliferation in the SVZ and subsequently the number of newborn cells in the OB.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

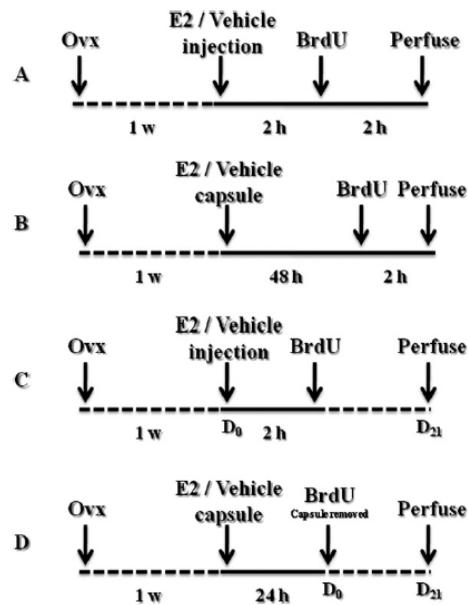
Two-month-old C57Bl6/J female mice were obtained from a local breeding colony at the GIGA Neurosciences, University of Liège, Belgium. Subjects were housed in groups of four per cage, under a 12 h: 12 h light–dark cycle (8.00 h lights on and 20.00 h lights off) in special light and temperature controlled housing units. Food and water were always available *ad libitum*.

All adult female mice were ovariectomized at the age of 9 weeks under general anesthesia after an i.p. injection of a mixture of ketamine (Pfizer, Brussels, Belgium, 80 mg/kg per mouse) and medetomidine (Domitor, Pfizer, Louvain-la-Neuve, Belgium, 1 mg/kg per mouse). Mice received atipamezole (Antisedan, Pfizer, Brussels, Belgium, 4 mg/kg per mouse) s.c. at the end of the surgery in order to antagonize medetomidine-induced effects, thereby accelerating their recovery.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines set forth by the National Institutes of Health “Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals,” and were approved by the Ethical Committees for Animal Use of the University of Liège. Effort was made to minimize the number of animals used and their suffering in this study.

### Estradiol treatment and BrdU administration

**Cell proliferation in the SVZ.** Estradiol by single injection. One week after ovariectomy, adult female mice received either a single s.c. injection of 1 or 10  $\mu\text{g}$  17 $\beta$ -estradiol [stock solution stored in a light-proof vial=1 mg 17 $\beta$ -estradiol (ICN Biomedicals Inc., Illkirch, France, CAT no. 101656) diluted in 10 ml sesame oil (Sigma, Steinheim, Germany)] ( $n=7$  females for each injection condition), or oil ( $n=6$  females for vehicle injections). Two hours after the injection, subjects received a single i.p. injection of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU Ultra 99%—Sigma B9285) at 50 mg/kg body weight (dissolved in 0.9% saline) and were killed 2 h later



**Fig. 1.** Summary of the experimental design. For studying cell proliferation in the subventricular zone (SVZ), ovariectomized C57Bl6/J females of 9 weeks of age received either a short term treatment with estradiol by either a single injection of 1 or 10  $\mu\text{g}$  17 $\beta$ -estradiol (A) or a Silastic capsule containing crystalline 17 $\beta$ -estradiol (B), or oil (or empty implant). In the single estradiol injection protocol (A), mice received a single i.p. injection with BrdU (50 mg/kg) 2 h after estradiol injection and were perfused with 4% paraformaldehyde 2 h after BrdU administration. In the estradiol implant protocol (B), mice received a single i.p. injection with BrdU 48 h after being implanted and were perfused 2 h after BrdU administration. For studying newborn cell survival in the OB, ovariectomized females received a short term treatment with estradiol by either a single injection of 10  $\mu\text{g}$  17 $\beta$ -estradiol (C) or a Silastic capsule containing crystalline 17 $\beta$ -estradiol (D), or oil (or empty implant). In the single injection protocol (C), mice received four i.p. injections with BrdU (2 h intervals) 2 h after estradiol injection ( $D_0$ ) and were perfused 21 days later ( $D_{21}$ ). In the estradiol implant protocol, mice received four i.p. injections with BrdU (2 h intervals) 24 h after the capsule was implanted. The implant was removed 3 h after the last BrdU injection ( $D_0$ ) and mice were perfused 21 days later ( $D_{21}$ ).

(Fig. 1A). At this time period, BrdU labels dividing progenitor cells only (Conover and Allen, 2002).

**Estradiol by silastic implant.** One week after ovariectomy, adult female mice received either a short term treatment with a s.c. Silastic capsule containing crystalline 17 $\beta$ -estradiol [diluted 1:1 with cholesterol (Sigma)] during 48 h ( $n=8$  females), or an empty capsule ( $n=8$  females). These capsules provide estrous levels of estradiol (for more details see Bakker et al., 2002). Estradiol capsules were put in saline at 37  $^{\circ}\text{C}$  during 24 h before being implanted in order to initiate the diffusion of the steroid, so at the time of implantation, the implants have started releasing the steroid. Two days later, subjects received a single i.p. injection of BrdU and were killed 2 h later (Fig. 1B).

**Cell survival in the OB.** Estradiol by single injection. One week after ovariectomy, adult female mice received a single s.c. injection of 10  $\mu\text{g}$  17 $\beta$ -estradiol ( $n=7$ ) or oil ( $n=5$ ) at 9.00 h. Two hours after the injection, subjects received an i.p. injection with

BrdU (50 mg/kg) four times with 2 h intervals (between 11.00 h and 18.00 h) and were killed 21 days later (Fig. 1C). At this time period, BrdU labels newly generated cells in the SVZ and which have migrated to the OB and have been differentiated into mature granule cells and periglomerular cells (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002). In order to analyze the cell survival in the OB, we used a classical protocol of BrdU injection for analyzing cell survival in the OB which requires more BrdU (a minimum of four injections) compared to cell proliferation studies in the SVZ in which only one or two injections of BrdU are sufficient (Rochefort et al., 2002; Veyrac et al., 2009).

**Estradiol by silastic implant.** One week after ovariectomy, adult female mice received either a short term treatment with a s.c. Silastic capsule containing crystalline 17 $\beta$ -estradiol ( $n=8$ ), or an empty capsule ( $n=5$ ). Twenty-four hours after the capsule was implanted, subjects received an i.p. injection with BrdU (50 mg/kg) four times with 2 h intervals (between 11.00 h and 18.00 h). In order to minimize interferences between surgery and BrdU cell incorporation, the capsule was removed 3 h after the last BrdU injection (BrdU is generally considered to be bioactive *in vivo* for about 2 h following an i.p. injection; Steiner et al., 2008). All animals were killed 21 days later (Fig. 1D). Estradiol capsules were preincubated in saline at 37 °C to ensure immediate diffusion of the steroid upon implantation.

At the end of each experiment, animals were anesthetized and perfused transcardially with saline followed immediately by 4% cold paraformaldehyde. Brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde for 2 h. Then brains were cryoprotected in 30% sucrose/PBS solution and when sunken, frozen on dry ice and stored at  $-80$  °C. Forebrains were cut coronally on a Leica CM3050S cryostat from the beginning of the OB (sections of 20  $\mu$ m) to the level of SVZ (sections of 30  $\mu$ m). Serial sections were stored at  $-20$  °C for later immunohistochemistry.

## Immunohistochemistry

**Cell proliferation study.** All incubations of free floating sections were carried out at room temperature (22 °C) and all washes of brain tissue sections were performed using phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M) or phosphate-buffered saline containing 0.2% Triton X-100 (PBST). Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the sections for 20 min with 0.6% hydrogen peroxide. To ensure access of antibody to BrdU containing DNA chains, sections were incubated for 20 min at 37 °C with 2N HCl. To restore the pH, sections were rinsed for 10 min with borate buffer (0.1 M—pH=8.5). Aspecific binding sites were blocked by incubating sections for 30 min with 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch) and PBST. Sections were then incubated with rat anti-BrdU antibody (1/400 in PBST; OBT0030—ABD Serotec) overnight at 4 °C. Then, sections were incubated for 2 h with a donkey anti-rat biotinylated antibody (1/2000 in PBST; Jackson ImmunoResearch). Sections were then processed for 90 min in avidin–biotin complex (ABC, Vector Laboratory) and rinsed in PBST. Sections were reacted for 10 min in a PBS solution containing 0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.05% diaminobenzidine. Sections were then washed, mounted onto gelatin-coated slides, dried overnight, left in xylene (Sigma) for 15 min and coverslipped using Eukit (Fluka).

**Cell survival study in the OB.** In order to keep the exact order of the sections from the OB and to facilitate stereological analysis of the BrdU signal, we mounted sections directly onto slides. All OB sections were processed for BrdU immunoreactivity as was previously described (Veyrac et al., 2009) and we ensured that this BrdU labelling method was comparable in free floating or mounted sections for the same brain region (data not shown). All incubations were carried out at room temperature (22 °C) and all washes of brain tissue sections were performed using phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M) or phosphate-buffered saline contain-

ing 0.5% Triton X-100 (PBST). To ensure access of antibody to BrdU, sections were incubated for 20 min at 98 °C with a Dako solution (Target Retrieval Solution—Dako Cytomation). After cooling for 20 min, sections were incubated for 3 min with 1N HCl and 0.0125% pepsine (Sigma). To eliminate endogenous peroxidase activity, sections were incubated for 30 min with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aspecific binding sites were blocked by incubating sections for 90 min with 5% normal horse serum (Jackson ImmunoResearch) and 5% BSA (Sigma) in PBST. Sections were then incubated with mouse anti-BrdU antibody (1/100 in PBST; Chemicon, Millipore) overnight at 4 °C. Then, sections were incubated for 2 h with a horse anti-mouse biotinylated antibody (1/200 in PBST; Vector). Sections were then processed for 30 min in avidin–biotin complex (ABC, Vector Laboratory) and rinsed in PBS. Sections were then preincubated for 5 min with 0.06% DAB solution (Sigma). Sections were reacted for 5 min in a Tris solution containing 0.03% NiCl<sub>2</sub>, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.06% DAB. Sections were then washed, dried overnight, left in xylene (Sigma) for 15 min and coverslipped using Eukit (Fluka, Steinheim, Germany).

## BrdU-stained nuclei quantification

A Zeiss microscope coupled with a computer-assisted image analysis system (Mercator Pro; Explora Nova, La Rochelle, France) was used for quantifying BrdU labeling. Cell counts and area measurements were performed using a previously validated method (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Veyrac et al., 2005). For each OB section, the granular cell layer (GrL), the periglomerular cell layer (PgL) and the subdendymal cell layer (SEL-OB) were delineated using a 5 $\times$  objective. All BrdU positive nuclei were counted in the GrL and PgL using a 20 $\times$  objective in four sections at 600  $\mu$ m intervals, starting from the anterior main OB (MOB) to the rostral apex of the AOB. The SVZ was delineated using a 5 $\times$  objective based on the histological difference from the surrounding tissue around the lateral ventricle and all labeled BrdU-positive cells were counted using a 20 $\times$  objective in four sections per animal starting from the opening of the ventricle (intersection intervals of 360  $\mu$ m). The volume of each layer was calculated according to a classical stereological method (Howard and Reed, 1998), using the area of each section, the distance between traced sections and the total number of sections. Profile density (number of labeled cell outlines/ $\mu$ m<sup>2</sup> on sections) and number density (number of labeled cell/ $\mu$ m<sup>3</sup>) were derived from these data. The total number of cells ( $T$ ) was estimated using the formula:

$$T = (N \times V) / t,$$

with  $V$  being the volume,  $N$  the profile density (number of profiles/ $\mu$ m<sup>2</sup>) and  $t$  the thickness of the sections.  $T$  was then related to the volume of the region of interest, to express data as a number of cells per mm<sup>3</sup> (volumetric density).

## Statistics

The data were averaged across animals within each experimental group (estradiol-treated vs. vehicle-treated) and statistical differences were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA; Statistica 8.0) followed by Fisher post hoc tests for experiments with more than two groups. For experiments consisting of only two groups, we used a two-tailed Student's  $t$ -test.

## RESULTS

### Cell proliferation in the SVZ

A short term treatment with estradiol led to a significant decrease in cell proliferation in the SVZ following either regimen of estradiol administration as compared to controls.

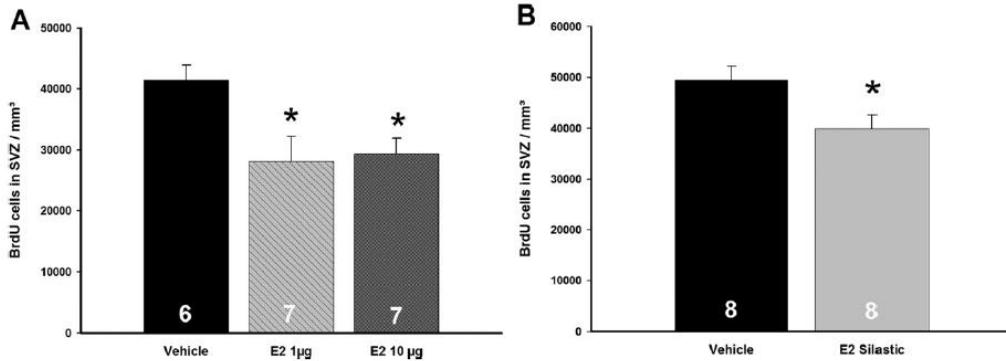


Fig. 2. Effects of estradiol on cell proliferation. Mean±SEM total number of BrdU cells in the SVZ following either a single injection of 1 or 10 µg 17β-estradiol (A) or an implant with a Silastic capsule containing crystalline 17β-estradiol (B), or oil/empty implant (vehicle conditions). The number of subjects is indicated in the bars. \*  $P < 0.05$  post hoc comparisons between estradiol and vehicle treatments.

**Estradiol by single injection.** ANOVA on the number of BrdU cells in the SVZ showed a significant effect of treatment ( $F(2,17)=5.01, P=0.019$ ). Post hoc analysis showed that a single injection of E2, either 1 µg ( $P=0.01$ ) or 10 µg ( $P=0.02$ ), led to a 30% decrease of BrdU labelled cells in the SVZ compared to a single injection with vehicle (Fig. 2A). Representative photomicrographs are shown in Fig. 3A–C.

**Estradiol by silastic implant.** *T*-test on the number of BrdU cells in the SVZ showed a significant difference between estradiol and vehicle treatments ( $t_{(14)}=2.50, P=0.025$ ). When delivering estrous levels of estradiol using the silastic implant, we also observed a 19% decrease of cell proliferation in the SVZ (Fig. 2B). Representative photomicrographs are shown in Fig. 3D, E.

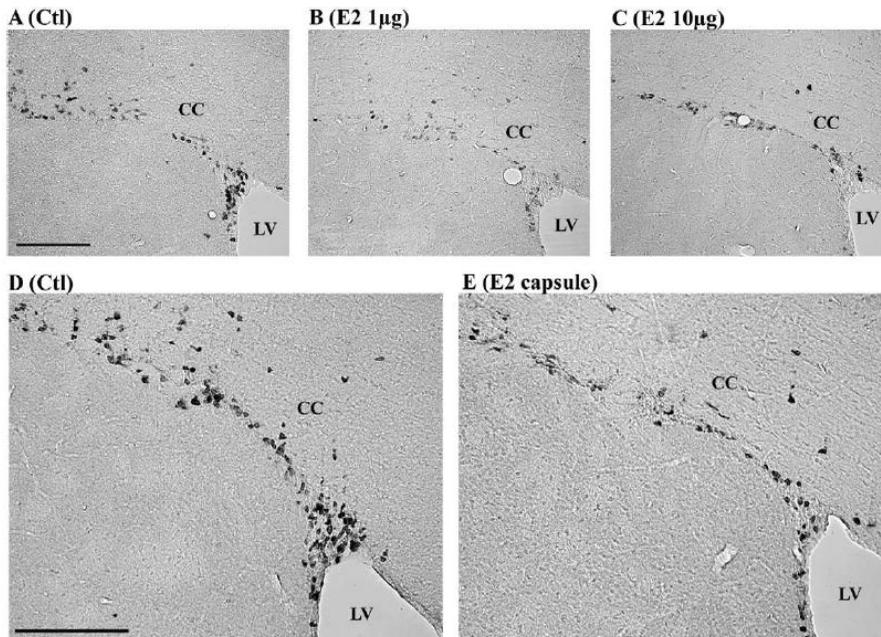


Fig. 3. Representative photomicrographs of 5-bromo-2 deoxyuridine (BrdU)-immunopositive cells in the subventricular zone (A–E). Number of cells incorporating BrdU was decreased in estradiol-treated mice (E2 1 µg, E2 10 µg and E2 capsule) compared to vehicle-treated control mice (Ctl) in the SVZ (A–E). Abbreviations: LV, lateral ventricle; CC, corpus callosum. Scale bars=150 µm (A–E).

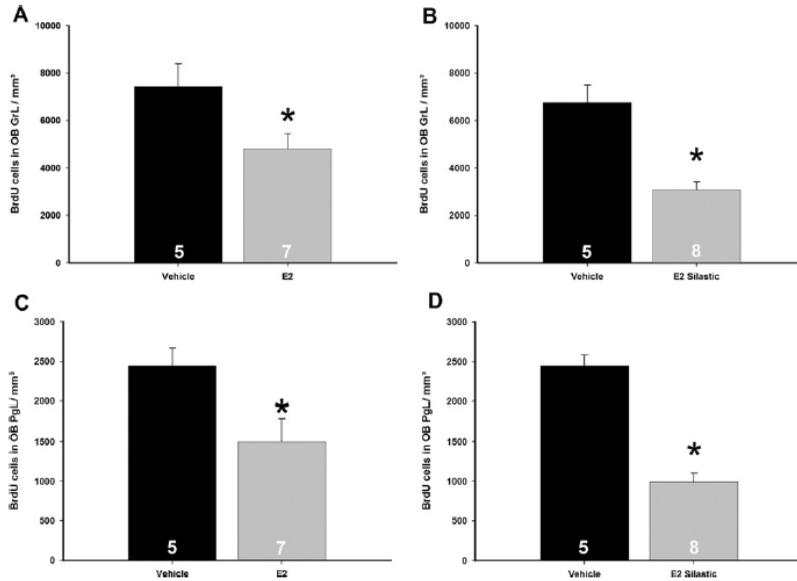


Fig. 4. Effects of estradiol on cell survival. Mean±SEM total number of BrdU cells in the granular layer (A, B) and periglomerular layer (C, D) in the olfactory bulb following a short term treatment with estradiol by either a single injection of 10 µg 17β-estradiol (A, C) or by a Silastic capsule containing crystalline 17β-estradiol (B, D), or oil/empty implant (vehicle conditions). The number of subjects is indicated in the bars. \*  $P < 0.05$  between estradiol and vehicle treatments.

**Cell survival in the OB**

The decrease observed in cell proliferation in the SVZ induced by a short term treatment with estradiol also led to a decreased number of newly generated granular and periglomerular cells in the OB.

*Estradiol by single injection.* *T*-tests on the number of BrdU cells in the GrL of the OB showed a significant difference between estradiol and vehicle injections ( $t_{(10)}=2.39, P=0.038$ ). Estradiol treatment led to a 35% decrease of newborn cells integrated into the GrL of the OB (Fig. 4A) whereas the volume of the GrL did not change compared to the vehicle condition (data not shown). *T*-tests on the number of BrdU cells in the PgL of the OB also showed a significant difference between estradiol and vehicle injections ( $t_{(10)}=2.39, P=0.038$ ). Estradiol treatment led to a 39% decrease of newborn cells integrated into the PgL of the OB (Fig. 4C) whereas the volume of the PgL did not change compared to the vehicle condition (data not shown). These results suggest that cells destined to the granular and periglomerular cell layers in the OB responded in a similar fashion to the short term treatment with estradiol. Representative photomicrographs are shown in Fig. 5A, 5B.

*Estradiol by silastic implant.* Very similar results were obtained when estradiol was administered by silastic implant. Thus *T*-tests on the number of BrdU cells in the GrL and the PgL of the OB showed a significant difference between estradiol and vehicle treatments (GrL:  $t_{(11)}=5.19, P=0.0003$ ; PgL:  $t_{(11)}=7.96, P<0.0001$ ). Estradiol treat-

ment led to a 54% and 60% decrease of newborn cells integrated into the GrL and the PgL, (Fig. 4B, 4D), respectively, whereas their volumes did not change compared to the vehicle condition (data not shown). Representative photomicrographs are shown in Fig. 5C, 5D.

**DISCUSSION**

Our results demonstrate that estradiol downregulates cell proliferation in the SVZ leading to a decreased number of newborn cells in adult female mice OB. Since the volumes of the granular layer and the periglomerular layer of the OB did not vary following estradiol treatment, it clearly suggests that estradiol acts on cell proliferation and the subsequent cell survival in the OB without affecting apoptosis of preexisting neurons in the OB (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002).

It has been suggested that estradiol plays a role in cell proliferation in the OB. For instance, estradiol stimulates neurogenesis in the adult SVZ following ischemic stroke in mice, thus potentially facilitating brain repair after injury (Suzuki et al., 2007). In this latter experiment, estradiol had no effect on cell proliferation in uninjured subjects when uncontrolled proliferation might not be desirable; however, the authors used very low doses of estradiol equivalent to low-basal circulating levels found during the diestrous state in female mice (Nelson et al., 1992) compared to our study using doses of estradiol corresponding to an estrous state. Smith et al. (2001) showed that exposure of female prairie voles to a male induced behavioral estrus and an increase in proliferation of BrdU-labelled cells from the

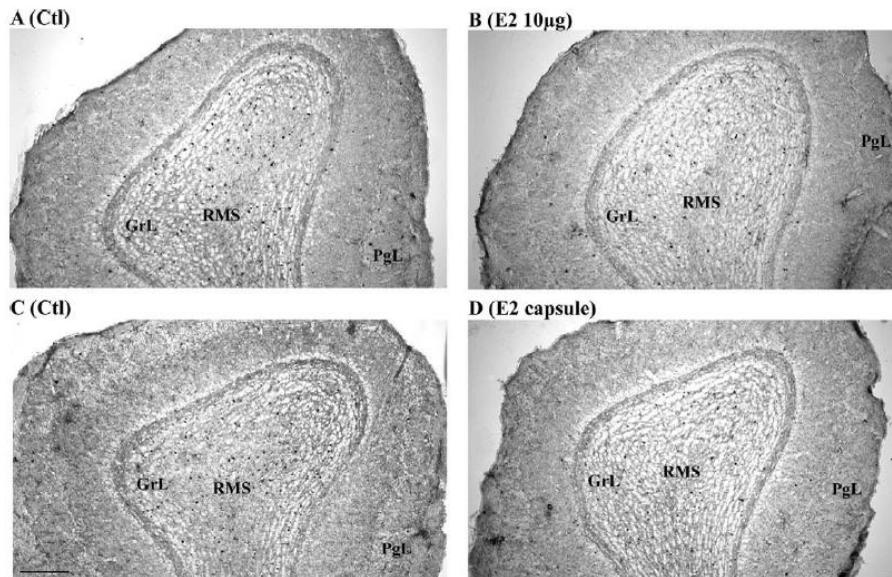


Fig. 5. Representative photomicrographs of 5-bromo-2 deoxyuridine (BrdU)-immunopositive cells in the olfactory bulb (A–D). Number of cells incorporating BrdU was decreased in estradiol-treated mice [E2 10  $\mu$ g (B) and E2 capsule (D)] compared to vehicle-treated control mice (Ctl—A, C) in the OB. Abbreviations: GrL, granular cell layer; PgL, periglomerular cell layer; RMS, rostral migratory system. Scale bar=200  $\mu$ m (A–D).

SVZ to the subependymal zone of the OB. As no proliferation was observed in ovariectomized females exposed to a sexual partner as well as the observation that estradiol-benzoate (EB) treatment was sufficient to restore the increased production of neuronal progenitors in the SVZ in ovariectomized females, they suggested that estradiol was partly involved in the stimulation of proliferation of SVZ-derived neuroblasts. However, they did not analyze whether these stimulatory effects of EB on cell proliferation in the SVZ was actually accompanied with an increase in newly generated cells in the RMS and the OB. Nevertheless, their results showed some stimulatory effects of EB on cell proliferation in the SVZ whereas we observed a decrease in cell proliferation in the SVZ following estradiol treatment. These discrepancies might be due to species differences, since female prairie voles seem to rely on male pheromonal cues to get into behavioral estrus, which is obviously not the case in mice. Thus it is possible that estrus induction and thus increased olfactory neurogenesis is accompanied by other, non specified, hormonal changes in the female prairie vole. Furthermore, there are some other differences between our and their study, like different timing following ovariectomy, different forms of estradiol used, different injection protocols for estradiol and BrdU. Only one study has suggested that estradiol affects cell survival in the OB: Hoyk et al. (2006) showed that an estrogen treatment for 6 days decreased the survival rate of newly integrated interneurons in the OB of adult female rats. Surprisingly, they only observed a decrease in cell survival in the AOB and not in the MOB. However, this study did not analyze any effects of estradiol

on cell proliferation in the SVZ. Thus it cannot be determined whether the decrease observed in the AOB resulted from either a decrease in the number of newborn cells generated in the SVZ or from a specific negative effect of estradiol in the survival of granule and periglomerular cells of the OB.

Continuous adult neurogenesis is required for the maintenance and reorganization of the whole interneuron system into the OB, and thus may play an important role in the modulation of processing of sensory information by interaction between the newborn granular and periglomerular cells and their olfactory bulb's projection neurons, the mitral and tufted cells (Lledo et al., 2006; Mouret et al., 2009). This brain plasticity seems to be crucial to the onset of several behaviors since several studies highlight strong correlations between the rate of newborn neurons survival in the OB and their possible implications in olfactory discrimination (Gheusi et al., 2009), odor memory (Rochefort et al., 2002) and olfactory learning (Mouret et al., 2008). However, it should be noted that the exact physiological role of "olfactory neurogenesis" remains unknown. In the OB, many studies suggest that newly integrated neurons may contribute to the perceptual and "memory" functions of the bulb, sometimes associated with social behavior (Gheusi et al., 2009). Exposure to male pheromones advances maternal behavior in female mice; this pheromone action is dependent on ovarian steroids and peptide hormones (especially prolactin), and is associated with increased cell proliferation in the SVZ during pregnancy and lactation (Shingo et al., 2003) and subsequent increase in new neurons in the OB leading to a better recognition of

pups and thus an advanced maternal behavior (Lenington et al., 2003; Larsen et al., 2008). Ovariectomy suppressed this increased cell proliferation and by consequence the advanced maternal behavior suggesting thus that estradiol could partly be involved in this effect. Mak et al. (2007) showed that dominant, but not subordinate, male pheromones provided specific sensory stimuli that stimulate proliferation in the SVZ of adult female mice and also led to a higher rate of newborn neurons in the OB. They showed that prolactin receptors mediate the increased production of neuroblasts in the SVZ however, they did not determine the role of estradiol on these effects. Mak et al. (2007) also suggested that LH might play a role in stimulating cell proliferation in the SVZ: administration of LH increased cell proliferation in the SVZ but only when using very high doses of LH. However, when they decreased their dose to 10% of the original dose they no longer observed an effect of LH infusion on cell proliferation in the SVZ. Although we did not measure LH levels in our mice, we can safely assume that LH levels were much lower than those that resulted of the LH treatment in the study by Mak et al. (2007). Furthermore, whether LH actually plays a role in the brain itself is still a subject of debate. A study by Pakarainen et al. (2005) showed that transplantation of wild-type ovary in luteinizing hormone receptor-knockout mice which were thus completely deprived of LH receptors completely restored their reproductive functions. This suggests that if there is any role for brain LH receptors in reproductive behavioral and sensory functions, it can only be minor. Finally, Mak et al. (2007) showed that dominant male pheromone-stimulated neurogenesis was required for mate selection in adult female mice, offering thus an ethological relevant function to adult female neurogenesis in the context of mate selection. As female prairie voles showed enhanced neurogenesis in the SVZ following exposure to males too and are a highly social species that form enduring selective pair bonds after mating (Smith et al., 2001), it would be interesting to examine whether this estrogen-mediated neurogenesis may play a role in the trace memory acquisition of the identity of the sexual partner. In male hamsters, Huang and Bittman (2002) showed that newborn cells integrated in the OB were specifically activated by exposure to an estrous female since they found an overlap between BrdU- and Fos-labelled cells. As the OB is part of the brain circuit controlling sexual behavior, it is quite likely that gonadal hormones may influence sexual behavior through modulating neurogenesis in the OB.

With regard to possible contribution of continuous neurogenesis in social behaviors like sexual behavior or partner preferences, we previously observed that female ArKO mice (which cannot convert testosterone to estradiol) showed an enhanced ability to discriminate very similar urinary odorants in an olfactometer task (Wesson et al., 2006). As ArKO females were treated with EB during the olfactory discrimination tests, we first hypothesized that they presented a hypersensitivity to estradiol due to greater numbers of estrogen receptors (Kudwa et al., 2007). This hypersensitivity to estradiol could have induced a better in-

tegration of new neurons in the OB, and thus promote their abilities to discriminate very similar sexual attractants. However, our present study showed that estradiol decreases the rate of newly generated cells, and thus contradicts our previous hypothesis. We are currently studying the effects of estradiol on the "olfactory neurogenesis" in adult female ArKO mice to better understand their olfactory performances.

As the majority (75–99%) of the newborn cells that are going to be integrated in the OB are GABA-ergic and thus inhibitory (Mouret et al., 2009), we could also suggest that in state of estrus there could be a decrease of inhibitory influences on olfaction which could facilitate the integration of pheromonal cues and by consequence the discrimination between different subtle odors. However, this hypothesis contradicts current observations showing that pharmacological blockade of GABAergic inhibition impairs discrimination between closely related odorants (Stopfer et al., 1997). Moreover, it has been shown that, through inhibition, granule cell activity enhances the refinement of odor-molecule tuning by the synchronization of mitral cell subpopulations widely distributed in the OB (for review see Kay et al., 2009).

We thus suggest that estradiol could act as a potential regulator of cell proliferation in the subventricular zone and subsequently the rate of newly generated cells in the OB and thus could modulate the processing of olfactory cues that are important for socio-sexual behaviors. Moreover, the cyclical fluctuations in sex hormone levels raise the possibility of corresponding cyclical waves of neurogenesis leading perhaps to a better integration of pheromonal information and thus facilitating reproduction. For example, during proestrus, a time when estrogen levels are high, cell proliferation in the SGZ of the hippocampus increases, compared with estrus and diestrus, when estrogens levels are lower (Tanapat et al., 1999). Clear evidence is still lacking about the effects of estradiol in the SVZ, but our study suggests an opposite way of action of estradiol in the SVZ and in the OB compared to its effects in the DG of rodents. In the DG, it has been shown that estradiol stimulates cell proliferation within a few hours after exposure (Tanapat et al., 1999), which is in contrast to what we observed in the SVZ following a single injection of estradiol. However, a 48 h exposure to estradiol suppresses cell proliferation in the DG (Ormerod and Galea, 2001), which is in line with what we observed using silastic implants. It has been shown that the stimulatory effects of estradiol on cell proliferation in the SGZ were exerted directly on the progenitors via estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (Nagy et al., 2006; Mazzucco et al., 2006) or indirectly by serotonin (Banasr et al., 2001; Shingo et al., 2003). Surprisingly, no estradiol receptors (ER $\alpha$  or ER $\beta$ ) are found in the SVZ in mice (Mitra et al., 2003; Merchantaler et al., 2004) although Isgor and Watson (2005) showed that Ki-67-immunoreactive cells of the SVZ expressed estrogen receptor alpha mRNA in rats. We thus suggest that estradiol most likely modulates cell proliferation by indirect pathways projecting to the SVZ such as dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH) or tyrosine hydroxylase (TH) neurons which are estradiol-

sensitive (Temel et al., 2002; Kishi et al., 2005) or by GPR30 which are membrane receptors binding estradiol (Bologa et al., 2006). Several reports suggested that GPR30 might be a G-protein coupled estrogen receptor mediating nongenomic effects of estradiol but its brain localization and its exact role remain still unknown (Micevych and Dominguez, 2009; Micevych et al., 2009).

*Acknowledgments*—This work was supported by the following grants: the NICHD (HD044897), the University of Liège (C-06/89 and C-08/53), and the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS; F 2.4572.09 with support of the French Community Wallonie-Brussels and the National lottery), all to Dr. Bakker. Dr. Bakker is a research associate of the FNRS. Dr. Keller is a research associate at the CNRS. We also thank Dr. Jodi Pawluski for commenting on an earlier version of the manuscript.

## REFERENCES

- Abrons DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85:523–569.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2002) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 22:9104–9112.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2004) Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behav* 46:1–10.
- Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A (2001) Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 14:1417–1424.
- Barker JM, Galea LA (2008) Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* 152:888–902.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER (2006) Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2:207–212.
- Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci* 21:512–520.
- Conover JC, Allen RL (2002) The subventricular zone: new molecular and cellular developments. *Cell Mol Life Sci* 59:2128–2135.
- Galea LA (2008) Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev* 57:332–341.
- Galea LA, McEwen BS (1999) Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience* 89:955–964.
- Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL (2006) Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus* 16:225–232.
- Gheusi G, Ortega-Perez I, Murray K, Lledo PM (2009) A niche for adult neurogenesis in social behavior. *Behav Brain Res* 200:315–322.
- Howard C, Reed M (1998) *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. Oxford, UK: Bios Scientific.
- Hoyk Z, Varga C, Parducz A (2006) Estrogen-induced region specific decrease in the density of 5-bromo-2-deoxyuridine-labeled cells in the olfactory bulb of adult female rats. *Neuroscience* 141:1919–1924.
- Huang L, Bittman EL (2002) Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamsters are specifically activated by exposure to estrous females. *Horm Behav* 41:343–350.
- Isgor C, Watson SJ (2005) Estrogen receptor alpha and beta mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone. *Neuroscience* 134:847–856.
- Kay LM, Beshel J, Brea J, Martin C, Rojas-Libano D, Kopell N (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci* 32:207–214.
- Kishi Y, Takahashi J, Koyanagi M, Morizane A, Okamoto Y, Horiguchi S, Tashiro K, Honjo T, Fujii S, Hashimoto N (2005) Estrogen promotes differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J Neurosci Res* 79:279–286.
- Kudwa AE, Harada N, Honda SI, Rissman EF (2007) Effects of organizational oestradiol on adult immunoreactive oestrogen receptors (alpha and beta) in the male mouse brain. *J Neuroendocrinol* 19:767–772.
- Lagace DC, Fischer SJ, Eisch AJ (2007) Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 17:175–180.
- Larsen CM, Kokay IC, Grattan DR (2008) Male pheromones initiate prolactin-induced neurogenesis and advance maternal behavior in female mice. *Horm Behav* 53:509–517.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367–1375.
- Lenington JB, Yang Z, Conover JC (2003) Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 1:99.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179–193.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145–1148.
- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci* 10:1003–1011.
- Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LA (2006) Both estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience* 141:1793–1800.
- Mechawar N, Saghatelian A, Grailhe R, Scoriels L, Gheusi G, Gabellec MM, Lledo PM, Changeux JP (2004) Nicotinic receptors regulate the survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9822–9826.
- Merchenthaler I, Lane MV, Numan S, Dellovade TL (2004) Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol* 473:270–291.
- Micevych P, Dominguez R (2009) Membrane estradiol signaling in the brain. *Front Neuroendocrinol* 30:315–327.
- Micevych P, Kuo J, Christensen A (2009) Physiology of membrane oestrogen receptor signalling in reproduction. *J Neuroendocrinol* 21:249–256.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144:2055–2067.
- Mouret A, Gheusi G, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2008) Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 28:11511–11516.
- Mouret A, Murray K, Lledo PM (2009) Centrifugal drive onto local inhibitory interneurons of the olfactory bulb. *Ann NY Acad Sci* 1170:239–254.
- Nagy AL, Ormerod BK, Mazzucco CA, Galea LAM (2006) Estradiol-induced enhancement in cell proliferation is mediated through estrogen receptors in the dentate gyrus of adult female rats. *Drug Dev Res* 66:142–149.
- Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, Finch CE (1992) Differential contributions of ovarian and extravarian factors to age-related

- reductions in plasma estradiol and progesterone during the estrous cycle of C57BL/6J mice. *Endocrinology* 130:805–810.
- Ormerod BK, Galea LA (2001) Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience* 102:369–379.
- Pakarainen T, Zhang FP, Poutanen M, Huhtaniemi I (2005) Fertility in luteinizing hormone receptor-knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action. *J Clin Invest* 115:1862–1868.
- Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LA (2009) Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol* 30:343–357.
- Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM (2003) An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat. *Eur J Neurosci* 18:923–930.
- Petreau L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106–6113.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679–2689.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117–120.
- Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB, Insel TR (2001) Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Horm Behav* 39:11–21.
- Steiner B, Zurborg S, Hörster H, Fabel K, Kempermann G (2008) Differential 24h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 154:521–529.
- Stopfer M, Bhagavan S, Smith BH, Laurent G (1997) Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* 390:70–74.
- Suzuki M, Wright LS, Marwah P, Lardy HA, Svendsen CN (2004) Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3202–3207.
- Suzuki S, Gerhold LM, Bottner M, Rau SW, Dela Cruz C, Yang E, Zhu H, Yu J, Cashion AB, Kindy MS, Merchenthaler I, Gage FH, Wise PM (2007) Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol* 500:1064–1075.
- Tanapat P, Hastings NB, Gould E (2005) Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol* 481:252–265.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792–5801.
- Temel S, Lin W, Lakhilani S, Jennes L (2002) Expression of estrogen receptor-alpha and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 143:3974–3983.
- Veyrac A, Didier A, Colpaert F, Jourdan F, Marien M (2005) Activation of noradrenergic transmission by alpha2-adrenoceptor antagonists counteracts deafferentation-induced neuronal death and cell proliferation in the adult mouse olfactory bulb. *Exp Neurol* 194:444–456.
- Veyrac A, Sacquet J, Nguyen V, Marien M, Jourdan F, Didier A (2009) Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 34:786–795.
- Wersinger SR, Rissman EF (2000) Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J Neuroendocrinol* 12:103–110.
- Wesson DW, Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2006) Enhanced urinary odor discrimination in female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav* 49:580–586.
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Liu Y (2001) Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain. *Front Neuroendocrinol* 22:33–66.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645–660.

(Accepted 21 December 2009)  
(Available online 4 January 2010)

## I.2 Principaux résultats & discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'E<sub>2</sub> régulait de façon négative la prolifération cellulaire au niveau de la SVZ, menant ainsi à une diminution du nombre de cellules nouveau-nées au sein de l'OB chez des femelles adultes. En effet, quels que soient la dose ou le mode d'administration, un traitement oestrogénique aigu entraîne une diminution du nombre de cellules BrdU positives (bromodéoxyuridine ; marqueur de la division cellulaire) au niveau de la SVZ, et conséquemment, une diminution du nombre de cellules BrdU positives incorporées dans la couche granulaire et périglomérulaire de l'OB. Le volume de ces deux couches cellulaires ne variant pas suite à l'administration du traitement oestrogénique, suggère que l'E<sub>2</sub> module la neurogenèse olfactive sans affecter l'apoptose des neurones préexistants au sein de l'OB.

D'un point de vue fonctionnel, nous avons postulé qu'une femelle en œstrus exprimait des concentrations plasmatiques, et donc cérébrales, en œstrogènes très élevées. Comme démontré dans cette étude, ce taux élevé entraînerait une diminution du nombre de cellules incorporées dans l'OB. Néanmoins, la majorité des nouveaux neurones incorporés dans le bulbe étant GABAergiques (Mouret et al., 2008), une diminution de la survie des cellules nouveau-nées pourrait donc engendrer une diminution des influences inhibitrices au sein de l'OB, et par conséquent, faciliter l'intégration des indices olfactifs socio-sexuels. Ce processus pourrait expliquer en partie les performances accrues des souris ArKO femelles traitées avec de l'EB à l'âge adulte. Cependant, cette hypothèse reste critiquable à plusieurs niveaux :

- Selon cette théorie, l'E<sub>2</sub> administré pourrait améliorer les performances olfactives d'un individu en diminuant l'apport de cellules nouveau-nées de type inhibitrices au sein de l'OB. Si tel était le cas, les femelles WT de l'expérience de Wesson (2006) devraient montrer les mêmes performances que les femelles ArKO vu qu'elles reçoivent le même traitement

oestrogénique à l'âge adulte. D'un autre côté, nous pourrions postuler que les femelles ArKO (exprimant un plus grand nombre d'ER), n'ayant jamais été exposées aux œstrogènes avant l'expérience d'olfactométrie, contrairement aux femelles WT, puissent montrer une hypersensibilité aux effets de cette hormone, conduisant peut-être ainsi à une inhibition de la neurogenèse olfactive adulte encore plus marquée chez ces individus.

- Au cours de cette étude, nous avons administré un traitement oestrogénique aigu, tandis que Wesson a traité ses animaux de manière chronique. Il est donc difficile de comparer nos résultats à cette expérience car la durée d'exposition aux œstrogènes peut mener à des modulations différentes de la neurogenèse adulte (Ormerod and Galéa, 2001).
- Récemment, Brill et ses collaborateurs (2009) ont démontré que certaines cellules nouveau-nées s'incorporant dans l'OB étaient de type glutamatergiques, c.à.d. excitatrices. Une diminution du nombre de ces cellules parvenant à l'OB aurait donc plutôt tendance à décroître les capacités olfactives.

Bon nombre d'études sont donc encore nécessaires afin de déterminer tous les mécanismes hormonaux pouvant influencer la neurogenèse olfactive. Cependant, une post-doctorante au sein de notre laboratoire a mené récemment une étude (Veyrac and Bakker, étude ArKO, manuscrit soumis) sur les effets d'un traitement oestrogénique sur la neurogenèse olfactive chez des souris femelles WT et ArKO, révélant quelques résultats parfois surprenants :

- La prolifération des progéniteurs cellulaires au sein de la SVZ n'est nullement affectée par l'E<sub>2</sub>. Ces données sont en accord avec les observations de Lagace (2007) selon lesquelles les niveaux endogènes d'E<sub>2</sub> n'influencent pas la neurogenèse hippocampique. D'un autre côté, ces données ArKO sont en désaccord avec nos précédentes observations

montrant une diminution de la prolifération cellulaire suite à un traitement oestrogénique. Cependant, deux facteurs principaux différenciant ces deux études peuvent expliquer cette divergence. Premièrement, le temps écoulé entre l'ovariectomie des femelles et le début du traitement oestrogénique est plus long dans l'étude ArKO (3 semaines *versus* 1 semaine pour notre étude C57BL/6) ; or, il a été démontré que les effets modulateurs de l'E<sub>2</sub> sur la prolifération cellulaire au sein du DG disparaissent si le traitement oestrogénique était administré 4 semaines après l'ovariectomie des sujets expérimentaux (Tanapat et al., 2005). Deuxièmement, le traitement oestrogénique administré dans l'étude ArKO est de type chronique (*versus* aigu dans l'étude C57BL/6) ; or la durée d'exposition à l'E<sub>2</sub> peut moduler différemment la production de nouvelles cellules (Galéa, 2008). De manière générale, nous suggérons donc que, tout comme la neurogenèse hippocampique adulte, les effets de l'E<sub>2</sub> sur la neurogenèse olfactive adulte semblent dépendre de bon nombre de facteurs dont la durée de l'ovariectomie et le mode de traitement.

- L'E<sub>2</sub> révèle des effets contraires sur la survie des neurones nouveau-nés au sein du bulbe olfactif principal (MOB) et accessoire (AOB). En effet, un traitement oestrogénique administré à l'âge adulte réduit le nombre de cellules nouveau-nées incorporées dans le MOB chez des individus WT et ArKO (tout comme dans notre étude C57BL/6), mais ne semble pas moduler la survie de ces cellules au sein de l'AOB. De plus, l'influence oestrogénique postnatale ne semble pas affecter l'intégration des cellules nouveau-nées au sein du MOB au vu des taux de survie cellulaire équivalents chez les femelles WT et ArKO. Par ailleurs, les individus ArKO montrent une nette diminution du nombre de cellules nouvellement formées au sein de l'AOB comparativement aux sujets WT, suggérant donc que les œstrogènes postnataux sont requis pour établir l'architecture de l'AOB (mais pas celle

du MOB) afin que les neurones nouveau-nés à l'âge adulte puissent survivre et s'intégrer dans la circuiterie fonctionnelle.

- Dans cette étude ArKO, les animaux ont été exposés à des odeurs urinaires émises par des conspécifiques mâles, et l'activation neuronale subséquente au sein de l'OB a été évaluée au moyen de l'expression de Zif268 (marqueur d'activité neuronale). Suite à la stimulation olfactive, l'expression de Zif268 est uniquement augmentée dans les neurones nouveau-nés (marqués par la BrdU) au sein du MOB chez les femelles WT (et non chez des femelles WT ovariectomisées, et chez des femelles ArKO traitées avec de l'E<sub>2</sub> à l'âge adulte), suggérant que les œstrogènes postnataux ainsi que les niveaux endogènes adultes d'E<sub>2</sub> et de progestérone influencent la réactivité des cellules nouvellement incorporées au sein de l'OB à l'âge adulte.

Ainsi, ces données suggèrent que les femelles ArKO posséderait une plasticité réduite au sein de l'OB du à l'altération de la neurogenèse adulte olfactive. Par ailleurs, l'explication des performances accrues de discrimination olfactives des souris femelles ArKO (Wesson et al., 2006) restent une énigme. D'un autre côté, ces données permettraient d'expliquer en partie les déficits d'investigation des stimuli olfactifs socio-sexuels observés chez ces animaux ArKO (Bakker and Baum, 2008).

## **II. Rôle des œstrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle des préférences sexuelles chez la souris**

### **II.1 Introduction**

Les souris AFP-KO, présentant une mutation au niveau du gène codant pour l'alpha-foetoprotéine (principale protéine fœtale) liant les œstrogènes avec une haute affinité, sont surexposées à l'E<sub>2</sub> au cours de leur vie embryonnaire (Gabant et al., 2002). Conséquemment, ces individus femelles sont fortement déféminisés, notamment quant à leur comportement reproducteur (suppression totale de l'expression de lordose à l'âge adulte ; Bakker et al., 2006) et à leur système GnRH/Kisspeptine (suppression du pic de LH ovulatoire ; De Mees et al., 2006 ; Gonzalez-Martinez et al., 2008). De manière plus surprenante, une étude a rapporté que les femelles AFP-KO montraient une préférence robuste pour un mâle lors d'un test comportemental présentant des odeurs volatiles émises par un conspécifique mâle et une femelle en oestrus au sein d'un labyrinthe en Y (Bakker et al., 2007). Ces données suggèrent donc que les préférences sexuelles sont organisées par les œstrogènes au cours d'une période postnatale.

Cependant, les résultats obtenus dans le labyrinthe en Y sont quelque peu discutables. En effet, au cours de cette expérience, les sujets sont uniquement traités avec de l'E<sub>2</sub> à l'âge adulte ; or, il est clairement établi que l'action synergique de l'E<sub>2</sub> et de la progestérone sont nécessaires pour stimuler le comportement reproducteur à l'âge adulte (Edwards and Thompson, 1970 ; Blaustein, 2008). Des souris femelles adultes ovariectomisées ne montrent pas de préférence pour un mâle si elles ne sont traitées qu'avec de l'E<sub>2</sub> (Bakker et al., 2002) ; par contre, cette préférence spécifique est observée si les femelles reçoivent un traitement combiné d'E<sub>2</sub> et de progestérone (Keller et al., 2006a,b). Nous pensons donc que les réponses comportementales exprimées par

les femelles AFP-KO dans le labyrinthe en Y pouvaient être en partie biaisées par un traitement hormonal non-optimal.

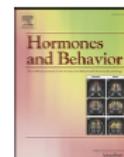
A l'heure actuelle, nous pensons également qu'un test comportemental utilisant le paradigme de l'enceinte à 3 compartiments (3CB) est plus appropriée afin d'évaluer les préférences sexuelles chez le rongeur. En effet, ce dispositif a été largement utilisé chez le rat, et fournit des résultats très fiables et reproductibles (Bakker et al., 1993, 1996). Plus récemment, le 3CB a été transposé chez la souris afin d'étudier les préférences olfactives (Mossman et al., 1996; Drickamer et al., 2000 ; Mak et al., 2007). De plus, il présente le réel avantage d'éliminer l'influence du comportement exploratoire sur les performances de préférences socio-sexuelles, comparativement aux longues distances séparant deux stimuli présentés au sein d'un labyrinthe en Y.

Ainsi, le traitement hormonal et le dispositif expérimental sont donc les deux principales raisons qui ont motivé notre choix de réétudier les préférences sexuelles chez les sujets AFP-KO.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yhbeh](http://www.elsevier.com/locate/yhbeh)

# Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice

Olivier Brock, Julie Bakker\*

GIGA-Neurosciences, University of Liège, Avenue de l'Hôpital 1 (B36), 4000 Liège, Belgium

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 23 June 2010

Revised 14 October 2010

Accepted 18 October 2010

Available online xxx

### Keywords:

α-fetoprotein knockout

Sexual differentiation

Estradiol

Mate preference

## ABSTRACT

The neural mechanisms controlling sexual behavior are sexually differentiated by perinatal actions of gonadal hormones. We recently observed using female mice deficient in alpha-fetoprotein (AFP-KO) and which lack the protective actions of AFP against maternal estrogens, that exposure to prenatal estrogens completely defeminized their potential to show lordosis behavior in adulthood. Therefore, we determined here whether mate preferences were also affected in female AFP-KO mice. We observed a robust preference for an estrous female over an intact male in female AFP-KO mice, which were ovariectomized in adulthood and subsequently treated with estradiol and progesterone, whereas similarly treated WT females preferred the intact male over the estrous female. Gonadally intact WT males preferred the estrous female over the male, but only when visual cues were blocked by placing stimulus animals behind opaque partitions. Furthermore, when given the choice between an intact male and a castrated male, WT females preferred the intact male, whereas AFP-KO females showed no preference. Finally when given the choice between an estrous female and an ovariectomized female, WT males preferred the estrous female whereas AFP-KO females preferred the ovariectomized female or showed no preference depending on whether they could see the stimulus animals or not. Taken together, when AFP-KO females are tested under estrous conditions, they do not show any male-directed preferences, indicating a reduced sexual motivation to seek out the male in these females. However, they do not completely resemble males in their mate preferences suggesting that the male-typical pattern of mate preferences is not solely organized by prenatal estrogens.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

## Introduction

When in breeding condition, male and female mammals usually seek out and mate with opposite sex conspecifics. It has been well established that the neural mechanisms controlling mate preference are sexually differentiated by the perinatal actions of sex steroid hormones (Bakker, 2003). Thus, a female-directed preference develops in male rats under the early (perinatal) influence of estradiol derived from neural aromatization of testosterone (Bakker et al., 1993, 1996a,b). Male rats treated neonatally with 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD), a specific inhibitor of the aromatase enzyme, failed to show a preference for an estrous female when given a choice between an estrous female and a sexually active male in a three compartment box, whereas normal males clearly preferred the vicinity of the estrous female. In fact, such neonatally ATD-treated male rats preferred the vicinity of the sexually active male, in particular following estradiol treatment in adulthood (Bakker et al.,

1993, 1996a,b) suggesting that their mate preference had not been masculinized.

We showed using aromatase knockout (ArKO) mice, which carry a targeted mutation in the *Cyp19* gene (Bakker et al., 2002a) and as a result cannot convert androgens into estrogens, that in the mouse, like in the rat, female-directed preferences seem to develop under the influence of estrogens (Bakker et al., 2004). Gonadally intact male ArKO mice failed to show a preference for an estrous female when provided with volatile body odors from an estrous female and a sexually active male in a Y-maze (Bakker et al., 2002a), whereas wild-type (WT) males preferred to investigate the estrous female box. Adult treatment of male ArKO mice with estradiol failed to induce a female-directed preference suggesting that mate preferences develop perinatally in male mice under the influence of estrogens (Bakker et al., 2004). Similar results have been obtained in male mice carrying a mutation in the estrogen receptor alpha gene (*ER-KO*; Wersinger and Rissman, 2000). Such *ER-KO* males failed to show a preference for an estrous female when given the choice between an anesthetized estrous female and an anesthetized intact male, further confirming the pivotal role of estrogens and ER in the development of female-directed preferences.

Interestingly, we recently observed female-typical (i.e., male-directed) preferences in female mice carrying a mutation in the *Afp*

\* Corresponding author. Fax: +32 4 366 5971.  
E-mail address: [jbakker@ulg.ac.be](mailto:jbakker@ulg.ac.be) (J. Bakker).

gene (AFP-KO) which encodes the major fetal plasma protein  $\alpha$ -fetoprotein that binds estradiol with high affinity (Bakker et al., 2007). This finding was quite unexpected since female AFP-KO mice are clearly defeminized with regard to their lordosis behavior (Bakker et al., 2006) as well as their GnRH/Kisspeptin system, i.e., no steroid induced preovulatory LH surges (De Mees et al., 2006; Gonzalez-Martinez et al., 2008). The observation of a robust male-directed preference in AFP-KO females would thus suggest that the development of mate preferences is postnatally influenced by ovarian estrogens. This finding is in line with our earlier study in female ArKO mice (Bakker et al., 2002b) that suggests feminizing effects of estradiol on the female brain since female ArKO mice showed reduced levels of lordosis behavior as well as no clear mate preferences in adulthood. Taken together, there is still some ambiguity about the role of perinatal estradiol signaling in the development of mate preferences in mice.

Therefore, in the present study, to further investigate the organizational role of prenatal estrogens in mate preferences, we extended our initial study to determine mate preferences in AFP-KO and WT female mice using a different testing paradigm, i.e., a three compartment box in addition to the Y-maze. The rationale for using a three compartment box was to offer the animals different choices between stimulus animals without the need to run from one arm to the other, since preferences measured in the Y-maze may be influenced by differences in exploratory activity of the subjects. Furthermore females were tested under estrous conditions, i.e., following treatment with estradiol and progesterone and not with estradiol alone as was done in our previous study (Bakker et al., 2007). We also determined mate preferences in a group of WT males that were left gonadally intact to determine whether AFP-KO females resembled males or not.

## 112 Materials and methods

### 113 Animals

All breeding and genotyping were performed at the GIGA Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium. In the present study, male and female mice heterozygous for the allele *Afp<sup>tm11bmm</sup>* (in the *CD1* background strain; Gabant et al., 2002; Bakker et al., 2006) were bred to generate wild-type (WT) and homozygous-null (AFP-KO) offspring. Mice were genotyped by PCR analysis of tail DNA (for more detailed description, see Bakker et al., 2006, 2007). Subjects were weaned at 21 days and placed into individual cages under a reversed light–dark cycle (12 h:12 h light/dark; 20.00 h lights on and 8.00 h lights off) in special light and temperature controlled housing units. Food and water were always available *ad libitum*.

Stimulus animals (all of the *CD1* strain) were gonadally intact males, long-term gonadectomized male (gdx) and female (ovx) mice, and ovariectomized females brought into behavioral estrus by treatment with estradiol and progesterone. Gonadectomy was performed under general anesthesia after an intraperitoneal injection (i.p.) of a mixture of ketamine (80 mg/kg per mouse) and medetomidine (Domitor, Pfizer, 1 mg/kg per mouse). Mice received atipamezole (Antisedan, Pfizer, 4 mg/kg per mouse) subcutaneously (s.c.) at the end of the surgery in order to antagonize medetomidine-induced effects, thereby accelerating their recovery. Ovariectomized females that were going to serve as estrous female stimulus were at the same time implanted with a Silastic capsule containing 17 $\beta$ -estradiol (diluted 1:1 with cholesterol, for more details see Bakker et al., 2002b).

All experiments were conducted in accordance with the guidelines set forth by the National Institutes of Health “Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals” and were approved by the Ethical Committees for Animal Use of the University of Liège.

### Behavioral tests

#### Mate preferences using the three compartment box

To assess mate preferences using either visual, auditory, and/or olfactory stimuli, we used a box (60  $\times$  13  $\times$  30 cm) that was divided into three compartments by placing either opaque or transparent partitions. Each compartment was thus 20 cm in length. The partitions contained perforated holes at a height of 8 cm to facilitate the diffusion of odors from the two side compartments to the middle compartment. Tests were performed during the dark phase of the light cycle (6 h after lights out). Animals were habituated to the three compartment box only once on the day before the behavioral experiments by placing them in the middle compartment for 10 min (with no stimulus animals placed in the two side compartments). On the day of testing, stimulus animals were placed in the two side compartments with their own bedding to make the stimulus as odorous as possible. The subject was then introduced into the middle compartment containing no sawdust, and was observed for 9 min. The time spent poking its nose through the holes of the partition or actively sniffing the bottom of the partition was recorded with a stopwatch. Each test session was divided into 3 min intervals in order to determine whether investigation times would decrease during the test, since we have previously observed that subjects have the tendency to investigate more during the first minutes of the test. However, since we did not observe any decrease along the test session, we only present the total time spent investigating the two stimuli in the results section.

Thus 24 adult mice (WT: 8 females and 10 males; AFP-KO: 6 females) were used in the present experiments. All females were ovariectomized and implanted in the neck with a 5 mm long Silastic capsule containing 17 $\beta$ -estradiol (diluted 1:1 with cholesterol) and received an injection of 500  $\mu$ g progesterone 3 h before each test. Subjects were tested between 10 and 17 weeks of age. All stimulus animals were awake and either presented behind transparent partitions (thus only physical contact was prevented, and mate preferences were based on visual, auditory and olfactory cues) or opaque partitions (to prevent any visual cues). We used the following experimental protocol to test mate preferences: the first series of preference tests were conducted using transparent partitions, thus allowing visual, auditory and olfactory cues. Subjects were first offered a choice between an intact male versus an estrous female. Next, they were offered a choice between an estrous female versus a long-term ovx female, and finally, a choice between an intact male versus a long-term gdx male. The second series of preference tests using opaque partitions, thus only allowing auditory and olfactory cues, was conducted the week after. Again, subjects were first offered a choice between an intact male versus an estrous female, then between an estrous female versus a long-term ovx female, and finally between an intact male versus a long-term gdx male. All tests were conducted on separate days and at least 2 days apart since female subjects were injected with progesterone before each preference test. The position (left versus right compartment) and presentation of the stimulus animals were not randomized to prevent variability due to possible residual odors in the compartments.

#### Mate preferences using the Y-maze

Following these tests in the three compartment box, subjects were tested once for their mate preferences in the Y-maze (for a more detailed description of the maze, see Bakker et al., 2002a) with as choice volatile odors from an anesthetized male versus those of an anesthetized estrous female (one AFP-KO female died between the three compartment box and the Y-maze tests). Briefly, before being tested for their mate preferences, all subjects were tested for 5 min in the Y-maze without any odor stimuli to adapt to the testing apparatus and to determine whether they would develop any side preferences. When subjects were tested for mate preferences using volatile body

ARTICLE IN PRESS

O. Brock, J. Bakker / *Hormones and Behavior* xxx (2010) xxx–xxx

3

odors (anesthetized stimulus animals) as stimuli, removable perforated opaque Plexiglas doors were placed at the distal end of each arm to separate the goal boxes from the rest of the maze. The time the subject spent sniffing the male and female sides (poking its nose through the holes of the door or actively sniffing the bottom and sides of the door of the goal box) was recorded with a stopwatch for 5 min. The maze was cleaned with Norvanol between trials. The level of anesthesia of the stimulus animals was checked between each trial and stimulus animals were placed regularly on a heating pad to prevent hypothermia.

Statistics

All behavioral data were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA; Statistica 8.0) using stimulus and sex/genotype as factors. When appropriate, all ANOVAs were followed by Fisher Least Significant Difference post-hoc comparisons adapted for repeated measures ANOVA. Only significant ( $P < 0.05$ ) effects detected by the ANOVAs are presented here.

Results

Mate preferences using the three compartment box

Table 1 summarizes our predictions regarding mate preferences for the different choice paradigms. These predictions were based on our hypothesis that mate preferences of female AFP-KO mice might resemble those of WT males since they have been exposed to high levels of estrogens before birth. The mate preferences observed in our study are presented in the same table.

Choice: Gonadally intact male versus estrous female

- Transparent partitions: visual, auditory, and olfactory stimuli

As predicted, female WT mice showed a preference for the male whereas female AFP-KO mice showed a preference for the female indicating that mate preferences are influenced by prenatal estrogens. By contrast, male WT male did not show a clear preference (Fig. 1A).

This was confirmed by ANOVA on the time spent investigating the male or female compartment showing a significant interaction between stimulus and sex/genotype ( $F(2,22) = 8.84, P = 0.001$ ). Post-hoc analysis indicated that WT females spent more time investigating the side containing the intact male over the one containing the estrous female, whereas AFP-KO females spent more time investigating the side containing the estrous female over the one containing the intact male. Furthermore, WT males spent an equal amount of time investigating the two sides.

- Opaque partitions: Auditory and olfactory stimuli

As observed with transparent partitions, AFP-KO females showed a preference for the female. By contrast, a preference for the male was less obvious in WT females, whereas WT males, as predicted (Table 1), now showed a preference for the female (Fig. 1B).

This was confirmed by ANOVA on the time spent investigating the male versus the estrous female stimulus showing a significant interaction between stimulus and sex/genotype ( $F(2,21) = 9.29, P = 0.001$ ). Post-hoc analysis indicated that both AFP-KO females and WT males spent more time investigating the side containing the estrous female compared to the one containing the intact male, whereas WT females spent equivalent amounts of time investigating the two sides.

Choice: Ovx female versus estrous female

- Transparent partitions: Visual, auditory, and olfactory stimuli

As predicted (Table 1), WT males showed a preference for the estrous female (Fig. 2A). By contrast, AFP-KO females showed a preference for the ovx female whereas WT females showed a preference for the estrous female (Table 2; Fig. 2A). These latter results were not predicted.

ANOVA showed a significant interaction between stimulus and sex/genotype ( $F(2,21) = 15.24, P < 0.001$ ). Post-hoc analysis indicated that both WT males and females spent more time investigating the side containing the estrous female over the side containing the ovx female whereas it was reverse with regard to AFP-KO females.

- Opaque partitions: auditory and olfactory stimuli

When visual stimuli were blocked by using opaque partitions, none of the experimental groups showed any mate preferences (Fig. 2B). There was a slight trend for a preference for the estrous female in WT mice of both sexes, which was not shown by AFP-KO females.

Choice: Gonadally intact male versus gdx male

- Transparent partitions: Visual, auditory, and olfactory stimuli

As predicted (Table 1), WT females showed a preference for the intact male, whereas no clear mate preferences were discerned in AFP-KO females and WT males (Fig. 3A).

ANOVA on the time spent investigating either the intact male or the gdx male showed a significant interaction between stimulus and sex/genotype ( $F(2,21) = 5.25, P = 0.014$ ). Post-hoc analysis indicated that WT females spent more time investigating the side containing the intact male over the one containing the gdx male, whereas AFP-KO females and WT males spent equivalent amounts of time investigating both sides.

- Opaque partitions: auditory and olfactory stimuli

When the intact male and gdx male were placed behind opaque partitions, very similar results were obtained, i.e., WT females showed a preference for the intact male and AFP-KO females did not show any mate preference (Fig. 3B). By contrast, WT males showed a preference for the intact male.

This was confirmed by ANOVA on the time spent investigating the intact male versus the gdx male showing a significant interaction between stimulus and sex/genotype ( $F(2,21) = 5.31, P = 0.014$ ). Post-

Table 1

Theoretical predictions and summary of mate preferences observed under different choice paradigms in the three compartment box. Our working hypothesis was that AFP-KO females might resemble WT males since they are overexposed to estrogens during prenatal development. Overall AFP-KO females never showed the same mate preference as WT females, suggesting that their mate preferences has been defeminized. Abbreviations: int = gonadally intact; est = estrous; ovx = ovariectomized; gdx = gonadectomized; E2 + P = estradiol and progesterone treatment; Pred = theoretical predictions; TP = transparent partitions; OP = opaque partitions.

| Group | Hormonal treatment | Preferences during stimuli presentation |                 |                 |                                     |                 |      |                                   |                |                |
|-------|--------------------|---|-----------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|------|-----------------------------------|----------------|----------------|
|       |                    | $\sigma_{int}$ vs. $\varphi_{est}$      |                 |                 | $\varphi_{est}$ vs. $\varphi_{ovx}$ |                 |      | $\sigma_{int}$ vs. $\sigma_{gdx}$ |                |                |
|       |                    | Pred                                    | TP              | OP              | Pred                                | TP              | OP   | Pred                              | TP             | OP             |
| WT ♀  | Ovx/E2+P           | $\sigma_{int}$                          | $\sigma_{int}$  | None            | None                                | $\varphi_{est}$ | None | $\sigma_{int}$                    | $\sigma_{int}$ | $\sigma_{int}$ |
| WT ♂  | Int                | $\varphi_{est}$                         | None            | $\varphi_{est}$ | $\varphi_{est}$                     | $\varphi_{est}$ | None | None                              | None           | $\sigma_{int}$ |
| KO ♀  | Ovx/E2+P           | $\varphi_{est}$                         | $\varphi_{est}$ | $\varphi_{est}$ | $\varphi_{est}$                     | $\varphi_{ovx}$ | None | None                              | None           | None           |

Please cite this article as: Brock, O., Bakker, J., Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice, *Horm. Behav.* (2010), doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.012

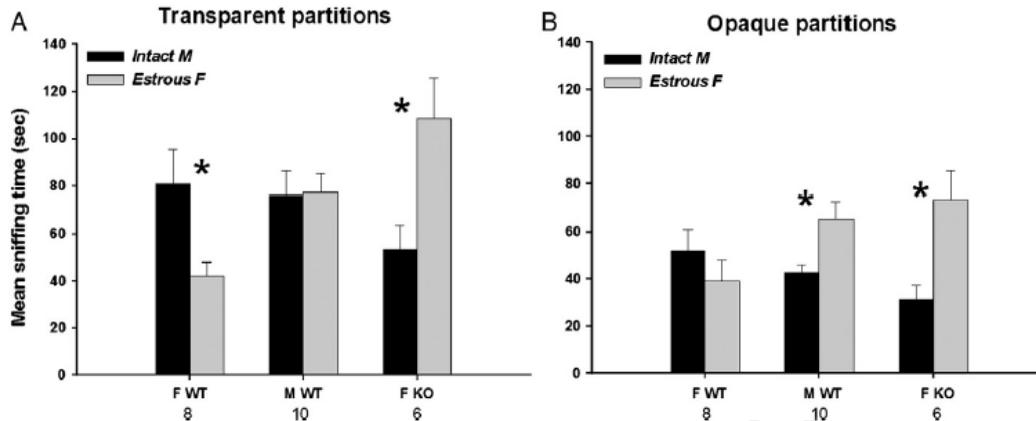


Fig. 1. Mean  $\pm$  SEM time spent by AFP-KO females (ovx and E2 + P treated) and WT males (gonadally intact) and females (ovx and E2 + P treated) mice investigating the stimulus animals when given a choice between an intact male and an estrous female behind transparent partitions allowing visual, auditory and olfactory stimulations (A) or behind opaque partitions allowing auditory and olfactory stimulations (B). The number of subjects is indicated below each sex/genotype. \* $P < 0.05$  post-hoc comparisons between the two presented stimuli.

299 hoc analysis indicated that WT males and females (almost reached  
 300 statistical significance;  $P = 0.059$ ) spent more time investigating the  
 301 side containing the intact male over the one containing the gdx male  
 302 (Fig. 3B) whereas AFP-KO females spent equal amounts of time  
 303 investigating both sides.

#### 304 Mate preferences using the Y-maze

305 In order to determine mate preferences based on olfactory cues  
 306 only, we tested the subjects in the Y-maze with the choice between  
 307 volatile odors derived from a gonadally intact male versus those  
 308 derived from an estrous female. We observed very similar results as in  
 309 the three compartment box tests. Female WT mice showed a male-  
 310 directed preference whereas female AFP-KO mice showed a female-  
 311 directed preference indicating that mate preferences are influenced

by prenatal estrogens (Fig. 4). However, WT males did not show a  
 clear mate preference.

This was confirmed by ANOVA on the time spent investigating  
 volatile body odors from an anesthetized gonadally intact male and an  
 anesthetized estrous female revealing a significant interaction  
 between odor stimulus and sex/genotype ( $F(2,20) = 5.65$ ,  
 $P = 0.011$ ). Post-hoc analysis indicated that WT females spent more  
 time investigating odors from the intact male over those from the  
 estrous female, whereas AFP-KO females spent more time investigat-  
 ing odors from the estrous female. WT males spent equal amounts of  
 time investigating both odor stimuli.

#### Discussion

The present study suggests that prenatal exposure to estradiol  
 interferes with some aspects of brain and behavioral sexual

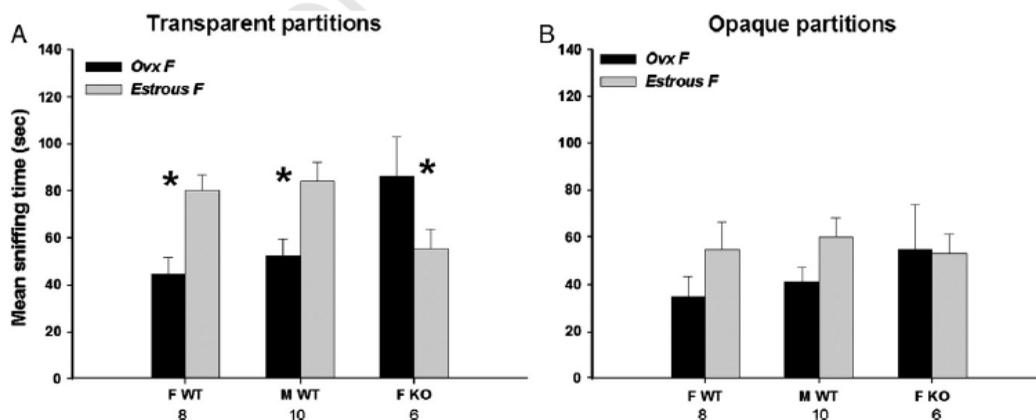


Fig. 2. Mean  $\pm$  SEM time spent by AFP-KO females (ovx and E2 + P treated) and WT males (gonadally intact) and females (ovx and E2 + P treated) mice investigating the stimulus animals when given a choice between a long-term ovariectomized and an estrous female behind transparent partitions allowing visual, auditory and olfactory stimulations (A) or behind opaque partitions allowing auditory and olfactory stimulations (B). The number of subjects is indicated below each sex/genotype. \* $P < 0.05$  post-hoc comparisons between the two presented stimuli.

Please cite this article as: Brock, O., Bakker, J., Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice, *Horm. Behav.* (2010), doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.012

ARTICLE IN PRESS

O. Brock, J. Bakker / *Hormones and Behavior* xxx (2010) xxx–xxx

5

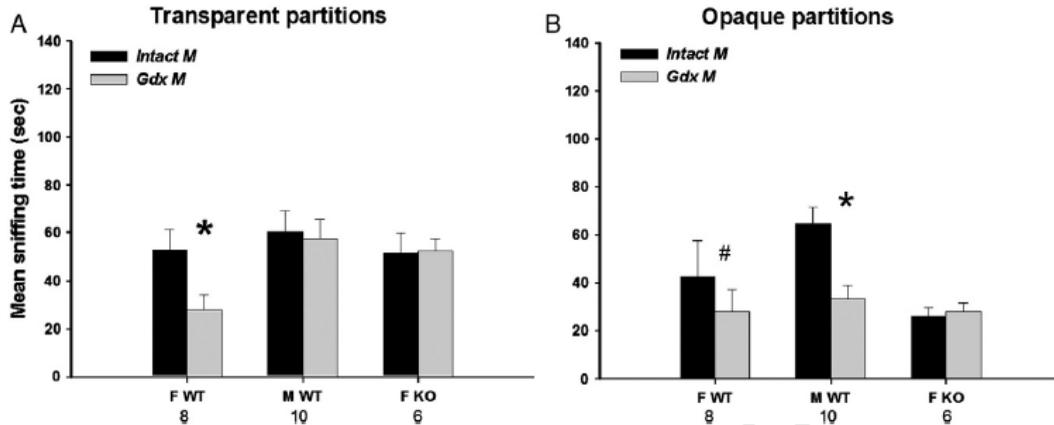


Fig. 3. Mean  $\pm$  SEM time spent by AFP-KO females (ovx and E2 + P treated) and WT males (gonadally intact) and females (ovx and E2 + P treated) mice investigating the stimulus animals when given a choice between an intact male and a long-term castrated (gdx) male behind transparent partitions allowing visual, auditory and olfactory stimulations (A) or behind opaque partitions allowing auditory and olfactory stimulations (B). The number of subjects is indicated below each sex/genotype. \* $P < 0.05$  post-hoc comparisons between the two presented stimuli and # $P < 0.09$ .

326 differentiation, such as mate preferences. Female mice carrying a  
 327 targeted mutation in the *Afp* gene did not show any mate preferences  
 328 for the intact male under any test condition. The *Afp* gene encodes the  
 329 fetal plasma protein, alpha-fetoprotein (AFP), which has a high  
 330 estradiol binding capacity (Raynaud et al., 1973). Thus AFP-KO  
 331 females are no longer protected from maternal estrogens during  
 332 embryonic development (Gabant et al., 2002; Bakker et al., 2006). This  
 333 result is in line with our earlier observation that AFP-KO females  
 334 showed no lordosis behavior when paired with a sexually active male,  
 335 and thus confirms that alpha-fetoprotein protects the brain from  
 336 defeminizing actions of estradiol on the developing neural mecha-  
 337 nisms controlling both proceptive and receptive patterns of feminine  
 338 sexual behavior. AFP-KO females did not completely resemble WT  
 339 males in their mate preferences, i.e., they did not show a preference  
 340 for the estrous female over the ovx female, as was observed in WT  
 341 males. These results suggest that the sexual differentiation of male-

typical aspects of behavior do not solely rely on the action of estradiol  
 during prenatal development, but that it may also require some  
 androgen action. Indeed, Bodo and Rissman (2008) recently observed  
 that female mice treated with a non-aromatizable androgen, i.e.,  
 dihydrotestosterone (DHT), on the day of birth, like male controls,  
 showed a preference for female-soiled versus male-soiled bedding. In  
 addition, such DHT-treated female mice showed a preference to  
 investigate an anesthetized female versus an anesthetized male in a Y-  
 maze test. The subjects in this study always had direct access to the  
 olfactory stimuli. Under similar test conditions, we also observed that  
 gonadally intact male ArKO mice resembled WT males in their  
 preference to investigate estrous female bedding over male bedding,  
 when given direct access to both types of bedding in a Y-maze (Bakker  
 et al., 2002a). These results suggest that estrogens are not involved in  
 the sexual differentiation of male-typical and thus female-directed  
 preferences when provided with predominantly non-volatile odors  
 that are contained in soiled bedding. By contrast, when nasal access to  
 the olfactory stimuli was prevented and thus only volatile odors were  
 presented, male ArKO mice failed to show a female-directed  
 preference (Bakker et al., 2002a). This deficit was not corrected by  
 adult treatment with estradiol (Bakker et al., 2004). These results  
 suggest thus a differential role for androgens versus estrogens in the  
 sexual differentiation of male-typical preferences depending on  
 whether the animals have direct access or not to the odor sources.  
 However, we cannot exclude any activational effects of gonadal  
 hormones on mate preferences. Clearly the hormonal status of our  
 subjects, i.e., AFP-KO females and WT males, were not the same at the  
 time of behavioral testing. AFP-KO females were ovariectomized in  
 adulthood and subsequently treated with estradiol and progesterone  
 to induce behavioral estrus, whereas WT males were left gonadally  
 intact. We chose these hormonal regimens in order to test the animals  
 under the most natural hormonal conditions. However, this difference  
 in circulating hormone levels might explain why WT males showed a  
 preference for the estrous female when given the choice between an  
 ovx and an estrous female, whereas female AFP-KO mice did not show  
 this preference. Perhaps if the latter would have been treated with  
 testosterone in adulthood, we would have observed identical mate  
 preferences between WT males and AFP-KO females. Future studies  
 will address this possibility.

Clearly mice can use either volatile or non-volatile odors to seek out  
 a potential mating partner. Traditionally the main olfactory system is

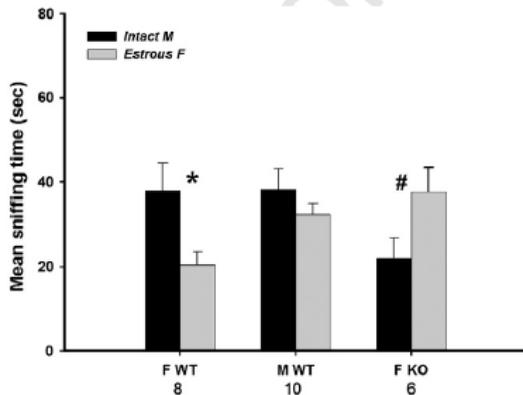


Fig. 4. Mean  $\pm$  SEM time that AFP-KO female (ovx and E2 + P treated) and WT male (gonadally intact) and female (ovx and E2 + P treated) mice spent investigating volatile body odors when given a choice between intact male odors and estrous female volatile odors in a Y-maze. The number of subjects is indicated below each sex/genotype. \* $P < 0.05$  and # $P < 0.09$  male versus female odor stimuli.

Please cite this article as: Brock, O., Bakker, J., Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice, *Horm. Behav.* (2010), doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.012

383 considered to be important to detect and process volatile odors  
 384 whereas the accessory olfactory system is thought to primarily detect  
 385 and process non-volatile odors and to integrate them into the  
 386 neuroendocrine system leading to behavioral changes. However,  
 387 lesion studies have shown that the main olfactory system is crucial  
 388 for mate recognition in both male and female mice whereas the  
 389 accessory olfactory system seems to be less important (reviewed in  
 390 Keller et al., 2009). Thus lesions of the main olfactory epithelium  
 391 (MOE) completely abolished mate preferences (both with and without  
 392 access to the odor stimuli) whereas lesions of the vomeronasal organ  
 393 (VNO) only disrupted mate preferences when direct nasal access was  
 394 provided to the odor stimuli. The latter finding suggests that the VNO  
 395 and thus investigation of non-volatile odors (as contained in bedding)  
 396 can contribute to the animals' motivation to approach and investigate  
 397 potential mates. With regard to the role of gonadal hormones in the  
 398 sexual differentiation of mate preferences, the accessory olfactory  
 399 system has sexually dimorphic characteristics (both morphological  
 400 and functional) at several stages along its projection pathway to the  
 401 hypothalamus (Bakker et al., 1996a; Bressler and Baum, 1996;  
 402 Guillaumon and Segovia, 1997), and sex steroids upregulate the ability  
 403 of pheromones to activate neurons throughout this system (Paredes  
 404 et al., 1998). There is also evidence of sexually differentiated function  
 405 in the main olfactory system, although these sex differences are less  
 406 well-described. In habituation/dishabituation studies using gonadec-  
 407 tomized mice (Baum and Keverne, 2002; Pierman et al., 2006), females  
 408 responded more reliably than males to low concentrations of volatile  
 409 urinary odors from either sex. Furthermore, male ArKO mice  
 410 resembled WT females in their ability to respond to lower concentra-  
 411 tions of male urinary odors (Pierman et al., 2006), raising the  
 412 possibility that the observed sex difference among WT mice in urine  
 413 attraction thresholds results from the perinatal actions of estrogen in  
 414 the male nervous system. However whether these sex differences in  
 415 urine attraction thresholds and thus main olfactory function relate to  
 416 the sex differences observed in mate preferences is rather unlikely  
 417 since these sex differences are already present in the absence of any  
 418 circulating gonadal hormones, whereas mate preferences clearly need  
 419 to be activated by gonadal hormones. Thus, how males and females  
 420 respond differently to olfactory cues may hold key to the neural basis  
 421 of mate preferences but clearly more studies are needed to unravel the  
 422 role of both olfactory systems in mate preference and in particular how  
 423 these neural and behavioral responses are sexually differentiated by  
 424 gonadal hormones.

425 In the present study when responding to visual, auditory and/or  
 426 olfactory stimuli (transparent partitions in the three compartment  
 427 box), AFP-KO females showed a robust preference for the estrous  
 428 female over the male indicating that their mate preferences might  
 429 have been masculinized or defeminized. Likewise, they did not show a  
 430 preference for the intact male when given a choice between an intact  
 431 male and a gdx male, whereas WT females clearly preferred the intact  
 432 male. When we eliminated visual stimuli using opaque partitions to  
 433 separate the two side compartments from the middle one, we  
 434 observed some quantitative differences in investigation times of the  
 435 male and female stimuli, but we observed the same pattern in AFP-KO  
 436 females, i.e., a preference for the estrous female. Since it has been  
 437 reported that the CD1 mouse strain (the background strain of the AFP-  
 438 KO mice) show a hereditary deafness (Shone et al., 1991; GMC  
 439 Coordination Team, Germany, personal communication), we could  
 440 consider that when using opaque partitions, their mate preference is  
 441 mostly based on olfactory stimuli; thus, results obtained in the 3  
 442 compartment box test with opaque partitions may be compared  
 443 directly to those obtained in the Y-maze test using anesthetized  
 444 subjects and thus volatile odors as stimuli. Hence when using the Y-  
 445 maze, we found the same result, i.e., a female-directed mate  
 446 preference in AFP-KO females. By contrast, mate preferences were  
 447 less clear in WT males: they showed no preference for either stimulus  
 448 animal. This may be due to the fact that WT males are also attracted to

449 male odors for non-sexual reasons, such as aggression and territori-  
 450 ality. However, when AFP-KO females were provided with the choice  
 451 between an estrous and an ovx female, they failed to show the male  
 452 pattern, i.e., a preference for the estrous female, indicating that they  
 453 have not really been masculinized but rather have been defeminized  
 454 regarding some aspects of brain and behavioral sexual differentiation,  
 455 such as to approach a sexually active male. However, as mentioned  
 456 above, it could be possible that when AFP-KO females are tested under  
 457 testosterone treatment instead of under estrous conditions, they will  
 458 show the male pattern in mate preferences.

459 Finally, our current finding of a female- and not a male-directed  
 460 preference in AFPKO females is in contrast with our earlier result of a  
 461 male-directed preference in these mice (Bakker et al., 2007). This  
 462 discrepancy can only be explained by differences in hormonal  
 463 treatments of the subjects, i.e., estradiol and progesterone in the  
 464 present study versus estradiol alone in our previous study, under-  
 465 lining thus the importance of hormonal status to observe any  
 466 genotype and sex differences in mate preferences.

#### Acknowledgments

467 This work was supported by the following grants: Fonds National  
 468 de la Recherche Scientifique (FNRS) (Mandat d'Impulsion Scientifique  
 469 F.4502.07) and the NICHD (HD044897) to Dr. Bakker. Dr. Bakker is a  
 470 Research Associate of the FNRS. We also thank Dr. Mike Baum for  
 471 commenting on an earlier version of the manuscript.  
 472

#### References

- 473  
 474 Bakker, J., 2003. Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating  
 475 mate recognition in mammals. *J. Neuroendocrinol.* 15, 615–621.  
 476 Bakker, J., Brand, T., van Ophemert, J., Slob, A.K., 1993. Hormonal regulation of adult  
 477 partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav. Neurosci.*  
 478 107, 480–487.  
 479 Bakker, J., Baum, M.J., Slob, A.K., 1996a. Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis  
 480 alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the  
 481 male rat. *Neuroscience* 74, 251–260.  
 482 Bakker, J., Van Ophemert, J., Slob, A.K., 1996b. Sexual differentiation of odor and partner  
 483 preference in the rat. *Physiol. Behav.* 60, 489–494.  
 484 Bakker, J., Honda, S., Harada, N., Balthazart, J., 2002a. Sexual partner preference requires  
 485 a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm. Behav.* 42, 158–171.  
 486 Bakker, J., Honda, S., Harada, N., Balthazart, J., 2002b. The aromatase knock-out mouse  
 487 provides new evidence that estradiol is required during development in the female  
 488 for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J. Neurosci.* 22,  
 489 9104–9112.  
 490 Bakker, J., Honda, S., Harada, N., Balthazart, J., 2004. Restoration of male sexual behavior  
 491 by adult exogenous estrogens in male aromatase knock-out mice. *Horm. Behav.* 46,  
 492 1–10.  
 493 Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpírer, J., Szpírer, C., 2006.  
 494 Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculiniza-  
 495 tion and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* 9, 220–226.  
 496 Bakker, J., De Mees, C., Szpírer, J., Szpírer, C., Balthazart, J., 2007. Exposure to oestrogen  
 497 prenatally does not interfere with the normal female-typical development of odour  
 498 preferences. *J. Neuroendocrinol.* 19, 329–334.  
 499 Baum, M.J., Keverne, E.B., 2002. Sex difference in attraction thresholds for volatile odors  
 500 from male and estrous female mouse urine. *Horm. Behav.* 41, 213–219.  
 501 Bodo, C., Rissman, E.F., 2008. The androgen receptor is selectively involved in  
 502 organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinology* 149,  
 503 4142–4150.  
 504 Bressler, S.C., Baum, M.J., 1996. Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the  
 505 rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience*  
 506 71, 1063–1072.  
 507 De Mees, C., Laes, J.F., Bakker, J., Smits, J., Hennuy, B., Van Vooren, P., Gabant, P., Szpírer,  
 508 J., Szpírer, C., 2006. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal  
 509 development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an  
 510 antiestrogenic action. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2012–2018.  
 511 Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Van Reeth, T., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smits,  
 512 J., Alexandre, H., Szpírer, C., Szpírer, J., 2002. Alpha-fetoprotein, the major fetal  
 513 serum protein, is not essential for embryonic development but is required for  
 514 female fertility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 12865–12870.  
 515 Gonzalez-Martinez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpírer, C., Bakker, J., 2008. Absence of  
 516 gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein  
 517 knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory  
 518 luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 149, 2333–2340.  
 519 Guillaumon, A., Segovia, S., 1997. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res.*  
 520 Bull. 44, 377–382.

Please cite this article as: Brock, O., Bakker, J., Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice, *Horm. Behav.* (2010), doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.012

## ARTICLE IN PRESS

O. Brock, J. Bakker / *Hormones and Behavior xxx (2010) xxx–xxx*

7

- 521 Keller, M., Baum, M.J., Brock, O., Brennan, P.A., Bakker, J., 2009. The main and the  
522 accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual  
523 behavior. *Behav. Brain Res.* 200, 268–276.
- 524 Paredes, R.G., Lopez, M.E., Baum, M.J., 1998. Testosterone augments neuronal Fos  
525 responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of  
526 gonadectomized male and female rats. *Horm. Behav.* 33, 48–57.
- 527 Pierman, S., Douhard, Q., Bakker, J., 2006. Attraction thresholds and sex discrimination  
528 of urinary odorants in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm.*  
529 *Behav.* 49, 96–104.
- Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Gallet-Bourquin, D., Philibert, D., Tournemine, C., Azadian- 530  
Baulanger, G., 1973. Comparative study of estrogen action. *Mol. Pharmacol.* 9, 531  
520–533.
- Shone, G., Raphael, Y., Miller, J.M., 1991. Hereditary deafness occurring in *cd/1* mice. 532  
*Hear. Res.* 57, 153–156. 534
- Wersinger, S.R., Rissman, E.F., 2000. Oestrogen receptor alpha is essential for female- 535  
directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone- 536  
induced luteinizing hormone surge in male mice. *J. Neuroendocrinol.* 12, 537  
103–110. 538

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: Brock, O., Bakker, J., Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice, *Horm. Behav.* (2010), doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.012

## II.2 Principaux résultats & discussion

Au cours de cette étude utilisant le paradigme du 3CB afin d'évaluer les préférences sexuelles chez la souris, nous avons démontré que les femelles AFP-KO ne développent jamais de préférence robuste pour un mâle. En effet :

- lors d'un choix entre une femelle sexuellement réceptive et un mâle intact, les femelles AFP-KO montrent une préférence dirigée vers la femelle, tandis que les femelles WT préfèrent clairement le mâle ;
- lors d'un choix entre un mâle intact et un mâle castré, les femelles AFP-KO ne montrent aucune préférence significative, tandis que les femelles WT préfèrent clairement le mâle intact.

Ainsi, ces données illustrent que l'exposition prénatale aux œstrogènes altèrent les préférences sexuelles chez les femelles AFP-KO, confirmant ainsi le rôle déféminisant des œstrogènes prénataux sur le développement des substrats neuronaux médiant le comportement reproducteur de type femelle.

Cependant, les préférences sexuelles des femelles AFP-KO ne sont pas complètement masculinisées ; par exemple, ces sujets n'investissent pas plus longtemps une femelle sexuellement réceptive par rapport à une femelle ovariectomisée, tandis que les mâles WT préfèrent largement la femelle sexuellement réceptive. Cette observation suggère que la différenciation sexuelle des aspects comportementaux de type mâle ne requiert pas uniquement l'action des œstrogènes prénataux, mais peut-être aussi celle des androgènes. Afin de vérifier cette hypothèse de manière indéniable, nous devrions concevoir une expérience supplémentaire administrant un traitement hormonal identique aux femelles AFP-KO et aux mâles WT. En effet, la divergence des résultats entre ces 2 groupes expérimentaux quant au choix « femelle sexuellement réceptive *versus* femelle ovariectomisée » peut simplement résulter d'un environnement hormonal différent à l'âge adulte, les femelles AFP-KO

étant traitées avec de l'E<sub>2</sub> et de la progestérone et les mâles ne recevant aucun traitement (et donc exposés normalement aux effets de leur T endogène). Ainsi, si nous administrions de la T à l'âge adulte (aromatisable par les 2 groupes d'individus gonadectomisés), nous pourrions peut-être induire, chez les femelles AFP-KO, une préférence dirigée vers la femelle sexuellement réceptive. Dans ce cas précis, nous pourrions dès lors avancer que les œstrogènes prénataux déféminisent et masculinisent les aspects comportementaux reproducteurs de type femelle ; dans le cas contraire (pas de préférence dirigée vers la femelle sexuellement réceptive chez des femelles AFP-KO traitées avec de la T à l'âge adulte), la masculinisation de ces composantes comportementales de type mâle nécessiterait alors l'action de métabolites androgéniques périnataux, tandis que leur activation à l'âge adulte est déclenchée par l'E<sub>2</sub> (Bakker et al., 2004).

Cette étude démontre également que le dispositif 3CB est tout à fait approprié à l'évaluation des préférences sexuelles chez la souris. En effet, pour un choix présentant une femelle sexuellement réceptive et un mâle intact, nous montrons exactement la même tendance de déféminisation/masculinisation des préférences exprimées par les femelles AFP-KO que ce soit au sein du 3CB ou du labyrinthe en Y.

Enfin, ces données soulignent également l'importance de l'environnement hormonal requis afin d'induire un comportement spécifique (effet activateur) ; en administrant à la fois de l'E<sub>2</sub> et de la progestérone, nous avons réussi à inverser les préférences sexuelles des femelles AFP-KO comparativement à l'étude de Bakker et al (2007). Nous pensons que les résultats actuels sont plus cohérents, dans le sens où l'état hormonal d'œstrus (E<sub>2</sub> + progestérone) induit chez une femelle se rapproche le plus des conditions physiologiques naturelles dans lequel un individu se trouve lorsqu'il cherche à se reproduire.

### **III. Rôle des œstrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle du traitement des stimuli socio-sexuels chez la souris**

#### **III.1 Introduction**

Au cours de l'étude précédente, nous avons démontré que des femelles AFP-KO, déficientes en alpha-foetoprotéine liant les œstrogènes prénataux avec une haute affinité, ne montraient jamais de préférence sexuelle dirigée vers un individu mâle (Brock and Bakker, 2010). Or, l'olfaction étant essentielle à la reconnaissance sociale et à l'expression de comportements reproducteurs appropriés chez la souris (Thompson and Edwards, 1972; Edwards and Burge, 1973; Keller et al., 2006a,b), nous avons d'abord postulé que les déficits observés au niveau du choix du partenaire sexuel adéquat chez les femelles AFP-KO pouvaient résulter d'une incapacité à répondre aux indices olfactifs émis par leurs conspécifiques. Cependant, nous avons récemment montré que les sujets AFP-KO, mâles et femelles, parvenaient à détecter et à discriminer des odeurs urinaires volatiles aussi bien que leurs homologues WT (Voir Article 4 ; Keller et al., 2010). Par ailleurs, les préférences sexuelles étant contrôlées par des substrats neuronaux sexuellement différenciés par l'action périnatale des hormones gonadiques (Bakker, 2003), nous avons dès lors postulé que les déficits observés chez les femelles AFP-KO pouvaient résulter d'une altération de l'intégration des stimuli olfactifs au sein de noyaux cérébraux spécifiques.

Afin d'étudier un tel processus, nous avons appliqué de l'urine mâle (ou de l'eau, traitement contrôle) directement sur le museau des sujets expérimentaux afin d'étudier par la suite, l'expression de la protéine Fos (marqueur de l'activité neuronale induite par l'exposition à ces odeurs) au sein de différents noyaux faisant partie intégrante de la circuiterie cérébrale médiant le comportement reproducteur. Cette technique d'exposition est utilisée couramment au sein de notre laboratoire (Pierman et al., 2008) ainsi que par d'autres groupes de recherches (Reyes et al., 2004).

## **FEMALE MICE DEFICIENT IN ALPHA FETOPROTEIN SHOW A FEMALE-TYPICAL NEURAL PROCESSING OF MALE-DERIVED PHEROMONES**

Olivier Brock<sup>1</sup>, Matthieu Keller<sup>2</sup>, Quentin Douhard<sup>1</sup> and Julie Bakker<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GIGA-Neurosciences, University of Liege, Avenue de l'Hôpital 1 (B36), 4000 Liege, Belgium

<sup>2</sup> Behavioural & Reproductive Physiology, UMR 6175 INRA/CNRS/University of Tours, Nouzilly, France

### **Abstract**

The neural mechanisms controlling sexual behaviour are sexually differentiated by the perinatal actions of sex steroid hormones. We recently observed using female mice deficient in alpha-fetoprotein (AFP-KO) and which lack the protective actions of AFP against maternal estrogens, that exposure to prenatal estrogens completely defeminized the potential to show lordosis behaviour in adulthood. Furthermore, AFP-KO females failed to show any male-directed mate preferences following treatment with estradiol and progesterone, indicating a reduced sexual motivation to seek out the male. In the present study, we asked whether neural responses to male-derived odors are also affected in AFP-KO female mice. Therefore, we compared patterns of Fos, the protein product of the immediate early gene, *c-fos*, commonly used as a marker of neuronal activation, between wild-type (WT) and AFP-KO female mice following exposure to male urine. We also included WT males to confirm the previously observed sex differences in neural responses to male urinary odors. Interestingly, AFP-KO females showed normal, female-like Fos responses, i.e. they had equivalent levels of Fos protein in the central portions of the accessory olfactory system (medial part of the bed nucleus stria terminalis, medial part of the preoptic nucleus) as well as in the lateral part of the

ventromedial hypothalamic nucleus, as WT females, whereas WT males did not show any significant induction of Fos protein in these brain areas. These results suggest that prenatal estrogens are not involved in the sexual differentiation of neural Fos responses to male-derived odors.

**Keywords:**  $\alpha$ -fetoprotein knockout, sexual differentiation, estradiol, olfaction, hypothalamus

### **Introduction**

In mice, body odors provide essential information about the sex, social, and reproductive status of conspecifics (Brown, 1979) and may thus play a key role in mate recognition and mate preferences. These socially relevant odors are detected by either the main or the accessory olfactory system or both. The main olfactory system is usually used to detect volatile odors derived from food, predators and potential mates (Firestein, 2001), whereas the accessory olfactory system is thought to detect non-volatile odors that influence reproductive and aggressive behaviors (Keverne, 1999). The accessory olfactory system has sexually dimorphic characteristics (morphological and functional) along its projection pathway, indicating an important role for sex steroid hormones in its development and functioning (Bakker et al., 1996a; Bressler & Baum, 1996; Guillamon & Segovia, 1997). For instance, sex differences in immediate early gene (*c-Fos*) responses were observed along the entire accessory olfactory projection pathway when mice were exposed to bedding soiled by gonadally intact males (Halem et al., 1999). These sex differences may reflect the perinatal action of estrogens in the male brain as male rats treated neonatally with an aromatase inhibitor showed female-typical *c-Fos* responses when exposed to male odors (Bakker et al., 1996a). However, using the aromatase knock-out mouse model (ArKO) which carries a targeted mutation in the aromatase gene thereby rendering these animals incapable of converting androgens into estrogens, Pierman et al (2008) showed that male ArKO mice did not show female-typical neural Fos responses to male odors. In addition, female ArKO mice showed

normal female-like levels of Fos-ir when exposed to male odors (data non-published). These data thus suggest that estradiol might not be involved in the sexual differentiation of olfactory responses in the mouse. Accordingly, Bodo & Rissman (2007) showed that male Tfm mice (carrying the testicular feminization mutation of the androgen receptor), like WT females, showed Fos responses to male urinary odors in the central portions of the accessory olfactory system, i.e. in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis, whereas no such induction was observed in males. This suggests that in contrast with the male rat, the sexual differentiation of neural *c-Fos* responses to male odors may not reflect the perinatal actions of estrogens, but those of androgens in the male mouse nervous system.

Mate preferences are controlled by neural mechanisms that are sexually differentiated by the perinatal actions of sex steroid hormones (Bakker, 2003). Interestingly, we recently observed that female mice carrying a mutation in the *Afp* gene (AFP-KO) which encodes the major fetal plasma protein alpha-fetoprotein that binds estradiol (E<sub>2</sub>) with high affinity did not show any male-directed mate preferences when tested under estrous conditions (Brock and Bakker, 2010). This finding is in line with our previous observations of female AFP-KO mice being clearly defeminized with regard to their female sexual behavior, i.e. lordosis behavior (Bakker *et al.*, 2006) as well as their GnRH/Kisspeptin system, i.e. no steroid induced LH surges (De Mees *et al.*, 2006; Gonzalez-Martinez *et al.*, 2008). As olfaction is essential for both mate recognition and expression of courtship behaviors in mice (Thompson and Edwards, 1972; Edwards and Burge, 1973; Keller *et al.*, 2006a,b), we hypothesized here that the absence of male-directed mate preferences in AFP-KO females might reflect an inability to respond to male-derived olfactory cues. However, this inability might reflect more the integration of olfactory cues instead of their detection since we recently showed that AFP-KO animals can discriminate between male and female urinary odors (Keller *et al.*, 2010).

Therefore, in the present study, we compared profiles of Fos protein between female WT and AFP-KO mice following exposure to male urinary odors. We also included WT males as experimental group in order to confirm previously observed sex differences in neural Fos responses to male-derived odors.

## **Materials and methods**

### **Animals**

All breeding and genotyping were performed at the GIGA Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium. In the present study, male and female mice heterozygous for the allele  $Afp^{tm11bmm}$  (in the *CD1* background strain; (Gabant *et al.*, 2002; Bakker *et al.*, 2006) were bred to generate wild type (WT) and homozygous-null (AFP-KO) offspring. Mice were genotyped by PCR analysis of tail DNA (for more detailed description, see (Bakker *et al.*, 2006; Bakker *et al.*, 2007). Subjects were weaned at 21 days and placed into individual cages under a reversed light-dark cycle (12 h: 12 h light/dark; 20.00 h lights on and 8.00 h lights off) in special light and temperature controlled housing units. Food and water were always available *ad libitum*.

After completion of a series of behavioural tests (for details, see Brock and Bakker, 2010), male subjects (6 months of age,  $n = 14$ ) were gonadectomized under general anaesthesia after an intraperitoneal injection (i.p.) of a mixture of ketamine (80mg/kg per mouse) and medetomidine (Domitor, Pfizer, 1 mg/kg per mouse). Mice received atipamezole (Antisedan, Pfizer, 4 mg/kg per mouse) subcutaneously (s.c.) at the end of the surgery in order to antagonize medetomidine-induced effects, thereby accelerating their recovery. Female subjects ( $n = 26$ ) were already ovariectomized at 3 months of age for the behavioural studies. All subjects received daily injections with estradiol-benzoate (EB, 5  $\mu$ g) for two weeks in order to provide an identical  $E_2$  regimen to all groups of mice. Half of the subjects was exposed to male urine (WT: 8 females and 7 males; AFP-KO: 6 females) whereas the other half was exposed to deionised water (WT: 8 females and 7 males; AFP-KO: 4 females) to serve as control.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines set forth by the National Institutes of Health “Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals”, and were approved by the Ethical Committees for Animal Use of the University of Liege.

### **Urine collection**

Male urine was collected from 8 gonadally intact *CD1* males by holding the mouse by the scruff of the neck over an Eppendorf vial and by pushing gently on its bladder. Urine stimulus samples were pooled and subsequently aliquoted in 500µl Eppendorf vials and stored at -80°C until use.

### **Urine exposure**

Male and female subjects were housed in two separate housing units to minimize their exposure to opposite-sex odors. Subjects were then trained daily, during 4 days, to the manipulation used for urine exposure. During the dark phase of the light/dark cycle, animals were taken out of their home cage and received 30 µl of deionized water directly onto their nose and were then placed back into their home cage. On the day of testing, mice were exposed to either intact male urine or to deionized water to serve as control. The latter group was housed separately from the animals that were going to be exposed to male urine. After exposure to the odor stimulus, the subject was placed back again into the home cage in which either some fresh (for the controls) or some soiled male bedding was placed.

Ninety minutes following the initial urine exposure, subjects were anaesthetized and perfused transcardially with saline followed immediately by 4% cold paraformaldehyde. Brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde for 2 hours. Then brains were cryoprotected in 30% sucrose/PBS solution and when sunken, frozen on dry ice and stored at -80°C. Sections of 30µm were cut on a Leica CM3050S cryostat. Forebrains were cut coronally from the level of the nucleus accumbens until

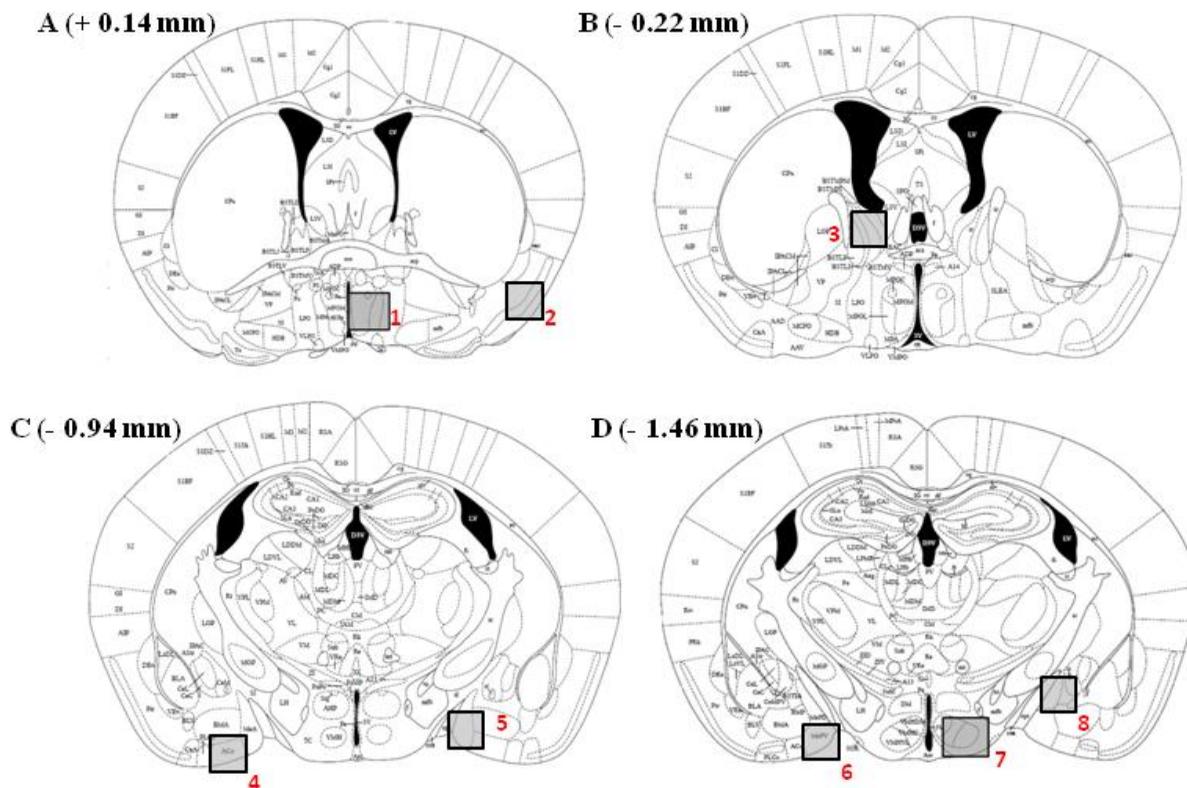
the end of the hippocampus. Sections were saved in four different series, placed in antifreeze solution, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later immunohistochemistry.

### **Immunocytochemistry**

All brain sections were processed for Fos immunoreactivity as previously described (Halem *et al.*, 2001; Pierman *et al.*, 2008). All incubations were carried out at room temperature ( $22^{\circ}\text{C}$ ) and all washes of brain tissue sections were performed using phosphate-buffered saline (PBS) or phosphate-buffered saline containing 0.1% Triton X-100 (PBST). Briefly, sections were pre-incubated for 3 hours in 7.5% normal goat serum (NGS) in PBST. Sections were then incubated overnight with a rabbit polyclonal anti-*c-fos* antibody (1:3000 in PBST/2% NGS; Santa Cruz – c-Fos (4): sc-52) followed by an incubation for 2 hours in a goat anti-rabbit biotinylated antibody (1:1000 in PBST; Dako Cytomation, Denmark). To eliminate endogenous peroxidase activity, sections were incubated for 30 minutes in PBS containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  at a final concentration of 0.6%. Sections were then incubated for 45 minutes in avidin-biotin complex (ABC, Vector Laboratory) and rinsed in 0.175 M sodium acetate. Sections were reacted for 4 minutes in a sodium acetate solution containing Nickel (II) Sulfate,  $\text{H}_2\text{O}_2$  at a final concentration of 3%, and diaminobenzidine at a final concentration of 0.05%. Sections were then washed, mounted onto gelatin-coated slides, dried overnight, left in SafeSolv for 10 minutes (Labonord) and coverslipped using SafeMount (Labonord).

### **Data analysis**

Numbers of Fos-immunoreactive (ir) cells were counted in several brain areas (Fig. 1) implicated in the accessory and main olfactory pathways (Paxinos & Franklin, 2001). Numbers of Fos-ir cells were quantified by an experimenter who was blind to the experimental treatment of mice, using a light microscope with a magnification of 10X20 and a cell-count analysis software (computerized image analysis: Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France) that also yields information on the level of gray of each counted object.



**Fig. 1.** Drawings taken from the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (2001) showing the location of forebrain regions where Fos-ir cells were quantified (*shaded areas* in each panel) in the MPOA (A1 : Figure 30 of the mouse atlas : interaural, 3.94 mm; bregma, 0.14 mm), PIR (A2 : Figure 30 of the mouse atlas : interaural, 3.94 mm; bregma, 0.14 mm), BnsT (B3 : Figure 33 of the mouse atlas : interaural, 3.58 mm; bregma, -0.22 mm), ACo (C4 : Figure 39 of the mouse atlas : interaural, 2.86 mm; bregma, -0.94 mm), MeA (C5: Figure 39 of the mouse atlas : interaural, 2.86 mm; bregma, -0.94 mm), MePV (D6 : Figure 43 of the mouse atlas : interaural, 2.34 mm; bregma, -1.46 mm), VMHvl (D7 : Figure 43 of the mouse atlas : interaural, 2.34 mm; bregma, -1.46 mm) and MePD (D8 : Figure 43 of the mouse atlas : interaural, 2.34 mm; bregma, -1.46 mm). The distance of each coronal brain slice in front of (+) or behind (-) bregma is given for each panel.

## Statistics

The number of Fos-immunoreactive cells were analysed using two-way analysis of variance (ANOVA – Statistica 8.0) with the number of Fos-ir cells as the dependent measure and sex/genotype as independent factors. When appropriate, all ANOVAs were followed by Fisher Least Significant Difference *post-hoc* comparisons. Only significant ( $P < 0.05$ ) effects are presented below.

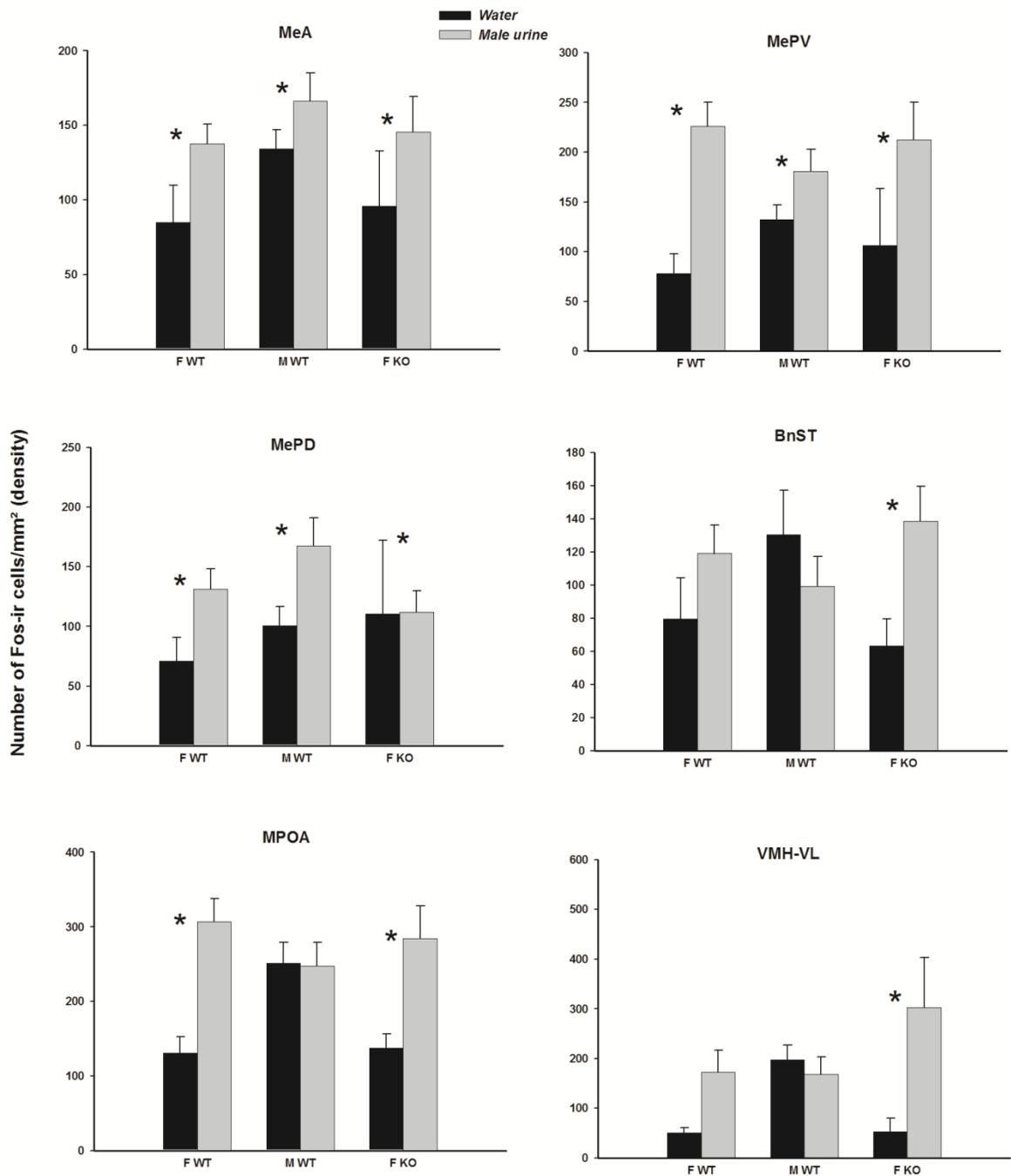
## Results

### Accessory olfactory pathway

Overall, in WT females as well as in AFP-KO females, exposure to male urine induced a significant expression of Fos in several brain regions receiving inputs from the accessory olfactory bulbs, including parts of the amygdala (MeA, MePV, MePD) and the MPOA. Only AFP-KO females showed a significant Fos activation in the BnST and the VMH-L. These neural Fos responses to intact male urine were sexually dimorphic for the more central regions of the accessory olfactory pathways, such as the MPOA, VMH-L and the BnST, with only females (WT and AFP-KO) but not males showing any significant Fos activation (Fig. 2).

ANOVA on the number of Fos-ir cells showed a significant effect of odour exposure in the MeA ( $F(1,36) = 6.33, P = 0.016$ ), MePD ( $F(1,35) = 4.67, P = 0.038$ ), MePV ( $F(1,34) = 18.94, P < 0.001$ ), MPOA ( $F(1,35) = 15.98, P < 0.001$ ), and the VMH-L ( $F(1,29) = 7.11, P = 0.012$ ). We also observed a significant interaction between the stimulus and sex/genotype in the BnST ( $F(2,35) = 2.57, P = 0.09$ ), the MPOA ( $F(2,35) = 4.92, P = 0.013$ ) and in the VMH-L ( $F(2,29) = 3.53, P = 0.043$ ). *Post-hoc* analysis indicated that only AFP-KO females showed a significant Fos activation in the BnST and in the VMH-L whereas AFP-KO and WT females showed a significant Fos activation in the MPOA.

RÉSULTATS

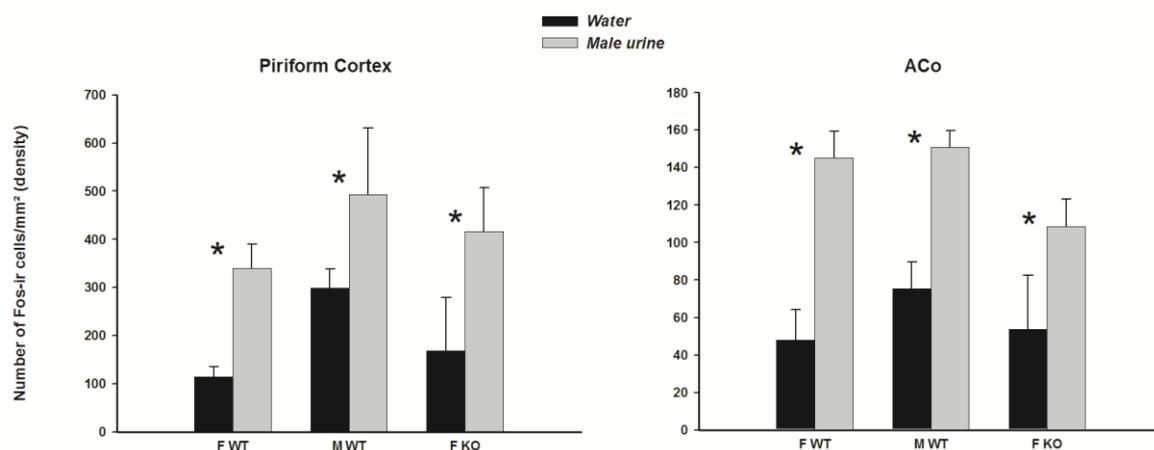


**Fig. 2.** Mean +/- SEM number of Fos-ir cells per mm<sup>2</sup> (density) in some brain regions which are part of the accessory olfactory pathway in male (castrated and EB treated) and female WT and AFP-KO female (ovx and EB treated) mice exposed to either water

or male urinary odors. \*  $P < 0.05$  significant Fos activation in response to male urine exposure when compared to exposure with deionised water.

### Main olfactory pathway

Exposure to urine derived from intact males induced significantly more Fos-ir cells in the piriform cortex and the ACo than exposure to water and this Fos response was quite similar between WT mice of both sexes and AFP-KO female mice (Fig. 3). ANOVA on the number of Fos-ir cells revealed that this activation was significant in the piriform cortex ( $F(1,34) = 11.10$ ,  $P = 0.002$ ) and in the ACo ( $F(1,32) = 34.07$ ,  $P < 0.001$ ).



**Fig. 3.** Mean  $\pm$  SEM number of Fos-ir cells per  $\text{mm}^2$  (density) in brain regions which are parts of the main olfactory pathway in male (castrated and EB treated) and female WT and AFP-KO female (ovx and EB treated) mice exposed to either water or male urinary odors. \*  $P < 0.05$  significant Fos activation in response to male urine exposure when compared to exposure with deionised water.

## **Discussion**

The present study showed that female mice carrying a targeted mutation in the *Afp* gene, encoding the important fetal plasma protein alpha-foetoprotein (AFP) that has high E<sub>2</sub> binding capacities (Raynaud *et al.*, 1973), had normal, female-typical Fos responses to male urinary odors in the main and accessory olfactory pathways despite the fact that they were exposed *in utero* to increased levels of estrogens. Male odors activated the BnST, the MPOA and the VMH-L which are targets of olfactory inputs and play an important role in female reproductive behavior including olfactory preferences (Robarts & Baum, 2007). Thus, prenatal exposure to estrogens does not seem to influence the processing of olfactory cues by the main and accessory olfactory systems in female mice. This result is surprising in light of our earlier studies showing a defeminizing role for prenatal estrogens in some aspects of behavioral sexual differentiation, such as mate preferences and lordosis behavior (Bakker *et al.*, 2006; Brock and Bakker, 2010).

In the present study, we did not analyze neural Fos responses in the olfactory bulbs because it has already been shown that processing of sexually relevant odors by the olfactory bulbs was not affected by the hormonal status of the respondent (Pfaff & Pfaffmann, 1969). In addition exposure to male-derived odors induced equivalent responses in Fos expression at the level of the main olfactory bulb (MOB) and the accessory olfactory bulb (AOB) in male and female mice (Halem *et al.*, 1999) as well as in ArKO versus WT mice (Pierman *et al.*, 2008). These studies thus suggest that the olfactory bulbs are probably not a critical target of estrogen action during perinatal development. The present study also confirms the presence of sexually dimorphic Fos responses in the accessory olfactory projection pathway to male urinary odors in WT mice as previously described by Halem (Halem *et al.*, 1999). Sex differences were not present in the main olfactory pathway (piriform cortex and ACo) and in the different parts of the amygdala (MeA, MePV and MePD) but emerged at the level of BnST, MPOA and VMH-L where neuronal Fos expression induced by male odors was high in

female mice and completely absent in male mice. The female-typical Fos induction shown here in WT and AFP-KO female mice is in line with earlier studies by Bodo & Rissman (2007) with regard to the MPOA and the BnST and by Pierman (2008) with regard to the VMH-L for WT subjects. These two studies also showed that ArKO males have a normal male-typical Fos pattern, i.e. no Fos induction in the MPOA, and that Tfm males (carrying a targeted mutation of the androgen receptor) showed female-like Fos responses to male odors suggesting that estrogens were not involved in the sexual differentiation of neural Fos responses. Recently, we also observed that ArKO female mice showed WT-like Fos induction in the VMH-L following exposure to urinary odors (data non-published), reinforcing the previous findings suggesting that estrogens do not interfere with the sexual differentiation of neural Fos responses to pheromonal cues. The present study further confirms this hypothesis which is in sharp contrast with rat studies showing that perinatal action of estrogens in the male rat nervous system may influence this sexual differentiation; male rats treated with ATD showed a significant Fos response (female-like) in the MPOA following exposure to male bedding (Bakker *et al.*, 1996a). More recently, Bodo & Rissman (2008) have confirmed the role of androgen receptor in the sexual differentiation of neural Fos responses; by treating female mice on the day of birth with DHT they observed that these females showed a reduced male-like Fos-immunoreactivity in the MPOA and in the BnST after exposure to male-soiled bedding.

As previously reported, female AFP-KO mice did not show any male-directed mate preferences (Brock and Bakker, 2010). The present study, however, shows that they had normal, female-typical, neural Fos responses in the accessory olfactory system when exposed to male-derived odors indicating the absence of a direct relationship between mate/odor preferences and neural Fos responses. A similar absence of a direct relationship has been described by Wersinger & Rissman (2000). They observed that male ER $\alpha$ KO mice (which lack a functional estrogen receptor  $\alpha$  gene) showed no preferences when offered the choice between an estrous female and an intact male with direct access; however, these ER $\alpha$ KO males showed male-like Fos responses to female-

soiled bedding suggesting that the neural substrates underlying the detection and processing of chemosensory cues could be uncoupled from those controlling mate preferences in mice. The same phenomenon has also been observed in rats; Bakker et al. (1996a; 1996b) showed that unlike untreated littermates, male rats treated neonatally with the aromatase inhibitor 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD), failed to show a preference for a compartment with female-soiled bedding over a compartment with male-soiled bedding. Despite this lack of preference, the pattern of Fos-ir cells after exposure to female chemosensory cues was equivalent between untreated and ATD-treated male rats. Thus, olfactory cues seemed to be correctly perceived by AFP-KO females (Keller et al., 2010) but perhaps not further integrated into their neuroendocrine system, including the kisspeptin/GnRH system. Female AFP-KO mice do not show any steroid induced luteinizing hormone surges and also have lower, male-typical, numbers of kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the third ventricle (De Mees *et al.*, 2006; Gonzalez-Martinez *et al.*, 2008). Some indirect support for this hypothesis comes from our observation (Bakker et al., 2010) that kisspeptin neurons were activated by male urinary odors in female but not in male WT mice, and that male and female GPR54 KO mice (which lack the G-protein-coupled receptor binding kisspeptin and playing reproductive roles) failed to show any sexual partner preference (Kauffman *et al.*, 2007).

In our previous behavioral studies, we assessed mate preferences after giving E<sub>2</sub> treatment combined with progesterone in adulthood since it has been clearly established that administration of both estrogen and progesterone increased levels of sexual arousal and receptivity in females (Edwards and Thompson, 1970). In the present study, neural Fos responses were assessed after giving E<sub>2</sub> treatment alone since our previous study in which we analyzed Fos responses to male odors in female mice was conducted following a treatment with E<sub>2</sub> alone (Pierman *et al.*, 2008). Since we already observed clear sex differences in neural Fos responses following E<sub>2</sub> treatment in that particular study, we did not expect that treatment with progesterone would lead to a more pronounced Fos induction or would even completely reverse neural Fos patterns in

AFP-KO subjects. Moreover, it has been shown that a treatment with progesterone increased the number of Fos-ir cells in the MPOA, the dorsal medial hypothalamus and the VMHvl of rat brain (Auger and Blaustein, 1995). This Fos induction by progesterone could partially mask a Fos induction due to pheromone exposure. Finally, for reasons of comparison, we preferred to use only E<sub>2</sub> since other groups have previously shown sex and/or genotype differences in Fos responses to male odors using only E<sub>2</sub> (Halem *et al.*, 1999; Halem *et al.*, 2001; Bodo & Rissman, 2007; 2008).

### **Acknowledgments**

This work was supported by the following grants: Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) (Mandat d'Impulsion Scientifique F.4502.07) and the NICHD (HD044897) to Dr Bakker. Dr. Bakker is a Research Associate of the FNRS. Dr. Keller is a research associate at the CNRS. We also thank Dr. Mike Baum for commenting on an earlier version of the manuscript.

### **References**

Auger, A.P. & Blaustein, J.D. (1995) Progesterone enhances an estradiol-induced increase in Fos immunoreactivity in localized regions of female rat forebrain. *J Neurosci*, 15, 2272-2279.

Bakker, J. (2003) Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *J Neuroendocrinol*, 15, 615-621.

Bakker, J., Baum, M.J. & Slob, A.K. (1996a) Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience*, 74, 251-260.

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

Bakker, J., De Mees, C., Szpirer, J., Szpirer, C. & Balthazart, J. (2007) Exposure to oestrogen prenatally does not interfere with the normal female-typical development of odour preferences. *J Neuroendocrinol*, 19, 329-334.

## RÉSULTATS

Bakker, J., Pierman, S., Gonzalez-Martinez, D. (2010) Effect of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav*, 57, 390-395.

Bakker, J., Van Ophemert, J. & Slob, A.K. (1996b) Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiol Behav*, 60, 489-494.

Bodo, C. & Rissman, E.F. (2007) Androgen receptor is essential for sexual differentiation of responses to olfactory cues in mice. *Eur J Neurosci*, 25, 2182-2190.

Bodo, C. & Rissman, E.F. (2008) The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinology*, 149, 4142-4150.

Bressler, S.C. & Baum, M.J. (1996) Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience*, 71, 1063-1072.

Brock, O. & Bakker, J. (2010) Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mates preference in mice. *Horm Behav*, In Press.

Brown, R.E. (1979) Mammalian social odors : a critical review. *Adv. Study Behav.*, 10, 103-162.

De Mees, C., Laes, J.F., Bakker, J., Smits, J., Hennuy, B., Van Vooren, P., Gabant, P., Szpirer, J. & Szpirer, C. (2006) Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol Cell Biol*, 26, 2012-2018.

Edwards, D.A. & Burge, K.G. (1973) Olfactory control of the sexual behaviour of male and female mice. *Physiol Behav*, 11, 867-872.

Edwards, D.A. & Thompson, M.L. (1970) Neonatal androgenisation and estrogenization and the hormonal induction of sexual receptivity in rats. *Physiol Behav*, 10, 1115-1119.

Firestein, S. (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413, 211-218.

Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Van Reeth, T., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smits, J., Alexandre, H., Szpirer, C. & Szpirer, J. (2002) Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12865-12870.

Gonzalez-Martinez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpirer, C. & Bakker, J. (2008) Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology*, 149, 2333-2340.

Guillamon, A. & Segovia, S. (1997) Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull*, 44, 377-382.

Halem, H.A., Baum, M.J. & Cherry, J.A. (2001) Sex difference and steroid modulation of pheromone-induced immediate early genes in the two zones of the mouse accessory olfactory system. *J Neurosci*, 21, 2474-2480.

Halem, H.A., Cherry, J.A. & Baum, M.J. (1999) Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol*, 39, 249-263.

Kauffman, A.S., Park, J.H., McPhie-Lalmansingh, A.A., Gottsch, M.L., Bodo, C., Hohmann, J.G., Pavlova, M.N., Rohde, A.D., Clifton, D.K., Steiner, R.A. & Rissman, E.F. (2007) The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci*, 27, 8826-8835.

Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006a) Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses*, 31, 315-323.

Keller, M., Pawluski, J.L., Brock, O., Douhard, D., Bakker, J. (2010). The  $\alpha$ -fetoprotein knock-out mouse model suggests that parental behaviour is sexually differentiated under the influence of prenatal estradiol. *Horm Behav*, 57, 434-440.

Keller, M., Pierman, S., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006b) The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci*, 23, 521-530.

Keverne, E.B. (1999) The vomeronasal organ. *Science*, 286, 716-720.

Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. (2001) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press, San Diego*.

Pfaff, D.W. & Pfaffmann, C. (1969) Olfactory and hormonal influences on the basal forebrain of the male rat. *Brain Res*, 15, 137-156.

Pierman, S., Douhard, Q. & Bakker, J. (2008) Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur J Neurosci*, 27, 423-431.

Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Gallet-Bourquin, D., Philibert, D., Tournemine, C. & Azadian-Baulanger, G. (1973) Comparative study of estrogen action. *Mol Pharmacol*, 9, 520-533.

Robarts, D.W. & Baum, M.J. (2007) Ventromedial hypothalamic nucleus lesions disrupt olfactory mate recognition and receptivity in female ferrets. *Horm Behav*, 51, 104-113.

Thompson, M.L. & Edwards, D.A. (1972) Olfactory bulb ablation and hormonal induced mating in spayed female mice. *Physiol Behav*, 8, 1141-1146.

Wersinger, S.R. & Rissman, E.F. (2000) Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J Neuroendocrinol*, 12, 103-110.

### III.2 Principaux résultats & discussion

De manière assez surprenante, nous avons démontré au cours de cette étude que les femelles AFP-KO montraient un pattern d'activation neuronale semblable à celui des femelles WT suite à une exposition à des odeurs émises par des conspécifiques mâles. En effet, ces odeurs activent, tant chez les femelles WT que chez les femelles AFP-KO, des noyaux tels que le MPOA, le BnST et le VMHvl, reconnus pour jouer un rôle important dans la modulation des composantes du comportement reproducteur dont les préférences olfactives (Robarts and Baum, 2007). Ainsi, l'exposition prénatale aux œstrogènes ne déféminisent pas le traitement des indices socio-sexuels, tant au niveau du système olfactif principal qu'accessoire.

Considérées dans leur ensemble, plusieurs études semblent mettre en évidence que les œstrogènes ne sont pas impliqués dans la différenciation sexuelle des réponses neuronales, traduites par l'expression de Fos, suite à l'exposition à des odeurs socio-sexuelles. En effet, chez le modèle ArKO (ne pouvant convertir la T en E<sub>2</sub>), les femelles montrent également un pattern d'activation neuronale comparable à celui observé chez des femelles WT après exposition aux phéromones mâles (Pierman et al., 2008) : de plus, dans ces mêmes conditions d'exposition, des mâles ArKO montrent un pattern d'activation comparable aux mâles WT (c.à.d. aucune expression de Fos au sein du MPOA ; Pierman et al., 2008), tandis que des mâles Tfm (portant une mutation au niveau du gène codant pour le récepteur androgénique) montrent un pattern d'activation semblable aux femelles WT (Bodo and Rissman, 2007). Plus récemment, une étude a également démontré qu'en traitant des souris femelles à la naissance avec de la DHT (métabolite non-aromatisable de la T), celles-ci montrent une forte réduction de l'expression de Fos au sein du MPOA suite à une exposition aux phéromones mâles (Bodo and Rissman, 2008). Toutes ces données suggèrent donc un rôle organisateur des androgènes, via le récepteur aux androgènes, sur la différenciation sexuelle des réponses neuronales aux stimulations olfactives. Ce phénomène semble dépendre de l'espèce car,

chez le rat, le rôle organisateur des œstrogènes a été clairement établi (Bakker et al., 1996).

Comme mentionné précédemment, les préférences sexuelles des souris AFP-KO sont affectées suite à une exposition prénatale aux œstrogènes, alors que ces animaux montrent un pattern d'activation neuronale comparable à celui observé chez des femelles WT suite à une stimulation olfactive émise par des conspécifiques mâles. Ces données soulignent donc une absence de corrélation entre l'aspect neural et comportemental. Le même phénomène a déjà été précédemment rapporté chez le rat (Bakker et al., 1996a, b) ainsi que chez le modèle de souris ER $\alpha$ KO (Wersinger & Rissman ; 2000). Nous postulons donc que les informations olfactives peuvent être correctement perçues par les individus AFP-KO (Article 4 ; Keller et al., 2010) mais subir par la suite une modulation de leur intégration au sein d'un système neuronal plus en aval, contrôlant à son tour le comportement reproducteur (par exemple, le système Kisspeptine/GnRH, décrit comme déféminisé chez les individus AFP-KO ; De Mees et al., 2006 ; Gonzales-Martinez et al., 2008). De plus, la circuiterie neuronale impliquée entre l'intégration d'un indice olfactif socio-sexuel et la production d'une réponse comportementale appropriée reste encore floue à ce jour, suggérant que bon nombres de variables encore inconnues peuvent également court-circuiter ce mécanisme cérébral.

Finalement, différents types de stimulations olfactives, volatiles *versus* non-volatiles, peuvent également engendrer des réponses comportementales distinctes. Ainsi, des femelles ArKO (Bakker et al., 2002) ou AFP-KO (Bakker et al., 2007) peuvent exprimer, ou non, des préférences pour un sexe donné selon la présentation d'urines (odeurs volatiles) ou de litière souillée (odeurs non-volatiles) provenant d'un même partenaire conspécifique ; ces données suggèrent ainsi que l'implication des différents systèmes olfactifs (respectivement, principal et accessoire) peuvent être différemment sensibles aux influences oestrogéniques périnatales. Afin de mieux caractériser ces processus, nous sommes actuellement occupés à étudier les effets d'une exposition aux œstrogènes prénataux sur les patterns d'activité neuronale en réponse à

## RÉSULTATS

stimulations non-volatiles (animaux hébergés sur litière souillée) chez des sujets AFP-KO. Cette expérience nous permettra ainsi de comparer les effets des œstrogènes sur les deux systèmes de traitement des indices socio-sexuels, même si leurs activités semblent dans certains cas complémentaires (Winans and Powers, 1977 ; Meredith, 1986 ; Pfeiffer and Johnston, 1994).

## **IV. Rôle des œstrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle du comportement maternel chez la souris**

### **IV.1 Introduction**

Le rôle des œstrogènes prénataux dans la différenciation sexuelle du comportement reproducteur a été largement documenté dans le contexte du comportement sexuel en utilisant le modèle AFP-KO. Cependant, une autre composante du comportement reproducteur, à savoir, le comportement maternel, est tout aussi importante afin d'assurer la transmission du patrimoine génétique. De plus, ce comportement est également sexuellement différencié ; à l'âge adulte, les souris femelles vierges développent spontanément un comportement maternel en présence de souriceaux, tandis que les mâles sont infanticides (Lonstein and De Vries, 2000). Ces différences sexuelles semblent être établies durant la période périnatale ; en effet, des jeunes femelles traitées avec de la T à la naissance développent un comportement infanticide à l'âge adulte (Gandelman, 1973). Ces données suggèrent donc que les réponses parentales exprimées à l'âge adulte ne dépendent pas du taux d'hormones circulantes mais semblent modulées par les effets organisateurs des hormones gonadiques au cours du développement.

Grâce au modèle AFP-KO, nous avons pu étudier les effets des œstrogènes prénataux sur le développement du comportement maternel à l'âge adulte. Nous avons ainsi utilisé des mâles et des femelles naïfs (c.à.d. ne s'étant jamais occupé d'une portée de souriceaux) et gonadectomisés, afin de supprimer un biais éventuel dû à la production hormonale adulte.

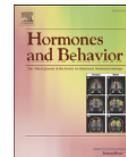
Le comportement maternel dépend également fortement de l'olfaction. Ainsi, chez les souris, la réactivité parentale est médiée par la détection de stimulations sensorielles émises par le jeune ; une modification de la nature de ces stimuli peut alors

engendrer une modification comportementale pouvant aller jusqu'à l'infanticide (Lévy et al., 2004 ; Lévy and Keller, 2009). Par exemple, l'anosmie (produite par irrigation nasale avec du sulfate de zinc) induite chez des souris femelles vierges adultes résulte en une majorité de sujets tuant leur progéniture (Dickinson and Keverne, 1988). Par ailleurs, la gestation et la lactation stimulent la neurogenèse olfactive adulte via la prolactine, aboutissant ainsi à une meilleure reconnaissance des souriceaux et au développement avancé du comportement maternel chez la souris (Shingo et al., 2003). Une exposition à des phéromones émises par un mâle engendre la même stimulation neurogénique (Mak et al., 2007), ainsi que les mêmes réponses comportementales chez des souris femelles vierges (Larsen et al., 2008). Subséquemment, nous avons déterminé les capacités de détection et de discrimination d'indices socio-sexuels chez les sujets AFP-KO, afin de s'assurer que des déficits potentiels du comportement parental ne soient pas liés à des altérations du système olfactif.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yhbeh](http://www.elsevier.com/locate/yhbeh)

## The $\alpha$ -fetoprotein knock-out mouse model suggests that parental behavior is sexually differentiated under the influence of prenatal estradiol

Matthieu Keller<sup>a,b,c,\*</sup>, Jodi L. Pawluski<sup>d</sup>, Olivier Brock<sup>e</sup>, Quentin Douhard<sup>e</sup>, Julie Bakker<sup>e,f,g</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

<sup>c</sup> Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

<sup>d</sup> Department of Psychiatry and Neuropsychology, Faculty of Health, Medicine and Life Science, Maastricht University, The Netherlands

<sup>e</sup> Neuroendocrinologie du Comportement, GIGA-Neurosciences, Université de Liège, Belgium

<sup>f</sup> Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam, The Netherlands

<sup>g</sup> Medical Center, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 August 2009

Revised 20 January 2010

Accepted 21 January 2010

Available online 28 January 2010

#### Keywords:

Parental behavior

Sex differences

$\alpha$ -fetoprotein

Gestational estradiol

Development

### ABSTRACT

In rodent species, sexual differentiation of the brain for many reproductive processes depends largely on estradiol. This was recently confirmed again by using the  $\alpha$ -fetoprotein knockout (AFP-KO) mouse model, which lacks the protective actions of  $\alpha$ -fetoprotein against maternal estradiol and as a result represents a good model to determine the contribution of prenatal estradiol to the sexual differentiation of the brain and behavior. Female AFP-KO mice were defeminized and masculinized with regard to their neuroendocrine responses as well as sexual behavior. Since parental behavior is also strongly sexually differentiated in mice, we used the AFP-KO mouse model here to ask whether parental responses are differentiated prenatally under the influence of estradiol. It was found that AFP-KO females showed longer latencies to retrieve pups to the nest and also exhibited lower levels of crouching over the pups in the nest in comparison to WT females. In fact, they resembled males (WT and AFP-KO). Other measures of maternal behavior, for example the incidence of infanticide, tended to be higher in AFP-KO females than in WT females but this increase failed to reach statistical significance. The deficits observed in parental behavior of AFP-KO females could not be explained by any changes in olfactory function, novelty recognition or anxiety. Thus our results suggest that prenatal estradiol defeminizes the parental brain in mice.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

The classic view of sexual differentiation in mammalian species holds that sex differences in the brain develop under the influence of testosterone and/or estradiol derived from neural aromatization of testosterone: the brain develops as male in the presence of these steroid hormones, and as female in their absence (see Bakker and Baum, 2008; McCarthy, 2008 for recent reviews). The recent introduction of the  $\alpha$ -fetoprotein knockout (AFP-KO) mouse (Gabant et al., 2002), which lacks the neuroprotective effects of  $\alpha$ -fetoprotein against maternal estrogens during the prenatal period, has provided a new model in which to study the role of estradiol in the development of the brain and behavior. Thus it has been shown that the principal action of prenatal estrogen exposure is to defeminize and, to some extent, masculinize the brain and behavior (Bakker and Baum, 2008; Bakker et al., 2006).

The role of prenatal estrogens in the sexual differentiation of reproductive behavior, using AFP-KO mice, has been extensively explored in the context of sexual behavior (Bakker and Baum, 2008; Bakker et al., 2006), but at present other reproductive behaviors that are also essential to ensure successful reproduction, namely parental behavior, have not been analyzed in this mouse model. Most mammalian species exhibit strong sex differences in their parental behavior towards offspring. For example, in adulthood, laboratory mice display pronounced sex differences in their responses towards pups so that almost all virgin females are spontaneously maternal (Gandelman, 1972; Gandelman et al., 1970, 1971a,b; Lonstein and de Vries, 2000b; Noiro, 1964; Rosenson, 1975; Svare, 1979) whereas males are usually infanticidal (Beilharz, 1975; Gandelman, 1972, 1973b; Lonstein and de Vries, 2000b; Perrigo et al., 1989; Rosenson, 1975; Svare and Mann, 1981; Svare et al., 1977; vom Saal and Howard, 1982).

In mice, parental responses are most likely sexually differentiated before puberty as sex differences in parental behavior are not under the control of circulating gonadal hormones. For example, the increase in infanticide observed in peripubertal male mice does not appear to be due to the sudden rise in circulating testosterone at puberty

\* Corresponding author. Laboratoire de Physiologie de la Reproduction and des Comportements, UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours, 37380 Nouzilly, France. Fax: +33 247 427 743.

E-mail address: [mkeller@tours.inra.fr](mailto:mkeller@tours.inra.fr) (M. Keller).

(Gandelman, 1973a,b; Svare et al., 1978). Furthermore the change in parental responsiveness that occurs when females age is not governed by gonadal activity because ovariectomy just before weaning has no effect on later parental responsiveness (Gandelman, 1973b). Finally, in many strains of mice, removal of circulating pituitary and gonadal hormones does not affect maternal responsiveness of adult virgin females (Davis and Gandelman, 1972; Gandelman, 1973a,b; Lonstein and de Vries, 2000b). By contrast, exposure to gonadal hormones during the perinatal period affects later responses of virgin adult mice toward pups; for example, female mice exposed to testosterone neonatally are often infanticidal (Gandelman, 1973a,b). These data demonstrate that the expression of parental responses in adult mice are not under the influence of circulating hormones in adulthood but are most likely affected by the organizational effects of hormones during development.

Therefore, in the present study, we determined whether prenatal exposure to estradiol affects parental behavior in adulthood by characterizing the parental behavior of male and female, parentally naïve, gonadectomized AFP-KO and WT mice. Furthermore, to ensure that any potential deficit in parental behavior was not related to changes in other behaviors, all mice were also tested for their olfactory function using olfactory habituation/dishabituation tests, their state of anxiety using the elevated plus maze test and their novel object recognition.

## Material and methods

### Animals

Heterozygous male and female mice of the CD1 (also known as Swiss-Webster) strain were bred to generate wild-type (WT) and homozygous-null AFP-KO offspring. Mice were genotyped by PCR analysis of tail DNA (for more detailed description, see Bakker et al., 2006). Groups were as follows: WT females ( $n=7$ ), AFP-KO females ( $n=8$ ), WT males ( $n=10$ ), and AFP-KO males ( $n=8$ ). All animals were 10 weeks of age at the beginning of the experiment. None of the animals had previously been exposed to pups (except to their siblings during development). Prior to testing animals were individually housed in a normal light–dark cycle (12L/12D, lights on at 08:00 h) and allowed access to food and tap water ad libitum. For behavioral testing animals were tested once on each test in the order described below; usually tests were performed at 48 h intervals. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health and were approved by the Ethical Committee for Animal Use at the University of Liège.

It should be noted that homozygous AFP-KO females are sterile and do not show any sexual behavior (Bakker et al., 2006) and as a consequence do not undergo pregnancy and parturition. Thus, it is not possible to test maternal responses in these animals during the postpartum period. However, as mentioned in the Introduction, circulating hormones in adult mice do not exert a major control on parental responses as adult mice can exhibit parental responsiveness without any hormonal priming (Lévy and Keller, 2009; Lévy et al., 2004; Lonstein and de Vries, 2000b; Weber and Olsson, 2008). Therefore all aspects of parental behavior can be observed in virgin animals when exposed to pups. Obviously, lactation and suckling cannot be observed however, since virgin females do not produce any colostrum and milk.

### Gonadectomy

To avoid any possible confounding effects of differences in levels of circulating gonadal steroids between the sexes or genotypes on the expression of parental behaviors, all animals were gonadectomized 3 weeks prior to testing. All animals were gonadectomized under general anesthesia induced by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (80 mg/kg per mouse) and medetomidine

(Domitor, Pfizer, 1 mg/kg per mouse). Mice received atipamezole (antisedan, Pfizer, 4 mg/kg per mouse) subcutaneously at the end of the surgery to antagonize medetomidine-induced effects, thus accelerating their recovery.

### Observation and quantification of parental behavior

Parental behavior was assessed during a 30 min test based on the classical pup retrieval experiment previously described (Rosenblatt, 1967; Brown et al., 1996). Briefly, parentally naïve virgin mice were housed individually and provided with cotton for nesting 1 day prior to pup exposure. As nesting material would have obscured direct observation of parental behavior, most of the nesting material was removed on the day of testing so that observers were able to quantify crouching and licking behavior when the animals were in the nest with the pups. At the beginning of the test, three foster pups (between 3 and 5 days of age) were placed in the home cage. One pup was placed in each of the three corners that did not contain the nest. According to the literature (Svare and Broida, 1982; Svare et al., 1984; vom Saal, 1985) neither the relatedness (e.g. mouse strain) nor sex or age (1 to 5 days) of the pups has a significant influence on a female's or male's initial tendency to show retrieval or infanticide. Therefore we used Balb/c mouse pups which were more abundantly available at the animal facility. The latency to retrieve each pup, the number of pups retrieved, the relative time spent crouching in the nest over the pups, the time spent self-grooming and the time spent off the nest exploring the cage were determined over 30 min. Retrieval was defined as the animal picking up a pup by the mouth and transporting it to the nest. If the animal picked up and dropped the same pup more than once on the way to the nest, the retrieval was not scored until the pup was in the nest. If all three pups were not retrieved by an animal at the time infanticidal behavior occurred the test was immediately stopped and a maximal latency (30 min) was attributed. Animals always retrieved the pups in the nest, thus suggesting that the previous removal of some part of the nest material did not disturb the animals. Crouching was defined as the animal arching and assuming the nursing posture over all three pups in the nest. Finally, animals that started to bite pups, producing repeated series of rough-handling calls, during the test were scored "infanticidal". In that case, the test was stopped immediately for ethical considerations (Elwood, 1991) and pups were either placed back with their mother or, if injured, killed immediately by cervical dislocation. Since some animals were infanticidal, different test durations were obtained between animals. Therefore, all measures are expressed as behavioral frequencies (% of time engaged in one activity over the duration of the observation). In addition, it should be noted that as the relative time spent crouching over the pups and the time spent licking them were determined (and only occurred) once the pups were retrieved into the nest, these percentages were also based on different test durations since differences in the latency to retrieve pups in the nest were observed between groups. Thus if pups were retrieved quickly (as was the case in WT females), the subject had more time to display crouching than if the retrieval was slow.

### Olfactory habituation–dishabituation test

Since disruption of olfactory function leads to a disruption of maternal behavior and even to infanticide in virgin female mice (Lévy et al., 2004; Lévy and Keller, 2009), we assessed olfactory discrimination abilities of all animals through habituation/dishabituation tests, using volatile urinary odors derived from male and estrous female mice as olfactory stimuli. Animals were tested in their home cage as described previously (Pierman et al., 2006; Keller et al., 2006a, b). Briefly, the steel cage top containing food and water was removed and replaced with a clean top. Odor stimuli were presented by applying 10  $\mu$ l of urine onto a piece of filter paper glued to a plastic

weighing boat (4.3×4.3 cm), which was then placed in the food hopper so that volatile odors from the stimulus were available at body level. Subjects were unable to make physical contact with the filter paper using either their snout or paws. Each test consisted of a sequence of three water presentations followed by three odor presentations of two different urinary odors, namely intact male and estrous female urine. The duration of investigation of the odor stimuli was recorded and any significant increase of olfactory investigation (dishabituation) when being exposed to the odorant stimulus was considered as the subject detecting the odor.

#### Elevated plus maze

Given that pups represent a potentially neophobic stimulation in the home-cage environment, we also determined whether the potential behavioral differences observed during the interactions with the pups might be due to any differences in subjects' state of anxiety. Therefore, animals were tested for differences in anxiety-like behavior using the elevated plus maze. Tests were conducted as previously described (Dalla et al., 2005; Keller et al., 2006a,b). Briefly, the elevated plus maze consisted of four arms (each arm 30 cm long×15 cm high×8 cm wide), two open and two closed arms formed a cross, which were raised 80 cm above the floor. At the beginning of the test, each mouse was placed in the center, and subsequently the time spent in the center, open, and closed arms was recorded for 5 min. Animals were tested individually in random order under normal white light. Between tests, the maze was cleaned with 70% ethanol to eliminate any odors.

#### Novel object recognition test

Given that pups represent a novel stimulus in the home-cage environment, animals were subject to a novel object recognition test to determine whether there were differences in novel object exploration. This was done as previously described (Bruehl-Jungerman et al., 2005; Ennaceur and Meliani, 1992). Briefly, two identical novel objects 2–3 cm in height and 1–2 cm in diameter were introduced into the mouse home cage. Objects were placed equidistance apart, in opposite corners of the cage and were secured to the floor with tape. Behavior was observed for 5 min after the objects were introduced and, 15 min later, for another 5 min, immediately after one of the now familiar objects was replaced with a distinct novel object of similar size. The identity of the objects used on the first and second observations was counterbalanced. Exploration was recorded when the animal's nose was within 1 cm of an object and was oriented towards that object. Objects were cleaned thoroughly with ethanol between trials to ensure the absence of olfactory cues. Mice that failed to reach the criteria of a minimum total object exploration time of 20 s for each presentation were excluded from the statistical analysis (two WT males and one WT female removed). Measurement of the time spent exploring the novel object was expressed as a percentage of the exploration time of the novel object related to the total exploration time for both objects (preference index: time investigating the novel object/total time of investigation×100).

#### Statistics

Latencies to retrieve pups and behavior expressed toward pups were analyzed using non-parametrical statistics given the fact that some of these data did not follow a normal distribution. Between groups comparisons were performed using Kruskal–Wallis tests and these tests were followed by Mann–Whitney *U* post-hoc tests if overall significant differences were observed (Siegel, 1956). All other tests (habituation/dishabituation, elevated plus maze and novel object recognition) were analyzed using analysis of variance (ANOVA). When appropriate, all ANOVAs were followed by Fisher

PLSD post hoc comparisons. Only significant ( $p < 0.05$ ) effects detected by the ANOVAs are mentioned in detail in the Results.

## Results

### Parental behavior

Maternal behavior was clearly affected in AFP-KO females as many of their behaviors expressed toward pups resembled those expressed by males (both AFP-KO and WT); by contrast WT females were immediately maternal, retrieving their pups rapidly to the nest (<2.5 min) and in general showing significantly higher levels of care toward pups.

Latencies to retrieve the pups were higher in AFP-KO females and males than in WT females (Table 1; for the clarity of the results only the latencies to retrieve the first and the last (third) pups are shown): Kruskal–Wallis analysis revealed between group differences for both the first ( $H_{(3, N=33)} = 11.60$ ;  $p = 0.0089$ ) and the last pup ( $H_{(3, N=33)} = 10.99$ ;  $p = 0.0118$ ). Mann–Whitney post-hoc tests revealed differences between WT females and both groups of males for the latency to retrieve the first pup (WT F vs. WT M:  $U = 8.50$ ,  $z = -2.586$ ,  $p = 0.0096$ ; WT F vs. KO M:  $U = 0.00$ ,  $z = -3.246$ ,  $p = 0.0003$ ) and differences between WT females and all other groups to retrieve the third pup (WT F vs. KO F:  $U = 10.00$ ,  $z = -2.083$ ,  $p = 0.0372$ ; WT F vs. WT M:  $U = 8.00$ ,  $z = -2.637$ ,  $p = 0.0068$ ; WT F vs. KO M:  $U = 3.00$ ,  $z = -2.898$ ,  $p = 0.0028$ ). In addition, WT females retrieved more pups in comparison to AFP-KO female mice and males (both WT and AFP-KO), but differences did not reach statistical significance.

When analyzing parental behavior performed once pups were retrieved into the nest, AFP-KO females like WT and AFP-KO males spent significantly less time crouching over the pups in a “nursing” posture in comparison to WT females. This was confirmed by a Kruskal–Wallis analysis ( $H_{(3, N=33)} = 14.265$ ;  $p = 0.0026$ ) and Mann–Whitney *U* comparisons (Fig. 1; WT F vs. KO F:  $U = 1.00$ ,  $z = 3.124$ ,  $p = 0.0018$ ; WT F vs. WT M:  $U = 4.00$ ,  $z = 3.025$ ,  $p = 0.0025$ ; WT F vs. KO M:  $U = 1.00$ ,  $z = 3.124$ ,  $p = 0.0018$ ). In addition, AFP-KO females appeared to spend less time licking the pups in comparison to WT females (Fig. 1), however this effect did not reach statistical significance.

When analyzing any parental behaviors which are not pup-directed, such as time spent out of the nest and self-grooming, AFP-KO females still differed from WT females and appeared to be very similar to males (Fig. 1). Thus, with regard to the relative time spent out of the nest, a Kruskal–Wallis analysis revealed between group differences ( $H_{(3, N=33)} = 14.681$ ;  $p = 0.0021$ ). Mann–Whitney *U* post-hoc tests revealed that AFP-KO females and both male groups spent more time out of the nest in comparison to WT females (WT F vs. AFP-KO F:  $U = 2.50$ ,  $z = -2.951$ ,  $p = 0.0031$ ; WT F vs. WT M:  $U = 2.00$ ,  $z = -3.220$ ,  $p = 0.0013$ ; WT F vs. AFP-KO M:  $U = 0.00$ ,  $z = -3.124$ ,  $p = 0.0012$ ). Regarding the time spent self-grooming, again between group differences were found ( $H_{(3, N=33)} = 8.362$ ;  $p = 0.0039$ ), in particular between WT females and both male groups (WT F vs. WT M:  $U = 10.50$ ,  $z = -2.391$ ,  $p = 0.0168$ ; WT F vs. AFP-KO M:  $U = 7.50$ ,  $z = -2.372$ ,  $p = 0.0139$ ) which spent significantly more time self-grooming than females.

**Table 1**

Latencies (min ± SEM) to retrieve the first and the last (third) pup and mean number of pups retrieved. \* $p < 0.05$  compared to WT females.

| Groups         | Latency to retrieve 1st pup | Latency to retrieve 3rd pup | Number of pups retrieved |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| WT females     | 0.56 ± 0.18                 | 2.19 ± 0.52                 | 3.00 ± 0                 |
| AFP-KO females | 7.37 ± 4.33                 | 9.32 ± 4.04*                | 2.62 ± 0.37              |
| WT males       | 5.67 ± 2.92*                | 14.38 ± 3.97*               | 2.50 ± 0.31              |
| AFP-KO males   | 6.39 ± 3.41*                | 12.15 ± 4.06*               | 2.50 ± 0.38              |

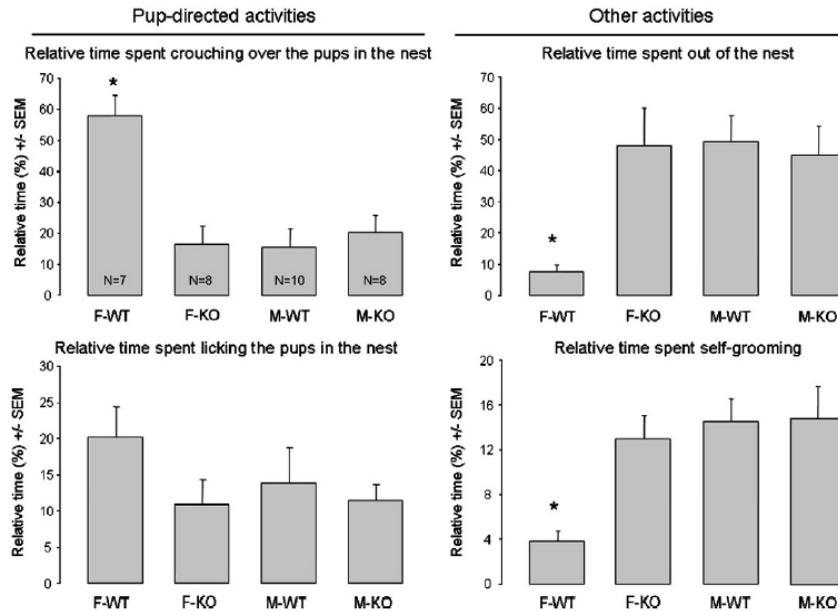


Fig. 1. Relative time spent by male (M) and female (F) mice of both WT and AFP-KO genotypes in activities directed (time spent crouching over pups and licking) or not (time spent out of the nest or self-grooming) towards pups. \* $p < 0.05$  compared to F-KO, M-WT, and M-KO.

Finally, analysis of infanticidal behavior revealed that 3 out of 8 (37.5%) AFP-KO females attacked pups during testing compared to 0/7 (0%) WT females, 1/10 (10%) WT males and 1/8 (12.5%) AFP-KO males (Fig. 2).

Other behaviors

The deficits in maternal care observed in AFP-KO females were not due to any disruption in their ability to detect and discriminate between odors since olfactory habituation/dishabituation tests showed normal responses towards urinary odor cues in AFP-KO females (Fig. 3). Indeed, a repeated measures ANOVA with sex and genotype as independent factors and trial as a repeated factor (the dependent measure being the time spent sniffing the odors) revealed a significant effect of the different trials ( $F_{(8,232)} = 35.21$ ;  $p < 0.001$ ). Therefore, subsequent repeated measures ANOVAs were conducted with sex and genotype as independent factors and the last presentation of water versus the first presentation of male urine or the last presentation of male urine versus the first presentation of

female urine as repeated factors (the dependent measure being again the time spent sniffing the urinary odors). These analyses revealed that all animals showed a clear and significant dishabituation response to the first presentation of male urine versus the last presentation of water ( $F_{(1,29)} = 91.23$ ;  $p < 0.001$ ). Similar results were obtained when comparing the first presentation of female urine versus the last presentation of male urine ( $F_{(1,29)} = 77.92$ ;  $p < 0.001$ ). In addition, a significant effect of sex ( $F_{(1,29)} = 13.82$ ;  $p < 0.001$ ) and a significant sex  $\times$  trial interaction ( $F_{(1,29)} = 22.13$ ;  $p < 0.001$ ) was observed with males (both WT and AFP-KO) investigating female urine for a longer period of time than females (both WT and AFP-KO; Fig. 3).

Likewise, the deficits in maternal care of AFP-KO females were not due to a higher state of anxiety in these females since no differences were observed in the elevated plus maze between mice according to genotype or sex (Fig. 4). Indeed, ANOVA with sex and genotype as independent factors and the time spent investigating each arm of the maze (open or closed) as repeated factor revealed only a main effect of the time spent investigating the arms of the maze. In fact, all groups spent significantly more time in the closed arms of the maze than in the open arms ( $F_{(1,29)} = 16.16$ ;  $p < 0.001$ ); no significant interactions were detected.

Finally, there were no significant differences between groups in object recognition and exploration (Fig. 5). ANOVA with sex and genotype as independent factors and time spent investigating the object as a dependent factor revealed no differences between groups with all groups investigating the novel object nearly twice as much as the familiar object (between 62% and 69% of the total time of investigation was dedicated to the novel object in the various groups).

Discussion

The present study is consistent with previous results showing that the principal action of prenatal estradiol is to defeminize and masculinize the brain and behavior (Bakker et al., 2006) and now

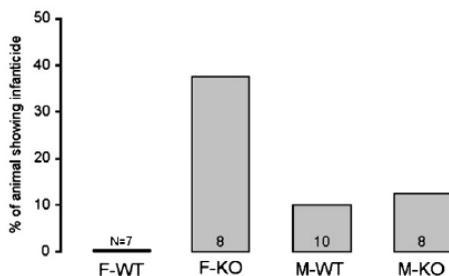


Fig. 2. Proportion of animals attacking pups in each group during the 30 min observation test.

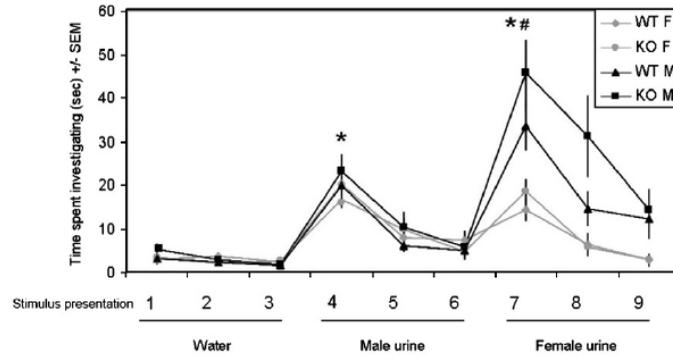


Fig. 3. Mean ( $\pm$  SEM) time spent by AFP-KO and WT mice of both sexes investigating deionized water or volatile urinary stimuli. \* $p < 0.05$  post-hoc comparisons between the time spent investigating the third presentation of a particular stimulus and the first presentation of the next stimulus. # $p < 0.05$  post-hoc comparisons between sexes.

extends this conclusion to another behavior that is important for reproductive success, i.e. parental care. Indeed, our data demonstrate that AFP-KO females show very little maternal behavior and actually do not differ from male mice, whereas WT females show substantial levels of maternal behavior, spending a long time crouching over the pups. These findings suggest that parental behavior (like sexual behavior) differentiates sexually under the influence of prenatal estradiol. This interpretation should however be taken with some caution since not all behaviors were affected in AFP-KO females. For example, no statistical significant differences were observed in the number of pups retrieved into the nest or in the percentage of time spent licking the pups.

Few studies have examined the influence of prenatal gonadal hormones in generating sex differences in adult parental behavior. In addition to the present results obtained in mice, adult female rats perinatally exposed to testosterone show masculinized (i.e. reduced) parental responsiveness (Ichikawa and Fujii, 1982; Juarez et al., 1998). Prenatally testosterone-treated female rats showed less time crouching over pups in adulthood in comparison with vehicle-treated females in tests similar to those used in the present study (Juarez et al., 1998). Such masculinizing effects of prenatal testosterone have also been observed in prairie voles (Lonstein and de Vries, 2000a). Interestingly, postnatal treatment with testosterone has little or no effect on parental behavior in rats or prairie voles (Bridges et al., 1973; Leboucher, 1989; Lonstein and de Vries, 2000a; Quadagno et al., 1973, 1974; Rosenberg et al., 1971), suggesting that a sensitive period may

exist for the differentiation of parental behavior during the prenatal period. Whether the masculinizing effect of prenatal testosterone is mediated through its androgenic or estrogenic (via aromatization) metabolites has not been explored, but it has been shown that exposing female mice in utero (between days 14 and 18 of gestation) to low doses of the estrogenic chemical bisphenol-A induces a reduction in maternal behavior in female offspring (Palanza et al., 2002). This latter finding supports our data and suggests that parental behavior is differentiated by an estrogenic rather than an androgenic mechanism during the prenatal period.

In the future, the prenatal role of estradiol in the differentiation of the parental brain should be further confirmed by blocking estrogen production during prenatal development by treating AFP-KO females in utero with an aromatase inhibitor such as 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD). This treatment has been previously performed in the context of sexual behavior and resulted in a complete reversal of the behavioral phenotype of AFP-KO females. Indeed, once in adulthood, ATD treated AFP-KO females showed levels of lordosis behavior similar to those observed in WT females (Bakker et al., 2006) and were fertile. Future work will thus aim to investigate the effect of prenatal ATD treatment on parental behavior.

In addition to their lack of maternal behavior, female mice perinatally exposed to testosterone are often infanticidal in adulthood when primed with testosterone (Gandelman, 1972). Interestingly, AFP-KO females showed the highest percentage of infanticide behavior in the present study suggesting that prenatal estradiol is important for parental behavior. However it should be noted that the level of infanticide was generally low in the present study and this

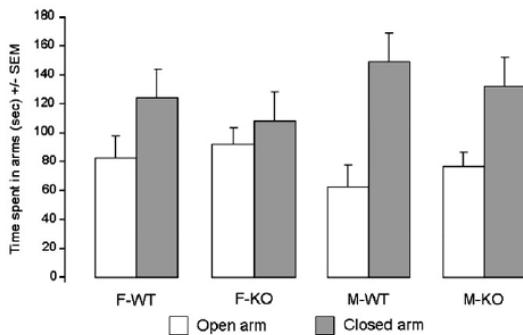


Fig. 4. Mean ( $\pm$  SEM) total time spent in the open and closed arms in the elevated plus maze test. ANOVA with sex and genotype as independent factors and the time spent investigating the arms of the maze as repeated factors indicated a general effect of time spent investigating each arm (open/closed) but no interactions between factors.

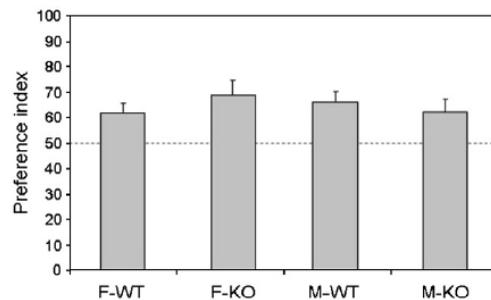


Fig. 5. Novel object recognition test. Time spent investigating the novel object is expressed as a preference index (time investigating the novel object/total time of investigation).

may have been due to gonadectomy or limited exposure to pups. Indeed, infanticide in males is greatly influenced by circulating gonadal hormones (Svare et al., 1977) since males that are castrated during adulthood showed lower levels of infanticide than gonadally intact males (Gandelman and vom Saal, 1975). In females, an increase in infanticide can be induced by a treatment of estradiol and dihydrotestosterone but this increase is reversed after the hormonal treatment is terminated (Davis and Gandelman, 1972; Gandelman, 1972; Gandelman and vom Saal, 1975; Svare, 1979).

The changes observed in parental behavior in AFP-KO females appear to be specific to this behavior as they cannot be explained by a deficit in olfactory perception, novelty detection or anxiety. Using habituation/dishabituation tests of olfactory discrimination, we confirmed that AFP-KO and WT mice of both sexes were able to discriminate between male and estrous female urine. Rather remarkably, AFP-KO females remained very female-like in their odor preference: they resembled WT females, i.e. spent less time investigating female urine compared to male mice (WT and AFP-KO). The present study is in line with earlier results obtained in our lab of normal male-directed odor preference in AFP-KO females (Bakker et al., 2007). These results suggest thus that not all aspects of reproductively relevant behaviors are defeminized and masculinized in AFP-KO females. Our observation of normal olfactory abilities in AFP-KO mice confirm our results obtained in aromatase knockout (ArKO) mice (Pierman et al., 2006) suggesting that estradiol is not directly involved in the development of olfactory discrimination abilities. Most importantly, these findings suggest that the differences observed in parental behavior are not the consequence of any olfactory deficit. This is important because parental responsiveness in mice is under the control of sensory cues; disruption of olfactory cues leads to a disruption in maternal behavior and even to infanticide in virgin female mice (Gandelman et al., 1971a,b; Lévy et al., 2004; Lévy and Keller, 2009). For example, anosmia produced by nasal irrigation of zinc sulfate or depletion of noradrenaline within the main olfactory bulb results in the majority of the females killing their offspring (Dickinson and Keverne, 1988; Seegal and Denenberg, 1974).

In addition, olfaction may be involved in discriminating pups from other conspecifics and can be readily related to sex differences in parental or infanticidal behaviors. Olfactory cues from pups usually stimulate various brain structures across the main and accessory olfactory systems that are sexually dimorphic (Baum, 2009; Insel et al., 1991; Swann and Fiber, 1997) and involved in the expression of parental behavior (Fleming and Rosenblatt, 1974a,b; Fleming et al., 1980; Segovia and Guillamon, 1993). For example one olfactory structure, namely the medial nucleus of the amygdala, appears to be larger in male than female rats (Hines et al., 1992) and this larger size seems to be correlated with the greater reluctance of males to act parentally. Interestingly some sex differences in the function and characteristics of more central regions of the olfactory systems (e.g., amygdala, medial preoptic area), are under the control of perinatal estradiol (Keller et al., 2009; Pierman et al., 2008; Wesson et al., 2006). Therefore, it would be interesting to analyze the effects of prenatal estradiol exposure on the processing of olfactory information related to the expression of maternal behavior.

#### Acknowledgments

Matthieu Keller and Julie Bakker are research scientists at the French Centre National de la Recherche Scientifique and the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique, respectively. Jodi Pawluski is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) post-doctoral fellow. This work was funded by INSERM PNR-RE 0702 to MK, by a CNRS/FNRS-CGRI grant to MK and JB and by a "Mandat d'Impulsion Scientifique" of the FNRS (F.4502.07) and a grant from the National Institutes of Child Health and Human Development HD 044897 NICHD to JB. The authors would also like to

thank Dr. Jacques Balthazart, University of Liège, Belgium and Dr. Lance J. Kriegsfeld, University of California, Berkeley for helpful suggestions regarding the statistical analysis of the data.

#### References

- Bakker, J., Baum, M.J., 2008. Role for estradiol in female-typical brain and behavior sexual differentiation. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 1–16.
- Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpirer, J., Szpirer, C., 2006. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat. Neurosci.* 9, 220–226.
- Bakker, J., De Mees, C., Szpirer, J., Szpirer, C., Balthazart, J., 2007. Exposure to oestrogen prenatally does not interfere with the normal female-typical development of odour preferences. *J. Neuroendocrinol.* 19, 329–334.
- Baum, M.J., 2009. Sexual differentiation of pheromone processing: links to male-typical mating behavior and partner preference. *Horm. Behav.* 55, 579–588.
- Beilharz, R.G., 1975. The aggressive response of male mice (*Mus musculus* L.) to a variety of stimulus animals. *Z. Tierpsychol.* 39, 141–149.
- Bridges, R.S., Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., 1973. The role of neonatal androgen in the expression of hormonally induced maternal responsiveness in the adult rat. *Horm. Behav.* 4, 315–322.
- Brown, J.R., Ye, H., Bronson, R.T., Dikkes, P., Greenberg, M.E., 1996. A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene *FosB*. *Cell* 86, 297–309.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., Rampon, C., 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 513–521.
- Dalla, C., Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Balthazart, J., Bakker, J., 2005. Male aromatase-knockout mice exhibit normal levels of activity, anxiety and "depressive-like" symptomatology. *Behav. Brain Res.* 163, 186–193.
- Davis, P.G., Gandelman, R., 1972. Pup-killing produced by administration of testosterone propionate to adult female mice. *Horm. Behav.* 3, 169–173.
- Dickinson, C., Keverne, E.B., 1988. Importance of noradrenergic mechanisms in the olfactory bulbs for the maternal behaviour of mice. *Physiol. Behav.* 43, 313–316.
- Elwood, R., 1991. Ethical implications of studies on infanticide and maternal aggression in rodents. *Anim. Behav.* 42, 841–849.
- Ennaceur, A., Meliani, I., 1992. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats: III. Spatial vs non-spatial working memory. *Behav. Brain Res.* 51, 83–92.
- Fleming, A.S., Rosenblatt, J.S., 1974a. Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 221–232.
- Fleming, A.S., Rosenblatt, J.S., 1974b. Olfactory regulation of maternal behavior in rats: II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 233–246.
- Fleming, A.S., Vaccarino, F., Luebke, C., 1980. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol. Behav.* 25, 731–743.
- Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Van Reeth, T., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smitz, J., Alexandre, H., Szpirer, C., Szpirer, J., 2002. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12865–12870.
- Gandelman, R., 1972. Induction of pup killing in female mice by androgenization. *Physiol. Behav.* 9, 101–102.
- Gandelman, R., 1973a. The development of cannibalism in male Rockland-Swiss mice and the influence of olfactory bulb removal. *Dev. Psychobiol.* 6, 159–164.
- Gandelman, R., 1973b. The ontogeny of maternal responsiveness in female Rockland-Swiss albino mice. *Horm. Behav.* 4, 257–268.
- Gandelman, R., Vom Saal, F.S., 1975. Pup-killing in mice: the effects of gonadectomy and testosterone administration. *Physiol. Behav.* 15, 647–651.
- Gandelman, R., Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., 1970. Maternal behavior: differences between mother and virgin mice as a function of the testing procedure. *Dev. Psychobiol.* 3, 207–214.
- Gandelman, R., Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., 1971a. Stimulus control of cannibalism and maternal behavior in anosmic mice. *Physiol. Behav.* 7, 583–586.
- Gandelman, R., Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., Myers, M., 1971b. Olfactory bulb removal eliminates maternal behavior in the mouse. *Science* 171, 210–211.
- Hines, M., Allen, L.S., Gorski, R.A., 1992. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res.* 579, 321–326.
- Ichikawa, S., Fujii, Y., 1982. Effect of prenatal androgen treatment on maternal behavior in the female rat. *Horm. Behav.* 16, 224–233.
- Insel, T.R., Gelhard, R., Shapiro, L.E., 1991. The comparative distribution of forebrain receptors for neurohypophysial peptides in monogamous and polygamous mice. *Neuroscience* 43, 623–630.
- Juarez, J., Del Rio-Portilla, I., Corsi-Cabrera, M., 1998. Effects of prenatal testosterone on sex and age differences in behavior elicited by stimulus pups in the rat. *Dev. Psychobiol.* 32, 121–129.
- Keller, M., Baum, M.J., Brock, O., Brennan, P.A., Bakker, J., 2009. Both main and accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behav. Brain Res.* 200, 268–276.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006a. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem. Senses* 31, 315–323.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006b. Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem. Senses* 31, 753–762.

- Leboucher, G., 1989. Maternal behavior in normal and androgenized female rats: effect of age and experience. *Physiol. Behav.* 45, 313–319.
- Lévy, F., Keller, M., 2009. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behav. Brain Res.* 200, 336–345.
- Lévy, F., Keller, M., Poindron, P., 2004. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm. Behav.* 46, 284–302.
- Lonstein, J.S., De Vries, G.J., 2000a. Influence of gonadal hormones in the development of parental behavior in adult virgin prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav. Brain Res.* 114, 79–87.
- Lonstein, J., De Vries, G.J., 2000b. Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 669–686.
- McCarthy, M.M., 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev.* 88, 91–124.
- Noiro, E., 1964. Changes in responsiveness to young in the adult mouse: II. The effect of external stimuli. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 57, 97–99.
- Palanza, P., Howdeshell, K.L., Parmigliani, S., Vom Saal, F., 2002. Exposure to bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ. Health Perspect.* 110, 415–422.
- Perrigo, G., Bryant, W.C., vom Saal, F.S., 1989. Fetal, hormonal, and experiential factors influencing the mating-induced regulation of infanticide in male house mice. *Physiol. Behav.* 46, 121–128.
- Pierman, S., Balthazart, J., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006. Attraction thresholds and sex discrimination of urinary odorants in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm. Behav.* 49, 96–104.
- Pierman, S., Douhard, Q., Bakker, J., 2008. Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur. J. Neurosci.* 27, 423–431.
- Quadagno, J.M., McCullough, J., Ho, G.K.-H., Spevak, A.M., 1973. Neonatal gonadal hormones: effect on maternal and sexual behavior in the female rat. *Physiol. Behav.* 11, 251–254.
- Quadagno, J.M., DeBold, J.F., Gorzalka, B.B., Whalen, R.E., 1974. Maternal behavior in the rat: aspects of concaveation and neonatal androgen treatment. *Physiol. Behav.* 12, 1071–1074.
- Rosenberg, K.M., Denenberg, V.H., Zarrow, M.X., Frank, B.L., 1971. Effects of neonatal castration and testosterone on the rat's pup-killing behavior and activity. *Physiol. Behav.* 7, 363–368.
- Rosenblatt, J.S., 1967. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156, 1512–1514.
- Rosenson, L.M., 1975. Responses of virgin mice, and of maternal females, to normal and caesarian-section delivered pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88, 670–677.
- Seegal, R.F., Denenberg, V.H., 1974. Maternal experience prevents pup killing in mice induced by peripheral anosmia. *Physiol. Behav.* 13, 339–341.
- Segovia, S., Guillamon, A., 1993. Sexual dimorphisms in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res. Rev.* 18, 51–74.
- Siegel, S., 1956. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. Series in Psychology. McGraw-Hill, New York. ISBN 07-057348-4.
- Svare, B., 1979. Steroidal influences on pup-killing behavior in mice. *Horm. Behav.* 13, 153–164.
- Svare, B., Mann, M., 1981. Infanticide: genetic, developmental and hormonal influences in mice. *Physiol. Behav.* 27, 921–927.
- Svare, B., Bartke, A., Gandelman, R., 1977. Individual differences in the maternal behavior of male mice: no evidence for a relationship to circulating testosterone levels. *Horm. Behav.* 8, 326–372.
- Svare, B., Bartke, A., Macrides, F., 1978. Juvenile male mice: an attempt to accelerate testis function by exposure to adult female stimuli. *Physiol. Behav.* 21, 1009–1013.
- Svare, B., Broida, J., 1982. Genotypic influences on infanticide in mice: environmental, situational and experiential determinants. *Physiol. Behav.* 28, 171–175.
- Svare, B., Kinsley, C.H., Mann, M.A., Broida, J., 1984. Infanticide: accounting for genetic variation in mice. *Physiol. Behav.* 33, 137–152.
- Swann, J., Fiber, J.M., 1997. Sex differences in function of a pheromonally stimulated pathway: role of steroids and the main olfactory system. *Brain Res. Bull.* 44, 409–413.
- Vom Saal, F.S., 1985. Time-contingent change in infanticide and parental behavior induced by ejaculation in male mice. *Physiol. Behav.* 34, 7–15.
- Vom Saal, F.S., Howard, L.S., 1982. The regulation of infanticide and parental behavior: implications for reproductive success in male mice. *Science* 215, 1270–1272.
- Weber, E.M., Olsson, A.S., 2008. Maternal behavior in *Mus musculus* sp.: an ethological review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 114, 1–22.
- Wesson, D., Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J., Bakker, J., 2006. Enhanced urinary odor discrimination in female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm. Behav.* 49, 580–586.

**Œstradiol**  
**&**  
**Féminisation**

## IV.2 Principaux résultats & discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que les comportements parentaux étaient sexuellement différenciés suite à l'influence des œstrogènes prénataux. En effet, des femelles AFP-KO vierges montrent une totale déféminisation de leur comportement maternel envers des souriceaux. Dans ce cas précis, nous pouvons même parler de masculinisation au vu du comportement infanticide (caractéristique typiquement mâle) développé par ces femelles. De l'autre côté, les femelles WT prodiguent des soins parentaux tout à fait appropriés aux souriceaux.

Les individus AFP-KO, mâles comme femelles, montrent les mêmes temps d'investigation des différentes odeurs urinaires proposées lors du test d'habituation/déshabituaton comparativement à leurs homologues WT. Les déficits parentaux observés chez ces sujets AFP-KO ne découlent donc pas d'une altération des capacités de détection et de discrimination d'indices olfactifs socio-sexuels. Enfin, ces sujets ne montrent pas non plus une anxiété accrue ou une réactivité différente face à un nouvel objet, suggérant donc bien que les œstrogènes prénataux jouent un rôle primordial dans l'établissement de l'expression du comportement maternel à l'âge adulte.

Afin d'apporter la preuve indéniable de cette contribution oestrogénique prénatale, nous envisagerions de traiter des mères gestantes avec de l'ATD (inhibiteur d'aromatase) afin d'évaluer ensuite le comportement maternel à l'âge adulte chez les femelles AFP-KO issues de cette portée.

Finalement, une autre approche intéressante serait d'étudier l'induction du comportement maternel par la prolactine chez ces animaux AFP-KO. Shingo et ses collaborateurs (2003) ont démontré que la sécrétion de prolactine induite par la gestation augmentait la neurogenèse olfactive, et conséquemment, facilitait l'expression du comportement maternel. Toutefois, les souris AFP-KO femelles étant stériles, leurs

déficits parentaux pourraient donc provenir d'une altération de ce système prolactine. En effet, cette hormone est indispensable à l'expression du comportement maternel; des souris PRL-KO (mutées pour l'expression du récepteur à la prolactine) montrent de gros déficits au niveau des soins parentaux (Lucas et al., 1998). Ainsi, nous pourrions envisager d'étudier la distribution des récepteurs à la prolactine, sexuellement dimorphique au sein de plusieurs noyaux hypothalamiques tels que le MPOA, l'AVPv et le noyau arqué (Pi and Grattan, 1998), chez les femelles AFP-KO. Si l'expression de ces récepteurs n'était pas affectée, nous pourrions alors réaliser des microinjections localisées de prolactine au sein du MPOA (Bridges and Ronsheim, 1990) afin de vérifier si un comportement maternel approprié peut être induit chez les femelles AFP-KO.

Il a été également démontré que dans certaines conditions, les phéromones mâles pouvaient inhiber la sécrétion de prolactine, phénomène contribuant notamment à l'effet Bruce chez les souris (Li et al., 1989, 1990). Cependant, chez des souris femelles vierges, l'exposition à des odeurs émises par un conspécifique mâle engendre une augmentation des taux plasmatiques de prolactine et affectent indirectement l'expression du comportement maternel, en modulant notamment la neurogenèse olfactive (Larsen et al., 2008). Nous pourrions donc reproduire cette expérience chez les sujets AFP-KO, afin d'établir si les œstrogènes prénataux modifient cette neurogenèse induite par la prolactine, à condition que les sujets AFP-KO présentent bien des récepteurs à la prolactine.

Parallèlement, il serait intéressant de mener la même étude chez les individus ArKO afin de déterminer si les effets postnataux des œstrogènes sont nécessaires à la féminisation du comportement maternel.

# **I. Détermination d'une période d'influence oestrogénique postnatale chez la souris femelle**

## **I.1 Introduction**

Selon la théorie classique de la différenciation sexuelle, les caractéristiques de type femelle se développent « par défaut », c.à.d. en l'absence de toute influence d'une production hormonale gonadique. Cependant, depuis quelques décennies, plusieurs études tendent à démontrer une influence postnatale féminisante des œstrogènes, mais sans réellement apporter de preuves indéniables (Lisk, 1969 ; Gerall et al., 1973 ; Toran-Allerand, 1976 ; Stewart and Cygan, 1980 ; Dohler et al., 1984 ; Baum et Tobet, 1986). De plus, très peu d'études ont été menées chez la souris, entraînant ainsi d'énormes lacunes quant à la caractérisation d'une période critique sensible chez cet animal. Avec l'apparition du modèle de souris transgénique ArKO présentant de nombreux déficits comportementaux suite à une absence permanente de sécrétions oestrogéniques mais possédant toujours des ER fonctionnels permettant ainsi de répondre à des traitements oestrogéniques exogènes, nous allons pouvoir répondre à ces deux questions en même temps.

Afin de déterminer la contribution potentielle des œstrogènes postnatals dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale, nous avons étudié l'expression postnatale d'un gène « œstradiol-dépendant », le récepteur à la progestérone (PR), chez des individus ArKO mâles et femelles de P0 à PN25. En effet, l'expression des PR au sein de l'hypothalamus est fortement « up-réglée » par l'E<sub>2</sub> chez les rongeurs femelles adultes (Quadros et al., 2002a, b). Le groupe de recherche de Wagner a mené bon nombre d'expériences sur l'expression des PR, tant chez le rat que chez la souris. Ainsi, ils ont démontré notamment que le nombre de cellules immunoréactives pour le PR (PR-ir) était significativement plus important au niveau de l'AVPv, du MPOA et du VMHvl (trois noyaux cérébraux jouant un rôle important dans la médiation du

comportement reproducteur chez les deux sexes) chez les mâles nouveau-nés que chez les femelles (Wagner et al., 2001 ; Quadros and Wagner, 2008). L'E<sub>2</sub>, principal métabolite de la T produite en grande concentration à la naissance chez les mâles, module l'expression des PR à cet âge au sein du MPOA (Quadros et al., 2002c). De plus, une administration transplacentaire d'ATD (inhibiteur d'aromatase) diminue fortement l'expression des PR chez les embryons femelles (Jahagirdar et al., 2008).

Si l'E<sub>2</sub> postnatal contribue effectivement à la féminisation des caractéristiques de type femelle, nous devrions alors observer :

- une diminution de l'expression des PR chez les individus ArKO (ne pouvant pas convertir la T en E<sub>2</sub>) comparativement aux sujets WT ;
- un nombre plus important de cellules PR-ir à la naissance chez les mâles WT comparativement aux femelles WT. Ces différences devraient s'amoinrir avec la production ovarienne débutant au 7<sup>ème</sup> jour.

## Reduced Prepubertal Expression of Progesterone Receptor in the Hypothalamus of Female Aromatase Knockout Mice

Olivier Brock, Quentin Douhard, Michael J. Baum, and Julie Bakker

Groupe Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée-Neurosciences (O.B., Q.D., J.B.), University of Liege, 4000 Liege, Belgium; and Department of Biology (M.J.B.), Boston University, Boston, Massachusetts 02215

Previous research using  $\alpha$ -fetoprotein knockout and aromatase knockout (ArKO) female mice suggested that the developing hypothalamic mechanisms that later control feminine sexual behavior are protected prenatally from estradiol, whereas shortly after birth, they may be stimulated by this same sex hormone. In the present study, we found that the amount of progesterone receptor immunoreactivity (PR-ir) in the anteroventral periventricular nucleus and medial part of the medial preoptic nucleus was significantly lower in ArKO female mice than in wild-type (WT) females at several prepubertal ages including postnatal d 15 (P15), P15, P20, and P25 but not neonatally at P0, P5, or P10. Likewise, PR-ir in the lateral subdivision of the ventromedial hypothalamic nucleus was significantly lower at P25 in ArKO vs. WT female mice but not at earlier postnatal ages. PR-ir was consistently higher in male than in female WT mice in the anteroventral periventricular nucleus and medial preoptic nucleus over P0–P10 and in the ventromedial hypothalamic nucleus over P0–P20. In these brain regions across these latter ages, PR-ir in male ArKO mice was significantly lower than in WT males and resembled the values seen in WT females, confirming previous reports that estradiol formed in the developing male hypothalamus from testicular testosterone is responsible for male-typical levels of neural PR expression. Thus, estradiol induces both female- and male-typical expression of PR postnatally in the mouse hypothalamus. Future experiments will determine whether this estradiol-induced PR expression contributes to either female- or male-typical brain and behavioral differentiation. (*Endocrinology* 151: 1814–1821, 2010)

A central tenet of contemporary theories of mammalian brain and behavioral sexual differentiation is that an organizational action of testosterone, secreted perinatally by the male's testes, controls male-typical facets of brain and behavioral development, whereas no active perinatal sex hormone signaling is required for female-typical differentiation. In rodents (1) and carnivores (2), much evidence suggests that many, although not all, of the perinatal organizational actions of testosterone on male nervous system development actually result from the cellular effects of estradiol formed via the local, neural aromatization of circulating testosterone. It was proposed

many years ago (3) that the brain of the developing female rodent fetus is protected from the actions of maternal estradiol and/or from aromatized products of testosterone derived from adjacent male fetuses by the relatively high-affinity binding of this sex hormone by circulating  $\alpha$ -fetoprotein (AFP). Indeed, Bakker *et al.* (4) found that the capacity of AFP-null mutant [AFP-knockout (KO)] female mice to display feminine receptive sexual behavior (lordosis) after adult ovariectomy and treatment with estradiol plus progesterone was severely attenuated. Likewise, AFP-KO females had a male-like number of tyrosine hydroxylase immunoreactive (ir) cells in the sexually differ-

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

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2009-1379 Received December 1, 2009. Accepted January 15, 2010.  
First Published Online February 24, 2010

Abbreviations: AFP,  $\alpha$ -Fetoprotein; ArKO, aromatase-KO; ATD, 1,4,-androstatriene-3,17-dione; AVPV, anteroventral periventricular nucleus; ER, estradiol receptor; ir, immunoreactive; KO, knockout; MPOA, medial preoptic area; P7, postnatal d 7; PR, progesterone receptor; TBS, Tris-buffered saline; TBST, TBS containing 0.2% Triton X-100; VMH-L, lateral part of the ventromedial hypothalamic nucleus; WT, wild type.

entiated anteroventral periventricular nucleus (AVPv) of the hypothalamus. Both of these behavioral and morphological consequences of the AFP-null mutation in female mice were reversed by transplacental treatment with an aromatase-inhibiting drug, 1,4,-androstatriene-3,17-dione (ATD). These results provide evidence that circulating AFP binds circulating estradiol in female fetuses so as to protect their brains from the potential defeminizing actions of this hormone that otherwise normally occur in the male nervous system in response to estradiol synthesized from testosterone after it is taken up from the circulation.

Toran-Allerand (5) first proposed that estradiol may actively contribute to the differentiation of female-typical aspects of brain and behavioral sexual differentiation. Early studies (6, 7) reported that removing the ovaries neonatally from female rats reduced their later lordotic responsiveness to ovarian hormones and that treatment with estradiol over peripubertal ages reversed the behavioral deficits induced by neonatal ovariectomy. More recently (8, 9), it was proposed that different doses of genes expressed off the X chromosome in XY (male) *vs.* XX (female) mice influence aspects of brain and behavioral sexual differentiation, perhaps reflecting a nonhormonal, genetic signaling mechanism that actively promotes female-typical brain sexual differentiation. Additional evidence of a possible contribution of estradiol to female-typical behavioral development involved the report (10) that aromatase-KO (ArKO) female mice showed significantly lower levels of lordosis behavior than wild-type (WT) controls after adult ovariectomy and treatment with ovarian hormones. ArKO females also showed significantly lower levels of olfactory investigation of urinary odors from male and female conspecifics and significantly less male-like mounting behavior toward a stimulus female than WT females. Finally, ArKO females had significantly fewer kisspeptin neurons than WT females in the AVPv (11). These results have resurrected the question of whether estradiol, acting during the first several weeks of life, actively contributes to female-typical brain and behavioral sexual differentiation (12), perhaps beginning after postnatal d 7 (P7) when the rat ovary first produces estradiol (13).

One approach to the question of whether estradiol actively contributes to female-typical brain sexual differentiation would be to compare the postnatal neural expression of an estradiol-dependent gene in ArKO female mice, which produce no estradiol in any tissue, and in WT control females. The expression of progesterone receptor (PR) in the hypothalamus of adult female rodents is well known to be dramatically up-regulated by estradiol (14, 15). Likewise, Wagner and co-workers have conducted an extensive series of experiments showing that the number of

PR-ir cells in the medial preoptic area (MPOA), the lateral part of the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH-L), and AVPv of both rat (16) and mouse (17, 18) is significantly greater in neonatal males than in females. Additional work from this group (18, 19) showed that estradiol, formed via the neural aromatization of testosterone in male neonates, is responsible for the higher, male-typical levels of PR expression in the MPOA. Finally, another study from this group (20) found that transplacental administration of the aromatase blocker ATD significantly reduced PR-ir in the MPOA of female rats killed at the end of gestation. Based on these results, we sought to use the expression of PR in three different hypothalamic regions, AVPv, MPOA, and VMH-L, as an index of estradiol's action in the female mouse brain across the first 25 d of postnatal development. We predicted that if estradiol normally acts in the developing female mouse hypothalamus, we would see significantly less PR-ir in some or all of these three brain regions from ArKO females (which cannot synthesize estradiol) *vs.* WT females at one or several of the postnatal ages studied. Finally, to confirm that our method of monitoring PR-ir in postnatal hypothalamic regions was reliable, we analyzed PR-ir in the same hypothalamic regions and at the same postnatal ages in WT males in an attempt to replicate the previous reports of Wagner *et al.* (21) of a sex difference in hypothalamic expression of PR shortly after birth. We also added groups of ArKO males to further test the hypothesis (15) that estrogenic metabolites of testosterone, formed in the male hypothalamus, stimulate the high, male-typical levels of neonatal PR expression.

## Materials and Methods

### Animals and tissue preparation

ArKO mice were generated by targeted disruption of exons 1 and 2 of the *Cyp 19* gene and consequently could not convert androgens into estrogens (22). Heterozygous males and females of the C57BL/6J strain were bred to generate WT, heterozygous, and homozygous-null (ArKO) offspring at the Center for Cellular and Molecular Neurobiology (now named GIGA Neurosciences), University of Liège, Liège, Belgium. Food (phytoestrogen-free mouse chow D10001 AIN-76A; Brogaarden, Lynge, Denmark) and water were available to mice *ad libitum*. To obtain brain tissues at postnatal ages, pregnant females were checked daily for parturition toward the end of pregnancy. Because all breeding females were housed under a 12-h light, 12-h dark cycle (lights on between 0800 and 2000 h), parturition usually occurred in the morning, 1–2 h after lights on. The day of birth was designated as P0. Brain tissues were collected on P0, P5, P10, P15, P20, and P25. We collected brains at these 5-d intervals because neonatal estradiol has been shown to induce hypothalamic PR expression in fewer than 5 days (15). Postnatal mice were decapitated whereupon brains were rapidly removed from the skull and immediately immersion fixed in 5% acrolein

in 0.1 M PBS (pH 7.6) for 2.5 h, rinsed twice in PBS for 30 min, and then cryoprotected in 30% sucrose and when sunken, frozen on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until being processed for PR immunocytochemistry. The sex of each pup was determined by visual inspection of the ano-genital distance, and the presence of ovaries or testes was confirmed by laparotomy. To determine the genotype of the pup, the tail was kept and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later PCR analysis of DNA. The number of animals used for each group was as follows: female WT, P0 = 8, P5 = 8, P10 = 8, P15 = 8, P20 = 8, and P25 = 8; female ArKO, P0 = 7, P5 = 7, P10 = 8, P15 = 8, P20 = 8, and P25 = 7; male WT, P0 = 6, P5 = 7, P10 = 7, P15 = 8, P20 = 7, and P25 = 7; and male ArKO, P0 = 7, P5 = 9, P10 = 7, P15 = 8, P20 = 8, and P25 = 8.

Brain sections (30  $\mu\text{m}$  thick) were cut on a Leica CM3050S cryostat. Forebrains were cut coronally from the level of the end of the olfactory bulb. Sections were saved in three different series, placed in antifreeze solution, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later immunocytochemistry.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines set forth by the National Institutes of Health Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals and were approved by the Committees for Ethical Animal Use at the University of Liège and at Boston University.

### Immunocytochemistry

Every effort was made to include an equal number of brains from all 24 groups in each immunocytochemistry run. PR immunocytochemistry was carried out on free-floating sections. All incubations were carried out at room temperature ( $22^{\circ}\text{C}$ ), and all washes of brain tissue sections were performed using Tris-buffered saline (TBS, 0.05 M) or TBS containing 0.2% Triton X-100 (TBST). Briefly, sections were rinsed and incubated in 10% sodium borohydride for 15 min. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the sections for 30 min with 3% hydrogen peroxide. Aspecific binding sites were then blocked by incubating sections for 30 min with 5% normal goat serum (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Sections were then incubated with a rabbit polyclonal antibody (1/1000 in TBST-normal goat serum 2%; Dako Cytomation) against the DNA-binding domain of the human PR for 72 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . This antibody detects both the A and B isoforms of PR (23) and has been validated for specific staining of PR in mouse brain by Wagner *et al.* (21) and in the Bakker laboratory (unpublished results). Sections were then incubated for 1 h in a goat antirabbit biotinylated antibody (1:800 in TBST; Dako Cytomation). Sections were then incubated for 1 h in avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and then reacted for 7 min with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB kit; Vector). Sections were then washed, mounted onto gelatin-coated slides, dried overnight, and coverslipped with a gelatin-based medium.

### Image analysis and statistics

The relative amount of PR-ir was measured in three brain areas (Fig. 1): the AVPv (Fig. 28 of the mouse atlas: interaural, 4.18 mm; bregma, 0.38 mm), the medial part of the MPOA (Fig. 30 of the mouse atlas: interaural, 3.94 mm; bregma, 0.14 mm), and the VMH-L (Fig. 43 of the mouse atlas: interaural, 2.34 mm; bregma,  $-1.46$  mm) (24). PR-ir was quantified by an experimenter, who was blind to the sex/genotype of the mice, using computer-assisted image analysis. Sections were digitized

through a video camera (CCD camera, XC-77CE, Sony) attached to a microscope (Olympus MTV-3 with  $\times 20$  objective), and PR-ir was quantified with a PC-based image analysis system using the particle-counting protocol of the NIH Image program (version 1.37; Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Digital images were made binary, and a manual threshold was used for discriminating the labeled material from the background. With a  $\times 20$  objective, exclusion thresholds were set at five (low threshold) and 200 (high threshold) pixels to remove from the quantification dark objects that were not the same size as a cell nucleus. The relative amount of PR-ir in the AVPv, MPOA, and VMH-L was measured in one entire field ( $720 \times 480$  pixels; area =  $328,769 \mu\text{m}^2$ ) placed in a standardized manner based on predefined anatomical landmarks in the sections (*e.g.* edge of the third ventricle or prominent fiber tracts) and determined by measuring the area (square micrometers) covered by thresholded pixels [those pixels with a gray level higher than a defined threshold density (specific immunoreactive staining)]. Threshold was determined as a constant function of the background OD defined as the mean OD three to five times the SD higher than the mean background density. The mean background density was measured in a region devoid of PR-ir, immediately lateral to the analyzed region containing PR-ir. We measured the relative amount of PR-ir in sections from the right hemisphere of each animal that included the three selected brain regions.

Statistical analysis was performed using a three-way ANOVA [ $P < 0.05$ ; factors included age (six)  $\times$  genotype (four)  $\times$  sex (two)], followed by planned pairwise comparisons using Fisher least significant difference *post hoc* tests ( $P < 0.05$ ).

### Results

Representative examples of PR-ir cells in the MPOA of WT *vs.* ArKO female and male mice killed at P10 are shown in Fig. 2. PR-ir first appeared in the MPOA of WT females at P10, and the levels of PR expression progressively increased in WT females over P10–P25 (Fig. 3). Over this prepubertal period, PR-ir was consistently lower in ArKO females than in WT females. ANOVA revealed a significant effect of genotype [ $F_{(1,154)} = 367.7$ ;  $P < 0.0001$ ], and *post hoc* comparisons showed that relative amount of PR-ir was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in ArKO female than in WT female mice at each of the prepubertal ages P15–P25. WT male mice consistently had more PR-ir in the MPOA than WT females across the neonatal ages P0–P10. ANOVA revealed a significant effect of sex [ $F_{(1,154)} = 80.4$ ;  $P < 0.0001$ ], and *post hoc* comparisons revealed significant ( $P < 0.05$ ) differences between WT male and WT female relative amount of PR-ir at P0–P10 but not at later ages. The relative amount of PR-ir in the MPOA was consistently significantly ( $P < 0.05$ ) lower in ArKO males than in WT males at all six postnatal ages studied.

PR-ir first appeared in the AVPv of WT females at P10, and the levels of PR expression progressively increased in

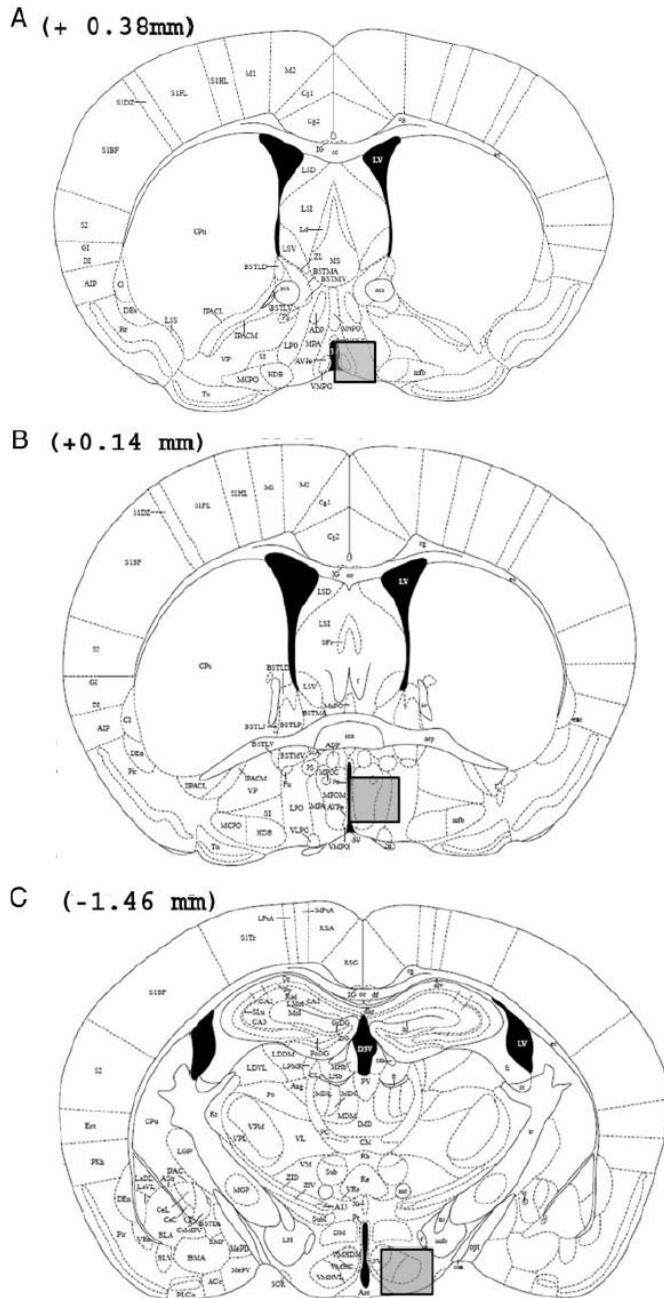


FIG. 1. Drawings taken from the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (24) showing the location of forebrain regions in which PR-ir cells were quantified (shaded areas in each panel) in the AVPv (A), MPOA (B), and VMH-L (C). The distance of each coronal brain slice in front of (+) or behind (–) bregma is given for each panel.

WT females over P10–P25 (Fig. 4). Over this prepubertal period, PR-ir was consistently lower in ArKO females than in WT females. ANOVA revealed a significant effect of ge-

notype [ $F_{(1,150)} = 148.1; P < 0.0001$ ], and *post hoc* comparisons showed that relative amount of PR-ir was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in ArKO female than in WT female mice at each of the ages P15–P25. WT male mice consistently had more PR-ir in the AVPv than WT females across the neonatal ages P0–P10. ANOVA revealed a significant effect of sex [ $F_{(1,150)} = 42.7; P < 0.0001$ ], and *post hoc* comparisons revealed significant ( $P < 0.05$ ) differences between WT male and WT female relative amount of PR-ir at P0–P10 but not at later ages. The relative amount of PR-ir in the AVPv was consistently significantly ( $P < 0.05$ ) lower in ArKO males than in WT males at all six postnatal ages studied.

There was a progressive increase in the relative amount of PR-ir in the VMH-L of both WT and ArKO female mice across the postnatal ages sampled (Fig. 5), with the values in ArKO females being lower than in WT females only at P25. ANOVA revealed a significant effect of genotype [ $F_{(1,156)} = 101.4; P < 0.0001$ ], and *post hoc* comparisons showed that relative amount of PR-ir was significantly ( $P < 0.05$ ) lower in ArKO females than in WT females only at P25. There was much more PR-ir in the VMH-L of WT males than in WT females across the postnatal ages P0–P20. ANOVA revealed a significant effect of sex [ $F_{(1,156)} = 81.8; P < 0.0001$ ], and *post hoc* comparisons showed that the relative amount of PR-ir was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the VMH-L of WT males than WT females over P0–P20. Again, there was significantly ( $P < 0.05$ ) less PR-ir in the VMH-L of ArKO males than WT males across all six postnatal ages sampled. Thus, the pattern of PR-ir in the VMH-L was clearly different from that observed for the MPOA and AVPv.

### Discussion

The present results support the view (12) that estradiol contributes prepubertally to at least one female-typical aspect of development in both the MPOA and the AVPv, the expression of PR. Thus, in WT female mice, we first detected PR-ir cells in

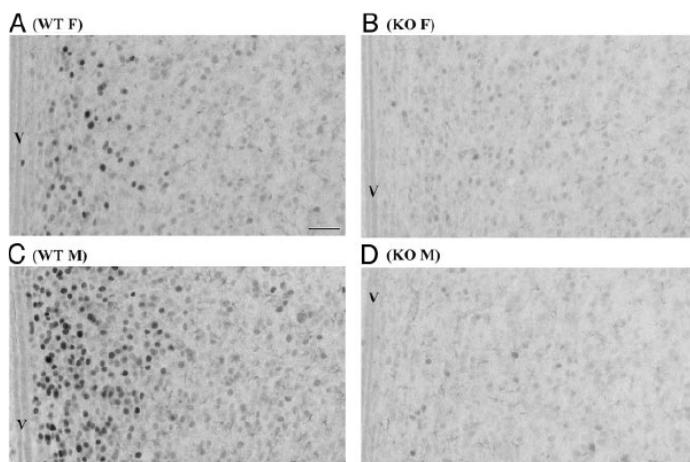


FIG. 2. Representative photomicrographs show coronal sections of the MPOA with PR-ir cells in a WT female (A), an ArKO female (B), a WT male (C), and an ArKO male (D) at P10. V, Third ventricle. Scale bar, 40  $\mu$ m.

both of these brain regions at P10, and the levels of PR expression steadily increased in WT females killed over the ages P15–P25. Our observation that PR-ir values in both the MPOA and the AVPv were significantly lower in ArKO females than in WT females across the ages P15–P25 suggests that estradiol normally stimulates PR expression at these prepubertal ages in WT female mice. Wagner *et al.* (18) also first detected PR-ir cells in the MPOA of WT female mice killed at P8 (older ages were not studied), and this level of PR expression was not different from that of estradiol receptor (ER)- $\alpha$  KO females. It is not known

whether PR expression would be reduced in ER- $\alpha$  KO female mice killed at later postnatal ages (e.g. P10–P25). The results of several studies using female rats further support our conclusion that estradiol normally stimulates female-typical levels of prepubertal PR expression in the mouse MPOA, although the exact timing of estradiol's postnatal action may differ between the two species. Thus, ovariectomy shortly after birth significantly reduced PR-ir in the MPOA of female rats killed at P13 (14) or at P14 (16). In the latter study (16), administration of estradiol to ovariectomized female rats significantly augmented PR-ir in the MPOA across a range (P7–P67) of postnatal ages. Also, neonatal administration of an ER- $\alpha$ , but not an ER- $\beta$  agonist, reliably stimulated PR expression in the MPOA of female rats killed on P7 (25). Finally (20), transplacental administration of the aromatase-blocking drug ATD significantly reduced PR-ir present in the female rat MPOA at the end of gestation.

The traditional view is that female-typical aspects of hypothalamic sexual differentiation in mammals occur without the benefit of any active sex hormone signaling (12). The present data from mice along with the rat data cited above suggest, however, that the female-typical, prepubertal profile of PR expression in the MPOA as well as the AVPv depends on a stimulatory action of estradiol.

More research is needed to identify the sources of this estradiol, which may include the females' ovaries and/or *de novo* synthesis in the female hypothalamus (20). Additional studies are also needed to see whether the prepubertal increase in neural PR expression seen in WT females is simply a passive, inconsequential response to increased ovarian production of estradiol or, alternatively, whether long-lasting morphological and/or behavioral neuroendocrine consequences of this prepubertal estrogenic stimulation of PR expression can be identified in the female rodent MPOA and AVPv. A feminizing role for estradiol has been reported in the development of the sexually dimorphic expression of kisspeptin (females more than males), an important modulator of GnRH secretion (11, 26). Both studies reported decreased numbers of kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the third ventricle, which includes the AVPv, in adult female ArKO mice, even after treatment with estradiol

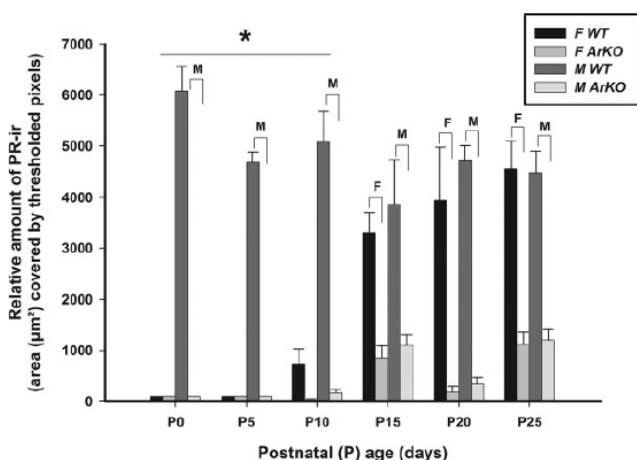
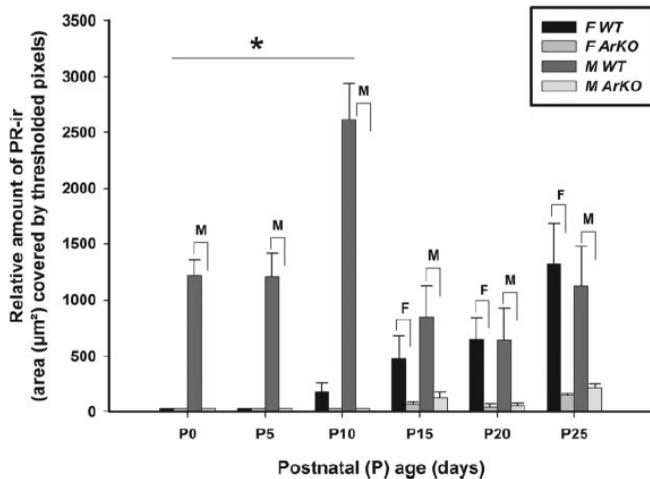


FIG. 3. The relative amount (mean  $\pm$  SEM) of PR-ir in the MPOA on P0, P5, P10, P15, P20, and P25 in male (M) and female (F) mice that were either WT or ArKO. \*, Post hoc comparisons indicated a significant ( $P < 0.05$ ) sex difference in WT mice at the ages indicated. Post hoc comparisons also indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences between WT vs. ArKO females (F over brackets) and between WT and ArKO males (M over brackets) at the ages shown.

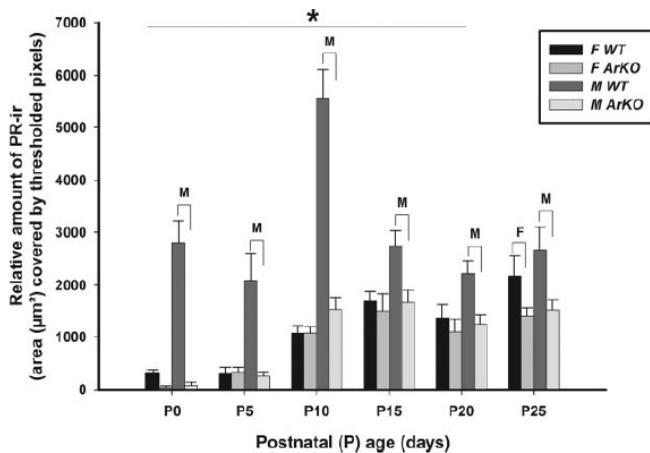


**FIG. 4.** The relative amount (mean  $\pm$  SEM) of PR-ir in the AVPv on P0, P5, P10, P15, P20, and P25 in male (M) and female (F) mice that were either WT or ArKO. \*, *Post hoc* comparisons indicated a significant ( $P < 0.05$ ) sex difference in WT mice at the ages indicated. *Post hoc* comparisons also indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences in WT vs. ArKO females (F over brackets) and between WT and ArKO males (M over brackets) at the ages shown.

in adulthood (11). Clarkson *et al.* (26) also showed that ovariectomy of female mice at P15 resulted in a 70–90% reduction in kisspeptin expression within the rostral periventricular area of the third ventricle analyzed at either P30 or P60, whereas administration of  $17\beta$ -estradiol to P15-ovariectomized mice from P15–P30 or P22–P30 completely restored kisspeptin expression in this brain region. These results suggest that the sex difference in

kisspeptin neuronal number in WT mice reflects a prepubertal, organizational action of estradiol in females. Additional evidence of an organizational role for prepubertal ovarian hormones is the observation (27) that ovariectomy on P20 reduced the later incorporation of newly born neurons into the female rat AVPv. More research is needed to determine whether any of these prepubertal, organizational actions of estradiol on the developing female nervous system are mediated by the induction of PR and the concurrent effects of progesterone.

Compared with the timing of estradiol action in the MPOA and AVPv, our results suggest that there is a delay in the postnatal age at which the female-typical profile of VMH-L PR expression in mice depends on the stimulatory action of estradiol. Thus, at ages P0–P20, there were no differences in PR-ir cell number between WT and ArKO females; only at P25 was PR-ir cell number significantly lower in ArKO than in WT females. Results obtained in rats (16) point to a similar, albeit shorter, delay in the postnatal age when estradiol first stimulates PR expression in the female VMH-L. Thus, ovariectomy on P0 failed to reduce PR-ir cell number in the VMH-L of female rats killed on P4, and administering estradiol to neonatally ovariectomized females failed to stimulate PR expression at P7, whereas significant estradiol-induced PR expression was seen over ages P14–P67.



**FIG. 5.** The relative amount (mean  $\pm$  SEM) of PR-ir in the VMH-L on P0, P5, P10, P15, P20, and P25 in male (M) and female (F) mice that were either WT or ArKO. \*, *Post hoc* comparisons indicated a significant ( $P < 0.05$ ) sex difference in WT mice at the ages indicated. *Post hoc* comparisons also indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences in WT vs. ArKO females (F over brackets) and between WT and ArKO males (M over brackets) at the ages shown.

In another study (25), administration of a specific ER- $\alpha$  agonist on P5 and P6 was even more effective than estradiol in stimulating PR-ir cell number in the VMH-L of female rats killed at P7. Furthermore, concurrent administration of an ER- $\beta$  agonist together with the ER- $\alpha$  agonist reduced the stimulation of PR expression on P7 otherwise obtained by administering the ER- $\alpha$  agonist alone, suggesting that an early neonatal period exists when ER- $\beta$  activation inhibits ER- $\alpha$ -induced transcriptional activity. After an initial neonatal delay in both female rats and mice, estradiol, acting via ER- $\alpha$ , reliably stimulates PR expression in the VMH-L across the life span. At the age of puberty, this estradiol-stimulated expression of PR in the VMH contributes importantly to the induction of proceptive and receptive aspects of feminine mating behaviors shown in response to progesterone (28). Ovarian steroids are thought to stimulate sexual recep-

tivity (lordosis) in female rodents by acting in the VMH-L (28). The observation (10) that ArKO female mice showed significantly less lordosis behavior than WT control females after ovariectomy, and treatment with estradiol and progesterone in adulthood is correlated with the present observation that PR expression was significantly reduced at least at one prepubertal age (P25). Again, more research is needed to determine whether a causal link exists between the absence of an estradiol-induced stimulation of PR expression (with a resultant loss of responsiveness to progesterone) in the VMH-L on or after P25 in ArKO females and their later behavioral refractoriness to ovarian hormones.

The present results confirm and extend to P10 a previous report (18) that PR-ir cell number was significantly greater in both the MPOA and VMH-L of WT male than WT female mice killed at P0, P4, and P8. A similar sex difference in PR expression in the MPOA across perinatal ages was also reported in the rat (15, 29). Another report from that group (21) showed that the organizational effects of testicular hormone (presumably testosterone), as opposed to genes expressed directly off the sex chromosomes, stimulate increased expression of PR neonatally in the MPOA and VMH-L of male *vs.* female mice. Indeed, castration of male rats on the day of birth significantly reduced PR expression in the MPOA over the next several days (19). Many of the perinatal actions of testosterone in the male rodent hypothalamus depend on the neural aromatization of this androgen into estradiol and the subsequent activation of ER- $\alpha$  and/or - $\beta$  (1). Our observation that PR-ir in the MPOA, AVPV, and VMH-L was significantly lower in ArKO males than in WT males across a range of postnatal ages (P0–P25) suggests that estrogenic metabolites of testosterone play an essential role in establishing the male-typical profile of hypothalamic PR expression in neonatal mice. A similar conclusion can be drawn from the report (18) that PR-ir values in both the MPOA and VMH-L were significantly lower in male mice with a null mutation of ER- $\alpha$  than in WT males killed at P0, P4, and P8. Likewise, transplacental administration of the aromatase blocker ATD significantly attenuated PR expression in the MPOA and AVPV of male rats killed at the end of gestation (15). Taken together, these results for mice and rats strongly suggest that the male-typical profile of PR expression in both MPOA and VMH-L depends on the stimulatory action of estradiol formed via the neural aromatization of testosterone secreted perinatally by the testes.

Just as it is unknown whether prepubertal estradiol-induced expression of hypothalamic PR expression contributes in the long term to female-typical brain and behavioral differentiation, it is uncertain whether the increased neo-

natal expression of PR in the male rodent MPOA, AVPV, and/or VMH-L contributes to the testosterone-dependent, male-typical organization of brain and behavior. It has been reported (14) that neonatal treatment of female rats with the PR antagonist RU486 significantly attenuated the masculinizing effect of neonatal testosterone on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the POA, whereas in another study (30), neonatal RU486 significantly reduced the proportion of male rats that showed mounting behavior in adult tests with an estrous female rat. Interpretation of these results is complicated by the fact the RU486 antagonizes glucocorticoid receptors in addition to PR (31). Also, other studies (32, 33) revealed either no significant disruption or an enhancement of masculine sexual behavior in PRKO male mice. Likewise, there was no disruption of normal male-male aggressive behavior in PRKO males (34). More research is needed to determine whether other male-typical as well as female-typical aspects of brain, behavioral, and/or reproductive neuroendocrine sexual differentiation are disrupted in PRKO mice of either sex.

## Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Julie Bakker, GIGA-Neurosciences, Avenue de l'Hopital (B36), 4000 Liege, Belgium. E-mail: jbakker@ulg.ac.be.

This work was supported by National Institutes of Health Grant HD044897 and Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) MIS F.4502.07. J.B. is a research associate of the Belgian FNRS.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

1. De Vries GJ, Simerly RB 2002 Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, eds. *Hormones, brain and behavior*. Amsterdam: Academic Press; 137–191
2. Baum MJ, Carroll RS, Cherrv JA, Tobet SA 1990 Steroidal control of behavioural, neuroendocrine and brain sexual differentiation: studies in a carnivore, the ferret. *J Neuroendocrinol* 2:401–418
3. McEwen BS, Plapinger L, Chaptal C, Gerlach J, Wallach G 1975 Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res* 96: 400–406
4. Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C 2006 Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 9:220–226
5. Toran-Allerand CD 1976 Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area *in vitro*: implications for sexual differentiation. *Brain Res* 106:407–412
6. Gerall AA, Dunlap JL, Hendricks SE 1973 Effect of ovarian secretions on female behavioral potentiality in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 82:449–465

7. Steward J, Cygan D 1980 Ovarian hormones act early in development to feminize adult open-field behavior in the rat. *Horm Behav* 14:20–32
8. Arnold AP, Xu J, Grisham W, Chen X, Kim YH, Itoh Y 2004 Sex chromosomes and brain sexual differentiation. *Endocrinology* 145:1057–1062
9. De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, Swain A, Lovell-Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP 2002 A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci* 22:9005–9014
10. Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J 2002 The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 22:9104–9112
11. Bakker J, Pierman S, Gonzalez-Martinez D 27 November 2009 Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav* 10.1016/j.yhbeh.2009.11.005
12. Bakker J, Baum MJ 2008 Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29:1–16
13. Weniger JP, Zeis A, Chourauji J 1993 Estrogen production by fetal and infantile rat ovaries. *Reprod Nutr Dev* 33:129–136
14. Quadros PS, Lopez V, De Vries GJ, Chung WC, Wagner CK 2002 Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J Neurobiol* 51:24–32
15. Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK 2002 Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* 143:3727–3739
16. Quadros PS, Wagner CK 2008 Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology* 149:3054–3061
17. Kudwa AE, Harada N, Honda SI, Rissman EF 2009 Regulation of progesterone receptors in medial amygdala: estradiol, phytoestrogens and sex. *Physiol Behav* 97:146–150
18. Wagner CK, Pfau JL, De Vries GJ, Merchenthaler IJ 2001 Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor  $\alpha$  expression. *J Neurobiol* 47:176–182
19. Quadros PS, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK 2002 Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J Neuroendocrinol* 14:761–767
20. Jahagirdar V, Quadros PS, Wagner CK 2008 Endogenous oestradiol regulates progesterone receptor expression in the brain of female rat fetuses: what is the source of oestradiol? *J Neuroendocrinol* 20:359–365
21. Wagner CK, Xu J, Pfau JL, Quadros PS, De Vries GJ, Arnold AP 2004 Neonatal mice possessing an Sry transgene show a masculinized pattern of progesterone receptor expression in the brain independent of sex chromosome status. *Endocrinology* 145:1046–1049
22. Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S 1998 Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 252:445–449
23. Traish AM, Wotiz HH 1990 Monoclonal and polyclonal antibodies to human progesterone receptor peptide-(533–547) recognize a specific site in unactivated (8S) and activated (4S) progesterone receptor and distinguish between intact and proteolyzed receptors. *Endocrinology* 127:1167–1175
24. Paxinos G, Franklin KBJ 2001 The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press
25. Gonzales KL, Tetel MJ, Wagner CK 2008 Estrogen receptor (ER) $\beta$  modulates ER $\alpha$  responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 149:4615–4621
26. Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE 2009 Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150:3214–3220
27. Ahmed EI, Zehr JL, Schulz KM, Lorenz BH, DonCarlos LL, Sisk CLT 2008 Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat Neurosci* 11:995–997
28. Blaustein JD, Erskine MS 2002 Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, eds. *Hormones, brain and behavior*. Amsterdam: Academic Press; 139–214
29. Wagner CK, Nakayama AY, De Vries GJ 1998 Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology* 139:3658–3661
30. Lonstein JS, Quadros PS, Wagner CK 2001 Effects of neonatal RU486 on adult sexual, parental, and fearful behaviors in rats. *Behav Neurosci* 115:58–70
31. Munden PM, Schmidt TJ 1992 Mifepristone blocks specific glucocorticoid receptor binding in rabbit iris-ciliary body. *Arch Ophthalmol* 110:703–705
32. Phelps SM, Lydon JP, O'Malley BW, Crews D 1998 Regulation of male sexual behavior by progesterone receptor, sexual experience, and androgen. *Horm Behav* 34:294–302
33. Schneider JS, Burgess C, Sleiter NC, DonCarlos LL, Lydon JP, O'Malley B, Levine JE 2005 Enhanced sexual behaviors and androgen receptor immunoreactivity in the male progesterone receptor knockout mouse. *Endocrinology* 146:4340–4348
34. Schneider JS, Stone MK, Wynne-Edwards KE, Horton TH, Lydon J, O'Malley B, Levine JE 2003 Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2951–2956

## I.2 Principaux résultats & discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'œstradiol contribuait bien, pendant une période pré-pubère, au développement d'une caractéristique typiquement femelle, à savoir l'expression du récepteur à la progestérone. En effet :

- Les mâles WT montrent de hauts niveaux de cellules PR-ir à la naissance au sein de l'AVPv, du MPOA et du VMHvl, alors qu'aucun marquage n'est détecté chez les mâles ArKO et les femelles WT et ArKO. Ces différences sexuelles entre mâles et femelles WT disparaissent significativement dès PN15 au sein de l'AVPv et du MPOA, et à PN25 au sein du VMHvl. Par contre, les niveaux d'expression des PR au cours des différents âges postnataux restent relativement insignifiants chez les sujets ArKO mâles et femelles.
- Chez les femelles WT, les premières cellules PR-ir sont détectées à partir de PN10 (période à laquelle les ovaires commencent à sécréter des œstrogènes ; Mannan et al., 1991) au sein de l'AVPv et du MPOA pour atteindre ensuite très rapidement, dès PN15, les niveaux observés chez les mâles WT. Au niveau du VMHvl, la différence du nombre de cellules PR-ir entre les femelles WT et ArKO n'apparaît qu'à partir de PN25.

L'E<sub>2</sub> semble réguler l'expression des PR via les récepteurs oestrogéniques de type  $\alpha$ . En effet, l'administration d'un agoniste puissant des ER $\alpha$  (PPT) entre P5 et P6 stimule de manière encore plus marquée l'expression des PR à P7 au sein du VMHvl de jeunes rattes, tandis que l'injection simultanée d'un agoniste puissant des ER $\beta$  (DPN) réduit la stimulation de cette expression comparativement à l'administration du PPT seul (Gonzales et al., 2008). Ces données suggèrent donc que l'activation d'ER $\beta$  peut

inhiber l'activité transcriptionnelle induite par l'ER $\alpha$  au cours d'une période néonatale chez le rat.

Le délai observé quant à l'influence postnatale oestrogénique au sein du VMHvl chez les souris WT femelles (également observé chez le rat mais correspondant à une période plus précoce ; Quadros and Wagner ; 2008) pourrait simplement s'expliquer par l'apparition d'une distribution des récepteurs oestrogéniques plus tardive au sein de ce noyau cérébral comparativement à l'AVPv et le MPOA. Nous sommes actuellement occupés à étudier le profil d'expression des ces récepteurs oestrogéniques (ER $\alpha$ ) au cours des différents âges postnataux P0 à PN25. Une expérience complémentaire étudiant le profil d'expression des PR entre PN25 et PN40 (correspondant au début de la puberté chez la souris) nous permettrait d'encore mieux cerner l'influence des oestrogènes postnataux sur la différenciation sexuelle de type femelle ; en effet, nous pourrions imaginer que cette différenciation nécessite deux vagues de stimulation oestrogénique, la première correspondant au début des sécrétions ovariennes (P7) et la deuxième, au début de la puberté (P35-40).

Les perspectives de ces résultats ont été en partie réalisées dans l'article 6 et seront plus longuement discutées dans le chapitre « Discussion Générale ».

## **II. Restauration du phénotype WT suite à un traitement oestrogénique pré-pubère chez des femelles ArKO**

### **II.1 Introduction**

La preuve la plus indéniable d'une contribution active des œstrogènes postnataux dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale de type femelle consisterait en une restauration, suite à un traitement oestrogénique durant une période spécifique restreinte, d'un phénotype comportemental normal chez des individus exprimant des déficits comportementaux particuliers dus à une privation oestrogénique permanente.

Grâce à l'expression du récepteur à la progestérone, nous avons pu déterminer une fenêtre de temps pré-pubère (PN10 à PN25) apparemment sensible aux effets féminisants des œstrogènes (Brock et al., 2010). Dès lors, nous avons administré un traitement oestrogénique à des souris femelles ArKO (présentant des déficits comportementaux à l'âge adulte) durant deux périodes postnatales spécifiques s'étendant soit de P5 à P15, soit de P15 à P25. A l'âge adulte, nous avons donc observé, chez ces animaux traités, l'évolution de réponses comportementales telles que :

- L'expression de lordose. En effet, la réceptivité sexuelle des femelles ArKO ovariectomisées, traitées ensuite avec de l'E<sub>2</sub> et de la progestérone à l'âge adulte, est quasi inhibée lorsqu'elles rencontrent un mâle sexuellement expérimenté (Bakker et al., 2002a).
- Les préférences sexuelles. En effet, les femelles ArKO passent beaucoup moins de temps à investiguer des odeurs volatiles émises par des conspécifiques, et leurs préférences sexuelles n'ont jamais été clairement établies (Bakker et al., 2002b).

## RÉSULTATS

- Le comportement de monte. Cette caractéristique est observée de manière surprenante chez des femelles en œstrus envers d'autres femelles sexuellement réceptives (Martel and Baum, 2009). Les femelles ArKO, quant à elles, montrent une forte diminution du nombre de montes comparativement aux sujets WT (Bakker et al., 2002a).

**PREPUBERTAL ESTRADIOL RESCUES FEMALE SEXUAL BEHAVIOR IN AROMATASE KNOCKOUT MICE: NEW EVIDENCE FOR A ROLE OF ESTRADIOL IN THE DIFFERENTIATION OF FEMALE-TYPICAL COURTSHIP BEHAVIORS**

Olivier Brock and Julie Bakker\*

GIGA-Neurosciences, University of Liege, Avenue de l'Hôpital 1 (B36), 4000 Liege, Belgium

\*Corresponding author.

**Abstract**

The classic view of brain sexual differentiation holds that the neural mechanisms controlling courtship behavior in female rodents develop in the absence of ovarian sex hormone actions. However, in a previous study, female aromatase knockout (ArKO) mice, which cannot convert androgen to estradiol, showed deficient male-oriented partner preference and lordosis behaviors in response to adult ovarian hormones, raising the possibility that estradiol may contribute to the development of neural mechanisms controlling female sexual behavior. In the present experiments, administering estradiol prepubertally (between postnatal days P15-P25) significantly enhanced the ability of ArKO female mice to display lordosis behavior in response to ovarian hormones administered later in adulthood whereas treatment with estradiol over an earlier neonatal period (P5-P15) had no such effect. Treatment of ArKO females with estradiol between P15-P25 also rescued their later preference to approach distal cues from an intact male over an estrous female. ArKO females also displayed significantly less female-directed (male-typical) mounting behavior than wild type control females when treated with testosterone in adulthood; however prepubertal estradiol treatment failed to reverse this deficit. These results provide new evidence for a specific organizing role of prepubertal

estradiol in the development of neural mechanisms that control female-typical courtship behavior.

**Keywords:** aromatase knockout, sexual differentiation, lordosis, estradiol, mate preference

## **Introduction**

Until recently, it was thought that the mammalian female nervous system develops in the absence of any active sex steroid signaling whereas the male requires testosterone (T), secreted over a species-specific perinatal period, to organize neural circuits that later control male-typical courtship behaviors in response to sex hormones and pheromones. In rodents (De Vries and Simerly, 2002) and carnivores (Baum et al., 1990), much evidence suggests that many, though not all, of the perinatal organizational actions of T on the development of the male nervous system actually result from the cellular effects of estradiol (E<sub>2</sub>) formed via the local, neural aromatization of circulating T. A contribution of perinatal E<sub>2</sub> to neural differentiation in female mammals was first proposed by Toran-Allerand (1976) who found that E<sub>2</sub> promoted neurite outgrowth from fetal hypothalamic explants of both sexes. More recently, several studies (Dohler et al., 1984; Baum and Tobet, 1986) also suggested that perinatal E<sub>2</sub> could contribute to female brain and behavioral development but eventually the hypothesis languished due to the absence of suitable animal models. The creation of the aromatase knock-out mouse model (ArKO), carrying a targeted mutation in the *Cyp19* gene which renders animals of both sexes unable to convert T into E<sub>2</sub> (Fisher et al., 1998; Honda et al., 1998) allowed us to reopen the debate on a potential role for estradiol in the development of the female brain. Despite this deficit, ArKO mice express functional estrogen receptors and thus are able to respond to exogenous E<sub>2</sub> at any point during their

lifespan. This allows us to distinguish between organizational (perinatal) and activational (adult) effects of E<sub>2</sub> on brain and behavioral functions.

Using the ArKO mouse model, we obtained some new evidence for a role of E<sub>2</sub> in female-typical brain and behavioral development (Bakker et al., 2002). We first showed that female ArKO mice, ovariectomized in adulthood and subsequently treated with E<sub>2</sub> and progesterone (P<sub>4</sub>), were less receptive (i.e. displayed lower lordosis quotients) when paired with a sexually active male compared to wild-type (WT) females. Furthermore, ArKO females also spent less time investigating volatile body odors from conspecifics of either sex in a Y-maze (Bakker et al., 2002). Taken together, these data suggest a potential role of E<sub>2</sub> in female behavioral and neural differentiation. However, the question remained when during development estrogens might be acting to feminize the female brain since ArKO females are deprived of estrogens from conception until the first administration of E<sub>2</sub> in adulthood. Therefore, we used the expression of an estrogen-dependent gene, i.e. the progesterone-receptor (PR), to identify possible estrogen-sensitive periods during development (Quadros et al., 2002a; Quadros et al., 2002b). We found that the amount of PR-immunoreactivity (PR-ir) in the anteroventral periventricular nucleus (AVPv) and medial part of the medial preoptic nucleus (MPOA) was significantly lower in female ArKO mice than in WT females at several prepubertal ages including postnatal (P) days P15, P20 and P25, but not neonatally at P0, P5 or P10 (Brock et al., 2010). Thus, these data suggest that E<sub>2</sub> may be acting during the first several weeks of life in female-typical brain and behavioral sexual differentiation (Bakker and Baum, 2008), perhaps beginning after P7 when the mouse ovary first produces E<sub>2</sub> (Mannan and O'Shaughnessy, 1991).

Therefore, in the present study, we determined whether treatment with estradiol during a selected prepubertal period would reverse later deficits in lordosis behavior and olfactory investigation of potential sexual partners in ArKO females. Since female mice normally display surprisingly high levels of male-like mounting behavior towards other

female mice around the time of estrus (Martel and Baum, 2009), in addition to our observation of reduced mounting behavior in ArKO females (Bakker et al., 2002), we also determined whether a prepubertal estrogenic treatment would affect the expression of this particular behavior. Since PR-ir started to increase from P10 in WT females (Brock et al., 2010), we defined thus two possible estrogen-sensitive postnatal periods, each revealing significant differences in hypothalamic PR expression between WT and ArKO female mice: 1/ P5 to P15, and 2/ P15 to P25. Thus cohorts of female ArKO and WT mice were either treated with estradiol benzoate (EB) from P5 to P15, or from P15 to P25, and later tested for different components of their reproductive behavior, i.e. lordosis and mounting behaviors, and mate preferences.

## **Material and Methods**

### *Experimental animals*

ArKO mice were generated by targeted disruption of exons 1 and 2 of the *Cyp 19* gene (Honda et al., 1998). Heterozygous (HET) males and females of the CD1 strain were bred to generate wild-type (WT), heterozygous (HET), and homozygous-null (ArKO) offspring at the GIGA Neurosciences, University of Liège, Belgium. Food (“phytoestrogen-free” mouse chow D10001 AIN-76A, Brogaarden, Denmark) and water were available to mice ad libitum. Pregnant females were checked daily for parturition towards the end of pregnancy. Since all breeding females were housed under a 12 light: 12 dark cycle (lights on between 8:00 and 20:00h), parturition usually occurred in the morning, 1-2h after lights on. The day of birth was designated as P0. All female subjects were weaned at P35 and genotyped by PCR analysis of tail DNA. The health of the animals was monitored throughout the experiment by weighing them monthly (data not provided).

All male and female stimulus mice were derived from a CD1 breeding colony at the GIGA Neurosciences, University of Liège, Belgium. Stimulus males were left gonadally intact. Stimulus females were ovariectomized in adulthood under general anesthesia after an intraperitoneal injection (i.p.) of a mixture of ketamine (80mg/kg per mouse) and medetomidine (Domitor, Pfizer, 1 mg/kg per mouse). Mice received atipamezole (Antisedan, Pfizer, 4 mg/kg per mouse) subcutaneously (s.c.) at the end of the surgery in order to antagonize medetomidine-induced effects, thereby accelerating their recovery. These females were at the same time implanted with a Silastic capsule containing 17 $\beta$ -estradiol [E<sub>2</sub> diluted 1:1 with cholesterol (for details, see Bakker et al., 2002), leading to plasma E<sub>2</sub> concentrations of about 150 pg/ml; gonadally intact female mice have estradiol levels of approximately 35 pg/ml on proestrus (Nelson et al., 1992)] and were brought into behavioral estrus by treatment with progesterone (500 $\mu$ g/mouse) 3 hours before each test session.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines set forth by the National Institutes of Health “Guiding Principles for the Care and Use of Research Animals”, and were approved by the Ethical Committees for Animal Use of the University of Liege.

#### *Early postnatal hormonal treatment*

A first cohort of WT and ArKO females was injected s.c. over P5 to P15 with either estradiol benzoate (EB; 0.5  $\mu$ g every 2 days; ICN Biomedicals Inc., CAT NO 190411, 1GM) or sesame oil (Sigma) (OIL); additional groups of WT and ArKO females were not injected during this period (CTRL) (Experiment 1). The latter group was included to control for any potential stress induced by repeated injections during early development. At 6 weeks of age, all females were ovariectomized and implanted with an E2 capsule. All behavioral testing began when subjects were 9 weeks of age.

A second cohort of WT and ArKO females was injected s.c. over postnatal ages P15 to P25 with either EB (0.05 µg every day) or sesame oil (OIL), or were not injected during this period (CTRL) (Experiment 2). At 6 weeks of age, all females were ovariectomized and implanted with an E2 capsule. All behavioral testing began when subjects were 9 weeks of age.

### *Behavioral analyses*

**Lordosis behavior.** All lordosis tests were conducted in a Plexiglas aquarium (35cm long x 25cm high x 19cm wide) whose floor was covered with fresh sawdust. At the beginning of each test, a sexually experienced male of the CD1 strain was placed alone in the aquarium and allowed to adapt for 15 min. Subsequently, 3 hours after receiving a progesterone injection (500µg), a female subject was placed in the aquarium and we recorded the lordosis responses of the female to the mounts of the stimulus male. The test lasted until the female received 20 mounts or 15 min had elapsed. We performed one test per week. At the end of each test, a lordosis quotient (LQ) was calculated by dividing the number of mounts received by the number of lordosis responses displayed by the female subjects.

**Mate preference test.** To assess mate preferences using auditory and/or olfactory stimuli, we used a box (60 x 13 x 30 cm) that was divided into three compartments using opaque partitions. Each compartment was 20cm in length. The partitions contained perforated holes at a height of 8cm to facilitate the diffusion of odors from the two side compartments to the middle compartment. Tests were performed during the dark phase of the light cycle (6h after lights out). Females were habituated to the three compartment box once on the day before the behavioral experiment by placing them in the middle compartment for 10 min (with no stimulus animals placed in the two side compartments). On the day of testing, an intact male stimulus was placed in the right compartment with its own bedding to make the stimulus as odorous as possible and an estrous female was placed in the left

compartment with its own bedding too. Three hours after receiving a progesterone injection (500 $\mu$ g), the female subject was introduced into the middle compartment containing no sawdust, and was observed for 10 min. In that way, only volatile body odors were detected by the experimental subject. The time the subject spent poking her nose through the holes of the partition or actively sniffing the bottom of the partition in front of the female *versus* male stimulus animal was recorded with a stopwatch.

**Mounting behavior.** Female mice normally display high levels of mounting behavior, including pelvic thrusting movements, towards other female mice after ovariectomy and treatment with testosterone (Mathews and Edwards, 1977; for details see Martel and Baum, 2009). So we first replaced the E2 capsule by one (same dimensions) containing testosterone (T, Fluka, Chemie 86500, Buchs CH9471). Two weeks following T implantation, tests were conducted in a Plexiglas aquarium (35cm long x 25cm high x 19cm wide) whose floor was covered with fresh sawdust. At the beginning of each test, a female subject was placed alone in the aquarium and allowed to adapt for 15min. Subsequently, an estrous female was introduced and the number of mounts including pelvic thrusting movements shown by the female subject was scored for 30min. The female subject was never mounted by the stimulus female.

#### *Experiment 1: EB treatment from P5 to P15*

The number of females in each group was as follows: WT CTRL = 8, WT OIL = 6, WT EB = 4, ArKO CTRL = 8, ArKO OIL = 4, ArKO EB = 8. First, each group was tested for lordosis behavior. A minimum of four tests is normally required to observe significant levels of lordosis behavior ( $LQ > 0.5$ ) in WT females (Bakker et al., 2002; Kudwa and Rissman, 2003). However, we decided to stop after three lordosis tests since none of the females treated neonatally with EB showed any lordosis behavior and actually showed increased aggressive behavior towards the stimulus males, whereas WT controls already showed substantial levels of lordosis behavior ( $LQ > 0.5$ ). We also did not assess mate preferences in this cohort of animals since we did not expect to obtain

any significant results because no restoration in lordosis behavior was observed in EB-treated ArKO animals. So next, each group received a T implant and was tested once for mounting behavior with an estrous female. Since we previously showed that estradiol is important for activating mounting behavior (Bakker et al., 2004), we also tested all groups for mounting behavior after adding EB (1µg/day for 2 weeks) to the T treatment.

#### *Experiment 2: EB treatment from P15 to P25*

The number of females in each group was as follows: WT CTRL = 9, WT OIL = 7, WT EB = 6, ArKO CTRL = 6, ArKO OIL = 4, ArKO EB = 15. First, each group was tested for lordosis behavior. Since we observed that lordosis behavior continued to increase in the 4<sup>th</sup> test in EB-treated ArKO females, we conducted a total of six lordosis tests over a 6-week period. Next, mate preferences were determined during one test following treatment with E<sub>2</sub> and progesterone. Then, all subjects received a T implant and were subsequently tested for mounting behavior 2 weeks later. We also tested females for mounting behavior after adding EB (1µg/day for 2 weeks) to the treatment.

#### *Statistical analysis*

All behavioral data were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA – Statistica 8.0) using genotype (2) and neonatal or prepubertal treatment (2) as independent variables and repeated tests as the repeated measure. When appropriate, all ANOVAs were followed by Fisher Least Significant Difference post-hoc comparisons adapted for repeated measures ANOVA. Only significant ( $p < 0.05$ ) effects detected by the ANOVAs are presented here. To analyze mounting behaviors or a single test session regarding lordosis behavior, we performed a two-way ANOVA [genotype (2) X treatment (2)].

Since we never observed any statistical differences between the experimental groups treated with oil or receiving no injections in any behavioral test, we concluded that repeated injections over the postnatal period did not lead to any major stress in our

[152]

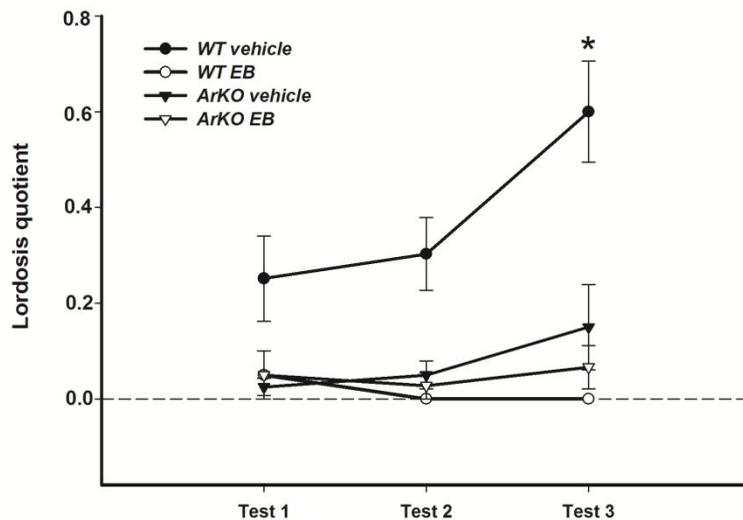
subjects. To simplify the presentation of the results, we thus combined the data for the oil-treated and non-treated subjects under the common group name “vehicle”.

## **Results**

### *Experiment 1: EB treatment from P5 to P15*

**Lordosis behavior.** As in Bakker et al (2002), ArKO females showed significantly less lordosis than WT control females. This deficit was not rescued in ArKO females by neonatal P5-P15 EB treatment. Indeed, treatment of WT females with EB over this period defeminized their lordosis behavior (Fig. 1).

This was confirmed by ANOVA on lordosis quotients showing a significant interaction between genotype and treatment in test 3 ( $F(1,34) = 5.34, P = 0,03$ ). *Post-hoc* analyses indicated that lordosis quotients were lower in ArKO vehicle females and in WT and ArKO females treated with EB compared to WT vehicle females.

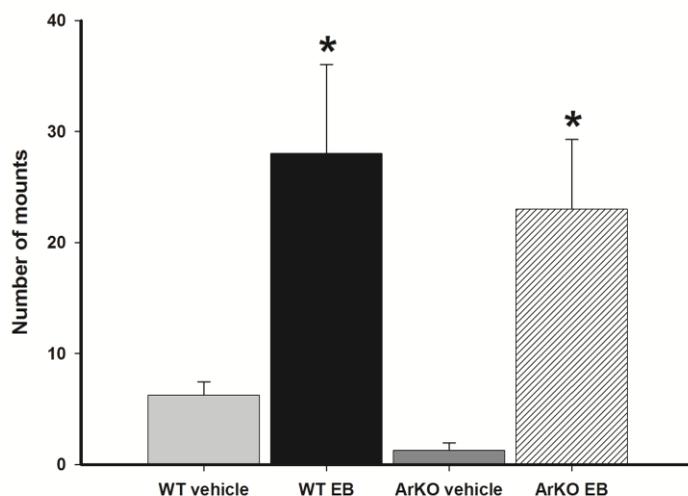


**Fig. 1.** Lordosis behavior with a sexually experienced male. Mean  $\pm$  SEM lordosis quotient (= number of lordosis responses/number of male mounts) expressed by WT vehicle females, WT females treated with EB from P5 to P15, ArKO vehicle females and ArKO females treated with EB from P5 to P15. \*  $P < 0.05$  *post-hoc* comparisons between the four groups.

**Mounting behavior.** EB treatment between P5 and P15 strongly increased mounting behavior in ArKO and WT females following adult treatment with testosterone (Fig. 2).

ANOVA showed a significant effect of treatment ( $F(1,27) = 59.8$ ,  $P < 0.001$ ) indicating that all females treated with EB during the postnatal period displayed more mounts when paired with an estrous female. When we only compared vehicle groups, ANOVA revealed a significant effect of genotype ( $F(1,22) = 11.65$ ,  $P = 0.002$ ) indicating that WT vehicle females showed more mounting behavior than ArKO vehicle females as shown previously (Bakker et al., 2002) (Bakker et al., 2002). Addition of EB to T

treatment did not further stimulate mounting behavior in any experimental group (data not shown).



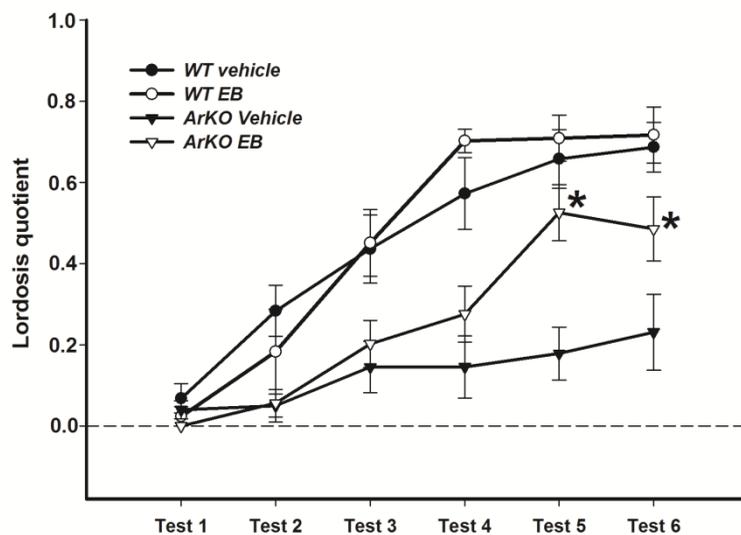
**Fig. 2.** Mounting behavior. Mean  $\pm$  SEM number of mounts performed by WT vehicle females, WT females treated with EB from P5 to P15, ArKO vehicle females and ArKO females treated with EB from P5 to P15 when paired with an estrous female. \* Treatment effect regardless of the genotype  $P < 0.05$ .

#### *Experiment 2: EB treatment from P15 to P25*

**Lordosis behavior.** EB treatment from P15 to P25 almost completely rescued the later ability of ArKO females to display lordosis behavior, whereas it had no longer any defeminizing effects on lordosis behavior in WT females (Fig. 3).

This was confirmed by repeated measures ANOVA on lordosis quotients over the six consecutive lordosis tests showing a significant interaction between test, genotype and treatment ( $F(5,205) = 4.01$ ,  $P = 0.002$ ). *Post-hoc* analyses of the last 2 tests (5 and 6) indicated that lordosis quotients were lower in ArKO vehicle females compared to the three other groups whereas lordosis quotients were equivalent between

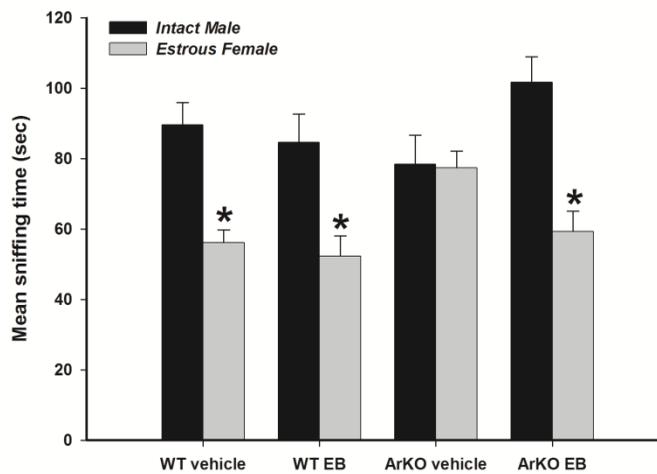
EB-treated ArKO females and WT vehicle females and EB-treated WT females. *Post-hoc* analyses also indicated that lordosis quotients increased equivalently from test 1 to test 4 before reaching plateau values in tests 5 and 6 in WT vehicle and EB-treated WT females whereas it only increased from test 3 to test 5 in EB-treated ArKO females. By contrast, no significant increase was observed in ArKO vehicle females over repeated testing.



**Fig. 3.** Lordosis behavior with a sexually experienced male. Mean  $\pm$  SEM lordosis quotient (= number of lordosis responses/number of male mounts) expressed by WT vehicle females, WT females treated with EB from P15 to P25, ArKO vehicle females and ArKO females treated with EB from P15 to P25. \* Different from the ArKO control females  $P < 0.05$ .

**Mate preference test.** EB-treated ArKO female mice, like WT females, showed a strong preference for an intact male over an estrous female whereas ArKO vehicle females showed no clear preference (Fig. 4).

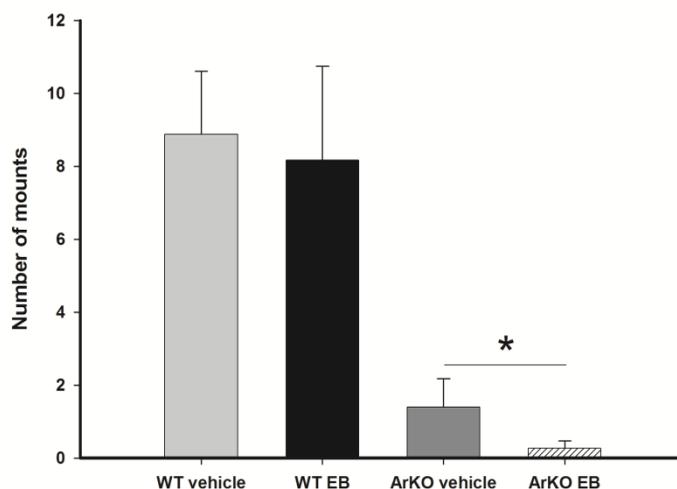
This was confirmed by ANOVA on the time spent investigating the male or female compartment showing a significant interaction between stimulus, genotype and prepubertal treatment ( $F(1,40) = 8.19, P = 0.007$ ). *Post-hoc* analyses indicated that WT vehicle and EB-treated females (ArKO and WT) females spent more time investigating the side containing the intact male over the one containing the estrous female whereas ArKO vehicle females spent an equal amount of time investigating the two sides.



**Fig. 4.** Mate preferences. Mean  $\pm$  SEM time spent by WT vehicle females, WT females treated with EB from P15 to P25, ArKO vehicle females and ArKO females treated with EB from P15 to P25 investigating the stimulus animals when given a choice between an intact male and an estrous female placed behind opaque partitions allowing auditory and olfactory stimuli. \* *Post-hoc* comparisons between the two presented stimuli  $P < 0.05$ .

**Mounting behavior.** As in Bakker et al (2002), ArKO females showed significantly less mounting behavior than WT control females. This deficit was the same in EB-treated ArKO showing that prepubertal EB treatment did not rescued this behavior. Indeed, treatment of WT females with EB over this period did not affect mounting behavior (Fig. 1).

ANOVA showed a significant genotype effect ( $F(1,43) = 26.15$ ,  $P < 0.001$ ) indicating that WT female groups showed higher levels of mounts when paired with an estrous female than ArKO female groups, regardless of the postnatal hormonal treatment. Additional treatment with EB did not further stimulate mounting behavior in ArKO females (data not shown).



**Fig. 5.** Mounting behavior. Mean +/- SEM number of mounts performed by WT vehicle females, WT females treated with EB from P15 to P25, ArKO vehicle females and ArKO females treated with EB from P15 to P25 when paired with an estrous female stimulus. \* Genotype effect regardless of the hormonal treatment  $P < 0.05$ .

## **Discussion**

In the present study, we obtained further evidence for a role of postnatal  $E_2$  in the development of female-typical courtship behaviors. We thus showed that the ability of ArKO female mice to show WT-like levels of lordosis behavior in response to adult ovarian hormones was almost completely rescued by daily treatment with EB over P15-P25, whereas EB given over an earlier postnatal period (P5-P15) had no such effect and even abolished lordosis behavior in WT females. These results suggest that  $E_2$  has feminizing effects on the neural mechanisms mediating lordosis behavior when administered between P15 and P25, whereas the same hormone clearly defeminizes lordosis behavior when administered between P5 and P15.

In the previous century, numerous studies have focused on the role of gonadal hormones in the development of sexual behavior in rats. The main conclusion was the existence of a neonatal critical period for brain development during which exposure of female pups to androgens and/or estrogens resulted in a permanent defeminization and masculinization of reproductive and non-reproductive behaviors (Whalen and Nadler, 1965; Whalen and Edwards, 1967; Edwards and Thompson, 1970; Dunlap et al., 1973; Gorski et al., 1979; Stewart et al., 1979; Stewart and Cygan, 1980; MacLusky and Naftolin, 1981; Pang and Tang, 1983; Tobet and Baum, 1987; Bloch et al., 1995). The duration of this critical period varied according to the behavior studied, but generally it was thought to be restricted to the first 10 days after birth in both rats and hamsters (Bloch et al., 1995). By contrast, very few studies have investigated the role of gonadal hormones on the sexual differentiation of the brain during the prepubertal period, i.e. after P10. However, one study by Stewart and Cygan (1980) showed that female rats ovariectomized on the day of birth and treated with  $E_2$  from postnatal days 10 to 20 had lower lordosis quotients than females treated with  $E_2$  from postnatal days 30 to 40. They suggested that  $E_2$  given as late as 10 days after birth could still have defeminizing effects on lordosis behavior, although an alternative explanation could be that  $E_2$  has

feminizing effects on sexual behavior when provided later in life. The absence of a suitable control group (i.e. intact females) in this study, however, prevented them from drawing such a conclusion. It should be noted that very few similar studies were conducted in mice (Edwards and Herndon, 1970; Edwards, 1971; McGill and Manning, 1976) and thus “critical periods for the sexual differentiation of the brain” were never clearly established in the mouse. Based on our previous results (Brock et al., 2010) showing that  $E_2$  modified PR expression between P10 and P25 in WT female mice compared to ArKO females, we identified a possible critical period for feminization of the female brain in mice. Therefore, in the present study, we treated ArKO females with EB during an early (P5-P15) and a later (P15-P25) postnatal period.

Treatment with EB between P5 and P15 was not successful in inducing lordosis behavior in ArKO females. In fact, it completely abolished lordosis behavior in WT females suggesting that  $E_2$  still has strong defeminizing actions on the brain and behavior between P5 and P15, as was also suggested for rats (Whalen and Nadler, 1965; Whalen and Edwards, 1967; Edwards and Thompson, 1970; Stewart et al., 1979; Stewart and Cygan, 1980). In addition, although not systematically recorded, EB-treated WT and ArKO females were very aggressive in lordosis tests, often attacking and wounding the stimulus males. This was also reported by Bronson and Desjardins (1968) and Edwards and Herndon (1970) showing that female mice receiving a single EB injection on postnatal day 3 were more aggressive in adulthood. In addition, no vaginal plugs were observed when paired with males indicating the absence of any sexual behavior in these females. As proposed by Hendricks and Weltin (1976), we also postulate that, while testosterone might no longer be effective after 5 days of age because of a strong reduction in T secretion levels,  $E_2$  itself, exogenously administered, could continue to be effective. By contrast, treatment with  $E_2$  between P15-P25 almost completely restored lordosis behavior in ArKO females, and also quite importantly, had no detrimental effects on the expression of lordosis behavior by WT females. These results suggest thus a feminizing role of  $E_2$  on the development of female courtship

behaviors, which is in line with the findings of Stewart and Cygan (1980) for open field behavior in female rats.

Treatment with estradiol between P15-P25 also restored a strong mate preference for an intact male over an estrous female in ArKO females. Previously, we reported that female ArKO mice failed to show clear odor preferences when given the choice between volatile odors from an intact male and those from an estrous female (Bakker et al., 2002). Rather surprisingly, female WT mice showed a clear odor preference for the estrous female. The absence of a male-directed preference was most likely linked to the hormonal treatment of the subjects in that study, i.e. they were treated with estradiol alone. Indeed, in later studies, we observed that female mice only show clear male-directed odor preferences when treated with both estradiol and progesterone (Keller et al., 2006; Brock and Bakker, 2010). In the present study, we confirmed male-directed preferences in WT females when treated with estradiol and progesterone as well as the absence of any clear mate preferences in ArKO control females. Our finding of a male-directed preference in EB-treated ArKO females suggests that in addition to restoring lordosis behavior in these females, prepubertal E<sub>2</sub> treatment also restored their motivation to seek out the male.

Our finding of WT vehicle females showing more adult mounting behavior (after T treatment) than ArKO vehicle confirms our previous results (Bakker et al., 2002) and provides an endocrine explanation for why female mice may show male-typical mating behavior. The observation that EB treatment over the early postnatal period (P5-P15) strongly masculinized both WT and ArKO females is consistent with the notion that aromatized T is responsible for male-typical masculinization of mating behavior in male mice. Thus, neural substrates regulating mounting behavior in adulthood could be masculinized in fetal females by the local aromatization of T from fetal males lying in close approximation. In contrast with lordosis capacity and male-oriented mate preferences, prepubertal EB treatment (P15-P25) of ArKO females failed

to rescue mounting capacities in these animals; nor did it masculinize this behavior in WT females. These results provide further evidence that the neural circuits controlling female and male-typical courtship behaviors in mice have different responses to estradiol across the first 4 weeks of life. Neural circuits controlling female-typical courtship behaviors are defeminized by early postnatal estradiol actions (P5-P15) and actively feminized by the same sex hormone acting prepubertally over P15-P25. By contrast, estradiol acts solely over the early postnatal period (P0-P15) to masculinize circuitry controlling male sex behavior. After P15, this system is impervious to estradiol manipulation until adulthood, when this hormone, perhaps acting with T, activates this behavior. Indeed, the high level of mounting shown in EB-treated ArKO females (P5-P15) confirms the ability of adult T to activate this behavior, even in the absence of conversion to estradiol.

### **Conclusion**

Although an important role for estradiol in male neural development is widely appreciated, it is still controversial whether estradiol contributes to female neural development. The present study provides new evidence for a role of E<sub>2</sub> in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. The present results thus suggest that the traditional view of the female-typical neural differentiation proceeding in the absence of any perinatal sex hormone signaling should be revised, since it was shown that E<sub>2</sub> is required during a specific prepubertal period (P15-P25) to organize the neural mechanisms that mediates normal female-typical reproductive behaviors.

### **References**

Bakker J, Baum MJ (2008) Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 29:1-16.

- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2002) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 22:9104-9112.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J (2004) Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behav* 46:1-10.
- Baum MJ, Tobet SA (1986) Effect of prenatal exposure to aromatase inhibitor, testosterone, or antiandrogen on the development of feminine sexual behavior in ferrets of both sexes. *Physiol Behav* 37:111-118.
- Baum MJ, Carroll RS, Cherrv JA, Tobet SA (1990) Steroidal control of behavioural, neuroendocrine and brain sexual differentiation: studies in a carnivore, the ferret. *J Neuroendocrinol* 2:401-418.
- Bloch GJ, Mills R, Gale S (1995) Prepubertal testosterone treatment of female rats: defeminization of behavioral and endocrine function in adulthood. *Neurosci Biobehav Rev* 19:177-186.
- Brock O, Bakker J (2010) Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice. *Horm Behav*.
- Brock O, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2010) Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology* 151:1814-1821.
- Bronson FH, Desjardins C (1968) Aggression in adult mice: modification by neonatal injections of gonadal hormones. *Science* 161:705-706.
- De Vries GJ, Simerly RB (2002) Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. In: *Hormones, Brain and Behavior* (Pfaff DW, ed), pp 137-191. Amsterdam: Academic Press.
- Dohler KD, Hancke JL, Srivastava SS, Hofmann C, Shryne JE, Gorski RA (1984) Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Prog Brain Res* 61:99-117.
- Dunlap JL, Gerall AA, McLean LD (1973) Enhancement of female receptivity in neonatally castrated males by prepuberal ovarian transplants. *Physiol Behav* 10:701-705.
- Edwards DA (1971) Neonatal administration of androstenedione, testosterone or testosterone propionate: effects on ovulation, sexual receptivity and aggressive behavior in female mice. *Physiol Behav* 6:223-228.
- Edwards DA, Thompson ML (1970) Neonatal androgenization and estrogenization and the hormonal induction of sexual receptivity in rats. *Physiol Behav* 5:1115-1119.
- Edwards DA, Herndon J (1970) Neonatal estrogen stimulation and aggressive behavior in female mice. *Physiol Behav* 5:993-995.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6965-6970.
- Gorski RA, Christensen LW, Nance DM (1979) The induction of heterotypical sexual behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 4:311-328.
- Hendricks SE, Weltin M (1976) Effect of estrogen given during various periods of prepubertal life on the sexual behavior of rats. *Physiological Psychology* 4.
- Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S (1998) Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 252:445-449.
- Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2006) Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses* 31:315-323.
- Kudwa AE, Rissman EF (2003) Double oestrogen receptor alpha and beta knockout mice reveal differences in neural oestrogen-mediated progestin receptor induction and female sexual behaviour. *J Neuroendocrinol* 15:978-983.
- MacLusky NJ, Naftolin F (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211:1294-1302.
- Mannan MA, O'Shaughnessy PJ (1991) Steroidogenesis during postnatal development in the mouse ovary. *J Endocrinol* 130:101-106.
- Martel KL, Baum MJ (2009) Adult testosterone treatment but not surgical disruption of vomeronasal function augments male-typical sexual behavior in female mice. *J Neurosci* 29:7658-7666.

## RÉSULTATS

- Mathews D, Edwards DA (1977) The ventromedial nucleus of the hypothalamus and the hormonal arousal of sexual behaviors in the female rat. *Horm Behav* 8:40-51.
- McGill TE, Manning A (1976) Genotype and retention of the ejaculatory reflex in castrated male mice. *Anim Behav* 24:507-518.
- Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, Finch CE (1992) Differential contributions of ovarian and extraovarian factors to age-related reductions in plasma estradiol and progesterone during the estrous cycle of C57BL/6J mice. *Endocrinology* 130:805-810.
- Pang SF, Tang F (1983) Sex differences in the serum concentrations of testosterone in mice and hamsters during their critical periods of neural sexual differentiation. *Journal of Endocrinology* 100:7-11.
- Quadros PS, Lopez V, De Vries GJ, Chung WC, Wagner CK (2002a) Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J Neurobiol* 51:24-32.
- Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK (2002b) Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* 143:3727-3739.
- Steward J, Cygan D (1980) Ovarian hormones act early in development to feminize adult open-field behavior in the rat. *Horm Behav* 14:20-32.
- Stewart J, Vallentyne S, Meaney MJ (1979) Differential effects of testosterone metabolites in the neonatal period on open-field behavior and lordosis in the rat. *Horm Behav* 13:282-292.
- Tobet SA, Baum MJ (1987) Role for prenatal estrogen in the development of masculine sexual behavior in the male ferret. *Horm Behav* 21:419-429.
- Toran-Allerand CD (1976) Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res* 106:407-412.
- Whalen RE, Nadler RD (1965) Modification of Spontaneous and Hormone-Induced Sexual Behavior by Estrogen Administered to Neonatal Female Rats. *J Comp Physiol Psychol* 60:150-152.
- Whalen RE, Edwards DA (1967) Hormonal determinants of the development of masculine and feminine behavior in male and female rats. *Anat Rec* 157:173-180.

## II.2 Principaux résultats & discussion

Au cours de cette étude, nous avons démontré que, selon la période critique considérée, un traitement oestrogénique pouvait avoir des effets totalement opposés sur le phénotype comportemental à l'âge adulte. Ainsi :

- ❖ Un traitement oestrogénique administré durant la période postnatale P5 à P15 engendre :
  - aucune restauration de l'expression de la lordose chez les femelles ArKO traitées, mais induit une suppression totale de ce comportement chez les femelles WT traitées comparativement aux femelles WT contrôles ;
  - une forte augmentation du nombre de montes à la fois chez les femelles ArKO et WT traitées ;
  - une agressivité accrue chez les femelles ArKO et WT traitées ;
- ❖ Un traitement oestrogénique administré durant la période pré-pubère P15 à P25 engendre :
  - une restauration quasi complète de l'expression de la lordose chez les femelles ArKO traitées, et un comportement tout à fait normal chez les femelles WT traitées ;
  - une restauration d'une préférence sexuelle robuste dirigée vers le mâle chez les femelles ArKO traitées ;
  - aucune influence sur le nombre de montes, tant chez les individus ArKO que WT.

Ces données démontrent donc que l'exposition précoce aux œstrogènes (au moins jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour postnatal) entraîne une déféminisation marquée chez les femelles WT, tandis qu'une exposition oestrogénique pré-pubère (au moins dès le 25<sup>ème</sup> jour postnatal) entraîne une féminisation comportementale chez les individus ArKO. Ceci confirme donc le double rôle des œstrogènes dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale en fonction de la période d'influence.

Au cours de cette étude, nous avons également obtenu des résultats préliminaires intéressants quant à l'expression des neurones à Kisspeptine au sein du noyau périventriculaire rostral du 3<sup>ème</sup> ventricule (RP3V). Comme expliqué précédemment (Introduction – Caractéristiques comportementales de la souche ArKO), le rôle de la Kisspeptine, produit du gène *Kiss1*, n'est pas encore complètement élucidé. Cette protéine semble être un puissant activateur du système GnRH contrôlant lui-même le comportement reproducteur par la régulation de la production de LH et FSH (Han et al., 2005 ; Kauffman et al., 2007). La distribution de ces neurones à Kisspeptine est sexuellement différenciée et est beaucoup plus importante chez les individus femelles (Clarkson and Herbison, 2006 ; Kauffman et al., 2007). De plus, ces cellules sont totalement absentes au niveau de l'AVPv chez des souris ArKO femelles (Clarkson et al., 2009; Bakker et al., 2010) suggérant donc que les hormones gonadiques périnatales organisent ce système Kisspeptine.

Après avoir achevé la batterie de tests comportementaux, nous avons retiré les implants hormonaux et traité tous les animaux avec de l'EB pendant 2 semaines avant de les sacrifier pour étudier le profil d'expression des neurones à Kisspeptine. Ainsi, suite à l'administration du traitement oestrogénique postnatal entre P5 et P15, nous avons observé une très forte réduction du nombre de neurones exprimant la Kisspeptine à la fois chez les femelles WT et ArKO traitées, à des niveaux observés chez des mâles WT (Bakker et al., 2010), suggérant donc un autre type d'effet masculinisant périnatal des œstrogènes. Par contre, suite à l'administration du traitement oestrogénique pré-pubère

entre P15 et P25, nous avons observé une restauration du nombre de neurones à Kisspeptine chez les femelles ArKO traitées comparable aux niveaux exprimés par les femelles WT contrôles et traitées, suggérant donc un autre type d'effet féminisant pré-pubère des œstrogènes. Clarkson et ses collaborateurs (2009) avaient déjà observé un effet similaire en utilisant des souris femelles ovariectomisées à P15 ; celles-ci montraient une forte réduction du nombre de neurones exprimant la Kisspeptine à P30 ou à P60, mais l'administration d'un traitement oestrogénique entre P15 et P30 ou P22 et P30 restaurait totalement, dans les deux cas, l'expression de la Kisspeptine au sein du RP3V.

Le problème rencontré au sein de notre étude est l'observation d'une expression non-nulle de neurones à Kisspeptine chez les femelles ArKO contrôles, en contradiction donc avec les précédentes études (Clarkson et al., 2009 ; Bakker et al., 2010). Ce phénomène pourrait cependant s'expliquer par plusieurs facteurs :

- La méthode de fixation des cerveaux diffère entre notre étude et les précédentes, c.à.d. respectivement, une fixation à l'acroléine *versus* une fixation au paraformaldéhyde. Cette dernière n'est apparemment pas optimale pour lier les protéines quand la fixation se fait à froid ou pendant un temps court. Ainsi, l'utilisation prolongée d'un tel fixateur pendant plusieurs semaines ou réalisée à température ambiante, ou encore l'utilisation d'un fixateur plus puissant tel que l'acroléine, peut permettre une meilleure fixation des antigènes, entraînant une détection plus fine lors de révélations immunohistochimiques. Ce processus pourrait dès lors expliquer le nombre plus élevé de neurones à Kisspeptine révélés chez nos sujets ArKO contrôles.
- Les stimuli olfactifs activent des régions cérébrales régulant le comportement sexuel mâle et femelle (Keller et al., 2006a, b). Récemment, nous avons démontré que les voies neuronales du système Kisspeptine

pouvaient être activées suite à des expositions aux phéromones (Bakker et al., 2010). Nous pourrions donc envisager que nos femelles ArKO, exposées de manière répétitive pendant une période relativement longue à différents stimuli olfactifs émis par des mâles, voient leur système Kisspeptine activé plus fortement comparativement aux femelles naïves, n'ayant jamais été exposée à un mâle, étudiées par Clarkson (2009).

- Au cours de notre étude, les femelles ArKO contrôles ont gardé pendant plusieurs semaines un implant d'E<sub>2</sub> nécessaire pour l'induction du comportement sexuel à l'âge adulte. Cette influence oestrogénique prolongée pourrait se traduire par des effets activateurs sur le système Kisspeptine.

Nous sommes actuellement occupés à déterminer si l'utilisation de différents fixateurs influence la détection des neurones exprimant la Kisspeptine lors de révélations immunohistochimiques. Parallèlement, nous étudions les effets potentiellement activateurs d'un traitement oestrogénique sur cette population neuronale en comparant des individus gonadectomisés et des individus gonadectomisés ayant reçu un traitement oestrogénique de différentes durées.

Comme décrit précédemment, les souris ArKO développent une obésité dès l'âge de 3 mois (Misso et al., 2003). Lors des expériences évaluant les performances comportementales suite à un traitement oestrogénique pré-pubère (P15-P25), nous avons relevé des différences significatives de poids entre les sujets femelles WT et ArKO. En effet, les individus WT et ArKO traités avec de l'EB durant la période pré-pubère montrent une diminution significative de leur poids comparativement à leurs homologues contrôles. Plusieurs mesures relevées à l'âge adulte (entre 3 et 6 mois) indiquent que ces différences sont constantes au cours des âges. Les femelles ArKO contrôles pèsent plus comparativement aux femelles WT contrôles ; cependant, les femelles ArKO traitées montrent un poids équivalent aux femelles WT contrôles au cours des différents âges. Ces données suggèrent donc que, en plus des composantes du

comportement adulte, l'E<sub>2</sub> semble également organiser des paramètres physiologiques importants tels que le poids corporel.

Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de contrôler l'évolution du poids des animaux ayant reçu un traitement oestrogénique postnatal (P5 - P15). Cependant, au vu des effets masculinisants de ce traitement sur le comportement des sujets femelles, il est raisonnable de penser que les femelles WT traitées avec de l'EB montraient un poids plus élevé que leurs homologues contrôles. Un tel effet a déjà été démontré chez le rat ; en effet, des rattes traitées avec du TP ou de l'EB lors du 5<sup>ème</sup> jour postnatal montrent un poids plus élevé que les individus contrôles (traités avec de l'huile) à l'âge adulte (Bell and Zucker, 1971).

Notre étude de l'évolution du poids reste critiquable dans le sens où les animaux ont subi de nombreuses modulations hormonales de nature différente (ovariectomie, implant d'E<sub>2</sub>, implant de T) au cours de leur vie. Les œstrogènes sont connus pour exercer des effets limitants sur la prise de poids à l'âge adulte, tandis que les androgènes montrent des effets promouvants (Bell and Zucker, 1971 ; Wade and Zucker, 1970). Ainsi, les différents traitements hormonaux administrés aux individus WT et ArKO au cours de notre étude ont pu modifier la prise et/ou perte de poids chez ces animaux. Cependant, les différences observées entre les groupes traités et non traités à l'âge pré-pubère étant toujours du même ordre quelque soit la période considérée à l'âge adulte, suggèrent que les influences hormonales activatrices étaient minimales.

Les perspectives de ces résultats seront plus longuement discutées dans le chapitre « Discussion Générale ».

### **III. Evidence du rôle organisateur de l'œstradiol dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale de type femelle chez la souris**

#### **I.1 Introduction**

Bien que le rôle important de l'E<sub>2</sub> dans le développement neuronal de type male soit largement reconnu par la communauté scientifique, son rôle dans le développement neuronal de type femelle est toujours sujet à controverses. Cependant, grâce aux expériences menées récemment sur les modèles transgéniques de souris ArKO et AFP-KO, nous sommes actuellement en position confortable pour affirmer que l'E<sub>2</sub> contribue activement à la différenciation cérébrale et comportementale de type femelle.

Nous postulons donc que la différenciation neuronale et comportementale de type mâle se manifeste au cours de la période prénatale chez les mâles, sous l'influence de l'E<sub>2</sub> (issu de l'aromatisation de la T produite par les testicules), qui est elle-même supprimée chez les embryons femelles suite au couplage de cette hormone avec l'AFP. D'un autre côté, la différenciation neuronale et comportementale de type femelle se manifeste au cours de la période pré-pubère, sous l'influence de l'E<sub>2</sub> sécrété par l'ovaire à un moment où l'AFP ne joue plus un rôle neuroprotecteur de par ses très faibles concentrations.

## Early Oestrogens in Shaping Reproductive Networks: Evidence for a Potential Organisational Role of Oestradiol in Female Brain Development

J. Bakker\*† and O. Brock\*

\*GIGA Neurosciences, University of Liège, Belgium.

†Netherlands Institute for Neuroscience, Medical Center Vrije Universiteit, The Netherlands.

### Journal of Neuroendocrinology

A central tenet of contemporary theories on mammalian brain and behavioural sexual differentiation is that an organisational action of testosterone, secreted by the male's testes, controls male-typical aspects of brain and behavioural development, whereas no active perinatal sex hormone signalling is required for female-typical sexual differentiation. Furthermore, the available evidence suggests that many, although not all, of the perinatal organisational actions of testosterone on the development of the male brain result from the cellular effects of oestradiol formed via neural aromatisation of testosterone. However, a default developmental programme for the female brain has been criticised. Indeed, we review new results obtained in aromatase knockout mice indicating that oestradiol actively contributes to the differentiation of female-typical aspects of brain and behavioural sexual differentiation. Furthermore, we propose that male-typical neural and behavioural differentiation occurs prenatally in genetic males under the influence of oestradiol, which is avoided in foetal genetic females by the neuroprotective actions of  $\alpha$ -fetoprotein, whereas female-typical neural and behavioural differentiation normally occurs postnatally in genetic females under the influence of oestradiol that is presumably produced by the ovaries.

**Key words:** oestrogens, sex differences, progesterone receptor, kisspeptin, sexual behaviour.

doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02016.x

*Correspondence to:*

Dr Julie Bakker, Research Associate  
FNRS, GIGA Neuroscience, University  
of Liège, Avenue de l'hôpital B36,  
4000 Liège, Belgium (e-mail:  
jbakker@ulg.ac.be).

The traditional view of sexual differentiation of the mammalian brain holds that sex differences in the brain and behaviour develop under the influence of gonadal hormones, with the male brain developing under the influence of testosterone secreted by the male's testes, and the female brain in the absence of these hormones. Accordingly, McEwen *et al.* (1) proposed that the female rodent brain needs to be protected from any oestrogens produced by the placenta or by male siblings lying in close approximation, and that  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), comprising an important plasma protein present during foetal development in high concentrations, is the most likely candidate to achieve this protection because of its high oestrogen-binding capacities. This idea of a default organisational programme for the female brain as well as a protective role for AFP has been challenged. First, there is some behavioural evidence indicating that the normal sexual differentiation of the female brain requires oestradiol (2, 3) and, second, the presence of AFP within neurones in the absence of any local AFP synthesis suggests that AFP can enter the brain. It was therefore proposed by Toran-Allerand (4) that AFP can actually act as a carrier transport-

ing oestradiol into the brain and, by doing so, participates in the sexual differentiation of the female brain. Thus, there have been two opposing hypotheses on the role of AFP and oestradiol in the development of the female brain.

However, we have recently been able to resolve this longstanding dilemma about the role of AFP in brain sexual differentiation using a knockout mouse model for AFP (AFP-KO) (5). Female AFP-KO mice were clearly defeminised with regard to their lordosis behaviour as well as their population of tyrosine hydroxylase neurones in the sexually differentiated anteroventral periventricular area (AVPV) of the hypothalamus, although these behavioural and morphological consequences of the AFP mutation could be reversed by transplacental treatment with an aromatase-inhibiting drug, 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD) (6). These results thus confirmed that circulating AFP binds oestradiol in female foetuses so as to protect their brains from the potential defeminising effects of this hormone that would normally occur in the male brain in response to oestradiol locally produced from testosterone after it has been taken up from the circulation.

Although the results obtained in AFP-KO female mice suggest that the principal action of prenatal oestrogen exposure, regardless of whether it occurs in female or male mice, is to defeminise, and to some extent, masculinise the brain and behaviour, there is increasing evidence for a feminising role of oestradiol in the development of the female brain. Indeed, in this review, we present results obtained in aromatase knockout (ArKO) mice showing that oestradiol can have feminising actions on the brain and behaviour. On the basis of the results obtained in both knockout mouse models (i.e. the ArKO and AFP-KO mouse), we propose that the defeminising actions of oestradiol normally occur prenatally in males and are avoided in foetal females because of the protective actions of AFP, whereas the feminising actions of oestradiol normally occur postnatally in genetic females, perhaps when the ovaries start to produce oestrogens (i.e. in the second week after birth) and when circulating concentrations of AFP have diminished so that AFP no longer plays a protective role.

#### Classical theory of brain and behavioural sexual differentiation

In male mammals, the presence of the Sry gene on the Y-chromosome causes the undifferentiated gonads to develop into testes instead of ovaries (7). Testosterone secreted by testicular Leydig cells promotes the development of the Wolffian ducts into the internal male genital structures, whereas anti-Müllerian hormone secreted by testicular Sertoli cells causes regression of the female-typical Müllerian ducts. The penis and scrotum develop under the influence of dihydrotestosterone, which is formed from testosterone by the enzyme, 5 $\alpha$ -reductase. In normal female differentiation, the Müllerian ducts develop without any apparent hormonal input into the uterus, fallopian tubes and the distal portion of the vagina. The Wolffian ducts regress and disappear in the absence of androgenic stimulation. A seminal study by Phoenix *et al.* (8) provided the first evidence that the capacity to display sex-specific behaviours in adulthood (and, by inference, the sexual differentiation of the brain) follows the same pattern as that of the genitals. Thus, female guinea pigs treated with testosterone propionate prenatally showed increased levels of male-typical mounting behaviour together with reduced levels of female-typical lordosis behaviour in adulthood after hormonal priming (8). Supportive evidence for a role of perinatal testosterone in the development of the male brain came from subsequent studies by Baum (9) and many others (10, 11) demonstrating that the removal of testosterone by neonatal castration reduced males' later capacity to show male sexual behaviours at the same time as enhancing their ability to show female sexual behaviours. Additional evidence suggested that testosterone secreted by the testes acts perinatally, either directly via androgen receptors or after being aromatised into oestradiol and stimulating oestradiol receptors (12, 13), to masculinise (enhance male-typical sexual responses) and/or defeminise (suppress female-typical sexual responses) the neural substrate that controls sexual behaviour in adulthood. The results of these early studies also implied that the neural mechanisms that control later female-typical sexual behaviour normally develop perinatally in females 'by default' (i.e. without

the need for any sex steroid stimulation). Consistent with this view is the observation (14) that the rodent ovary does not secrete significant amounts of oestradiol before postnatal day 7, and that any oestrogens secreted by the mother during gestation will not be available to the foetal (male or female) brain because they are bound with high affinity and capacity to AFP, a plasma glycoprotein produced in high quantities by the foetal liver (15, 16). Thus, it was proposed by McEwen *et al.* (1) that AFP serves to protect the developing female brain from becoming masculinised and/or defeminised by any oestradiol originating from their mother or male siblings lying in close approximation. This hypothesis on a protective role for AFP was recently confirmed by our research group using AFP-KO mice (6).

#### Role of oestradiol in female-typical brain and behavioural sexual differentiation

The possible importance of ovarian hormones in female-typical brain sexual differentiation was first suggested by some early behavioural studies (3, 17) in which it was shown that female rats ovariectomised on the day of birth had lower lordosis quotients after adult treatment with oestradiol and progesterone than females that either kept their ovaries (17) or were ovariectomised at birth and at the same time implanted with ovaries until postnatal day 60 (3). In addition, Toran-Allerand (18) reported that oestradiol promoted neurite outgrowth from foetal hypothalamic explants of both sexes, suggesting a role for oestradiol in neural differentiation. More recently, Dohler *et al.* (19) showed that neonatal treatment of female rats with tamoxifen, an oestrogen receptor antagonist, decreased their later capacity to show lordosis behaviour, whereas concurrent neonatal administration of a low dose of oestradiol benzoate (EB) prevented this effect. Finally, Baum and Tobet (20) found that female ferrets treated prenatally with the aromatase inhibitor, ATD, and then treated in adulthood with a low or moderate dose of EB, displayed decreased acceptance quotients when paired with a stimulus male.

These various behavioural results suggested that exposure to a low level of oestradiol over a postnatal interval between birth and the age of puberty facilitated the later capacity to display female sexual behaviour; however, they did not provide incontrovertible evidence that oestradiol normally contributes to the development of female sexual behaviour in female mammals. First, the effects of neonatal ovariectomy on the potential to show lordosis behaviour later in life were only transient because any differences in lordosis behaviour disappeared after repeated testing (3). Perhaps more importantly, in addition to its anti-oestrogenic actions, tamoxifen can exert oestrogen-like agonist actions in the brain (21). Therefore, the observed reduction in lordosis behaviour induced by administering tamoxifen neonatally to female rats (19) may actually have resulted from a partial defeminisation of the brain by the oestradiol-like actions of tamoxifen acting on neural oestradiol receptors. Finally, prenatally ATD-treated female ferrets and control females displayed equivalent, high, acceptance quotients when tested after receiving a high dose of EB in adulthood (20), again indicating that ATD-treated females were capable of displaying normal female-typical receptive behaviour. Thus, it has been difficult to provide con-

clusive evidence of a role for oestrogens in the development of the female brain. As a result, the hypothesis languished since the mid-1980s as a result of the absence of a suitable animal model in which to assess rigorously the possible contribution of oestradiol. The creation of the ArKO mouse (22, 23) provided an opportunity to reopen work on this hypothesis. Because ArKO mice cannot produce oestrogens themselves as a result of a targeted mutation in the aromatase (*Cyp19*) gene, but do have functional oestrogen receptors, they can respond to exogenous oestradiol at any time during their life span. This means that this model can be used to distinguish between organisational and activational effects of oestradiol on brain and behavioural functions. Here, we present a short overview of the results obtained in the ArKO mouse model that provide evidence for a role of oestradiol in female neural and behavioural differentiation.

#### Reduced female sexual behaviour in female ArKO mice

In a first experiment, we determined whether lordosis behaviour was affected in female ArKO mice (24). If the female brain indeed develops in the absence of any oestradiol, ArKO female mice should show normal, wild-type levels of lordosis behaviour, provided that they are supplemented with ovarian hormones, such as oestradiol and progesterone, in adulthood because they cannot produce oestradiol. In addition, progesterone levels are affected in ArKO females (22) because they do not show any signs of ovulation (25). Indeed, their ovaries contain follicles but no corpora lutea. In addition, during puberty, their ovaries appear to develop some testicular tissue, as demonstrated by the presence of Sertoli and Leydig cells, suggesting that oestrogens are not only necessary for folliculogenesis, but also to maintain ovarian morphology. Adult treatment with oestradiol restores ovarian morphology in ArKO females (26), but fails to induce ovulation (27). We observed that ArKO females showed less lordotic responses when mounted by the stimulus male (Fig. 1A). There was no genotype differences in the number of mounts received. In addition, this reduction in lordosis behaviour did not disappear with repeated testing as was observed in the early studies using neonatally ovariectomised female rats (3), suggesting thus permanent effects of early oestradiol deprivation on the later ability to show lordosis behaviour.

The absence of lordosis behaviour in ArKO females might have been caused by a partial defeminisation of the brain as a result of the presence of phytoestrogens in the food. By contrast to natural oestrogens, phytoestrogens are generally nonsteroidal and thus have lower affinities for oestradiol-binding plasma proteins such as AFP. They may thus evade the protective actions of AFP and freely enter the brain to interfere with the development of the neural circuits involved in later sexual behaviour. However, these experiments on lordosis behaviour in ArKO females have been repeated when feeding all subjects, including ArKO mice, phytoestrogen-free food (phytoestrogen-free mouse chow D10001 AIN-76A; Brogaard, Lyng, Denmark) and very similar results were obtained (i.e. a clear significant reduction in lordosis behaviour in ArKO females compared to wild-type females) (O Brock, M.J. Baum, and J. Bakker, unpublished results).

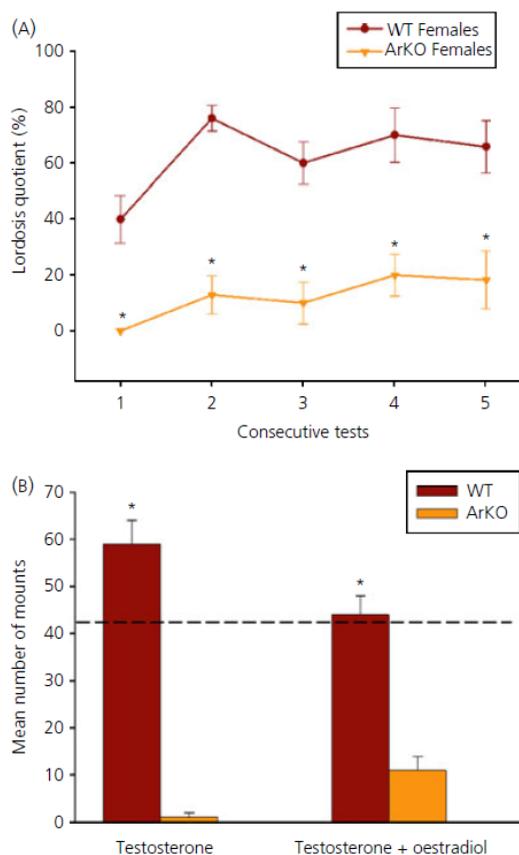


Fig. 1. Sexual behaviour of female wild-type and aromatase knockout (ArKO) mice. (A) Mean  $\pm$  SEM lordosis quotients calculated by dividing the number of lordotic responses shown by the number of mounts received from the stimulus male ( $\times 100\%$ ). \* $P < 0.05$  compared to wild-type (WT) females. (B) Mean  $\pm$  SEM number of mounts (including mounts with intromission-like movements) displayed with an oestrous female. Females were first tested with testosterone and then with testosterone and oestradiol. The dotted line represents number of mounts and intromissions displayed by gonadally intact wild-type male mice under similar testing conditions (48) \* $P < 0.05$  compared to ArKO females. Data adapted from Bakker *et al.* (24).

Another possible explanation for reduced levels of lordosis behaviour in ArKO females could be that they have been partially masculinised by increased concentrations of testosterone during early development. Fisher *et al.* (22) reported that ArKO mice (a different knockout model than the one used in our studies) of both sexes are exposed to increased plasma levels of testosterone during adulthood. These increased levels of testosterone probably results from the lack of negative-feedback action of oestradiol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as suggested by the increased levels of circulating luteinising hormone (LH) and follicle stimulating hormone in these mice (22). Alternatively, the increase in plasma

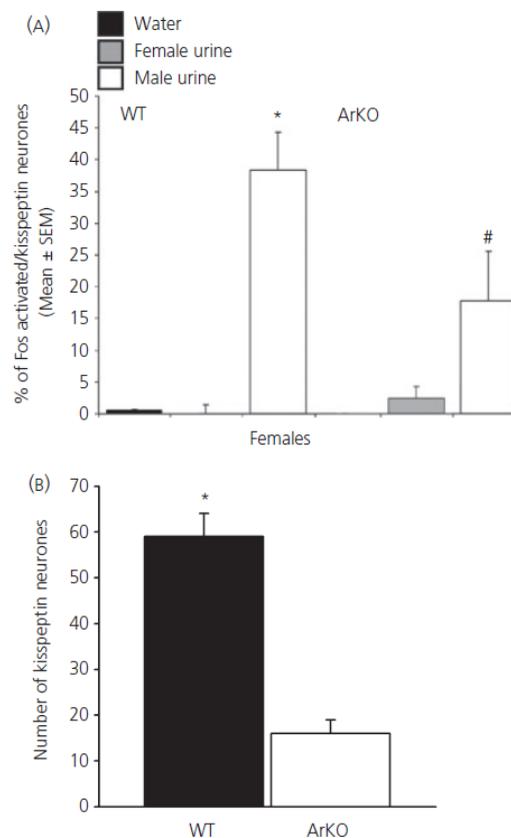
testosterone could be the result of an accumulation of the androgenic substrate because it is no longer aromatised to oestradiol as a result of targeted mutation in the aromatase gene. Because the foetal and neonatal ovaries are not producing high levels of steroid hormones, as well as there being little evidence that the HPG axis is active during early development (28), it is unlikely that this increase in testosterone levels also takes place during early development; however, because no data are available at present to evaluate this question, it could be speculated that increased levels of testosterone contribute to the development of the behavioural phenotype of ArKO female mice. Therefore, to evaluate whether the reduction in lordosis behaviour in ArKO females reflects the masculinising and defeminising actions of testosterone on their brains during early development, female wild-type and ArKO mice were tested for their ability to show male-typical mounting behaviour with an oestrous female. After 3 weeks of testosterone treatment, female ArKO mice showed very little mounting behaviour, whereas wild-type readily displayed mounting behaviour, even at higher frequencies, as observed in gonadally intact wild-type male mice of the same strain (Fig. 1a). Adding oestradiol stimulated some mounting behaviour in ArKO females, but not up to the levels observed in wild-type females. Thus, there is no clear behavioural evidence for brain masculinisation in ArKO females. Indeed, it may be argued that female mounting behaviour is actually a female-typical behavioural characteristic that also needs to be feminised by oestradiol during early development, and thus not, as it is traditionally thought, a typical male behavioural characteristic only. The ethological significance of female-female mounting behaviour is of course less clear when compared to male-female mounting behaviour, although it might signal dominance and reproductive status.

In summary, the results obtained on lordosis behaviour in ArKO females are best explained by assigning an active role for oestradiol in female-typical behavioural differentiation. At present, these results provide the best available evidence for a role of oestradiol in the development of the female brain.

#### Reduced kisspeptin expression in female ArKO mice

In recent years, the *Kiss1* gene product, kisspeptin, has been proposed as an important upstream regulator of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) system because human patients did not enter into puberty as a result of a mutation in the *GPR54* gene (29), which encodes the kisspeptin receptor, named GPR54 (now named Kiss1r). Similar results were obtained in mice with a targeted disruption of the *Kiss1* gene (30). Interestingly, kisspeptin expression is sexually dimorphic in rodent species, with females having greater numbers of kisspeptin-expressing neurones than males in the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V) (31, 32) suggesting that kisspeptin may play a sexually dimorphic role in controlling reproductive events. In particular, the RP3V kisspeptin population has been proposed to play a critical role in the positive-feedback actions of oestradiol on GnRH release. Because ArKO females were reported to be unable to ovulate (25, 27), we determined whether the sexual differentiation of the RP3V kisspeptin population was affected in ArKO female mice. In addition,

because we observed several changes in olfactory functioning in female ArKO mice (24, 33, 34), we investigated whether the integration of pheromones into the reproductive system was affected in ArKO female mice and thus whether oestradiol may be important in organising sexually dimorphic responses of the reproductive system, such as LH release, to pheromones. Exposure to male pheromones induced Fos protein in RP3V kisspeptin neurones in ArKO female mice, albeit significantly less compared to wild-type females (Fig. 2a). The sexual differentiation of kisspeptin neuronal number was lost in ArKO females (Fig. 2b) (i.e. the number of kisspeptin-immunoreactive neurones in the RP3V of ArKO females is as low as



**Fig. 2.** Effects of aromatase knockout (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. (a) Mean  $\pm$  SEM percentage of fos activated kisspeptin expressing neurones after exposure to either water, intact male or oestrous female urine in the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V) of female wild-type (WT) and ArKO mice. \* $P < 0.05$  compared to water exposure; # $P < 0.05$  compared to water exposure and wild-type females exposed to male urine. (b) Mean  $\pm$  SEM number of kisspeptin neurones in the RP3V. \* $P < 0.05$  compared to ArKO females. Data adapted from Bakker *et al.* (35).

that observed in male mice), suggesting that the sex difference in kisspeptin neuronal number in wild-type mice reflects an organisational action of oestradiol in females (35) because ArKO females were supplemented with oestradiol in adulthood for these experiments. This result was confirmed by a recent study performed by Clarkson *et al.* (36), who showed that ovariectomy of female pups at postnatal (P) day 15 resulted in a 70–90% reduction in kisspeptin expression within the RP3V analyzed at either P30 or P60, whereas oestradiol treatment in P15 ovariectomised mice from P15–P30 or P22–P30 resulted in a complete restoration of kisspeptin expression in this brain region. Furthermore, they showed decreased numbers of kisspeptin neurones in the RP3V of adult female ArKO mice, as was also observed in our study (35). These findings can be best explained by organisational rather than activational effects of oestradiol on kisspeptin neurones in the RP3V because earlier work from this group showed that the RP3V kisspeptin population is not present before P25 (31).

Interestingly, kisspeptin neurones in the RP3V were still activated by male pheromones in ArKO females, although this activation was clearly reduced in comparison with wild-type females. Whether there is a link between this reduced activation of kisspeptin neurones and the lack of showing ovulation following adult oestradiol treatment (27) is still unknown. We are currently determining whether concurrent treatment with oestradiol and progesterone, which has been shown to be successful in inducing LH surges in wild-type female mice (37), can induce LH surges in ArKO female mice.

In summary, these results clearly show that oestradiol induces a female-typical population of kisspeptin in the RP3V and thus provides additional evidence for an organisational role of oestradiol in female neural differentiation.

#### Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female ArKO mice

The observation of clear deficits in lordosis behaviour (24), as well as decreased numbers of kisspeptin neurones in the RP3V (35) of female ArKO mice, has resurrected the question of whether oestradiol, acting during the first several weeks of life, actively contributes to female-typical brain and behavioural sexual differentiation, perhaps beginning after postnatal day 7 when the ovary first produces oestradiol (38) and when the AFP concentration has diminished to such an extent that it no longer plays a neuroprotective role against oestrogens. One approach to the question of whether oestradiol actively contributes to female development would be to compare the expression of an oestradiol-dependent gene in ArKO female mice, which produce no oestradiol in any tissue, and in wild-type control females. The expression of the progesterone receptor (PR) in the hypothalamus of adult female rodents is well known to be dramatically up-regulated by oestradiol (39, 40). Likewise, Wagner and colleagues have conducted an extensive series of experiments showing that the number of PR-immunoreactive (-ir) cells in the medial preoptic area (MPOA), the lateral part of the ventromedial hypothalamus (VMHvl) and the AVPV of both rat (41) and mouse (42, 43) is significantly greater in neonatal males than

in females. Additional work from this group (40, 43) showed that oestradiol, formed via the neural aromatisation of testosterone in male neonates, is responsible for the higher, male-typical levels of PR expression in the MPOA. Finally, another study from this group (44) showed that administration of the aromatase inhibitor ATD reduced PR-ir in the MPOA of male rats killed at the end of gestation. Therefore, based on these results, we used the expression of PR-ir in three different hypothalamic regions (i.e. AVPV, MPOA and VMHvl) as an index of the action of oestradiol action in the female mouse brain across the first 25 days of postnatal development (45). We found that the amount of PR-ir in the AVPV and MPOA was significantly lower in ArKO female mice than in wild-type females at several prepubertal ages, including postnatal day P15, P20 and P25, but not neonatally at P0, P5, or P10 (Fig. 3) (45). Similarly, PR-ir was significantly lower in the VMHvl at P25 in ArKO versus wild-type females but not at earlier postnatal ages (45). We also observed that PR-ir was consistently higher in male than in female wild-type mice in the AVPV and MPOA over P0–P10 and in the VMHvl over P0–P20. In addition, PR-ir in ArKO males was significantly lower than in wild-type males in these brain areas across these latter ages, and resembled the values observed in wild-type females, confirming previous studies indicating that oestradiol formed in the male hypothalamus by aromatisation of testosterone is responsible for inducing male-typical levels of neural PR expression.

These results thus support the view that oestradiol contributes prepubertally to at least one female-typical aspect of development in both the MPOA and AVPV, namely the expression of PR (45). However, more research is needed to determine whether this prepubertal increase in neural PR expression observed in wild-type females is simply a passive, inconsequential response to increased

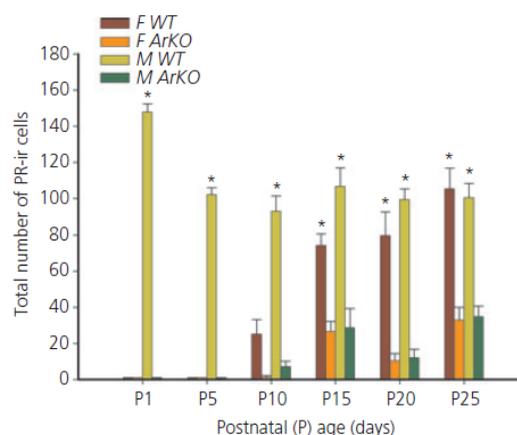
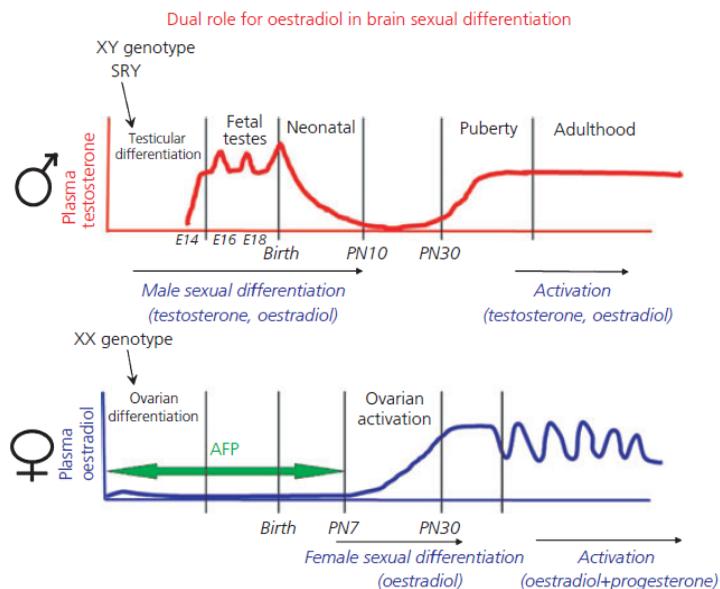


Fig. 3. Reduced prepubertal expression of progesterone receptor (PR) in the hypothalamus of aromatase knockout (ArKO) mice. (A) The total number of PR-immunoreactive (-ir) cells in the medial preoptic area (MPOA) at several postnatal ages in female and male wild-type (WT) and ArKO mice. \* $P < 0.05$  compared to ArKO mice of both sexes. Data adapted from Brock *et al.* (45).



**Fig. 4.** Working hypothesis on how oestradiol can have both feminising and defeminising effects on brain sexual differentiation. Thus, male-typical neural and behavioural differentiation occurs prenatally in genetic males under the influence of testosterone and oestradiol, which is avoided in foetal genetic females by the neuroprotective actions of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), whereas female-typical neural and behavioural differentiation probably occurs postnatally in genetic females under the influence of oestradiol that is presumably produced by the ovaries and at the time that AFP no longer plays a neuroprotective role.

ovarian production of oestradiol or, alternatively, whether long-lasting morphological and/or behavioural neuroendocrine consequences of this prepubertal oestrogenic stimulation of PR expression can be identified in the female rodent MPOA and AVPV, such as the development of the female-typical kisspeptin population.

Interestingly, these results also indicate that oestradiol induces both female- and male-typical expression of PR in the mouse hypothalamus, with the male-typical population developing prenatally and the female-typical population developing postnatally (Fig. 4). These sex differences in expression (and particularly in the induction of PR expression) may simply reflect gonad development, with the brain responding passively, and perhaps not some inherent brain sex difference or sex difference in critical period.

### Conclusions and future directions

The results obtained in female ArKO mice suggest an active contribution of oestrogens to the development of the female brain. Initially, these results are at odds with our results obtained in AFP-KO mice demonstrating that the principal action of prenatal oestrogen exposure, regardless of whether it occurs in female or male mice, is to defeminise and to some extent masculinise brain and behaviour. Thus, both knockout mouse models show feminising and defeminising actions of oestradiol. Such a dual role of oestradiol in brain sexual differentiation was earlier suggested by Dohler

*et al.* (19) who introduced the 'progressive hypothesis of brain sexual differentiation', which asserts that, under the influence of moderate levels of oestradiol, female-typical neural and behavioural traits develop, whereas, under the influence of high levels of oestradiol, male-typical neural and behavioural traits develop. However, our results obtained in AFP-KO mice clearly show that any prenatal oestrogen action is blocked by AFP during development and, thus, in order for oestradiol to influence brain sexual differentiation, it has to be produced locally from testosterone by aromatisation. So the next question would be that if oestradiol is acting prenatally in the female brain, what might be the sources of this oestradiol? It may be *de novo* synthesis (44) but, at present, the evidence to support is still lacking. Another possibility is that female-typical neural and behavioural characteristics develop postnatally at the time that the ovaries have begun to produce oestradiol (after P7) and when the amount of AFP has decreased substantially and AFP no longer plays a protective role (Fig. 4). Our results obtained on PR expression clearly show that the female-typical expression of PR develops after P10, which suggests that feminising actions of oestradiol take place prepubertally and not perinatally. Supportive evidence comes from the study by Clarkson *et al.* (36) on the sexual differentiation of the RP3V kisspeptin population, showing that prepubertal treatment with  $17\beta$ -oestradiol between P15 and P30 was able to restore the decrease observed in kisspeptin expression in P15-ovariectomised female mice. However, the possibility cannot be ruled out that some prenatal or early

neonatal event is still necessary for mice to be able to later show a female-typical response to oestradiol with regard to hypothalamic kisspeptin and PR expression. The ArKO mouse will be a great model to test whether there is a specific critical period for female brain development because they can be supplemented with oestradiol at various times during development. Studies are currently underway aiming to determine whether deficits in lordosis behaviour can be reversed by prepubertal treatment with oestradiol. If normal wild-type levels of lordosis behaviour can be induced in female ArKO mice by treating them with exogenous oestradiol over a specific postnatal period, then these results would provide the best evidence for an active contribution of oestradiol to female neural and behavioural sexual differentiation.

Finally, the view that testosterone and/or oestradiol are solely responsible for the development of sex differences in the mammalian brain has been challenged as well. Several sex dimorphisms have been identified that are difficult to attribute solely to the perinatal actions of sex steroids in the nervous system. Thus, it has been proposed that different doses of genes expressed off the X chromosome in XY (male) versus XX (female) mice influence aspects of brain and behavioural sexual differentiation (46), perhaps reflecting a nonhormonal, genetic signalling mechanism that actively promotes female-typical brain sexual differentiation. For example, De Vries *et al.* (47) showed that the male-typical profile of vasopressin innervation of the lateral septum depends on the presence of a Y-chromosome. XY males and XY female mice (i.e. females with a deletion of the Sry gene) were more masculine than XX mice with respect to the density of vasopressin-ir fibres in the lateral septum. Our finding (6) of a female-like vasopressin innervation in the lateral septum of female AFP-KO mice is intriguing because mice had been exposed to high defeminising levels of oestradiol during prenatal development. Thus, more research is needed to determine the contribution of chromosome genes to the sexual differentiation of the brain.

At present, there is increasing evidence for an organisational role of oestradiol in female-typical neural and behavioural sexual differentiation, thereby challenging the old dogma of a default organisational programme for the female brain. However, more research is needed on when oestradiol is precisely acting in the female brain to induce feminisation (i.e. is there a specific critical time window for female brain differentiation as has been shown for the development of the male brain?). In addition, questions remain on the mechanisms by which oestradiol induces feminisation (i.e. is there a specific role for progesterone receptors as well as progesterone itself in the development of the female brain?).

### Acknowledgements

This work was supported by National Institutes of Health grant HD044897 and Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) MIS F.4502.07. J.B. is a research scientist of the Belgian FNRS.

Received: 2 April 2010,  
revised 28 April 2010,  
accepted 28 April 2010

### References

- McEwen BS, Plapinger L, Chaptal C, Gerlach J, Wallach G. Role of fetal-neonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res* 1975; **96**: 400–406.
- Dunlap JL, Gerall AA, McLean LD. Enhancement of female receptivity in neonatally castrated males by prepubertal ovarian transplants. *Physiol Behav* 1973; **10**: 701–705.
- Gerall AA, Dunlap JL, Hendricks SE. Effect of ovarian secretions on female behavioral potentiality in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1973; **82**: 449–465.
- Toran-Allerand CD. On the genesis of sexual differentiation of the central nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of alpha-fetoprotein. In: De Vries GJ, De Bruin JPC, Uyllings HBM, Corner MA, eds. *Progress in Brain Research, Sex Differences in the Brain, The Relation Between Structure and Function*. Amsterdam: Elsevier 1984: 63–98.
- Gabant P, Forrester L, Nichols J, Van Reeth T, De Mees C, Pajack B, Watt A, Smitz J, Alexandre H, Szpirer C, Szpirer J. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 12865–12870.
- Bakker J, De Mees C, Douhard O, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 220–226.
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990; **348**: 450–452.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 1959; **65**: 369–382.
- Baum MJ. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 1979; **3**: 265–284.
- Feder HH, Whalen RE. Feminine behavior in neonatally castrated and estrogen-treated male rats. *Science* 1965; **147**: 306–307.
- Grady KL, Phoenix CH, Young WC. Role of the developing rat testis in differentiation of the neural tissues mediating mating behavior. *J Comp Physiol Psychol* 1965; **59**: 176–182.
- MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; **211**: 1294–1302.
- Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Petro Z, Kuhn M. The formation and metabolism of estrogens in brain tissues. *Adv Biosci* 1975; **15**: 105–121.
- Lamprecht SA, Kohen F, Ausher J, Zor U, Lindner HR. Hormonal stimulation of oestradiol-17 beta release from the rat ovary during early postnatal development. *J Endocrinol* 1976; **68**: 343–344.
- Andrews GK, Dziadek M, Tamaoki T. Expression and methylation of the mouse alpha-fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissues. *J Biol Chem* 1982; **257**: 5148–5153.
- Tilghman SM, Belayew A. Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 5254–5257.
- Lisk RD. Progesterone: biphasic effects on the lordosis response in adult or neonatally gonadectomized rats. *Neuroendocrinology* 1969; **5**: 149–160.
- Toran-Allerand CD. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area *in vitro*: implications for sexual differentiation. *Brain Res* 1976; **106**: 407–412.
- Dohler KD, Hancke JL, Srivastava SS, Hofmann C, Shryne JE, Gorski RA. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Prog Brain Res* 1984; **61**: 99–117.

- 20 Baum MJ, Tobet SA. Effect of prenatal exposure to aromatase inhibitor, testosterone, or antiandrogen on the development of feminine sexual behavior in ferrets of both sexes. *Physiol Behav* 1986; **37**: 111–118.
- 21 Mathews GA, Brenowitz EA, Arnold AP. Paradoxical hypermasculinization of the zebra finch song system by an antiestrogen. *Horm Behav* 1988; **22**: 540–551.
- 22 Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6965–6970.
- 23 Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**: 445–449.
- 24 Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 2002; **22**: 9104–9112.
- 25 Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the *Cyp 19* (aromatase) gene. *Endocrinology* 2000; **141**: 2614–2623.
- 26 Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod* 2004; **71**: 1712–1723.
- 27 Toda K, Okada T, Takeda K, Akira S, Saibara T, Shiraishi M, Onishi S, Shizuta Y. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17 $\beta$ -oestradiol to aromatase gene (*Cyp19*) knockout mice. *J Endocrinol* 2001; **168**: 455–463.
- 28 Wu S, Wilson MD, Busby ER, Isaac ER, Sherwood NM. Disruption of the single copy gonadotropin-releasing hormone receptor in mice by gene trap: severe reduction of reproductive organs and functions in developing and adult mice. *Endocrinology* 2010; **151**: 1142–1152.
- 29 de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *KISS1*-derived peptide receptor *GPR54*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10972–10976.
- 30 d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Coll-edge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10714–10719.
- 31 Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; **147**: 5817–5825.
- 32 Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M. Sexual differentiation of *Kiss1* gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; **148**: 1774–1783.
- 33 Pierman S, Douhard Q, Bakker J. Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur J Neurosci* 2008; **27**: 423–431.
- 34 Pierman S, Douhard Q, Balthazart J, Baum MJ, Bakker J. Attraction thresholds and sex discrimination of urinary odorants in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav* 2006; **49**: 96–104.
- 35 Bakker J, Pierman S, Gonzalez-Martinez D. Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav* 2009; **5**: 390–395.
- 36 Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 2009; **150**: 3214–3220.
- 37 Gonzalez-Martinez D, De Mees C, Douhard Q, Szpirer C, Bakker J. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and *Kiss1* activation in alpha-feto-protein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 2008; **149**: 2333–2340.
- 38 Weniger JP, Zeis A, Chouraqui J. Estrogen production by fetal and infantile rat ovaries. *Reprod Nutr Dev* 1993; **33**: 129–136.
- 39 Quadros PS, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK. Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J Neuroendocrinol* 2002; **14**: 761–767.
- 40 Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK. Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* 2002; **143**: 3727–3739.
- 41 Quadros PS, Wagner CK. Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology* 2008; **149**: 3054–3061.
- 42 Kudwa AE, Harada N, Honda SI, Rissman EF. Regulation of progesterone receptors in medial amygdala: estradiol, phytoestrogens and sex. *Physiol Behav* 2009; **97**: 146–150.
- 43 Wagner CK, Pfau JL, De Vries GJ, Merchenthaler IJ. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J Neurobiol* 2001; **47**: 176–182.
- 44 Jahagirdar V, Quadros PS, Wagner CK. Endogenous oestradiol regulates progesterone receptor expression in the brain of female rat fetuses: what is the source of oestradiol? *J Neuroendocrinol* 2008; **20**: 359–365.
- 45 Brock O, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology* 2010; **151**: 1814–1821.
- 46 Arnold AP, Xu J, Grisham W, Chen X, Kim YH, Itoh Y. Minireview: sex chromosomes and brain sexual differentiation. *Endocrinology* 2004; **145**: 1057–1062.
- 47 De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, Swain A, Lovell-Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci* 2002; **22**: 9005–9014.
- 48 Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. Sexual partner preference requires a functional aromatase (*cyp19*) gene in male mice. *Horm Behav* 2002; **42**: 158–171.

# **Discussion générale**

Le résultat le plus valorisant de cette thèse de doctorat portant sur le rôle des œstrogènes dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale chez la souris est sans aucun doute la définition d'une période sensible pré-pubère au cours de laquelle les œstrogènes semblent féminiser divers aspects comportementaux et physiologiques. Ces données apportent un nouvel argument indéniable quant à la réfutation de la théorie classique de la différenciation sexuelle selon laquelle le sexe de type femelle se développait « par défaut », c.à.d. en l'absence de toute influence hormonale gonadique. De plus, l'établissement de cette fenêtre sensible ouvre de nouvelles portes permettant d'étudier les influences oestrogéniques organisatrices sur bon nombre de paramètres autres que comportementaux ; nous avons déjà proposé une piste en démontrant que les œstrogènes pré-pubères semblaient interférer avec le métabolisme lipidique.

D'un autre côté, nous avons également mis en évidence que les œstrogènes pouvaient fortement moduler les capacités olfactives d'un individu probablement par l'intermédiaire de la neurogenèse adulte olfactive. L'olfaction est primordiale en termes de fitness ; en effet, elle sous-tend bon nombre de composantes du comportement reproducteur comme par exemple, la reconnaissance individuelle, le choix d'un partenaire, les soins parentaux, etc. Nous avons démontré que des perturbations neuroendocriniennes affectaient ces différents comportements (préférences sexuelles, comportement maternel) pouvant, in fine, conduire à une diminution du succès reproducteur.

Dans un sens très général, il est relativement important de comprendre les mécanismes d'influence des œstrogènes pré- et postnataux sur de tels paramètres comportementaux. Au sein de notre environnement, nous sommes de plus en plus exposés à des perturbateurs neuroendocriniens, dont notamment le Bisphénol A (BPA). Celui-ci possède des propriétés hormono-mimétiques, se lie spécifiquement aux récepteurs oestrogéniques de type  $\alpha$  et  $\beta$  (Kuiper et al., 1998) et montre un passage

transplacentaire significatif chez la souris (Zalko et al., 2003). Ainsi, cette molécule exogène peut mimer les effets déféminisants prénataux de l'E<sub>2</sub> que nous avons observé chez le modèle AFP-KO (Braniste et al., 2010), et à échelle humaine, affecter notamment le développement de l'identité sexuelle.

Les modèles d'animaux expérimentaux permettent notamment de tenter de corréliser des systèmes cellulaires modifiés par les influences oestrogéniques et certaines réponses comportementales altérées. Cependant, déterminer avec précision par exemple quelles populations neuronales gouvernent un type de comportement spécifique est une tâche très laborieuse au vu des nombreuses variables encore non-identifiées entre une stimulation neuronale et la réponse comportementale correspondante.

Dans ce chapitre, nous discuterons donc de l'importance de discerner les effets organisateurs des effets activateurs des hormones gonadiques, d'identifier des systèmes neuronaux traduisant de manière spécifique l'activation d'un comportement donné et d'évaluer si les processus pré-pubères de féminisation induits par les œstrogènes peuvent être sous-tendus par la progestérone et ses récepteurs. Finalement, nous discuterons la contribution des facteurs génétiques portés par les chromosomes sexuels pouvant également influencer la différenciation sexuelle du cerveau.

## **I. Effets organisateurs *versus* activateurs des hormones gonadiques sur le comportement**

Phoenix (1959) fut le premier à proposer une subdivision de la différenciation sexuelle en effets organisateurs (permanents, périnataux, irréversibles) et activateurs (transitoires, adultes, réversibles) des hormones gonadiques. Ces deux types d'influence

se répercutent sur plusieurs comportements mâles et femelles, tels que le comportement sexuel, le comportement de monte et les préférences sexuelles, chez la souris.

## **I.1 Le comportement sexuel**

Chez la femelle, l'E<sub>2</sub> montre à la fois des effets organisateurs et activateurs sur l'expression de la lordose à l'âge adulte. En effet, nous venons de démontrer que si nous traitions des femelles ArKO (montrant des niveaux très bas de lordose suite à un traitement oestrogénique combiné à de la progestérone à l'âge adulte) avec de l'E<sub>2</sub> durant une période pré-pubère, elles récupéraient leurs capacités d'expression du comportement sexuel de type femelle (Article 7). Par ailleurs, une exposition à l'E<sub>2</sub> au cours d'une période postnatale (jusque PN5 ; Article 7) ou prénatale (modèle AFP-KO ; Bakker et al., 2006) engendre une déféminisation totale des capacités d'expression de la lordose à l'âge adulte chez des femelles. Ces données suggèrent donc que le comportement de lordose est bel et bien féminisé par l'E<sub>2</sub> durant une période pré-pubère (correspondant au début des sécrétions ovariennes). Cependant, l'expression de ce comportement à l'âge adulte nécessite également l'influence de l'E<sub>2</sub> (combinée avec la progestérone) ; en effet, des femelles WT ovariectomisées ne seront réceptives sexuellement que si un traitement combiné d'E<sub>2</sub> et de progestérone leur est administré. Outre les effets organisateurs, ces données suggèrent donc que l'E<sub>2</sub> exerce également une influence activatrice sur ce comportement, influence spécifique aux femelles car un tel traitement administré à un mâle, intact ou castré, n'induirait jamais de comportement sexuel typiquement femelle chez ce mâle.

Chez le mâle, l'E<sub>2</sub> (via l'aromatisation de la T) montre des effets activateurs sur l'expression du comportement sexuel pouvant varier selon la composante comportementale envisagée. Ainsi, des mâles ArKO (ayant perdu la capacité d'expression du comportement sexuel) montrent une restauration du comportement de monte suite à l'administration d'un traitement oestrogénique à l'âge adulte, suggérant

que l'E<sub>2</sub> possède une influence activatrice plutôt qu'organisatrice sur ce comportement. Les composantes comportementales d'intromission et d'éjaculation semblent obéir aux mêmes influences activatrices oestrogéniques, bien qu'elles ne soient pas complètement restaurées par un traitement à l'E<sub>2</sub> à l'âge adulte (Bakker et al., 2004). L'administration combinée de DHTP semble cependant améliorer la restauration de ce comportement, suggérant que la testostérone puisse également avoir quelques effets activateurs (via les récepteurs androgéniques) sur ces composantes comportementales. Par ailleurs, la T est requise pour l'organisation du comportement sexuel de type mâle ; en effet, des mâles AR-KO (portant une mutation induite par le système Cre-loxP pour le gène codant pour le récepteur androgénique), montrent des comportements sexuels et agressifs sévèrement affectés (Sato et al., 2004, Raskin et al., 2009). En outre, des femelles WT traitées au cours d'une période périnatale avec de la DHT, montrent un comportement sexuel de type mâle induit par un traitement androgénique ou oestrogénique à l'âge adulte. Cependant, cette masculinisation comportementale est absente chez les femelles AR-KO (Sato et al., 2004), suggérant ainsi que la masculinisation cérébrale périnatale requiert l'influence de la T (ou des ses métabolites non-aromatisables) via la présence des récepteurs androgéniques.

## **I.2 Le comportement de monte**

Chez la femelle, le comportement de monte régulièrement observé pourrait traduire l'expression d'un statut de dominance ou reproducteur. Ce comportement particulier est organisé suite aux actions masculinisantes périnatales de l'E<sub>2</sub> via les récepteurs ER. En effet, des femelles ArKO ne montrent pas de montes envers d'autres femelles, alors que ce comportement se développe suite à un traitement oestrogénique administré à ces individus entre PN5 et PN15. De plus, des femelles AFP-KO (surexposées aux œstrogènes pendant la vie embryonnaire) montrent également de plus hauts taux de montes comparativement à des femelles WT (Bakker et al., 2006). Ainsi,

le comportement de monte serait organisé chez les embryons femelles WT suite à une action masculinisante de l'E<sub>2</sub> prénatal, probablement produit par l'aromatase locale cérébrale de la T émise par les embryons mâles de la même portée. L'hypothèse d'une déféminisation/masculinisation induite par les œstrogènes placentaires (provenant de la mère gestante) est peu probable en raison du rôle neuroprotecteur de l'AFP présente chez ces embryons femelles WT. Par ailleurs, le comportement de monte est activé par la T via les récepteurs AR à l'âge adulte. En effet, les femelles ArKO (ne pouvant pas convertir la T en E<sub>2</sub>) ayant subi une masculinisation suite à l'administration d'un traitement oestrogénique entre PN5 et PN15 montrent des taux élevés de montes envers d'autres femelles suite à l'administration d'un traitement androgénique à l'âge adulte. En outre, les femelles WT exprimeraient ce comportement particulier suite à une activation induite par la T probablement sécrétée en faibles quantités par les glandes surrénales à l'âge adulte.

Chez le mâle, comme expliqué précédemment, le comportement de monte est organisé suite aux actions masculinisantes périnatales de la T via les récepteurs AR (les mâles AR-KO ne montrant aucun comportement sexuel à l'âge adulte), tandis qu'il est activé par l'E<sub>2</sub> à l'âge adulte (les mâles ArKO montrent une restauration du comportement sexuel suite à l'administration d'un traitement oestrogénique à l'âge adulte).

### **I.3 Les préférences sexuelles**

Chez la souris, il s'avère relativement difficile de mettre en évidence des préférences sexuelles prononcées comparativement aux rats. En effet, les résultats varient fortement selon la nature de la stimulation (odeurs corporelles volatiles, odeurs urinaires volatiles, odeurs non-volatiles comme la litière souillée); de plus, les comportements exprimés par les mâles reflètent parfois plus une réaction territoriale (comportement agressif dirigé vers les odeurs mâles) qu'un choix reproducteur

(préférence sexuelle dirigée vers les odeurs d'une femelle sexuellement réceptive). Ainsi, les concepts organisateurs/activateurs présentés ci-dessous se restreignent aux préférences sexuelles observées suite à une exposition des odeurs socio-sexuelles volatiles.

Chez la femelle, l'E<sub>2</sub> montre à la fois des effets organisateurs et activateurs sur l'expression des préférences sexuelles à l'âge adulte. En effet, nous avons démontré qu'un traitement oestrogénique administré au cours d'une période pré-pubère (PN15-PN25) restaurait une préférence robuste dirigée vers le mâle chez des femelles ArKO adultes traitées alors avec de l'E<sub>2</sub> et de la progestérone, suggérant donc un rôle organisateur féminisant de l'E<sub>2</sub> pré-pubère sur ce comportement. D'un autre côté, des femelles WT ovariectomisées et traitées avec de l'E<sub>2</sub> à l'âge adulte montrent une préférence sexuelle dirigée vers la femelle (Bakker et al., 2002) ; cependant, si l'E<sub>2</sub> est combiné avec de la progestérone, ces femelles montrent alors une nette préférence dirigée vers le mâle. Ces observations suggèrent donc que l'action synergique de ces deux hormones est nécessaire pour activer ce comportement.

Chez le mâle, l'E<sub>2</sub> montre des effets organisateurs sur l'expression des préférences sexuelles. En effet, des mâles ArKO (ne sachant pas convertir la T en E<sub>2</sub>) traités avec de l'EB, ou avec de l'EB combiné à de la DHTP, ne montrent pas de préférence dirigée vers une femelle (Bakker et al., 2004), suggérant donc que l'E<sub>2</sub> exerce une influence périnatale sur le développement de ce comportement. Cependant, des mâles Tfm (portant une mutation pour le gène codant pour les récepteurs androgéniques) ne montrent pas de préférence sexuelle dirigée vers une femelle à l'âge adulte (Bodo and Rissman, 2007). De plus, des femelles WT traitées avec de la DHT à la naissance développent une nette préférence dirigée vers un mâle (Bodo and Rissman, 2008). Ces dernières données suggèrent donc que la T (ou ses métabolites non-aromatisables tels que la DHT) possède également une influence organisatrice sur ce comportement (Bodo and Rissman, 2007, 2008). Prises dans leur ensemble, ces

[184]

observations semblent donc suggérer que l'action synergique de la T et de l'E<sub>2</sub> soit nécessaire pour organiser les préférences sexuelles chez le mâle.

## **II. Système neuronal sous-tendant le comportement sexuel femelle**

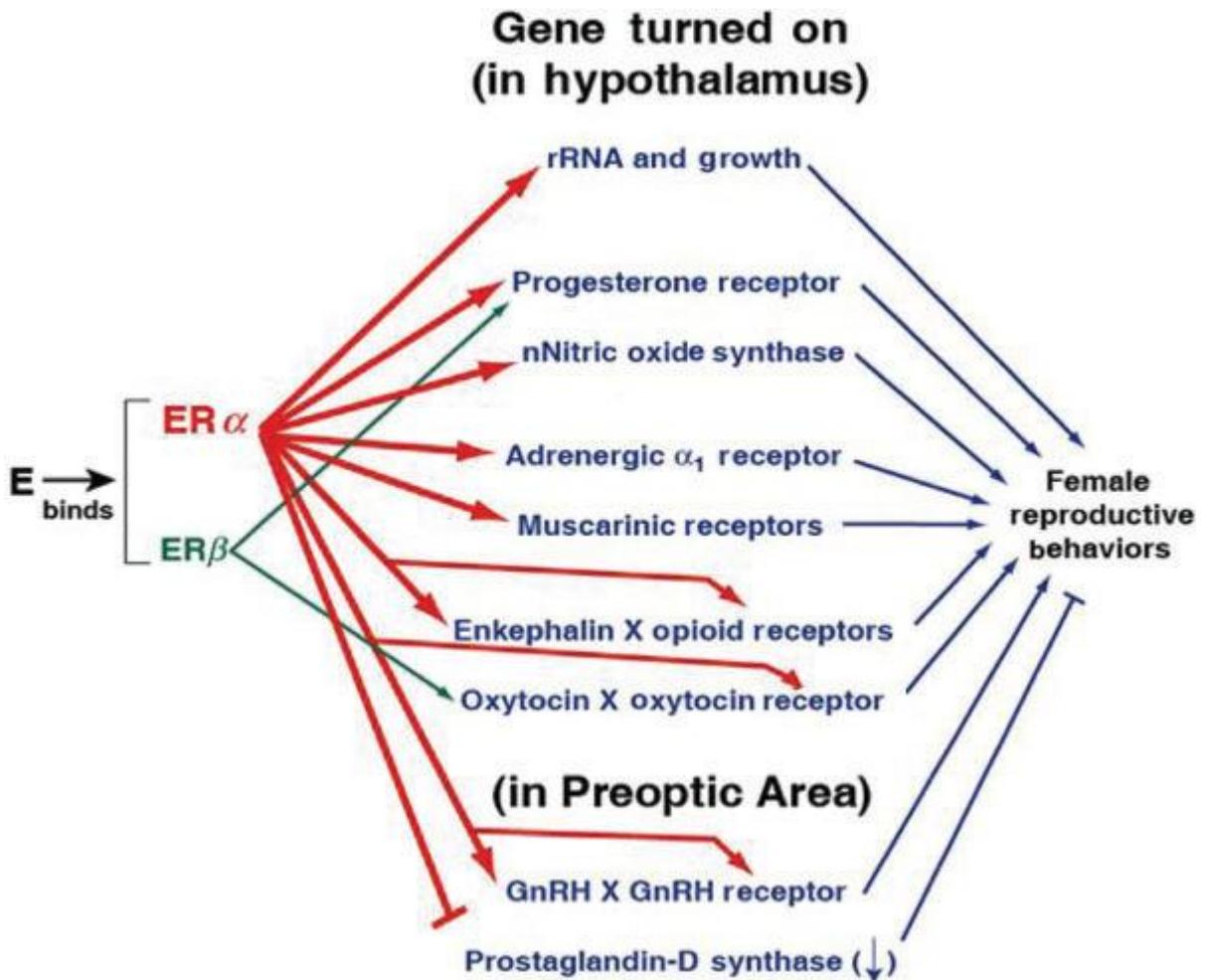
Au cours de nos différentes études, nous avons pu mettre en évidence des effets organisateurs et activateurs de l'E<sub>2</sub> sur l'expression du comportement sexuel de type femelle (c.à.d. la lordose). Bien que le VMH soit reconnu comme le centre de régulation de l'expression de la lordose, et qu'une partie spécifique de ce noyau (VMHvl) renferme une population neuronale présentant une grande distribution de récepteurs oestrogéniques semblant impliqués dans les voies de stimulation/inhibition d'expression de lordose (Flanagan-Cato et al., 2001 ; McClellan et al., 2006), ces dernières restent à ce jour une énigme à part entière.

Dès lors, nous nous sommes penchés sur le système Kisspeptine/GnRH. Nous savons que ce système contribue à la régulation du pic d'hormone lutéinisante (LH) apparaissant chez la femelle avant l'ovulation. Chez des femelles AFP-KO ayant perdu la capacité d'expression de la lordose, ce système particulier est également déféminisé. Cependant, comme expliqué précédemment (Introduction – Etudes comportementales de la souche ArKO), aucune corrélation n'a été observée entre la population de neurones exprimant la Kisspeptine et le comportement de lordose chez la femelle rongeur. Actuellement, nous pensons que ce système ne représente peut-être pas un si bon candidat pour la régulation de l'expression de la lordose. En effet, il se pourrait que le système Kisspeptine soit activé par l'E<sub>2</sub> à l'âge adulte. Par exemple, dans l'étude de Clarkson (2009), des souris ArKO ne recevant aucun traitement oestrogénique ne montrent aucun neurone exprimant la Kisspeptine au sein du RP3V, tandis que, dans

l'étude de Bakker (2010), l'administration d'un traitement oestrogénique durant 2 semaines à l'âge adulte engendre l'apparition d'une faible proportion (1/3) de neurones à Kisspeptine chez des femelles ArKO comparativement à des femelles WT. Récemment (voir Discussion de l'Article 7), nous venons d'observer que des femelles ArKO ayant un reçu un traitement oestrogénique pendant plusieurs semaines montraient une population neuronale Kisspeptine équivalente à 2/3 de celle observé chez des femelles WT traitées de façon similaire. Par ailleurs, l'expression de la lordose chez ces femelles ArKO (groupe contrôle dans l'Article 7) reste toujours nulle malgré une population de neurones exprimant la Kisspeptine plus importante. De plus, les neurones à Kisspeptine sont activés suite à l'exposition de phéromones mâles à la fois chez les femelles WT et ArKO (Bakker et al., 2010). Prises ensemble, ces données suggèrent donc que les neurones exprimant la Kisspeptine peuvent être activés et stimulés respectivement par l'E<sub>2</sub> et les phéromones mâles à l'âge adulte chez des femelles ArKO alors qu'elles restent incapables d'exprimer de la lordose, soulignant ainsi la faiblesse de la corrélation entre les deux aspects.

En reconsidérant le candidat promu à l'étude de la régulation de la lordose chez la souris, nous avons recensé plusieurs gènes dont les modulations engendraient des modifications directes du comportement sexuel chez les femelles (**Figure 13**). Cependant, nous en avons retenus deux, principalement reliés au VMH :

**1/ Le système ocytocine** : L'ocytocine (OT) est un nonapeptide, proche de la vasopressine, toutes deux produites dans les cellules lutéales. L'OT joue un rôle important dans bon nombre de fonctions liées à la reproduction telles que la régulation de la longueur du cycle œstral et la stéroïdogenèse ovarienne (Fuchs, 1988). Outre ces effets endocriniens, l'OT semble également jouer un rôle en tant que neurotransmetteur ou neuromodulateur cérébral, influençant les comportements socio-sexuels (Insel and Young, 2000). Le noyau cérébral VMH est entouré d'un complexe de fibres latérales marquées pour le neuropeptide OT (Daniels and Flanagan-Cato, 2000) ; de plus, il



**Figure 13** : Ensemble de gènes modulés par les œstrogènes (E). Ces gènes voient leur transcription augmentée suite à la fixation des E aux récepteurs oestrogéniques de type  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) ou  $\beta$  (ER $\beta$ ), et leurs produits facilitent l'expression de la lordose chez la ratte. Une seule exception a été révélée : la transcription de la synthase D-prostaglandine est réduite au sein de l'aire préoptique entraînant une inhibition du comportement sexuel femelle (Shelley et al., 2006).

contient une large distribution de récepteurs OT (Griffin et al., 2010). Ainsi, bon nombre d'études pharmacologiques employant des antagonistes/agonistes des récepteurs OT ont démontré que les niveaux endogènes d'OT facilitaient l'expression du comportement sexuel de type femelle chez la ratte (Arletti and Bertolini, 1985 ; Caldwell et al., 1986 ; Witt and Insel, 1991 ; McCarthy et al., 1994). Cependant, l'avènement du modèle de souris transgénique OTKO (supprimant toute production endogène d'OT) a permis d'obtenir de nouvelles données concernant la régulation des mécanismes socio-sexuels. Ainsi, contrairement aux observations rapportées chez le rat, les souris ne semblent pas requérir l'influence de l'OT afin d'exprimer un comportement sexuel ou maternel normaux (Winslow and Insel, 2002). En outre, les souris knockout pour les récepteurs OT (Oxtr-KO) ne montrent pas de déficits apparents au niveau de l'expression de la lordose chez les femelles (Nishimori et al., 2008). Ces données suggèrent donc que la modulation du comportement sexuel par l'OT dépend de l'espèce, rendant donc ce système peu pertinent dans notre recherche.

**2/ Le système nNOS :** L'oxyde nitrique (NO) est un radical libre formé lors de la conversion de l'arginine en citrulline par l'enzyme NO-synthase (NOS) et joue un rôle important dans bon nombre de fonctions reproductives dont la régulation du pic de LH (Mani et al., 1994). Chez le rongeur, nNOS représente l'isoforme neuronale de NOS et est exprimée dans les circuits neuraux impliqués dans le contrôle du comportement reproducteur tels que le MPOA, le BnST et le VMH (Goti et al., 2005). Chez la souris, ces structures cérébrales montrent un dimorphisme sexuel quant au nombre de cellules nNOS immunoréactives (nNOS-ir) ; les mâles révèlent des taux de nNOS-ir plus élevés que les femelles au niveau du BnST et du VMH (Sica et al., 2009). De plus, les populations neuronales nNOS-ir montrent des fluctuations liées aux changements des concentrations des hormones gonadiques au cours du cycle œstral ; par exemple, les femelles révèlent des taux de nNOS-ir beaucoup plus élevés au sein du MPOA lors du proestrus (Sica et al., 2009). La coexistence des cellules nNOS-ir avec les récepteurs

gonadiques suggèrent une corrélation neuroendocrinienne entre les métabolites produisant le NO et le comportement sexuel (Panzica et al., 2006). Ainsi, chez un rat mâle, l'inhibition de l'activité NOSique (suite à l'injection de L-NAME) réduit fortement le nombre d'intromissions et d'éjaculations (Bialy et al., 1996), tandis que chez la ratte, l'administration d'un inhibiteur d'activité NOSique (L-NMMA) supprime l'expression de la lordose (Mani et al., 1994). Finalement, une expérience récente démontre que les mâles ArKO expriment de très faibles nombres de nNOS-ir comparativement à des mâles WT (Sica et al., données non-publiées), suggérant donc que ce système est organisé par l'E<sub>2</sub> au cours d'une période périnatale chez la souris mâle. Cependant, aucunes données ne sont encore disponibles quant à l'organisation de ce système particulier chez la souris femelle. En conclusion, ce système nNOS pourrait donc être un candidat d'intérêt afin d'étudier les mécanismes neuronaux sous-tendant la restauration de l'expression de lordose chez les femelles ArKO ayant reçu un traitement oestrogénique pré-pubère.

### **III. Effets de la progestérone sur le développement du cerveau femelle**

Au cours de nos expériences (Article 6 et 7), nous avons démontré que l'E<sub>2</sub> exerçait une action organisatrice féminisante sur le développement du cerveau de type femelle au cours d'une période pré-pubère. Cependant, il serait très intéressant de déterminer si ces effets sont spécifiquement supportés par l'induction des récepteurs à la progestérone, et donc par l'influence concomitante de la progestérone.

Tout d'abord, il faudrait déterminer les concentrations hypothalamiques de progestérone au cours de différents âges pré-pubères afin de vérifier que cette hormone est bel et bien disponible dans le système nerveux en développement afin de participer à

la différenciation sexuelle des caractéristiques de type femelle. Comme mentionné précédemment (Introduction – Caractéristiques physiologiques de la souche ArKO), des dosages préliminaires montrent que la progestérone est bien présente au sein de l'hypothalamus à PN15 chez des femelles WT (2.25 pg/mg de tissu), tandis que nous observons une diminution significative du taux de cette hormone chez des femelles ArKO (1.50 pg/mg de tissu). L'ovariectomie des femelles nouveau-nées nous permettra d'établir si cette production de progestérone est bien d'origine ovarienne. Ces données suggèrent donc que la progestérone pourrait jouer un rôle dans la médiation des capacités d'expression de la lordose chez la femelle.

Ensuite, afin d'évaluer si la restauration de la lordose observée chez les individus ArKO traités avec de l'EB au cours de la période pré-pubère (PN15-PN25) est supportée par l'induction des PR, il faudrait traiter simultanément, au cours de cette période, les nouveau-nés avec un antagoniste des PR et de l'EB. Les résultats attendus seraient donc une suppression de la restauration de lordose sous-tendue par les effets féminisants de l'E<sub>2</sub> chez les femelles ArKO. Parallèlement, un traitement avec un antagoniste des PR pourrait être administré à des femelles WT au cours de cette période pré-pubère, et évaluer si un tel traitement affecte les capacités d'expression de la lordose, des préférences sexuelles et du comportement de monte. Actuellement, l'antagoniste des PR le plus couramment utilisé est le RU486 (ou mifépristone) ; cependant, il a été démontré que ce stéroïde synthétique pouvait exercer des actions agonistes (semblables à la progestérone) dans certaines situations et pouvait également agir en tant qu'antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes (Afshuppe et al., 2009). Cependant, il semble exister un autre antagoniste, le ZK 137316, décrit comme étant plus spécifique des PR (Afshuppe et al., 2009). Ce composé, n'ayant pas encore été étudié chez le rongeur, nécessite d'être testé à différentes concentrations afin de déterminer la dose optimale pouvant inhiber les effets potentiellement sous-tendus par les PR chez les femelles pré-pubères.

Finalement, une approche complémentaire permettant l'étude des effets concomitants de la progestérone sur l'expression de comportements influencés par les œstrogènes pré-pubères serait d'utiliser le modèle de souris transgéniques PRKO (portant une mutation codant pour le PR). En effet, des souris femelles PRKO ovariectomisées perdent leur capacité à exprimer le comportement de lordose suite à l'administration d'un traitement d'E<sub>2</sub> et de progestérone à l'âge adulte (Mani et al., 1996) en raison de l'inactivation de l'isoforme PR-A des PR (Mani et al., 2006). Il serait dès lors intéressant d'évaluer l'expression de comportements tels que la monte, les préférences sexuelles et l'activation neuronale suite à des expositions aux phéromones, chez ces animaux PRKO afin de déterminer l'implication de la progestérone dans ces composantes comportementales.

#### **IV. Différenciation sexuelle & facteurs génétiques**

Similairement à la mise en place du concept théorique des processus de la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale régulés par les effets organisateurs et activateurs des stéroïdes sexuels, bon nombre d'évidences s'accumulent progressivement à l'heure actuelle suggérant que cette théorie, largement acceptée, de différenciation cérébrale déclenchée par les hormones gonadiques devrait être révisée à son tour afin d'y inclure des effets génétiques antérieurs, ou concomitants, aux effets hormonaux.

Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, les hormones devinrent un des rares facteurs, si pas le seul, à être étudié afin de caractériser les différences sexuelles observées au niveau cérébral ; cependant, aucun n'auteur ne s'accordait à dire que ces hormones expliquaient toutes les différences sexuelles. A cette époque, l'idée alternative que des différences génétiques entre les cellules XX et XY pouvaient engendrer des différences

sexuelles fonctionnelles intrinsèques aux cellules mâles et femelles, semblait peu probable ; en effet, dans certains cas, des femelles XX montraient certains phénotypes complètement masculinisés suite à un traitement néonatal avec de la T (Döhler et al., 1984) tandis que des mâles XY étaient complètement féminisés si les effets organisateurs de la T étaient bloqués (Breedlove and Arnold, 1980, 1983). En bref, pas besoin de chercher après d'autres facteurs influents. Cependant, à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, certaines découvertes ont ressuscité l'intérêt pour les effets directs des gènes situés sur les chromosomes X et Y (O et al., 1988 ; Dewing et al., 2003). Des différences sexuelles ont été rapportées avant la différenciation des gonades, ou avant que les niveaux plasmatiques de T soient sexuellement dimorphiques, suggérant ainsi que les différences génétiques intrinsèques aux cellules cérébrales mâles et femelles pouvaient être à l'origine de certaines différences sexuelles phénotypiques (De Vries et al., 2002)

Les zygotes mâles et femelles possèdent un set identique d'autosomes comprenant 95% du génome, rendant ainsi les mâles et les femelles relativement similaires dans leurs fonctionnalités et leurs comportements. Les chromosomes sexuels, comprenant les 5% restants du génome, diffèrent de 3 manières au sein du zygote : 1/ seuls les mâles possèdent les gènes Y ; 2/ les deux sexes diffèrent par leur nombre de copies du gène X (bien que cette différence soit largement éliminée par le processus d'inactivation du chromosome X) ; 3/ les femelles reçoivent l'empreinte d'un X paternel, inexistante chez le mâle. En utilisant le modèle rongeur, plusieurs approches ont fourni l'évidence que les différences observées au sein des génomes XX et XY pouvaient être la cause directe des différences sexuelles observées dans les cellules non-gonadiques ; ces différences sont appelées les effets des chromosomes sexuels.

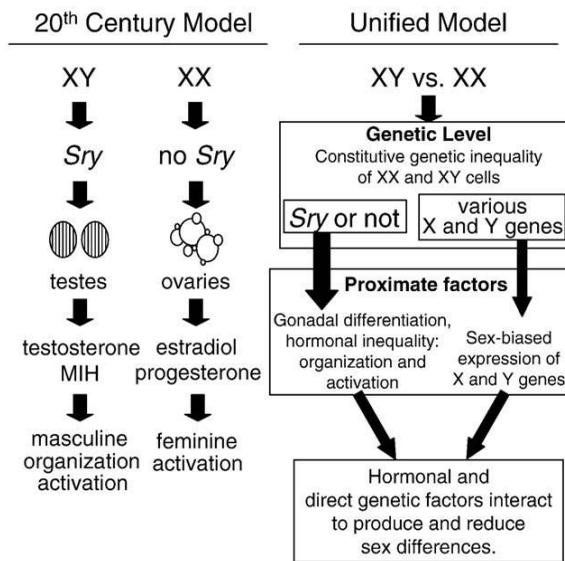
Une première approche a été d'affecter directement l'expression du gène Y afin de démontrer son rôle spécifique dans le développement cérébral mâle. Ainsi, la première évidence du rôle direct d'un gène Y sur le phénotype cérébral fut obtenue suite à l'injection d'oligonucléotides anti-sens réduisant l'expression du gène SRY ; celle-ci [192]

engendre une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase au sein du striatum et interfère conséquemment avec l'activité motrice chez le rat et la souris mâle (Dewing et al., 2006). Une seconde approche s'est basée sur l'utilisation du modèle de souris transgénique SF1-KO (portant une mutation pour le gène codant pour le facteur stéroïdogénique) ; ces animaux n'ont pas de glandes surrénales ni de gonades, mais peuvent survivre suite à un traitement néonatal avec des corticostéroïdes et à l'implantation de tissus surrénaux. Les souris SF1-KO XX et XY, se développant donc sans aucune influence gonadique, diffèrent tant au niveau de leur poids corporel qu'au niveau de la distribution de cellules spécifiques au sein de l'hypothalamus, du MPOA et du BnST, suggérant ainsi que les chromosomes sexuels affectent ces phénotypes (Budefeld et al., 2008 ; Grgurevic et al., 2008). La troisième approche représente le modèle le plus couramment utilisé afin d'évaluer les effets des chromosomes sexuels : le modèle souris FCG (« four core genotypes »). Chez ces animaux, le gène SRY est supprimé du chromosome Y et inséré au sein d'un autosome chez des individus XX et XY ; dès lors, des testicules produisant de la T peuvent se développer à la fois chez les souris XX et XY, offrant ainsi 4 modèles différents : des individus avec des gonades mâles  $XX_M$  et  $XY_M$  *versus* des individus avec des gonades femelles  $XX_F$  et  $XY_F$ . Ceux-ci permettent donc de distinguer les contributions hormonales gonadiques de celles des gènes situés sur les chromosomes sexuels par rapport au développement des traits neuronaux et comportementaux sexuellement dimorphiques (De Vries et al., 2002 ; Arnold and Burgoyne, 2004 ; Arnold and Chen, 2009). Les études réalisées sur ce modèle ont démontré de nombreuses différences sexuelles  $XX$  *versus*  $XY$ , indépendantes des influences gonadiques, notamment au niveau comportemental (comportement social, agressif, maternel, d'habituation et nociceptif), expression génique (distribution de la vasopressine au sein du septum latéral) et susceptibilité aux maladies (fermeture du tube neural, maladies auto-immunes). De plus, certains de ces effets sont supportés par des différences sexuelles du

nombre de copies de gènes X ou de leur origine parentale (pour détails : Arnold, 2009 ; Arnold and Chen, 2009).

Suite aux évidences de la contribution génétique à la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale, Arnold (2002, 2004) proposa un nouveau modèle théorique, toujours basé sur les hypothèses émises par Phoenix (1959), mais soulignant que les hormones gonadiques ne constituent pas les seuls facteurs responsables des différences sexuelles phénotypiques (**Figure 14**). « Toutes les différences sexuelles phénotypiques dérivent des différents effets des gènes situés sur les chromosomes sexuels qui représentent les seuls facteurs distincts entre le zygote mâle et femelle. L'ensemble des gènes X et Y constitue le facteur primaire lié au sexe engendrant des différences sexuelles phénotypiques développementales et adultes. Le plus important est le gène *SRY* car il contrôle la différenciation sexuelle des gonades, et conséquemment la sécrétion sexuellement différenciée des hormones gonadiques. Ces dernières, et plus particulièrement la T et l'E<sub>2</sub>, exercent à travers tout l'organisme, des modulations organisatrices (permanentes) et activatrices (réversibles) au cours de différentes périodes entraînant la majorité des différences sexuelles connues entre mâles et femelles. Outre *SRY*, de nombreux autres gènes X et Y exercent des actions distinctes sur les cellules mâles et femelles en raison du nombre de leur copie ou de leur origine parentale. Divers facteurs liés au sexe peuvent donc agir de manière synergique ou antagoniste. Finalement, les cellules XX et XY sont différenciées avant la sécrétion des hormones gonadiques, et les hormones gonadiques modulent de manière inégale les cellules XX et XY » (Arnold, 2009).

En résumé, pour expliquer la différenciation sexuelle d'un phénotype donné, il est nécessaire d'identifier les facteurs des chromosomes sexuels responsables de la différence sexuelle d'expression d'un facteur causant directement la différenciation sexuelle du phénotype considéré. Concrètement, afin d'élucider les processus responsables de la différenciation sexuelle du comportement sexuel, il est d'abord utile [194]



**Figure 14** : Contraste entre le modèle proposé par Phoenix (1959) au cours du 20<sup>ème</sup> siècle et celui d'Arnold (2009). Dans le modèle de Phoenix, la différenciation sexuelle des gonades est attribuée aux effets spécifiques du gène *SRY* présent uniquement chez le mâle. Une fois les gonades différenciées, celles-ci sécrètent des stéroïdes sexuels. Selon l'hypothèse organisationnelle/activationnelle, la T produite par les testicules et l'hormone antimüllérienne (MIH) exercent leurs effets sur divers tissus (tractus génital et cerveau) chez l'embryon/nouveau-né mâle afin d'établir des substrats neuronaux sexuellement différenciés de type mâle. Au cours de la vie postnatale, les hormones ovariennes et testiculaires modulent différemment ces substrats afin d'induire les différences sexuelles phénotypiques. Par ailleurs, le nouveau modèle proposé par Arnold suggère que *SRY* et d'autres gènes X et Y occupent le premier niveau d'influence en raison de leur encodage inégal sur les chromosomes sexuels chez le mâle et la femelle. Ainsi, certains gènes X et Y agissent de manière spécifique sur les gonades et d'autres tissus, engendrant des différences sexuelles au niveau des cellules XX et XY. *SRY* joue un rôle dominant en établissant les différences sexuelles au niveau des sécrétions hormonales gonadiques qui perdureront au cours de la vie entière de l'individu tout en exerçant des actions organisatrices et activatrices sur le cerveau et d'autres tissus. Les gènes des chromosomes sexuels et les hormones gonadiques peuvent alors agir de manière synergique (les gènes Y et la T engendrent une fonctionnalité différente d'un même tissu chez un mâle comparativement à une femelle), ou se neutraliser mutuellement afin de réduire les différences sexuelles (chez la femelle, un processus inactive une copie du chromosome X dans chaque cellule afin de neutraliser une production biaisée à partir de gènes X excédentaires). Sous réserve de modifications mineures, ce modèle peut s'appliquer aux oiseaux et aux autres animaux présentant un déséquilibre constitutif au niveau des chromosomes sexuels (Arnold, 2009).

d'identifier le gène porté par les chromosomes sexuels responsable de la différenciation des hormones gonadiques (T et E<sub>2</sub>), responsables elles-mêmes de la modulation directe du comportement sexuel.

Par ailleurs, nous tenons à nuancer l'enjouement pour ces facteurs génétiques ; les effets des gènes portés par les chromosomes sexuels n'engendrent jamais de modifications aussi drastiques que celles observées suite aux influences des hormones gonadiques. Il est évident que ces gènes induisent des variations comportementales chez les mâles et les femelles, mais ces changements sont très minimes comparativement à la T ou à l'E<sub>2</sub> capables de supprimer un patron comportemental entier. De plus, il est impératif de noter que les gènes des chromosomes influencent le développement du comportement sexuel uniquement par la voie de la différenciation sexuelle des hormones gonadiques (Arnold and Chen, 2009).

# Conclusion

Le message à retenir de cette thèse de doctorat est qu'une même hormone peut exercer des effets différents sur le développement des caractéristiques de type femelle selon la période à laquelle elle est produite : l'œstradiol nous a ainsi dévoilé son double jeu, révélant à la fois des effets déféminisants prénataux pouvant s'exercer jusqu'à 5<sup>ème</sup> jour postnatal et des effets féminisants s'exerçant dès le 15<sup>ème</sup> jour postnatal.

Au cours de ce doctorat, nous avons donc contribué à éclaircir certaines zones d'ombre concernant le rôle des œstrogènes dans la différenciation sexuelle cérébrale et comportemental chez la souris :

### 1/ Oestrogènes & olfaction:

- ❖ Nous avons démontré qu'un traitement oestrogénique aigu diminuait la prolifération cellulaire au sein de la SVZ, et conséquemment, le nombre de cellules nouveau-nées incorporées dans l'OB chez une souris femelle adulte (**Article 1**).
- ❖ Nous avons montré, en utilisant un nouveau test comportemental (3CB), que des femelles AFP-KO (portant une mutation pour le gène codant pour l' $\alpha$ -foetoprotéine, et par conséquent ne bénéficiant plus du rôle neuroprotecteur de l'AFP) n'exprimaient jamais de préférences sexuelles dirigées vers un mâle, suggérant ainsi que les œstrogènes prénataux déféminisaient les préférences sexuelles chez les souris femelles (**Article 2**).
- ❖ De manière surprenante, nous avons observé que ces femelles AFP-KO exprimaient toujours des patterns d'activation neuronale semblables à des femelles WT suite à l'exposition à des phéromones mâles. Ces données suggèrent donc que les œstrogènes ne sont pas

impliqués dans la différenciation sexuelle du traitement des indices olfactifs socio-sexuels (**Article 3**).

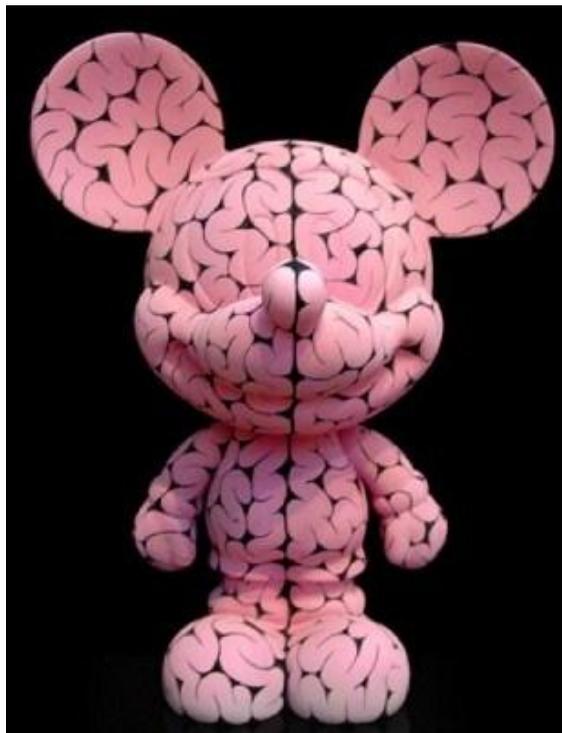
- ❖ Dans un contexte plus social que sexuel, nous avons démontré que les œstrogènes prénataux déféminisaient et masculinisaient les soins parentaux prodigués par les femelles AFP-KO (**Article 4**).

## 2/ Oestrogènes & féminisation:

- ❖ En étudiant le profil d'expression d'un gène dit « œstradiol-dépendant », nous avons réussi à définir une période sensible pré-pubère (PN15 à PN25) au cours de laquelle les œstrogènes semblent exercer des effets féminisants sur le développement des caractéristiques de type femelle (**Article 5**).
- ❖ Suite à l'administration d'EB durant la période pré-pubère définie précédemment, nous sommes parvenus à rétablir un phénotype WT chez des individus ArKO (portant une mutation pour le gène codant pour l'aromatase, et par conséquent, ne pouvant pas convertir la T en E<sub>2</sub>), c.à.d. à restaurer l'expression de lordose à l'âge adulte ainsi qu'une préférence sexuelle robuste dirigée vers un mâle. Ces données apportent donc la preuve indéniable que les œstrogènes exercent bel et bien une action féminisante sur le développement de type femelle après la naissance (**Article 6**).
- ❖ Nous avons recensé la majorité des données émanant des expériences réalisées sur les modèles de souris transgéniques ArKO et AFP-KO apportant des preuves indéniables envers la réfutation de la théorie

classique de la différenciation sexuelle cérébrale et comportementale selon laquelle les caractéristiques de type femelle se développaient « par défaut », c.à.d. sans aucune influence d'hormones gonadiques (**Article 7**).

*Entre le cerveau et le comportement,  
c'est d'abord une histoire de sexe !*



# **Références bibliographiques**

- Abelev, G.I. & Eraiser, T.L. (1999) Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors. *Semin Cancer Biol*, **9**, 95-107.
- Abrous, D.N., Koehl, M. & Le Moal, M. (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, **85**, 523-569.
- Afhuppe, W., Sommer, A., Muller, J., Schwede, W., Fuhrmann, U. & Moller, C. (2009) Global gene expression profiling of progesterone receptor modulators in T47D cells provides a new classification system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **113**, 105-115.
- Agarwal, V.R., Sinton, C.M., Liang, C., Fisher, C., German, D.C. & Simpson, E.R. (2000) Upregulation of estrogen receptors in the forebrain of aromatase knockout (ArKO) mice. *Mol Cell Endocrinol*, **162**, 9-16.
- Ahmed, E.I., Zehr, J.L., Schulz, K.M., Lorenz, B.H., DonCarlos, L.L. & Sisk, C.L. (2008) Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat Neurosci*, **11**, 995-997.
- Allieri, A., Spigolon, G., Viglietti-Panzica, C., Garcia-Falgueras, A., Guillamon, A., Collado, P. & Panzica, G.C. (2005) The Tfm rat, a model to study the influence of testosterone on the development of limbic vasopressinergic system *Meeting of the Society of Behavioral Neuroendocrinology*, pp. 198-199.
- Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **137**, 433-457.
- Alvarez-Buylla, A. (1990) Mechanism of neurogenesis in adult avian brain. *Experientia*, **46**, 948-955.
- Alvarez-Buylla, A. & Kirn, J.R. (1997) Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J Neurobiol*, **33**, 585-601.
- Alvarez-Buylla, A., Ling, C.Y. & Yu, W.S. (1994) Contribution of neurons born during embryonic, juvenile, and adult life to the brain of adult canaries: regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. *J Comp Neurol*, **347**, 233-248.
- Andrews, G.K., Dziadek, M. & Tamaoki, T. (1982) Expression and methylation of the mouse alpha-fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissues. *J Biol Chem*, **257**, 5148-5153.
- Arendash, G.W. & Gorski, R.A. (1983) Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull*, **10**, 147-154.
- Arletti, R. & Bertolini, A. (1985) Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides*, **6**, 247-253.
- Arnold, A.P. (2002) Concepts of genetic and hormonal induction of vertebrate sexual differentiation in the twentieth century, with special reference to the brain. In Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgent, A., Fahrbach, S., Rubin, R. (eds) *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 105-135.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arnold, A.P. (2004) Sex chromosomes and brain gender. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 701-708.
- Arnold, A.P. (2009) The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav*, **55**, 570-578.
- Arnold, A.P. & Burgoyne, P.S. (2004) Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends Endocrinol Metab*, **15**, 6-11.
- Arnold, A.P. & Chen, X. (2009) What does the "four core genotypes" mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front Neuroendocrinol*, **30**, 1-9.
- Aste, N., Honda, S. & Harada, N. (2003) Forebrain Fos responses to reproductively related chemosensory cues in aromatase knockout mice. *Brain Res Bull*, **60**, 191-200.
- Bakker, J. (2003) Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *J Neuroendocrinol*, **15**, 615-621.
- Bakker, J. & Baum, M.J. (2008) Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol*, **29**, 1-16.
- Bakker, J., Baum, M.J. & Slob, A.K. (1996a) Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience*, **74**, 251-260.
- Bakker, J., Brand, T., van Ophemert, J. & Slob, A.K. (1993) Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav Neurosci*, **107**, 480-487.
- Bakker, J. & Brock, O. (2010) Early oestrogens in shaping reproductive networks: evidence for a potential organisational role of oestradiol in female brain development. *J Neuroendocrinol*, **22**, 728-735.
- Bakker, J., De Mees, C., Douhard, Q., Balthazart, J., Gabant, P., Szpirer, J. & Szpirer, C. (2006) Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci*, **9**, 220-226.
- Bakker, J., De Mees, C., Szpirer, J., Szpirer, C. & Balthazart, J. (2007) Exposure to oestrogen prenatally does not interfere with the normal female-typical development of odour preferences. *J Neuroendocrinol*, **19**, 329-334.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N. & Balthazart, J. (2002a) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci*, **22**, 9104-9112.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N. & Balthazart, J. (2002b) Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm Behav*, **42**, 158-171.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N. & Balthazart, J. (2004) Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. *Horm Behav*, **46**, 1-10.

- Bakker, J., Pierman, S. & Gonzalez-Martinez, D. (2010) Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav*, **57**, 390-395.
- Bakker, J., Pool, C.W., Sonnemans, M., van Leeuwen, F.W. & Slob, A.K. (1997) Quantitative estimation of estrogen and androgen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of neonatally estrogen-deprived male rats. *Neuroscience*, **77**, 911-919.
- Bakker, J., Van Ophemert, J. & Slob, A.K. (1996b) Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiol Behav*, **60**, 489-494.
- Balthazart, J., Tlemcani, O. & Ball, G.F. (1996) Do sex differences in the brain explain sex differences in the hormonal induction of reproductive behavior? What 25 years of research on the Japanese quail tells us. *Horm Behav*, **30**, 627-661.
- Baquedano, M.S., Saraco, N., Berensztein, E., Pepe, C., Bianchini, M., Levy, E., Goni, J., Rivarola, M.A. & Belgorosky, A. (2007) Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 2215-2222.
- Bardy, C. & Pallotto, M. (2010) What Happens to Olfaction without Adult Neurogenesis? *Front Neurosci*, **4**, 24.
- Baum, M.J. (1979) Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosci Biobehav Rev*, **3**, 265-284.
- Baum, M.J. & Keverne, E.B. (2002) Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm Behav*, **41**, 213-219.
- Baum, M.J. & Tobet, S.A. (1986) Effect of prenatal exposure to aromatase inhibitor, testosterone, or antiandrogen on the development of feminine sexual behavior in ferrets of both sexes. *Physiol Behav*, **37**, 111-118.
- Belayew, A. & Tilghman, S.M. (1982) Genetic analysis of alpha-fetoprotein synthesis in mice. *Mol Cell Biol*, **2**, 1427-1435.
- Bell, D.D. & Zucker, I. (1971) Sex differences in body weight and eating: organization and activation by gonadal hormones in the rat. *Physiol Behav*, **7**, 27-34.
- Bellringer, J.F., Pratt, H.P. & Keverne, E.B. (1980) Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *J Reprod Fertil*, **59**, 223-228.
- Bialy, M., Beck, J., Abramczyk, P., Trzebski, A. & Przybylski, J. (1996) Sexual behavior in male rats after nitric oxide synthesis inhibition. *Physiol Behav*, **60**, 139-143.
- Blaustein, J.D. (2008) Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annu Rev Psychol*, **59**, 93-118.
- Bloch, G.J., Mills, R. & Gale, S. (1995) Prepubertal testosterone treatment of female rats: defeminization of behavioral and endocrine function in adulthood. *Neurosci Biobehav Rev*, **19**, 177-186.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bodo, C. & Rissman, E.F. (2007) Androgen receptor is essential for sexual differentiation of responses to olfactory cues in mice. *Eur J Neurosci*, **25**, 2182-2190.
- Bodo, C. & Rissman, E.F. (2008) The androgen receptor is selectively involved in organization of sexually dimorphic social behaviors in mice. *Endocrinology*, **149**, 4142-4150.
- Boehm, U., Zou, Z. & Buck, L.B. (2005) Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell*, **123**, 683-695.
- Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., Martin, P.G., Theodorou, V., Fioramonti, J. & Houdeau, E. (2010) Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 448-453.
- Breedlove, S.M. & Arnold, A.P. (1980) Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord. *Science*, **210**, 564-566.
- Breedlove, S.M. & Arnold, A.P. (1983) Hormonal control of a developing neuromuscular system. I. Complete Demasculinization of the male rat spinal nucleus of the bulbocavernosus using the anti-androgen flutamide. *J Neurosci*, **3**, 417-423.
- Bressler, S.C. & Baum, M.J. (1996) Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience*, **71**, 1063-1072.
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M.R., 3rd & Saghatelian, A. (2009) Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci*, **29**, 15245-15257.
- Bridges, R.S. & Ronsheim, P.M. (1990) Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology*, **126**, 837-848.
- Brill, M.S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R.D., Ozen, I., Yang, R., Lepier, A., Gascon, S., Erdelyi, F., Szabo, G., Parras, C., Guillemot, F., Frotscher, M., Berninger, B., Hevner, R.F., Raineteau, O. & Gotz, M. (2009) Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci*, **12**, 1524-1533.
- Britt, K.L., Drummond, A.E., Cox, V.A., Dyson, M., Wreford, N.G., Jones, M.E., Simpson, E.R. & Findlay, J.K. (2000) An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology*, **141**, 2614-2623.
- Britt, K.L., Drummond, A.E., Dyson, M., Wreford, N.G., Jones, M.E., Simpson, E.R. & Findlay, J.K. (2001) The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **79**, 181-185.
- Britt, K.L., Saunders, P.K., McPherson, S.J., Misso, M.L., Simpson, E.R. & Findlay, J.K. (2004) Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod*, **71**, 1712-1723.

- Brock, O. & Bakker, J. (2010) Potential contribution of prenatal estrogens to the sexual differentiation of mate preferences in mice. *Horm Behav.*
- Brock, O., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2010) Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology*, **151**, 1814-1821.
- Brock, O., Keller, M., Veyrac, A., Douhard, Q. & Bakker, J. (2010) Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience*, **166**, 368-376.
- Bronson, F.H. & Desjardins, C. (1968) Aggression in adult mice: modification by neonatal injections of gonadal hormones. *Science*, **161**, 705-706.
- Bronson, F.H. & Maruniak, J.A. (1976) Differential effects of male stimuli on follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin secretion in prepubertal female mice. *Endocrinology*, **98**, 1101-1108.
- Brown, R.E. (1979) Mammalian social odors : a critical review. *Adv. Study Behav.*, **10**, 103-162.
- Bruce, H.M. (1959) An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, **184**, 105.
- Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175-187.
- Buck, L.B. (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*, **100**, 611-618.
- Budefeld, T., Grgurevic, N., Tobet, S.A. & Majdic, G. (2008) Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads. *Dev Neurobiol*, **68**, 981-995.
- Caldwell, J.D., Prange, A.J., Jr. & Pedersen, C.A. (1986) Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. *Neuropeptides*, **7**, 175-189.
- Cecchi, G.A., Petreanu, L.T., Alvarez-Buylla, A. & Magnasco, M.O. (2001) Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J Comput Neurosci*, **11**, 175-182.
- Clancy, A.N. & Michael, R.P. (1994) Effects of testosterone and aromatase inhibition on estrogen receptor-like immunoreactivity in male rat brain. *Neuroendocrinology*, **59**, 552-560.
- Clancy, A.N., Zumpe, D. & Michael, R.P. (1995) Intracerebral infusion of an aromatase inhibitor, sexual behavior and brain estrogen receptor-like immunoreactivity in intact male rats. *Neuroendocrinology*, **61**, 98-111.
- Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R. & Herbison, A.E. (2009) Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*, **150**, 3214-3220.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Clarkson, J. & Herbison, A.E. (2006) Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **147**, 5817-5825.
- Collado, P., Valencia, A., Del Abril, A., Rodriguez-Zafra, M., Perez-Laso, C., Segovia, S. & Guillamon, A. (1993) Effects of estradiol on the development of sexual dimorphism in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, **75**, 285-287.
- Conley, A.J., Corbin, C.J., Hinshelwood, M.M., Liu, Z., Simpson, E.R., Ford, J.J. & Harada, N. (1996) Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol Reprod*, **54**, 497-505.
- Coquelin, A. & Bronson, F.H. (1979) Release of luteinizing hormone in male mice during exposure to females: habituation of the response. *Science*, **206**, 1099-1101.
- Corotto, F.S., Henegar, J.R. & Maruniak, J.A. (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience*, **61**, 739-744.
- Couse, J.F., Hewitt, S.C., Bunch, D.O., Sar, M., Walker, V.R., Davis, B.J. & Korach, K.S. (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*, **286**, 2328-2331.
- Curtis, J.T., Liu, Y. & Wang, Z. (2001) Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Res*, **901**, 167-174.
- Daniels, D. & Flanagan-Cato, L.M. (2000) Functionally-defined compartments of the lordosis neural circuit in the ventromedial hypothalamus in female rats. *J Neurobiol*, **45**, 1-13.
- De Jonge, F.H., Louwerse, A.L., Ooms, M.P., Evers, P., Endert, E. & van de Poll, N.E. (1989) Lesions of the SDN-POA inhibit sexual behavior of male Wistar rats. *Brain Res Bull*, **23**, 483-492.
- De Mees, C., Laes, J.F., Bakker, J., Smits, J., Hennuy, B., Van Vooren, P., Gabant, P., Szpirer, J. & Szpirer, C. (2006) Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol Cell Biol*, **26**, 2012-2018.
- Demotes-Mainard, J. & Vincent, J.D. (2001) Hypothalamus, régulations neuroendocriniennes et comportements. In Guénard, H. (ed) *Physiologie humaine*. Pradel, Paris, pp. 149-190.
- De Vries, G.J. & al-Shamma, H.A. (1990) Sex differences in hormonal responses of vasopressin pathways in the rat brain. *J Neurobiol*, **21**, 686-693.
- De Vries, G.J., Rissman, E.F., Simerly, R.B., Yang, L.Y., Scordalakes, E.M., Auger, C.J., Swain, A., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P.S. & Arnold, A.P. (2002) A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci*, **22**, 9005-9014.
- De Vries, G.J., Wang, Z., Bullock, N.A. & Numan, S. (1994) Sex differences in the effects of testosterone and its metabolites on vasopressin messenger RNA levels in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *J Neurosci*, **14**, 1789-1794.

- Del Punta, K., Rothman, A., Rodriguez, I. & Mombaerts, P. (2000) Sequence diversity and genomic organization of vomeronasal receptor genes in the mouse. *Genome Res*, **10**, 1958-1967.
- Dewing, P., Chiang, C.W., Sinchak, K., Sim, H., Fernagut, P.O., Kelly, S., Chesselet, M.F., Micevych, P.E., Albrecht, K.H., Harley, V.R. & Vilain, E. (2006) Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr Biol*, **16**, 415-420.
- Dewing, P., Shi, T., Horvath, S. & Vilain, E. (2003) Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*, **118**, 82-90.
- Dickinson, C. & Keverne, E.B. (1988) Importance of noradrenergic mechanisms in the olfactory bulbs for the maternal behaviour of mice. *Physiol Behav*, **43**, 313-316.
- Doetsch, F. & Alvarez-Buylla, A. (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14895-14900.
- Döhler, K.D. & Hancke, J.L. (1978) Thoughts on the mechanism of sexual brain differentiation. In Dörner, G., Kawakami, M. (eds) *Hormones and Brain Development, Developments in Endocrinology*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 153-158.
- Dohler, K.D., Hancke, J.L., Srivastava, S.S., Hofmann, C., Shryne, J.E. & Gorski, R.A. (1984) Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Prog Brain Res*, **61**, 99-117.
- Dorries, K.M., Adkins-Regan, E. & Halpern, B.P. (1995) Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiol Behav*, **57**, 255-259.
- Drickamer, L.C., Gowaty, P.A. & Holmes, C.M. (2000) Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance. *Anim Behav*, **59**, 371-378.
- Dulac, C. & Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, **83**, 195-206.
- Dulac, C. & Wagner, S. (2006) Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet*, **40**, 449-467.
- Dunlap, J.L., Gerall, A.A. & McLean, L.D. (1973) Enhancement of female receptivity in neonatally castrated males by prepuberal ovarian transplants. *Physiol Behav*, **10**, 701-705.
- Edwards, D.A. & Burge, K.G. (1973) Olfactory control of the sexual behavior of male and female mice. *Physiol Behav*, **11**, 867-872.
- Edwards, D.A. & Herndon, J. (1970) Neonatal estrogen stimulation and aggressive behavior in female mice. *Physiol Behav*, **5**, 993-995.
- Edwards, D.A. & Thompson, M.L. (1970) Neonatal androgenization and estrogenization and the hormonal induction of sexual receptivity in rats. *Physiol Behav*, **5**, 1115-1119.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Engelmann, M. & Landgraf, R. (1994) Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiol Behav*, **55**, 145-149.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. & Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, **4**, 1313-1317.
- Everts, H.G. & Koolhaas, J.M. (1997) Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? *Brain Res*, **760**, 1-7.
- Everts, H.G. & Koolhaas, J.M. (1999) Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behaviors in rats. *Behav Brain Res*, **99**, 7-16.
- Feder, H.H. & Whalen, R.E. (1965) Feminine Behavior in Neonatally Castrated and Estrogen-Treated Male Rats. *Science*, **147**, 306-307.
- Firestein, S. (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, **413**, 211-218.
- Fisher, C.R., Graves, K.H., Parlow, A.F. & Simpson, E.R. (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6965-6970.
- Flanagan-Cato, L.M., Calizo, L.H. & Daniels, D. (2001) The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Horm Behav*, **40**, 178-182.
- Forger, N.G. (1988) Sex differentiation, psychological. In Knobil, E., Neil, J.D. (eds) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, pp. 421-430.
- Fowler, C.D., Liu, Y. & Wang, Z. (2008) Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus. *Brain Res Rev*, **57**, 342-351.
- Fuchs, A.R. (1988) Oxytocin and ovarian function. *J Reprod Fertil Suppl*, **36**, 39-47.
- Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Van Reeth, T., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smitz, J., Alexandre, H., Szpirer, C. & Szpirer, J. (2002) Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12865-12870.
- Gage, F.H. (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci*, **22**, 612-613.
- Galea, L.A. (2008) Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev*, **57**, 332-341.
- Galea, L.A. & McEwen, B.S. (1999) Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience*, **89**, 955-964.
- Galea, L.A., Spritzer, M.D., Barker, J.M. & Pawluski, J.L. (2006) Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus*, **16**, 225-232.

- Gandelman, R. (1973) The development of cannibalism in male Rockland-Swiss mice and the influence of olfactory bulb removal. *Dev Psychobiol*, **6**, 159-164.
- Garcia-Segura, L.M., Chowen, J.A., Parducz, A. & Naftolin, F. (1994) Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*, **44**, 279-307.
- Gelez, H. & Fabre-Nys, C. (2006) Neural pathways involved in the endocrine response of anestrus ewes to the male or its odor. *Neuroscience*, **140**, 791-800.
- George, F.W. & Ojeda, S.R. (1982) Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology*, **111**, 522-529.
- Gerall, A.A., Dunlap, J.L. & Hendricks, S.E. (1973) Effect of ovarian secretions on female behavioral potentiality in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, **82**, 449-465.
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.D. & Lledo, P.M. (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1823-1828.
- Gillespie, J.R. & Uversky, V.N. (2000) Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. *Biochim Biophys Acta*, **1480**, 41-56.
- Gilmore, D.P. (2002) Sexual dimorphism in the central nervous system of marsupials. *Int Rev Cytol*, **214**, 193-224.
- Gonzales, K.L., Tetel, M.J. & Wagner, C.K. (2008) Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, **149**, 4615-4621.
- Gonzalez-Martinez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpirer, C. & Bakker, J. (2008) Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology*, **149**, 2333-2340.
- Gorski, R.A. (1984) Critical role for the medial preoptic area in the sexual differentiation of the brain. *Prog Brain Res*, **61**, 129-146.
- Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E. & Southam, A.M. (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res*, **148**, 333-346.
- Goti, S., Viglietti-Panzica, C. & Panzica, G.C. (2005) The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech*, **68**, 13-35.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A. & Fuchs, E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, **17**, 2492-2498.
- Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S. & Gross, C.G. (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, **286**, 548-552.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Grgurevic, N., Budefeld, T., Rissman, E.F., Tobet, S.A. & Majdic, G. (2008) Aggressive behaviors in adult SF-1 knockout mice that are not exposed to gonadal steroids during development. *Behav Neurosci*, **122**, 876-884.
- Griffin, G.D., Ferri-Kolwicz, S.L., Reyes, B.A., Van Bockstaele, E.J. & Flanagan-Cato, L.M. (2010) Ovarian hormone-induced reorganization of oxytocin-labeled dendrites and synapses lateral to the hypothalamic ventromedial nucleus in female rats. *J Comp Neurol*, **518**, 4531-4545.
- Guillamon, A. & Segovia, S. (1997) Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull*, **44**, 377-382.
- Halem, H.A., Cherry, J.A. & Baum, M.J. (1999) Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol*, **39**, 249-263.
- Hall, P.F., Chen, S., Nakajin, S., Shinoda, M. & Shively, J.E. (1987) Purification and characterization of aromatase from human placenta. *Steroids*, **50**, 37-50.
- Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A. & Herbison, A.E. (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*, **25**, 11349-11356.
- Han, T.M. & De Vries, G.J. (2003) Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurobiol*, **54**, 502-510.
- Haqq, C.M., King, C.Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T.N., Donahoe, P.K. & Weiss, M.A. (1994) Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science*, **266**, 1494-1500.
- Harada, N. & Yamada, K. (1992) Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction. *Endocrinology*, **131**, 2306-2312.
- Hennessey, A.C., Wallen, K. & Edwards, D.A. (1986) Preoptic lesions increase the display of lordosis by male rats. *Brain Res*, **370**, 21-28.
- Herrada, G. & Dulac, C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*, **90**, 763-773.
- Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y. & Maeda, S. (1998) Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 445-449.
- Houtsmuller, E.J., Brand, T., de Jonge, F.H., Joosten, R.N., van de Poll, N.E. & Slob, A.K. (1994) SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol Behav*, **56**, 535-541.
- Hoyk, Z., Varga, C. & Parducz, A. (2006) Estrogen-induced region specific decrease in the density of 5-bromo-2-deoxyuridine-labeled cells in the olfactory bulb of adult female rats. *Neuroscience*, **141**, 1919-1924.

- Huang, L. & Bittman, E.L. (2002) Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamsters are specifically activated by exposure to estrous females. *Horm Behav*, **41**, 343-350.
- Huang, L., DeVries, G.J. & Bittman, E.L. (1998) Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J Neurobiol*, **36**, 410-420.
- Hutchison, J.B., Beyer, C., Hutchison, R.E. & Wozniak, A. (1995) Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **53**, 307-313.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S. & Kageyama, R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*, **11**, 1153-1161.
- Insel, T.R. (1990) Regional induction of c-fos-like protein in rat brain after estradiol administration. *Endocrinology*, **126**, 1849-1853.
- Insel, T.R. & Young, L.J. (2000) Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 784-789.
- Ivanova, T. & Beyer, C. (2000) Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell Tissue Res*, **300**, 231-237.
- Jacobs, B.L., van Praag, H. & Gage, F.H. (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry*, **5**, 262-269.
- Jacobson, C.D. & Gorski, R.A. (1981) Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *J Comp Neurol*, **196**, 519-529.
- Jacobson, M. (1991) *Developmental Neurobiology*. Plenum Press, New-York.
- Jahagirdar, V., Quadros, P.S. & Wagner, C.K. (2008) Endogenous oestradiol regulates progesterone receptor expression in the brain of female rat fetuses: what is the source of oestradiol? *J Neuroendocrinol*, **20**, 359-365.
- Johnston, R.E. & Bronson, F. (1982) Endocrine control of female mouse odors that elicit luteinizing hormone surges and attraction in males. *Biol Reprod*, **27**, 1174-1180.
- Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., Yao, S. & Simpson, E.R. (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12735-12740.
- Jost, A. (1947) Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Archives Anatomic Microscopish Experimentales*, **36**, 271-316.
- Jost, A. (1953) Problems of fetal endocrinology. *Recent Prog Horm Res*, **8**.
- Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, **197**, 1092-1094.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Karlson, P. & Luscher, M. (1959) Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, **183**, 55-56.
- Karolczak, M., Kuppens, E. & Beyer, C. (1998) Developmental expression and regulation of aromatase- and 5alpha-reductase type I mRNA in the male and female mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, **10**, 267-274.
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A. & Tena-Sempere, M. (2007) Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, **148**, 1774-1783.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006a) Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses*, **31**, 315-323.
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006b) Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem Senses*, **31**, 753-762.
- Keller, M., Pawluski, J.L., Brock, O., Douhard, Q. & Bakker, J. (2010) The alpha-fetoprotein knock-out mouse model suggests that parental behavior is sexually differentiated under the influence of prenatal estradiol. *Horm Behav*, **57**, 434-440.
- Keller, M., Pierman, S., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006c) The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci*, **23**, 521-530.
- Kelliher, K.R. (2007) The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Horm Behav*, **52**, 561-570.
- Kelliher, K.R., Chang, Y.M., Wersinger, S.R. & Baum, M.J. (1998) Sex difference and testosterone modulation of pheromone-induced NeuronalFos in the Ferret's main olfactory bulb and hypothalamus. *Biol Reprod*, **59**, 1454-1463.
- Kempermann, G. (2006) Neurogenesis in the adult olfactory system *Adult Neurogenesis*. University Press, Oxford, pp. 141-167.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, **386**, 493-495.
- Keverne, E.B. (1999) The vomeronasal organ. *Science*, **286**, 716-720.
- Kevetter, G.A. & Winans, S.S. (1981) Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J Comp Neurol*, **197**, 81-98.
- Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. & Lovell-Badge, R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, **348**, 450-452.

- Kudwa, A.E., Harada, N., Honda, S.I. & Rissman, E.F. (2007) Effects of organisational oestradiol on adult immunoreactive oestrogen receptors (alpha and beta) in the male mouse brain. *J Neuroendocrinol*, **19**, 767-772.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5925-5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. & Gustafsson, J.A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- Lagace, D.C., Fischer, S.J. & Eisch, A.J. (2007) Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*, **17**, 175-180.
- Larsen, C.M., Kokay, I.C. & Grattan, D.R. (2008) Male pheromones initiate prolactin-induced neurogenesis and advance maternal behavior in female mice. *Horm Behav*, **53**, 509-517.
- Larsson, K. & Heimer, L. (1964) Mating Behaviour of Male Rats after Lesions in the Preoptic Area. *Nature*, **202**, 413-414.
- Lauber, M.E. & Lichtensteiger, W. (1994) Pre- and postnatal ontogeny of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in the male rat brain studied by in situ hybridization. *Endocrinology*, **135**, 1661-1668.
- Lazarini, F., Mouthon, M.A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Lamarque, S., Abrous, D.N., Boussin, F.D. & Lledo, P.M. (2009) Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS ONE*, **4**, e7017.
- Leighton, P.C., Kitau, M.J., Chard, T., Gordon, Y.B. & Leek, A.E. (1975) Levels of alpha-fetoprotein in maternal blood as a screening test for fetal neural-tube defect. *Lancet*, **2**, 1012-1015.
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., S, P.C., Maul-Pavicic, A., Jager, M., Li, X.H., Breer, H., Zufall, F. & Boehm, T. (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*, **306**, 1033-1037.
- Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J.C. & Lledo, P.M. (2005) Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, **25**, 6816-6825.
- Lemire, J.M. & Fausto, N. (1991) Multiple alpha-fetoprotein RNAs in adult rat liver: cell type-specific expression and differential regulation. *Cancer Res*, **51**, 4656-4664.
- Lephart, E.D. (1996) A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev*, **22**, 1-26.
- Lepri, J.J. & Wysocki, C.J. (1987) Removal of the vomeronasal organ disrupts the activation of reproduction in female voles. *Physiol Behav*, **40**, 349-355.
- Leranth, C., Roth, R.H., Elsworth, J.D., Naftolin, F., Horvath, T.L. & Redmond, D.E., Jr. (2000) Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory. *J Neurosci*, **20**, 8604-8609.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Levy, F. & Keller, M. (2009) Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behav Brain Res*, **200**, 336-345.
- Levy, F., Keller, M. & Poindron, P. (2004) Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm Behav*, **46**, 284-302.
- Leybold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F. & Axel, R. (2002) Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6376-6381.
- Li, C.S., Kaba, H., Saito, H. & Seto, K. (1989) Excitatory influence of the accessory olfactory bulb on tuberoinfundibular arcuate neurons of female mice and its modulation by oestrogen. *Neuroscience*, **29**, 201-208.
- Li, C.S., Kaba, H., Saito, H. & Seto, K. (1990) Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. *Neuroscience*, **36**, 773-778.
- Lieberburg, I. & McEwen, B.S. (1975) Estradiol-17beta: a metabolite of testosterone recovered in cell nuclei from limbic areas of neonatal rat brains. *Brain Res*, **85**, 165-170.
- Lin, D.Y., Zhang, S.Z., Block, E. & Katz, L.C. (2005) Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*, **434**, 470-477.
- Lisk, R.D. (1969) Progesterone: biphasic effects on the lordosis response in adult or neonatally gonadectomized rats. *Neuroendocrinology*, **5**, 149-160.
- Lledo, A. (1998) Mémoire olfactive et migration neuronale chez l'adulte. *Médecine/Sciences*, **14**, 771-776.
- Lledo, P.M., Alonso, M. & Grubb, M.S. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 179-193.
- Lloyd-Thomas, A. & Keverne, E.B. (1982) Role of the brain and accessory olfactory system in the block to pregnancy in mice. *Neuroscience*, **7**, 907-913.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, **264**, 1145-1148.
- Lombardi, J.R. & Vandenbergh, J.G. (1977) Pheromonally induced sexual maturation in females: regulation by the social environment of the male. *Science*, **196**, 545-546.
- Lonstein, J.S., Quadros, P.S. & Wagner, C.K. (2001) Effects of neonatal RU486 on adult sexual, parental, and fearful behaviors in rats. *Behav Neurosci*, **115**, 58-70.
- Lucas, B.K., Ormandy, C.J., Binart, N., Bridges, R.S. & Kelly, P.A. (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*, **139**, 4102-4107.
- Luskin, M.B. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, **11**, 173-189.

- MacLusky, N.J. & Naftolin, F. (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, **211**, 1294-1302.
- MacLusky, N.J., Walters, M.J., Clark, A.S. & Toran-Allerand, C.D. (1994) Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci*, **5**, 691-698.
- Mak, G.K., Enwere, E.K., Gregg, C., Pakarainen, T., Poutanen, M., Huhtaniemi, I. & Weiss, S. (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci*, **10**, 1003-1011.
- Mandiyani, V.S., Coats, J.K. & Shah, N.M. (2005) Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice. *Nat Neurosci*, **8**, 1660-1662.
- Mani, S.K., Allen, J.M., Lydon, J.P., Mulac-Jericevic, B., Blaustein, J.D., DeMayo, F.J., Conneely, O. & O'Malley, B.W. (1996) Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Mol Endocrinol*, **10**, 1728-1737.
- Mani, S.K., Allen, J.M., Rettori, V., McCann, S.M., O'Malley, B.W. & Clark, J.H. (1994) Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6468-6472.
- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulac-Jericevic, B. & Conneely, O.M. (2006) Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol Endocrinol*, **20**, 1322-1332.
- Mannan, M.A. & O'Shaughnessy, P.J. (1991) Steroidogenesis during postnatal development in the mouse ovary. *J Endocrinol*, **130**, 101-106.
- Martel, K.L. & Baum, M.J. (2009) Adult testosterone treatment but not surgical disruption of vomeronasal function augments male-typical sexual behavior in female mice. *J Neurosci*, **29**, 7658-7666.
- Mathews, G.A., Brenowitz, E.A. & Arnold, A.P. (1988) Paradoxical hypermasculinization of the zebra finch song system by an antiestrogen. *Horm Behav*, **22**, 540-551.
- Matsumoto, T., Honda, S. & Harada, N. (2003) Alteration in sex-specific behaviors in male mice lacking the aromatase gene. *Neuroendocrinology*, **77**, 416-424.
- Matsunami, H. & Buck, L.B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, **90**, 775-784.
- Mayes, J.S. & Watson, G.H. (2004) Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev*, **5**, 197-216.
- Mazzucco, C.A., Lieblich, S.E., Bingham, B.I., Williamson, M.A., Viau, V. & Galea, L.A. (2006) Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience*, **141**, 1793-1800.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- McCall, A.L., Han, S.J., Millington, W.R. & Baum, M.J. (1981) Non-saturable transport of [3H]oestradiol across the blood-brain barrier in female rats is reduced by neonatal serum. *J Reprod Fertil*, **61**, 103-108.
- McCarthy, M.M. (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*, **88**, 91-124.
- McCarthy, M.M., Kleopoulos, S.P., Mobbs, C.V. & Pfaff, D.W. (1994) Infusion of antisense oligodeoxynucleotides to the oxytocin receptor in the ventromedial hypothalamus reduces estrogen-induced sexual receptivity and oxytocin receptor binding in the female rat. *Neuroendocrinology*, **59**, 432-440.
- McClellan, K.M., Parker, K.L. & Tobet, S. (2006) Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, **27**, 193-209.
- McEwen, B.S. & Alves, S.E. (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, **20**, 279-307.
- McEwen, B.S., Lieberburg, I., Chaptal, C. & Krey, L.C. (1977) Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm Behav*, **9**, 249-263.
- McEwen, B.S., Plapinger, L., Chaptal, C., Gerlach, J. & Wallach, G. (1975) Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res*, **96**, 400-406.
- Meisel, R.L. & Sachs, B.D. (1994) The physiology of male sexual behavior. In Knobil, E., Neil, J.D. (eds) *Physiology of Reproduction*. Raven, New-York, pp. 3-106.
- Mendelson, C.R., Cleland, W.H., Smith, M.E. & Simpson, E.R. (1982) Regulation of aromatase activity of stromal cells derived from human adipose tissue. *Endocrinology*, **111**, 1077-1085.
- Mensah-Nyagan, A.G., Do-Rego, J.L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G. & Vaudry, H. (1999) Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, **51**, 63-81.
- Merchenthaler, I., Lane, M.V., Numan, S. & Dellovade, T.L. (2004) Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol*, **473**, 270-291.
- Meredith, M. (1986) Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav*, **36**, 737-743.
- Merkle, F.T., Mirzadeh, Z. & Alvarez-Buylla, A. (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, **317**, 381-384.
- Miller, M.A., Urban, J.H. & Dorsa, D.M. (1989) Steroid dependency of vasopressin neurons in the bed nucleus of the stria terminalis by in situ hybridization. *Endocrinology*, **125**, 2335-2340.
- Misso, M.L., Murata, Y., Boon, W.C., Jones, M.E., Britt, K.L. & Simpson, E.R. (2003) Cellular and molecular characterization of the adipose phenotype of the aromatase-deficient mouse. *Endocrinology*, **144**, 1474-1480.

- Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., McEwen, B.S. & Alves, S.E. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, **144**, 2055-2067.
- Mizejewski, G.J. (2004) Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**, 439-463.
- Mizejewski, G.J., Vonnegut, M. & Jacobson, H.I. (1983) Estradiol-activated alpha-fetoprotein suppresses the uterotrophic response to estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2733-2737.
- Mizukami, S., Nishizuka, M. & Arai, Y. (1983) Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp Neurol*, **79**, 569-575.
- Morel, Y., Mallet, D. & Calemard-Michel, D. (2005) Différenciation sexuelle du fœtus. In Doin, G.L.S. (ed) *Endocrinologie périnatale*, Paris, pp. 197-220.
- Moreno, M.M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A. & Mandairon, N. (2009) Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 17980-17985.
- Mossman, C.A. & Drickamer, L.C. (1996) Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J Comp Psychol*, **110**, 131-138.
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M.M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C. & Lledo, P.M. (2008) Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci*, **28**, 11511-11516.
- Murata, Y., Robertson, K.M., Jones, M.E. & Simpson, E.R. (2002) Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. *Mol Cell Endocrinol*, **193**, 7-12.
- Naftolin, F., Ryan, K.J., Davies, I.J., Reddy, V.V., Flores, F., Petro, Z., Kuhn, M., White, R.J., Takaoka, Y. & Wolin, L. (1975) The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res*, **31**, 295-319.
- Nishimori, K., Takayanagi, Y., Yoshida, M., Kasahara, Y., Young, L.J. & Kawamata, M. (2008) New aspects of oxytocin receptor function revealed by knockout mice: sociosexual behaviour and control of energy balance. *Prog Brain Res*, **170**, 79-90.
- Nissant, A., Bardy, C., Katagiri, H., Murray, K. & Lledo, P.M. (2009) Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci*, **12**, 728-730.
- O, W.S., Short, R.V., Renfree, M.B. & Shaw, G. (1988) Primary genetic control of somatic sexual differentiation in a mammal. *Nature*, **331**, 716-717.
- Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S. & Pfaff, D.W. (2000) Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14737-14741.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ormerod, B.K. & Galea, L.A. (2001) Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience*, **102**, 369-379.
- Ormerod, B.K., Lee, T.T. & Galea, L.A. (2003) Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neurobiol*, **55**, 247-260.
- Pang, S.F. & Tang, F. (1983) Sex differences in the serum concentrations of testosterone in mice and hamsters during their critical periods of neural sexual differentiation. *Journal of Endocrinology*, **100**, 7-11.
- Pankevich, D.E., Baum, M.J. & Cherry, J.A. (2004) Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci*, **24**, 9451-9457.
- Pantages, E. & Dulac, C. (2000) A novel family of candidate pheromone receptors in mammals. *Neuron*, **28**, 835-845.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C., Sica, M., Gotti, S., Martini, M., Pinos, H., Carrillo, B. & Collado, P. (2006) Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. *Neuroscience*, **138**, 987-995.
- Perez-Laso, C., Segovia, S., Collado, P., Rodriguez-Zafra, M., Del Abril, A. & Guillamon, A. (1997) Estradiol masculinizes the number of accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Brain Res Bull*, **42**, 227-230.
- Perfilieva, E., Risedal, A., Nyberg, J., Johansson, B.B. & Eriksson, P.S. (2001) Gender and strain influence on neurogenesis in dentate gyrus of young rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 211-217.
- Peteanu, L. & Alvarez-Buylla, A. (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, **22**, 6106-6113.
- Petrovich, G.D., Canteras, N.S. & Swanson, L.W. (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev*, **38**, 247-289.
- Pfeiffer, C.A. & Johnston, R.E. (1994) Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiol Behav*, **55**, 129-138.
- Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A. & Young, W.C. (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, **65**, 369-382.
- Pi, X.J. & Grattan, D.R. (1998) Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol*, **394**, 462-474.

- Pierman, S. (2008) Le rôle des oestrogènes dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement: Etude de la souris aromatase knockout. Belgium, Liege.
- Pierman, S., Douhard, Q. & Bakker, J. (2008a) Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur J Neurosci*, **27**, 423-431.
- Pierman, S., Douhard, Q., Balthazart, J., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006) Attraction thresholds and sex discrimination of urinary odorants in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav*, **49**, 96-104.
- Pierman, S., Sica, M., Allieri, F., Viglietti-Panzica, C., Panzica, G.C. & Bakker, J. (2008b) Activational effects of estradiol and dihydrotestosterone on social recognition and the arginine-vasopressin immunoreactive system in male mice lacking a functional aromatase gene. *Horm Behav*, **54**, 98-106.
- Piferrer, F. & Blazquez, M. (2005) Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol Biochem*, **31**, 215-226.
- Polston, E.K., Gu, G. & Simerly, R.B. (2004) Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience*, **123**, 793-803.
- Price, J.L. (1985) Beyond the primary olfactory cortex : olfactory related areas in the neocortex, thalamus and hypothalamus. *Chemical Senses*, **10**, 239-258.
- Quadros, P.S., Lopez, V., De Vries, G.J., Chung, W.C. & Wagner, C.K. (2002a) Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J Neurobiol*, **51**, 24-32.
- Quadros, P.S., Pfau, J.L., Goldstein, A.Y., De Vries, G.J. & Wagner, C.K. (2002b) Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology*, **143**, 3727-3739.
- Quadros, P.S. & Wagner, C.K. (2008) Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology*, **149**, 3054-3061.
- Rajendren, G. & Dominic, C.J. (1984) Role of the vomeronasal organ in the male-induced implantation failure (the Bruce effect) in mice. *Archives de Biologie*, **95**, 1-9.
- Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F. & Mhaouty-Kodja, S. (2009) Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci*, **29**, 4461-4470.
- Raynaud, J.P. (1973) Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids*, **21**, 249-258.
- Raynaud, J.P., Mercier-Bodard, C. & Baulieu, E.E. (1971) Rat estradiol binding plasma protein (EBP). *Steroids*, **18**, 767-788.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L. & Buck, L.B. (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, **73**, 597-609.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Reyes, R., Mendoza, J., Ballesteros, J. & Moffatt, C. (2004) Male chemosignals inhibit the neural responses of male mice to female chemosignals. *Brain Res Bull*, **63**, 301-308.
- Robarts, D.W. & Baum, M.J. (2007) Ventromedial hypothalamic nucleus lesions disrupt olfactory mate recognition and receptivity in female ferrets. *Horm Behav*, **51**, 104-113.
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., Boon, W.C., Fisher, C.R., Graves, K.H., McLachlan, R.I. & Simpson, E.R. (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7986-7991.
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J.D. & Lledo, P.M. (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*, **22**, 2679-2689.
- Roos, J., Roos, M., Schaeffer, C. & Aron, C. (1988) Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. *J Comp Neurol*, **270**, 121-131.
- Roselli, C.E., Klosterman, S.A. & Fasasi, T.A. (1996) Sex differences in androgen responsiveness in the rat brain: regional differences in the induction of aromatase activity. *Neuroendocrinology*, **64**, 139-145.
- Roselli, C.E. & Resko, J.A. (1993) Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **44**, 499-508.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P. & Kato, S. (2004) Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1673-1678.
- Savu, L., Benassayag, C., Vallette, G., Christeff, N. & Nunez, E. (1981) Mouse alpha 1-fetoprotein and albumin. A comparison of their binding properties with estrogen and fatty acid ligands. *J Biol Chem*, **256**, 9414-9418.
- Scalia, F. & Winans, S.S. (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol*, **161**, 31-55.
- Schachter, B.S. & Toran-Allerand, C.D. (1982) Intraneuronal alpha-fetoprotein and albumin are not synthesized locally in developing brain. *Brain Res*, **281**, 93-98.
- Schaefer, M.L., Young, D.A. & Restrepo, D. (2001) Olfactory fingerprints for major histocompatibility complex-determined body odors. *J Neurosci*, **21**, 2481-2487.
- Scott, J.W. (1986) The olfactory bulb and central pathways. *Experientia*, **42**, 223-232.
- Segovia, S. & Guillamon, A. (1993) Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Brain Res Rev*, **18**, 51-74.
- Segovia, S., Paniagua, R., Nistal, M. & Guillamon, A. (1984) Effects of postpuberal gonadectomy on the neurosensorial epithelium of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res*, **316**, 289-291.

- Sell, S. & Becker, F.F. (1978) alpha-Fetoprotein. *J Natl Cancer Inst*, **60**, 19-26.
- Sharp, F.R., Kauer, J.S. & Shepherd, G.M. (1975) Local sites of activity-related glucose metabolism in rat olfactory bulb during olfactory stimulation. *Brain Res*, **98**, 596-600.
- Shelley, D.N., Choleris, E., Kavaliers, M. & Pfaff, D.W. (2006) Mechanisms underlying sexual and affiliative behaviors of mice: relation to generalized CNS arousal. *Soc Cogn Affect Neurosci*, **1**, 260-270.
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C. & Weiss, S. (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, **299**, 117-120.
- Shiple, M.T. & Ennis, M. (1996) Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol*, **30**, 123-176.
- Sica, M., Martini, M., Viglietti-Panzica, C. & Panzica, G. (2009) Estrous cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. *BMC Neurosci*, **10**, 78.
- Smuk, M. & Schwers, J. (1977) Aromatization of androstenedione by human adult liver in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, **45**, 1009-1012.
- Spring, S., Lerch, J.P. & Henkelman, R.M. (2007) Sexual dimorphism revealed in the structure of the mouse brain using three-dimensional magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, **35**, 1424-1433.
- Steward, J. & Cygan, D. (1980) Ovarian hormones act early in development to feminize adult open-field behavior in the rat. *Horm Behav*, **14**, 20-32.
- Stewart, J., Vallentyne, S. & Meaney, M.J. (1979) Differential effects of testosterone metabolites in the neonatal period on open-field behavior and lordosis in the rat. *Horm Behav*, **13**, 282-292.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C. & Koentges, G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, **295**, 1493-1500.
- Suzuki, S., Gerhold, L.M., Bottner, M., Rau, S.W., Dela Cruz, C., Yang, E., Zhu, H., Yu, J., Cashion, A.B., Kindy, M.S., Merchenthaler, I., Gage, F.H. & Wise, P.M. (2007) Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol*, **500**, 1064-1075.
- Tanapat, P., Hastings, N.B. & Gould, E. (2005) Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol*, **481**, 252-265.
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J. & Gould, E. (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, **19**, 5792-5801.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Terashima, M., Toda, K., Kawamoto, T., Kuribayashi, I., Ogawa, Y., Maeda, T. & Shizuta, Y. (1991) Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Arch Biochem Biophys*, **285**, 231-237.
- Thompson, M.L. & Edwards, D.A. (1972) Olfactory bulb ablation and hormonally induced mating in spayed female mice. *Physiol Behav*, **8**, 1141-1146.
- Tilghman, S.M. & Belayew, A. (1982) Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 5254-5257.
- Tobet, S.A. & Baum, M.J. (1987) Role for prenatal estrogen in the development of masculine sexual behavior in the male ferret. *Horm Behav*, **21**, 419-429.
- Toran-Allerand, C.D. (1976) Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res*, **106**, 407-412.
- Toran-Allerand, C.D. (1980) Coexistence of alpha-fetoprotein, albumin and transferrin immunoreactivity in neurones of the developing mouse brain. *Nature*, **286**, 733-735.
- Toran-Allerand, C.D. (1984) On the genesis of sexual differentiation of the central nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of alpha-fetoprotein. In De Vries, G.J., De Bruin, J.P.C., Uylings, H.B.M., Corner, M.A. (eds) *Progress in Brain Research, Sex differences in the brain, the relation between structure and function*. Elsevier, Amsterdam, pp. 63-98.
- Toran-Allerand, C.D. (1987) Neuronal uptake of alpha-fetoprotein (AFP) synthesized and secreted by hepatocytes in liver/brain co-cultures. *Neurosci Lett*, **83**, 35-40.
- Trojan, J. & Uriel, J. (1980) Immunocytochemical localization of alpha-fetoprotein in the developing rat brain. *Oncodev Biol Med*, **1**, 107-111.
- Uriel, J., Bouillon, D., Aussel, C. & Dupiers, M. (1976) Alpha-fetoprotein: the major high-affinity estrogen binder in rat uterine cytosols. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1452-1456.
- Valencia, A., Segovia, S. & Guillamon, A. (1986) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Brain Res*, **389**, 287-290.
- Valley, M.T., Mullen, T.R., Schultz, L.C., Sagdullaev, B.T. & Firestein, S. (2009) Ablation of mouse adult neurogenesis alters olfactory bulb structure and olfactory fear conditioning. *Front Neurosci*, **3**, 51.
- van Leeuwen, F.W., Caffé, A.R. & De Vries, G.J. (1985) Vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: sex differences and the influence of androgens. *Brain Res*, **325**, 391-394.
- Vreeburg, J.T., van der Vaart, P.D. & van der Schoot, P. (1977) Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. *J Endocrinol*, **74**, 375-382.
- Wade, G.N. & Zucker, I. (1970) Development of hormonal control over food intake and body weight in female rats. *J Comp Physiol Psychol*, **70**, 213-220.

- Wagner, C.K., Pfau, J.L., De Vries, G.J. & Merchenthaler, I.J. (2001) Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J Neurobiol*, **47**, 176-182.
- Wagner, M., Toews, A.D. & Morell, P. (1995) Tellurite specifically affects squalene epoxidase: investigations examining the mechanism of tellurium-induced neuropathy. *J Neurochem*, **64**, 2169-2176.
- Wald, N.J., Huttly, W.J. & Hackshaw, A.K. (2003) Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *Lancet*, **361**, 835-836.
- Wang, Z. & De Vries, G.J. (1995) Androgen and estrogen effects on vasopressin messenger RNA expression in the medial amygdaloid nucleus in male and female rats. *J Neuroendocrinol*, **7**, 827-831.
- Wersinger, S.R. & Rissman, E.F. (2000) Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemoinvestigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J Neuroendocrinol*, **12**, 103-110.
- Wesson, D.W., Keller, M., Douhard, Q., Baum, M.J. & Bakker, J. (2006) Enhanced urinary odor discrimination in female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav*, **49**, 580-586.
- Whalen, R.E. & Edwards, D.A. (1967) Hormonal determinants of the development of masculine and feminine behavior in male and female rats. *Anat Rec*, **157**, 173-180.
- Whalen, R.E. & Nadler, R.D. (1965) Modification of Spontaneous and Hormone-Induced Sexual Behavior by Estrogen Administered to Neonatal Female Rats. *J Comp Physiol Psychol*, **60**, 150-152.
- Whalen, R.E. & Olsen, K.L. (1981) Role of aromatization in sexual differentiation: effects of prenatal ATD treatment and neonatal castration. *Horm Behav*, **15**, 107-122.
- Whitten, W.K. (1959) Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J Endocrinol*, **18**, 102-107.
- Winans, S.S. & Powers, J.B. (1977) Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res*, **126**, 325-344.
- Winslow, J.T. & Insel, T.R. (2002) The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides*, **36**, 221-229.
- Witcher, J.A. & Clemens, L.G. (1987) A prenatal source for defeminization of female rats is the maternal ovary. *Horm Behav*, **21**, 36-43.
- Witt, D.M. & Insel, T.R. (1991) A selective oxytocin antagonist attenuates progesterone facilitation of female sexual behavior. *Endocrinology*, **128**, 3269-3276.
- Wysocki, C.J., Yamazaki, K., Curran, M., Wysocki, L.M. & Beauchamp, G.K. (2004) Mice (*Mus musculus*) lacking a vomeronasal organ can discriminate MHC-determined odortypes. *Horm Behav*, **46**, 241-246.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Xu, F., Greer, C.A. & Shepherd, G.M. (2000) Odor maps in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **422**, 489-495.
- Yamaguchi, M. & Mori, K. (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9697-9702.
- Yoon, H., Enquist, L.W. & Dulac, C. (2005) Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell*, **123**, 669-682.
- Young, K.M., Fogarty, M., Kessar, N. & Richardson, W.D. (2007) Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*, **27**, 8286-8296.
- Yuen, M.F. & Lai, C.L. (2005) Serological markers of liver cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **19**, 91-99.
- Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R. & Cravedi, J.P. (2003) Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect*, **111**, 309-319.
- Zhang, X. & Firestein, S. (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci*, **5**, 124-133.
- Zou, Z., Horowitz, L.F., Montmayeur, J.P., Snapper, S. & Buck, L.B. (2001) Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*, **414**, 173-179.

# **Annexe**



## Research report

## The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior

Matthieu Keller<sup>a,\*</sup>, Michael J. Baum<sup>b</sup>, Olivier Brock<sup>c</sup>, Peter A. Brennan<sup>d</sup>, Julie Bakker<sup>c</sup><sup>a</sup> Behavioral & Reproductive Physiology, UMR 6175 INRA/CNRS/University of Tours, Nouzilly, France<sup>b</sup> Department of Biology, Boston University, USA<sup>c</sup> Behavioral Neuroendocrinology, Center for Cellular & Molecular Neurobiology, University of Liège, Belgium<sup>d</sup> Department of Physiology & Pharmacology, University of Bristol, United Kingdom

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 December 2008

Received in revised form 13 January 2009

Accepted 14 January 2009

Available online 23 January 2009

## Keywords:

Pheromones

Vomeranosal organ

Main olfactory epithelium

Olfactory bulb

## ABSTRACT

In the field of sensory perception, one noticeable fact regarding olfactory perception is the existence of several olfactory subsystems involved in the detection and processing of olfactory information. Indeed, the vomeronasal or accessory olfactory system is usually conceived as being involved in the processing of pheromones as it is closely connected to the hypothalamus, thereby controlling reproductive function. By contrast, the main olfactory system is considered as a general analyzer of volatile chemosignals, used in the context of social communication, for the identification of the status of conspecifics. The respective roles played by the main and the accessory olfactory systems in the control of mate recognition and sexual behavior are at present still controversial. We summarize in this review recent results showing that both the main and accessory olfactory systems are able to process partially overlapping sets of sexual chemosignals and that both systems support complimentary aspects in mate recognition and in the control of sexual behavior.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Among the various communication strategies that have evolved in mammalian species, smell is surely the most widespread and the most conserved [106]. In the field of chemosensory communication, Karlson and Lüscher [43] introduced the concept of “pheromones” as chemosignals that provide information to conspecifics about sex or endocrine status or which stimulate hard-wired species-specific social behaviors. Traditionally, pheromones have been classified as either “releaser pheromones” which trigger an immediate response or as “primer pheromones” inducing long-term changes in behavior or physiology. More recently, a new terminology has been introduced, including “signaler pheromones”, which induce behavioral or physiological changes depending on the identity of the individuals emitting or sending the pheromonal signal. However, it is difficult to classify specific pheromonal compounds regarding their neurobiological processing and/or their behavioral action and consequently there has been some controversy about the use and definition of the term “pheromone”. For example, a pheromonal compound such as brevicomin can act either as a releaser pheromone, eliciting aggressive responses in conspecific males, or as a primer pheromone, inducing estrus in female mice [81].

Despite these controversies, it is clear that olfactory/pheromonal signals profoundly influence neuroendocrine functioning and regulate a wide variety of social behaviors including sexual interactions, parent–offspring relations and inter-individual aggression. In the field of sexual functioning, olfactory cues and pheromones are probably the most powerful signals mediating the influence of social environment on reproductive function in many species. For example, pheromones have been shown to influence nearly all stages of reproductive life including the modulation of sexual maturation and puberty [110], the suppression of estrous cyclicity [115], the mediation of mate recognition and sexual interactions [3,47], the disruption of pregnancy [13,14,18] or the initiation of maternal behavior at parturition [58,59].

Finally, one noticeable fact in the physiology of olfaction is the existence of at least two distinct but complementary systems for the detection of chemosensory molecules, namely the main and the accessory olfactory systems [12,15,75,102] (see [11] for the newly chemosensory system identified in the Grueneberg ganglion) in most mammalian species. These olfactory systems have evolved so that they differ in their peripheral anatomy, their central projections and also in their function. However, both systems may also function synergistically in sustaining some pheromone-dependent behaviors [7,48,90]. Therefore, a central problem in olfaction is to elucidate the relative roles played by both systems in detecting olfactory information and in regulating chemosensory-dependent behaviors. In this review, we will focus on the relative roles of the

\* Corresponding author at: Laboratoire de Physiologie de la Reproduction & des Comportements, UMR 6175 INRA/CNRS/Université de Tours, 37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 247 427 275; fax: +33 247 427 743.

E-mail address: [mkeller@tours.inra.fr](mailto:mkeller@tours.inra.fr) (M. Keller).

main versus accessory olfactory systems in the processing of sexual olfactory/pheromonal chemosignals and their involvement in the control of sexual interactions, including mate recognition, as well as how these olfactory systems are regulated by gonadal hormones.

## 1. Functional organization of both the accessory and main olfactory systems

### 1.1. The accessory olfactory system

The accessory olfactory system, through its close connections with the reproductive hypothalamus, is usually conceived to be involved in the detection of odors that influence reproductive behaviors and as a consequence triggers neuroendocrine changes leading to puberty acceleration, estrous induction, and pregnancy block, as well as the testosterone increases in males when exposed to urine from estrous females [51,52,91]. The sensory neurons of the accessory olfactory system are found in the vomeronasal organ (VNO), a blind-ended tube located at the basis of the nasal septum which opens via a small duct into the nasal cavity or into the mouth depending on the species. The VNO detects pheromones which gain access to the VNO by a vascular pumping mechanism [78]. Indeed, many mammalian species engage in intense physical investigation of scent sources, thus exposing VNO sensory neurons to chemosignals which are pumped into the lumen of the VNO when the animal is attending to the stimulus [66,76]. Pheromonal ligands then interact with receptors on the membrane of VNO sensory neurons. These vomeronasal receptors have been identified and classified in two distinct families: the vomeronasal type 1 (V1Rs) and type 2 receptors (V2Rs). Both types of receptors share little sequence homology and are thought to have an ancient evolutionary origin [51,52]. In addition, both types of receptors are expressed in different regions of the VNO: V1Rs are expressed in the apical part of the VNO, near the lumen, while V2Rs are expressed in the more basal region [14,38]. This regionalization is conserved at the level of the first olfactory relay, the AOB, where V1Rs neurons send projections exclusively to the rostral part of the AOB while the V2Rs neurons project to the caudal part of the AOB. It has been shown that these subdivisions of the VNO and AOB sustain functional differences as they respond differentially to pheromonal stimuli in mice [16,37]. After the first olfactory relay, mitral cells of the AOB project in turn to the medial nucleus of the amygdala, where information processed in the two parts (rostral vs caudal) of the vomeronasal pathway converge when their projections overlap in this structure [111]. Olfactory information is then dispatched to several hypothalamic and limbic regions involved in the regulation of reproductive behavior such as the bed nucleus of the stria terminalis (BnST), the medial preoptic area (MPOA) and the ventromedial hypothalamus [93] and thus bypass higher cognitive cortical centers.

### 1.2. The main olfactory system

The vomeronasal system has traditionally been the main focus for pheromonal research, while the main olfactory system has been considered as a general analyzer that detects and differentiates among complex chemosignals that are present in the physical and social environment of individuals [31]. However, some mammalian pheromones have long been known to be detected by the main olfactory system (MOS; [12]. In the MOS, chemosignals are detected by olfactory sensory neurons located in the main olfactory epithelium (MOE). These sensory neurons represent the start point of the central treatment of olfactory information as they project their axons through the cribriform plate to converge at the first relay of the central olfactory system in the brain: the glomeruli of the main olfactory bulb (MOB) [19]. It should be noticed that individual sen-

sory neurons in the MOE project a single axon to a single glomerulus in the MOB, therefore, the glomerular layer of the MOB forms a map of olfactory axons terminals [19,120]. These projections of the MOE sensory neurons are precisely organized so that MOE sensory neurons expressing a given odorant receptor send their axons to a few converging glomeruli with a fixed topographical localization. The mitral and tufted cells abutting these MOB glomeruli then transmit olfactory signals to various forebrain and cortical targets including the piriform cortex, the entorhinal cortex or the anteriorcortical nucleus of the amygdala [93].

### 1.3. Convergence between main and accessory olfactory pathways

While main and accessory olfactory systems exhibit segregated pathways at the level of the first olfactory relays, the two systems converge downstream at several levels, including the cortical-medial amygdala [33,53,54,75,77,93,107]. Indeed, electrical stimulations of both the MOB and vomeronasal organ induce electrophysiological activation of this structure [61,77]. More interestingly, single neurons have been shown to respond to these stimulations, suggesting that both systems can interact in the processing of olfactory/pheromonal signals at the single cell level in the amygdala and interact downstream towards the BnST or MPOA which are of great importance in the regulation of sexual behavior. In addition, it has been recently suggested that the AOB receives backward connections from several forebrain sites including the bed nucleus of the accessory olfactory tract, the rostral portion of the medial amygdala (MeA), and the posteromedial cortical nucleus of the amygdala (PMCo). When exposed to male urinary volatiles, these connections show specific activation, suggesting that main olfactory–MeA–AOB signaling may motivate approach behavior to opposite-sex pheromonal signals that ensure successful reproduction [71].

Another site of cellular convergence of both olfactory systems appears to be the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. Indeed, it is widely accepted that the effects of pheromones on neuroendocrine status are mediated by GnRH neurons which are found scattered in the anterior hypothalamus [77,80,113,114]. Several sets of experiments have repeatedly demonstrated that the vomeronasal system sends projections to the GnRH neurons, and that pheromonal signals processed through the vomeronasal system can activate these neurons [80,113,114]. However, while recent experiments confirmed that GnRH neurons receive signals from subsets of neurons located in the vomeronasal system, they also, and more surprisingly, demonstrated that GnRH neurons receive connections from the main olfactory system [10,119] suggesting that GnRH neurons can receive information about odorants processed by both olfactory systems. Interestingly, GnRH neurons have bidirectional contacts with both main and accessory olfactory systems-relay areas, implying that they can also modulate the processing and transmission in both olfactory systems. Finally, GnRH neurons contact brain areas associated with sexual behavior whose connections exhibit sexual dimorphism. All these results suggest that both olfactory systems converge on and can impact GnRH neurons and in turn influence sexual behavior [10,119].

## 2. Functional roles of both the main and the accessory olfactory systems in pheromonal processing

The vomeronasal system is known to be involved in several pheromone-induced physiological responses in mice, including puberty acceleration, estrus induction, and pregnancy block—confirming the traditional view of the vomeronasal pathway. In the case of pregnancy block (Bruce effect) the pregnancy of recently mated females is disrupted if these females are exposed to the urine of an unfamiliar male [12,15,18]. This effect is based

on females' learning of the mating male's olfactory signature during the immediate post-copulatory period. Once this learning is established, the urine of the mating male will not induce this pregnancy failure, contrary to the urinary odors of unfamiliar males. Although the nature of the signal supporting the Bruce effect is still unclear (see [13] this issue for a complete discussion of this point), the MHC class-1 peptides [57] have been shown to convey, through their action on the V2R-expressing receptor neurons in the basal VNO, some information about the individuality of the mating male. Lesioning the VNO itself or any other level of the vomeronasal pathway has been shown to consistently disrupt the pregnancy block effect [8,64]. Lesions to the VNO have also been shown to disrupt other pheromally induced behaviors, such as the acceleration of puberty, measured through the occurrence of the first estrous cycle, which is observed in pre-pubertal female mice that are exposed to male olfactory cues (Vandenbergh effect; [65], or the suppression of the estrous cycle that occurs after housing adult females together (Whitten effect) [27,115].

By contrast, the MOS is traditionally thought to be involved in the processing of odors related to social attraction and complex social recognition, thus allowing animals to distinguish sex, social or reproductive status of conspecifics. Indeed, urine, like most other social olfactory stimuli, consists of a large number of distinct chemical compounds that vary according to the sex, strain, social and physiological status of the emitter [1,42]. For example, the volatile urinary compound (methylthio) methanethiol (MTMT) has been shown to activate a subset of mitral cells in the MOB, and when added to urine, enhances urine attractiveness to female mice [62]. In this context, the anatomical segregation of the two systems and the extensive functional differences between them have given rise to the traditional view that the MOE detects volatile odorants in the environment while the VNO detects non-volatile pheromones [15,19]. In support of this functional dichotomy, Luo et al. have demonstrated using electrophysiological recordings of mitral cells in the AOB in behaving animals that these cells are only activated when mice make direct physical contact with the odorant source (either the face or anogenital regions of an anaesthetised stimulus female [66]).

The functional dichotomy between both main and accessory olfactory systems is not so clear-cut and it is now necessary to revise this segregation. This revision is based on recent experimental facts showing that both the VNO and the MOE have the ability to detect some overlapping sets of chemosensory cues. Some of the experiments supporting this view are listed below. First, the view that the VNO is only involved in the detection of non-volatile odors has recently been challenged by using both electrophysiological and imaging methods. With these new approaches, several groups have demonstrated, using *in vitro* preparations, that VNO neurons can express very sensitive and specific responses to urinary or bodily volatile compounds, such as farnesenes or brevicomine [23,56]. However, the general view is that these volatile ligands need to be transported into the VNO by transport proteins belonging to the lipocalin family; *in vivo*, such molecules gain access to the VNO after direct contact with the stimulus source. Among these proteins that act as carrier for volatile ligands, some, such as major urinary proteins (MUPs) [15,40] or aphrodisin [17] have been now clearly characterized. It should be noticed that these carrier proteins might also serve by themselves as cues for individual recognition, especially because they exhibit a high degree of polymorphism [40] and are able to stimulate *egr-1* expression in specific regions of the accessory olfactory bulb [16].

Whether the accessory olfactory system can be directly stimulated by volatile pheromones (i.e. without direct physical contact with the olfactory source) remains controversial but some experiments reported the activation of the AOB by volatile compounds delivered in the airstream [70,118]. In addition, other indirect

behavioral evidence for a role of the VNO in the detection of volatile molecules comes from the study by Trinh and Storm [109], who used transgenic mice with a nonfunctional cAMP signaling pathway in the olfactory epithelium due to a mutation in type 3 adenylyl cyclase (AC3). Such AC3 KO mice were able to detect several volatile odorants, including putative pheromones, presumably via the VNO. However, more recently it was shown that mice defective in the olfactory cAMP signaling pathway can detect some volatile odorants through their olfactory epithelium using alternative transduction pathways [63].

It has also been known for a long time that some pheromones can be detected by the main olfactory system. For example, the volatile steroid androstenone in boar saliva induces lordosis in receptive sows [25,26]. Indeed, this volatile chemosignal continues to induce lordosis in female sows even if their VNO is blocked, suggesting that it is detected and processed by the MOE. In sheep, the male effect, characterized by the occurrence, during the anestrus period, of a preovulatory LH surge and ovulation in ewes, is due to exposure to ram odors and involves the main olfactory system [21,24,32]. Indeed, lesioning the vomeronasal pathway does not affect the ewe's neuroendocrine LH response to the ram. In mice, MTMT in male mouse urine is also detected by the MOB and is a potent attractant for female mice [62]. With regard to mother–young relationships, the rabbit mammary pheromone 2-methylbut-2-enal present in the milk of the mother induces nipple-searching behavior in pups [94]; removal of the VNO has no effect on the nipple-search behavior while ablation of the MOE abolishes it completely [39]. Finally, with regard to humans, who do not have a functional VNO and in whom an AOB has never been identified, it has been shown that exposing women with normal menstrual cycles to axillary extracts from women in their follicular phase shortens the length of the recipient's menstrual cycle [104]. Furthermore, Shinohara et al. [100] reported that women exposed to female axillary secretions showed changes in LH pulses. Finally, Preti et al. [88] showed that male axillary extracts affected pulsatile secretion of LH and mood in women recipients. These studies thus showed that axillary secretions contain one or more compounds that may act as a pheromone in humans.

Additionally, some pheromonal signals may also be processed in parallel by the two olfactory systems. Calcium imaging studies with *in vitro* preparation of nasal tissue have shown that some sensory neurons respond to MHC peptides in both the VNO and the MOE [103]. Indeed, it has been demonstrated that non-volatile olfactory cues can also gain access to the MOE after direct physical contact [103]. The thresholds of sensory neurons responses to MHC peptides differ in both VNO and MOE, with values in the nanomolar range for vomeronasal sensory neurons [57] and near  $10^{-10}$  M in the MOE [103]. The mechanisms underlying the detection for the same chemosignals by sensory neurons in the VNO and MOE depends on distinct sets of transduction mechanisms. For example, local field potentials to MHC peptides are inhibited by the drug 2-aminoethoxydiphenylborate (or 2-APB) in the VNO, but not in the MOE [57,103]. In addition, MOE responses to MHC peptides are inhibited by adenylyl cyclase antagonists and critically depend on a functional CNGA4 gene, which encodes a principal subunit of a cyclic AMP-sensitive CNG channel expressed in MOE but not in the VNO, thus showing that MHC peptides ligands are transduced in the MOE by cells employing a cAMP-signaling pathway and the olfactory CNG channel. Similar results have been obtained with the odorant 2-heptanone: its detection appears to be dependent on the *Trp2* gene in the VNO, while in the MOE, detection of 2-heptanone depends on the CNGA2 [60,63]. At the behavioral level, this processing of the same olfactory signals is not just a redundancy. Indeed, specific activation of each system can lead to distinct behavioral outcomes. Thus, in the vomeronasal system, MHC-class I peptides signals has been shown to sustain information about individuality

in the context of the Bruce effect [57] while processing of MHC-class I peptides in the MOE support social preferences [103]. This demonstrates that MHC processing via the MOE does not replace VNO sensory inputs.

### 3. Both main and accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior

#### 3.1. Olfactory control of mate recognition

As mentioned previously, it is generally believed that recognition/discrimination as well as attraction to the opposite sex involves the main olfactory pathway. Indeed, this has been demonstrated to be the case in several species including rodents, ferrets, pig or monkeys. By contrast, the accessory olfactory pathway is thought to control sexual behavior due to its connections with the hypothalamus. However no general consensus has been yet established and a recent series of experiments based on specific lesions of the main versus accessory olfactory pathways have started to establish more precisely the relative roles of both systems in the control of mate recognition.

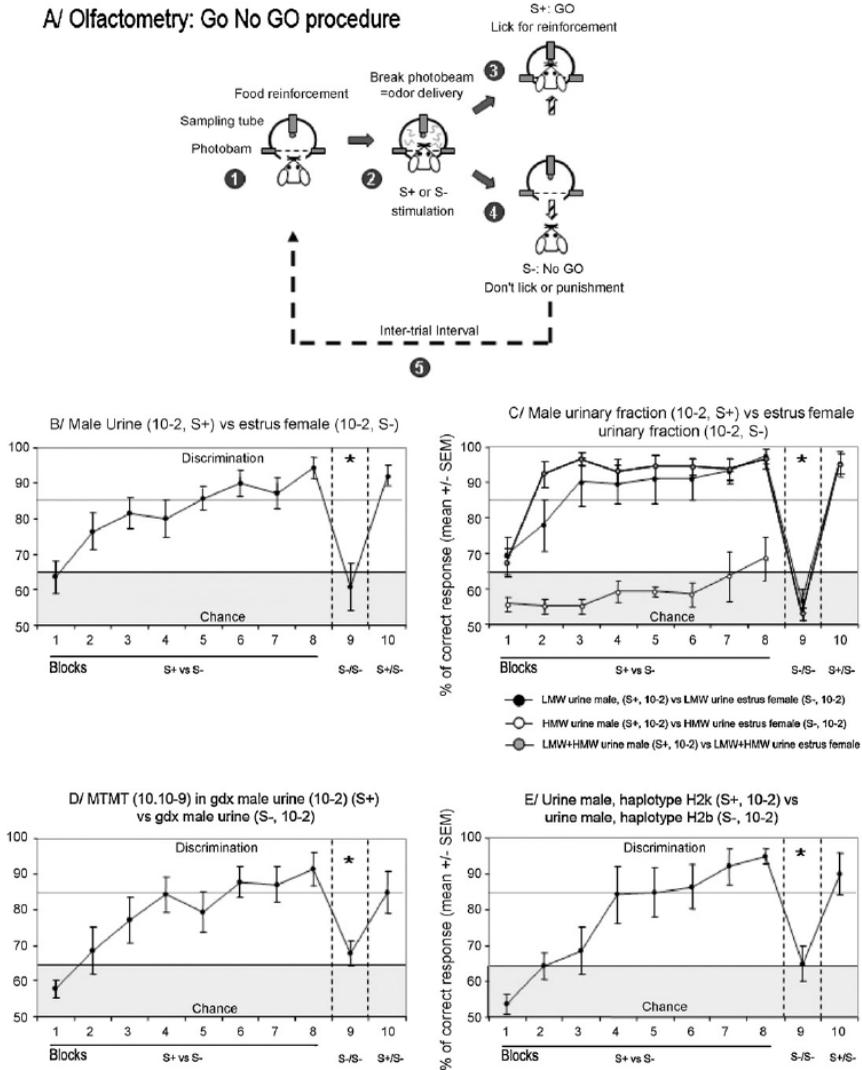
The general view that attraction/recognition toward the opposite sex involves the main olfactory system is based on the fact that sexual discrimination is usually achieved by animals of both sexes on the sole basis of volatile olfactory cues. These results have been consistently obtained using various behavioral paradigms including habituation/dishabituation tests [6,86], Y-maze preference tests [44,45,83] or studies using olfactory go-no-go conditioning procedures [101,112]. In this context, recent olfactometer experiments performed by our group have confirmed and further explored sexual discrimination abilities of female mice on the sole basis of volatile odors. Briefly, the general principle of olfactometry is as follows: the olfactometer presents an odor when the mouse breaks a photobeam in the odor sampling tube with its snout (Fig. 1A1; see [112] for further experimental details). When the photobeam is broken, a stream of purified air displaces the volatile odor headspace in the odor vials, sending this odor through a mixing manifold to pass by the nose of the animal as it licks from a reward spout (Fig. 1A2). In this go/no-go discrimination paradigm, mice were rewarded with Pediasure® when they responded correctly by licking to the presentation of the S+ (hit) odor (Fig. 1A3). If the animal did not lick for presentation of the S+ odor (miss) or did lick for presentations of the S− odor (false alarm), it was given a negative score. Alternatively, in cases when the animal did not lick for presentations of the S− odor (correct reject), the animal received a positive score (Fig. 1A4). After the completion of a trial, the next trial started after an inter-trial interval of 5 s (Fig. 1A5). Olfactory discrimination was assessed during 8 S+/S− blocks of 20 trials followed by a control block (S−/S−) and a final block S+/S− block. As illustrated in Fig. 1B, experimental C57Bl6 female mice (n=7) readily discriminated volatile olfactory cues emanating from male mouse urine versus estrous female urine. Very similar results were obtained when the same kind of discrimination task was administered to mice using low molecular weight urinary fractions which contain only volatile odors (LMW; see [46] for details regarding biochemical separation of low molecular versus high molecular urine fractions; HMW). By contrast, mice failed to discriminate the odors when the task was performed using non-volatile urinary fractions (Fig. 1C). Reloading HMW with LMW fractions restored discrimination between male versus estrous female urinary cues. Additionally, we also demonstrated that the volatile male mouse pheromone, MTMT, can be discriminated at a concentration as low as 10 nM when added to a solution of gonadectomized male urine diluted in water (Fig. 1D). In support of this behavioral result, this molecule has been recently shown to induce attraction of female mice at a concentration of 20 nM, and electrophysiological work has

demonstrated that MTMT induced clear responses in MOB mitral cells of female mice, indicating that the main olfactory system mediates the attraction of females to this pheromone [62]. Finally, mice were also able to discriminate between volatile urinary cues derived from congenic mouse urine (C57Bl/10J mice (bb at H-2) and C57Bl/10J-H-2<sup>k</sup> (kk at H-2); Fig. 1E). This result confirmed previous experiments performed by various groups who demonstrated that mice lacking a vomeronasal organ can discriminate between MHC odortypes [117] and MHC-class I peptides [50]. This whole set of results further suggests that volatile olfactory cues are strictly processed by the main olfactory system, at least when physical contact with the odor source is prevented.

The involvement of the main olfactory system in mate recognition has been confirmed by lesion studies of main olfactory function using intranasal application of zinc sulphate [44,45]. In both sexes, lesioning the MOS completely suppressed the preference for opposite-sex olfactory cues observed in both Y-maze and habituation/dishabituation experiments. This effect of zinc sulphate lesioning was not only obtained when the animals were provided with volatile olfactory stimuli, but also when direct contact with olfactory cues was allowed, thus providing both volatile and non-volatile olfactory cues. This latter result suggests that, zinc sulphate-treated animals do not detect the volatile odors released from odor sources and subsequently are not attracted to investigate them further. This is in line with previous observations in OMP-ntr mice, where targeted destruction of the MOE made it impossible for female mice to locate male urine spots placed in their home cage [67].

Complimentary to the results detailed previously, surgical lesions of the VNO clearly showed that this treatment is not effective in disrupting mate recognition in both male and female mice [44,45,82,83]. Indeed, VNO-lesions did not impair the discrimination of body or urinary volatile odorants in a habituation/dishabituation test as well as the preference for opposite-sex-derived volatile odors measured in Y-maze choice-tests. The lack of involvement of the vomeronasal pathway to support mate recognition has also been demonstrated in female ferrets, where lesioning the VNO did not affect the preference for volatile body odorants emitted from males [116]. By contrast, blocking the nares of the animals disrupted mate recognition in both male and female ferrets [49]. In addition, VNO duct occlusion failed to disrupt female attraction toward the boar pheromone, androstenone, [26]. Interestingly, these results demonstrating the lack of a role for the VNO in mate recognition, have been broadly confirmed by performing lesions downstream in the accessory olfactory pathway at the level of the AOB [41,72]. The fact that mate recognition is not disrupted when the AOB is lesioned also confirms that previous results obtained by surgical removal of the VNO were not the consequence of an occlusion of the nasal cavity by blood clots, as was recently suggested by Kimchi et al. [55].

Despite this convergent body of results, a role for the VNO in mate recognition has been recently claimed by studies using transient receptor potential cation 2 channel knock-out male mice [60,105]. Indeed, deletion of Trp2 results in a dramatic reduction of various electrophysiological responses in VNO sensory neurons after exposure to urinary odorants. In addition, at the behavioral level, Trp2-KO male mice mounted male and female subjects indiscriminately [60,105], leading to the conclusion that the VNO is required for sex discrimination. However neither study measured olfactory sex discrimination directly. It remains questionable whether Trp2-KO males can discriminate between the sexes on the basis of olfactory cues. These results can, however, be reconciled with previous findings because in a recent study performed by Kelliher et al. [50], Trp2-KO mice showed electrophysiological responses after being stimulated with MHC-class I peptides; in addition these mice showed a pregnancy block effect when exposed



**Fig. 1.** (A) procedure for assessing odor discrimination capacity using a liquid olfactometer. Briefly, the olfactometer presents an odor when the mouse breaks a photobeam with its snout. When the photobeam is broken, a stream of purified air displaces the odor headspace in the odor vials, sending this odor through a mixing manifold to pass by the nose of the animal as it licks from a reward spout. In this go, no-go discrimination paradigm, mice were rewarded with approximately 3  $\mu$ l of Pediasure when they responded correctly by licking to the presentation of the S+ (hit) odor. If the animal did not lick for presentation of the S+ odor (miss) or did lick for presentations of the S- odor (false alarm), it was given a negative score. Alternatively, in cases when the animal did not lick for presentations of the S- odor (correct reject), the animal received a positive score. Results are expressed as percentage of correct responses by blocks of 20 trials. For each discrimination task, female mice ( $n=7$ ) were submitted to eight discrimination blocks (S+/S-), followed by a control block (S-/S-) to discard any potential contamination allowing to achieve the discrimination task through non specific olfactory cues; during this control block performance was expected to be under the chance threshold (set-up at 65%); a final discrimination was performed to test for recovery of normal performance. (B-E) discrimination task involving (B) male vs estrus female urine (dilution of urine  $10^{-2}$ , see [112] for experimental details), (C) low molecular urinary fraction (black circles), high molecular urinary fraction (white circles) and high molecular fraction reloaded with low molecular fraction; all fractions derived from male vs estrus female urine (see [46] for separation of urinary fractions), (D) (methylthio)methanethiol diluted in gonadectomized male urine vs gonadectomized male urine and (E) urine of congenic mice. Discrimination tasks were performed in the order described previously. Results clearly demonstrated that volatile urinary cues are sufficient for mate recognition in female mice.

to the odor of a strange male. These results indicate that ablation of Trp2 cannot be considered as being totally equivalent to a complete elimination of VNO function. Instead, it seems likely that some VNO function, presumably involving the V2-R expressing receptor neurons, is retained in Trp2 KO mice. Finally, it must be mentioned that when direct access to the odorant source is provided to VNO

lesioned animals in Y-maze odor preference tests, olfactory investigation and preference is clearly disrupted, suggesting that the VNO can contribute to subject's motivation to approach and investigate potential mates. However, this appears to be only on the basis of non-volatile olfactory cues detected through direct physical contact with the odorant source [46].

### 3.2. Olfactory control of sexual behavior

Which olfactory system mediates sexual behavior in mice has also been a matter of debate. In the male, the involvement of VNO in copulatory behavior seems to vary according to the species. In male mice, lesioning the VNO is without any impact on male sexual behavior [82] and Trp2-KO male mice also show normal levels of copulation [105]. These results point to a possible role for the main olfactory system in the expression of male sexual behavior [45]. However, genetic ablation of a subset of V1Rs has significant effects on sexual behavior in males [23]. In other species such as hamsters or prosimian primates (*Microcebus murinus*), surgical ablation of the VNO seemed to have more dramatic effects on the display of sexual behaviors [2,87]. However, in mice, male sexual behavior has been shown to be more generally dependent on a functioning MOE. Indeed, if initial studies by Edwards and Burge [28] suggested that the MOE was not involved in controlling male sexual behavior, this result has recently been challenged by various studies, using either chemical lesions of the MOE with dichlobenil [119] or zinc sulphate [45] or using genetically engineered mice lacking CNGA2, a channel that is only expressed in MOE sensory neurons [69]. All studies showed a dramatic disruption of sexual behavior after destruction/inactivation of the MOE, which is in sharp contrast with the results of Edwards and Burge [28]. Sexual experience may account for these discrepancies as at the behavioral level, sexual experience is a factor allowing the integration of chemosignals originating from both main and accessory olfactory systems.

Indeed, the integration of the ability to mate is, in male hamsters, dependent on sexual experience and integration of vomeronasal cues with main olfactory cues [74,84]. In sexually naïve males, severe deficits in mating behavior can be observed following removal of the VNO, demonstrating that vomeronasal inputs are necessary to achieve copulation in these animals. By contrast, either main or vomeronasal inputs are sufficient for mating to occur in sexually experienced males, and only lesioning of both systems impairs copulation. This effect of olfactory deprivation on sexual behavior may be mediated by GnRH neurons. Indeed, as mentioned previously, GnRH cells receive olfactory information from both the main and the accessory olfactory system and an icv injection with GnRH is able to overcome the absence of olfactory inputs in a way similar to that of sexual experience [29,30,77,79]. Therefore, it is possible that sexual experience modulates the relative functional efficiency of these MOB to GnRH neuron connections; these connections gaining functional efficiency only after sexual experience. To support this hypothesis, it has been shown that, female chemosensory cues are better able to induce MPOA activation (a structure where GnRH neurons are located), measured through Fos immunocytochemistry, in sexually experienced than in naïve males. This compensation between both olfactory systems may however not be a general rule as previously mentioned in male mice, where lesion of main olfactory epithelium disrupted mating behavior in sexually naïve [119] as well as sexually experienced animals [45], suggesting that vomeronasal inputs are not sufficient to sustain copulation in this species.

In the female, early studies [28,108] also pointed to a role for the main olfactory system in the display of female sexual receptivity, since destruction of the MOE by intranasal infusion with zinc sulphate attenuated lordosis behavior in estrogen–progesterone-treated mice. In accordance with these results, recent experiments showed that destruction of the MOE reduced lordosis (in ovariectomized females primed with estradiol and progesterone) quotients by approximately 50% [45]. These results suggest that deprivation of main olfactory sensory input may induce less activation of the brain centers regulating lordosis and as a consequence impairs lordosis behavior. However, these effects of MOE lesions did not

disrupt lordosis as effectively as did VNO lesions. Thus, VNO lesions completely abolished lordosis behavior in females of several mammalian species including hamsters [68], voles [22], rats [89] and mice [45]. Intriguingly, studies on the role of the VNO in the Bruce effect in mice showed that VNO ablation did not prevent female mice from becoming pregnant [50,64], suggesting that the VNO may not mediate female sexual receptivity in mice. However, both sets of data can be reconciled considering the time of exposure of the female to a stimulus male. Indeed, it has been shown that the adverse effects of VNO lesions can be overcome by long-term exposure to the male. For example, the lordosis quotient of VNO-lesioned female rats increased after prolonged exposure to the male [89]. Whether females are sexually experienced or not prior to VNO removal may also play a role.

### 4. Sexual differentiation of both olfactory systems

Sexual behaviors displayed by males and females are clearly differentiated. As olfaction is the major sensory modality regulating sexual interactions, at least in rodents, it is not surprising that the olfactory systems show sexual dimorphisms at both morphological and functional levels. These sexual dimorphisms are the result of perinatal actions of gonadal hormones (see [4] or [73] for general principles regarding brain sexual differentiation). For example, the VNO, but also the whole vomeronasal system, is a sexually dimorphic chemosensory structure differentiated by gonadal hormones shortly after birth [35,95–97,99]. The overall volume, neuroepithelial volume, and number of bipolar neurons are all larger in male rats. These sex differences are abolished and inverted when males are gonadectomized and females are androgenized on the day of birth. Androgenized females had greater morphometric values than control females and in this regard resembled control males, while males castrated at birth did not differ from control females. Gonadal steroids maintained VNO structure in adulthood: when male and female rats were gonadectomized at 90 days and sacrificed at 180 days, a decrease in the VNO neuroepithelial height occurred in sexes [98]. Whether the same morphological sex differences exist in the main olfactory system is unknown.

Sex differences have also been reported in olfactory sensitivity at the functional level. For instance, sows are significantly better than boars at using decreasing concentrations of the volatile male pig pheromone, androstenone, to identify the presence of a food reward [25]. In addition, using positron emission tomography [92], women but not men showed a significant activation of the preoptic area and ventromedial nuclei of the hypothalamus when actively smelling androstadienone, an androgenic compound secreted by the axillary glands in higher concentrations in men than in women [34]. These sex differences in olfactory sensitivity are not only restricted to the detection of opposite-sex odors, but also involve same-sex odors. For instance, using habituation/dishabituation tests to determine odor attraction thresholds, female mice respond more reliably than male mice to low concentrations of volatile urinary odors from either sex [6,86]. By contrast, other studies have shown that males were more proficient than females at discriminating between several types of urinary odors using an olfactometric device [112]. As with morphological differences, the existence of sex differences in olfactory sensitivity suggests that gonadal hormones may affect olfactory capabilities. These sex differences in olfactory sensitivity may reflect differences in circulating sex steroids at the time of testing (activational effects) or a hard-wired sex dimorphism in the functioning of the olfactory system that resulted from the perinatal actions of gonadal hormones (organizational effects). In this context, the aromatase knock-out (ArKO) mice have been used as a tool to assess the effects of perinatal estrogen exposure on social odor processing. ArKO females read-

ily learned to discriminate urinary volatiles from ovariectomized females treated with estradiol as opposed to estradiol sequenced with progesterone and estradiol. Surprisingly, wild-type females failed to acquire this discrimination in a food-motivated go/no-go task [112]. Both wild-type and ArKO females successfully learned to discriminate between other types of volatile urinary odors, including those from gonadally intact male versus ovariectomized females primed with estradiol + progesterone and those from gonadally intact versus castrated males. However, the different capacities of WT and ArKO females to discriminate volatile urinary odors from ovariectomized females treated with estradiol as opposed to oestradiol + progesterone cannot be explained by a difference between females of these two phenotypes in the ability of these two odors to activate distinguishable clusters of MOB glomeruli [70], suggesting that the central processing of social odors may be affected in female ArKO mice. In this respect, ArKO females that were treated with estradiol benzoate in adulthood to correct for their estrogen deficiency showed a normal, female-typical, Fos activation at the level of the olfactory bulbs when exposed to male urinary odors, but Fos responses were affected at more central levels [85]. Indeed, male odors still induced significant Fos expression in the medial amygdala of ArKO females, although this increase was clearly reduced in comparison with WT female mice, and failed to activate the VMH, a brain region critical for the expression of reproductive behavior in female mice. This result suggests that, in ArKO females, olfactory cues from a potential mate are correctly detected at the level of the olfactory bulb but that the integration of their reproductive value at the level of the amygdala and VMH is reduced, which may explain their deficits in the expression of sexual behavior [5]. Different patterns of Fos expression following exposure to urinary odors from conspecifics of both sexes were also observed in the amygdala of WT and ArKO males, a region that seems to be essential for the integration of olfactory stimuli in mice [20], suggesting that perinatal estrogens may be involved in the development of this brain area in both males and females. Finally, these results confirmed previously observed sex differences in neural activation of the accessory olfactory pathway following exposure to male odors [36], although no significant Fos responses were observed in central brain regions of male ArKO mice when exposed to male urine, suggesting that these sex differences probably reflect the perinatal actions of androgens as was recently suggested by the work of Bodo and Rissman [9].

## 5. Conclusion

We have reviewed the current view of how the mammalian main and accessory olfactory systems detect partially overlapping sets of social chemosensory cues, giving rise to a model that involves parallel processing of the same molecules but through different mechanisms leading to specific behavioral outputs. Consequently, both systems should be conceived as complementary rather than as separate pathways. Further experimentation will be needed to understand how chemosensory cues are integrated with hormonal and neuroendocrine factors to control courtship and mating behaviors.

## Acknowledgements

Matthieu Keller is a CNRS research associate (France); Michael Baum is professor of Biology at Boston University (USA); Peter Brennan is reader at the University of Bristol (UK); Julie Bakker is a FNRS research associate (Belgium). The preparation of this manuscript was made possible through the support of the following grants: NICHD No. 044897 to JB and MJB; FNRS-Mandat d'Impulsion Scientifique to JB and INSERM, Programme National de Recherche en Reproduction et Endocrinologie grant to MK.

## References

- Andreolini F, Jemiolo B, Novotny M. Dynamics of excretion of urinary chemosignals in the house mouse (*Mus musculus*) during the natural estrous cycle. *Experientia* 1987;43:998–1002.
- Aujard F. Effect of vomeronasal organ removal on male socio-sexual responses to female in a prosimian primate (*Microcebus murinus*). *Physiol Behav* 1997;62:1003–8.
- Bakker J. Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanisms regulating mate recognition in mammals. *J Neuroendocrinol* 2003;15:615–21.
- Bakker J, Baum MJ. Role for estradiol in female-typical brain and behavioral sexual differentiation. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:1–16.
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* 2002;22:9104–12.
- Baum MJ, Keverne EB. Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm Behav* 2002;41:213–9.
- Baum MJ, Kelliher KR. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol* 2009;71:141–60.
- Bellringer JF, Pratt HP, Keverne EB. Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *J Reprod Fertil* 1980;59:223–8.
- Bodo C, Rissman EF. Androgen receptor is essential for sexual differentiation of responses to olfactory cues in mice. *Eur J Neurosci* 2007;25:2182–90.
- Boehm U, Zou Z, Buck LB. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell* 2005;123:683–95.
- Brechbuhl J, Klaley M, Broillet MC. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 2008;321:1092–5.
- Brennan PA. The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Horm Behav* 2004;46:231–40.
- Brennan PA. Outstanding issues surrounding vomeronasal mechanisms of pregnancy block and individual recognition in mice. *Behav. Brain Res* 2009;200:287–94.
- Brennan PA, Keverne EB. Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol* 2004;14:R81–9.
- Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 2006;444:308–15.
- Brennan PA, Schellinck HM, Keverne EB. Patterns of expression of the immediate-early gene *egr-1* in the accessory olfactory bulb of female mice exposed to pheromonal constituents of male urine. *Neuroscience* 1999;90:1463–70.
- Briand L, Huet J, Perez V, Lenoir G, Nespoulous C, Boucher Y, et al. Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein. *FEBS Lett* 2000;476:179–85.
- Bruce HM. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 1959;184:105.
- Buck LB. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 2000;100:611–8.
- Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, et al. *Lhx6* delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* 2005;46:647–60.
- Cohen-Tannoudji J, Lavenet C, Locatelli A, Tillet Y, Signoret JP. Non-involvement of the accessory olfactory system in the LH response of anoestrous ewes to male odour. *J Reprod Fertil* 1989;86:135–44.
- Curtis JT, Liu Y, Wang Z. Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Res* 2001;901:167–74.
- Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam D, Wysocki CJ, Ogawa S, et al. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 2002;419:70–4.
- Delgado JA, Gelez H, et al. The 'male effect' in sheep and goats—Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res* 2009;200:304–14.
- Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP. Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiol Behav* 1995;57:255–9.
- Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP. Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav Evol* 1997;49:53–62.
- Drickamer LC, Hoover JE. Effects of urine from pregnant and lactating female house mice on sexual maturation of juvenile females. *Dev Psychobiol* 1979;12:545–51.
- Edwards DA, Burge KG. Olfactory control of the sexual behavior of male and female mice. *Physiol Behav* 1973;11:867–72.
- Fernandez-Fewell GD, Meredith M. c-Fos expression in vomeronasal pathways of mated or pheromone-stimulated male golden hamsters: contributions from vomeronasal sensory input and expression related to mating performance. *J Neurosci* 1994;14:3643–54.
- Fernandez-Fewell GD, Meredith M. Facilitation of mating behavior in male hamsters by LHRH and AclHRH5–10: interaction with the vomeronasal system. *Physiol Behav* 1995;57:213–21.
- Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 2001;413:211–8.

- [32] Gelez H, Fabre-Nys C. The “male effect” in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm Behav* 2004;46:257–71.
- [33] Gomez DM, Newman SW. Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 1992;317:195–218.
- [34] Gower DB, Ruparella BA. Olfaction in humans with special reference to odorous 16-androstenes: their occurrence, perception and possible social, psychological and sexual impact. *J Endocrinol* 1993;137:167–87.
- [35] Guillemon A, Segovia S. Sex differences in the vomeronasal system. *Brain Res Bull* 1997;44:377–82.
- [36] Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol* 1999;39:249–63.
- [37] Halem HA, Baum MJ, Cherry JA. Sex difference and steroid modulation of pheromone-induced immediate early genes in the two zones of the mouse accessory olfactory system. *J Neurosci* 2001;21:2474–80.
- [38] Halpern M, Martinez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* 2003;70:245–318.
- [39] Hudson R, Distel H. Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 1986;37:123–8.
- [40] Hurst JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DH, et al. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 2001;414:631–4.
- [41] Jakupovic J, Kang N, Baum MJ. Effect of bilateral accessory olfactory bulb lesions on volatile urinary odor discrimination and investigation as well as mating behavior in male mice. *Physiol Behav* 2008;93:467–73.
- [42] Jemiolo B, Andreolini F, Xie TM, Wiesler D, Novotny M. Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. *Physiol Behav* 1989;46:293–8.
- [43] Karlson P, Luscher M. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 1959;183:55–6.
- [44] Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses* 2006;31:315–23.
- [45] Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem Senses* 2006;31:753–62.
- [46] Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci* 2006;23:521–30.
- [47] Keller M, Baum MJ, Bakker J. Olfactory control of sex-recognition and sexual behavior in mice. In: Hurst JL, Beynon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, editors. *Chemical signals in vertebrates XI*. Springer-Verlag, New York, 2008. ISBN 978-0-387-73944-1. 2008:241–50.
- [48] Kelliher KR. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Horm Behav* 2007;52:561–70.
- [49] Kelliher KR, Baum MJ. Nares occlusion eliminates heterosexual partner selection without disrupting coitus in ferrets of both sexes. *J Neurosci* 2001;21:5832–40.
- [50] Kelliher KR, Spehr M, Li XH, Zufall F, Leinders-Zufall T. Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing. *Eur J Neurosci* 2006;23:3385–90.
- [51] Keverne EB. The vomeronasal organ. *Science* 1999;286:716–20.
- [52] Keverne EB. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiol Behav* 2004;83:177–87.
- [53] Kevetter GA, Winans SS. Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the “olfactory amygdala”. *J Comp Neurol* 1981;197:99–111.
- [54] Kevetter GA, Winans SS. Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the “vomeronasal amygdala”. *J Comp Neurol* 1981;197:81–98.
- [55] Kimchi T, Xu J, Dulac C. A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* 2007;448:1009–14.
- [56] Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT, et al. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 2000;405:792–6.
- [57] Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, Chandramani SP, Maul-Pavicic A, Jäger M, et al. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 2004;306:1033–7.
- [58] Levy F, Keller M, Pointron P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm Behav* 2004;46:284–302.
- [59] Lévy F, Keller M. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behav Brain Res* 2009;200:336–45.
- [60] Leybold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R. Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6376–81.
- [61] Licht G, Meredith M. Convergence of main and accessory olfactory pathways onto single neurons in the hamster amygdala. *Exp Brain Res* 1987;69:7–18.
- [62] Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 2005;434:470–7.
- [63] Lin W, Arellano J, Slotnick B, Restrepo D. Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system. *J Neurosci* 2004;24:3703–10.
- [64] Lloyd-Thomas A, Keverne EB. Role of the brain and accessory olfactory system in the block to pregnancy in mice. *Neuroscience* 1982;7:907–13.
- [65] Lomas DE, Keverne EB. Role of the vomeronasal organ and prolactin in the acceleration of puberty in female mice. *J Reprod Fertil* 1982;66:101–7.
- [66] Luo M, Fee MS, Katz LC. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 2003;299:1196–201.
- [67] Ma D, Allen ND, Van Bergen YC, Jones CM, Baum MJ, Keverne EB, et al. Selective ablation of olfactory receptor neurons without functional impairment of vomeronasal receptor neurons in OMP-ntr transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2002;16:2317–23.
- [68] Mackay-Sim A, Rose JD. Removal of the vomeronasal organ impairs lordosis in female hamsters: effect is reversed by luteinising hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 1986;42:489–93.
- [69] Mandiyan VS, Coats JK, Shah NM. Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice. *Nat Neurosci* 2005;8:1660–2.
- [70] Martel KL, Keller M, Douhard Q, Bakker J, Baum MJ. Comparison of odor-induced glomerular activation in the main olfactory bulb of aromatase knock-out and wild type female mice. *Neurosci Lett* 2007;421:102–7.
- [71] Martel KL, Baum MJ. A centrifugal pathway to the mouse accessory olfactory bulb from the medial amygdala conveys gender-specific volatile pheromonal signals. *Eur J Neurosci* 2009;29(2):368–76.
- [72] Martinez-Ricos J, Agustin-Pavon C, Lanuza E, Martinez-Garcia F. Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience* 2008;153:383–95.
- [73] McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 2008;88:91–124.
- [74] Meredith M. Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol Behav* 1986;36:737–43.
- [75] Meredith M. Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;39:601–14.
- [76] Meredith M. Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiol Behav* 1994;56:345–54.
- [77] Meredith M. Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:349–61.
- [78] Meredith M, O’Connell RJ. Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J Physiol* 1979;286:301–16.
- [79] Meredith M, Howard G. Intracerebroventricular LHRH relieves behavioral deficits due to vomeronasal organ removal. *Brain Res Bull* 1992;29:75–9.
- [80] Meredith M, Fewell G. Vomeronasal organ: electrical stimulation activates Fos in mating pathways and in GnRH neurons. *Brain Res* 2001;922:87–94.
- [81] Novotny M, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2059–61.
- [82] Pankevich DE, Baum MJ, Cherry JA. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odors from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* 2004;24:9451–7.
- [83] Pankevich DE, Cherry JA, Baum MJ. Effect of vomeronasal organ removal from male mice on their preference for and neural Fos responses to female urinary odors. *Behav Neurosci* 2006;120:925–36.
- [84] Pfeiffer CA, Johnston RE. Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiol Behav* 1994;55:129–38.
- [85] Pierman S, Douhard Q, Bakker J. Evidence for a role of early oestrogens in the central processing of sexually relevant olfactory cues in female mice. *Eur J Neurosci* 2008;27:423–31.
- [86] Pierman S, Douhard Q, Balthazart J, Baum MJ, Bakker J. Attraction thresholds and sex discrimination of urinary odors in male and female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav* 2006;49:96–104.
- [87] Powers JB, Winans SS. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* 1975;187:961–3.
- [88] Preti G, Wysocki CJ, Barnhart KT, Sondheimer SJ, Leyden JJ. Male axillary extracts contain pheromones that affect pulsatile secretion of luteinizing hormone and mood in women recipients. *Biol Reprod* 2003;68:2107–13.
- [89] Rajendren G, Dudley CA, Moss RL. Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. *Neuroendocrinology* 1990;52:368–72.
- [90] Restrepo D, Arellano J, Oliva AM, Schaefer ML, Lin W. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm Behav* 2004;46:247–56.
- [91] Rodriguez I. Pheromone receptors in mammals. *Horm Behav* 2004;46:219–30.
- [92] Savic I, Berglund H, Gulyas B, Roland P. Smelling of odorous sex hormone-like compounds causes sex-differentiated hypothalamic activations in humans. *Neuron* 2001;31:661–8.
- [93] Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 1975;161:31–55.
- [94] Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Ginies C, Semon E, Perrier G. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 2003;424:68–72.
- [95] Segovia S, Guillemon A. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res* 1982;281:209–12.
- [96] Segovia S, Guillemon A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Brain Res Rev* 1993;18:51–74.
- [97] Segovia S, Guillemon A. Searching for sex differences in the vomeronasal pathway. *Horm Behav* 1996;30:618–26.

- [98] Segovia S, Paniagua R, Nistal M, Guillamon A. Effects of postpuberal gonadectomy on the neurosensorial epithelium of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res* 1984;316:289–91.
- [99] Segovia S, Guillamon A, del Cerro MC, Ortega E, Perez-Laso C, Rodriguez-Zafra M, et al. The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behav Brain Res* 1999;105:69–80.
- [100] Shinohara K, Morofushi M, Funabashi T, Kimura F. Axillary pheromones modulate pulsatile LH secretion in humans. *Neuroreport* 2001;12:893–5.
- [101] Sorwell KG, Wesson DW, Baum MJ. Sexually dimorphic enhancement by estradiol of male urinary odor detection thresholds in mice. *Behav Neurosci* 2008;122:788–93.
- [102] Spehr M, Spehr J, Ukhanov K, Kelliher KR, Leinders-Zufall T, Zufall F. Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1476–84.
- [103] Spehr M, Kelliher KR, Li XH, Boehm T, Leinders-Zufall T, Zufall F. Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J Neurosci* 2006;26:1961–70.
- [104] Stern K, McClintock MK. Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* 1998;392:177–9.
- [105] Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 2002;295:1493–500.
- [106] Swaney WT, Keverne EB. The evolution of pheromonal communication. *Behav Brain Res* 2009;200:239–47.
- [107] Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 1998;21:323–31.
- [108] Thompson ML, Edwards DA. Olfactory bulb ablation and hormonally induced mating in spayed female mice. *Physiol Behav* 1972;8:1141–6.
- [109] Trinh K, Storm DR. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci* 2003;6:519–25.
- [110] Vandenberg JG. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 1969;84:658–60.
- [111] von Campenhausen H, Mori K. Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci* 2000;12:33–46.
- [112] Wesson DW, Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. Enhanced urinary odor discrimination in female aromatase knockout (ArKO) mice. *Horm Behav* 2006;49:580–6.
- [113] Westberry J, Meredith M. The influence of chemosensory input and gonadotropin releasing hormone on mating behavior circuits in male hamsters. *Brain Res* 2003;974:1–16.
- [114] Westberry JM, Meredith M. Pre-exposure to female chemosignals or intracerebral GnRH restores mating behavior in naive male hamsters with vomeronasal organ lesions. *Chem Senses* 2003;28:191–6.
- [115] Whitten WK. Physiological control of population growth. *Nature* 1956;178:992.
- [116] Woodley SK, Cloe AL, Waters P, Baum MJ. Effects of vomeronasal organ removal on olfactory sex discrimination and odor preferences of female ferrets. *Chem Senses* 2004;29:659–69.
- [117] Wysocki CJ, Yamazaki K, Curran M, Wysocki LM, Beauchamp GK. Mice (*Mus musculus*) lacking a vomeronasal organ can discriminate MHC-determined odortypes. *Horm Behav* 2004;46:241–6.
- [118] Xu F, Schaefer M, Kida I, Schafer J, Liu N, Rothman DL, et al. Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol* 2005;489:491–500.
- [119] Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell* 2005;123:669–82.
- [120] Zufall F, Leinders-Zufall T. Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:483–9.