

Effets des décalages horaires sur le contrôle journalier du pic préovulatoire de LH par les neurones à kisspeptine

Master 2 - Mathilda Kretz

Equipe des Rythmes Neuroendocriniens de la Reproduction – CNRS Strasbourg

EPU d'AMP – 5 octobre 2019



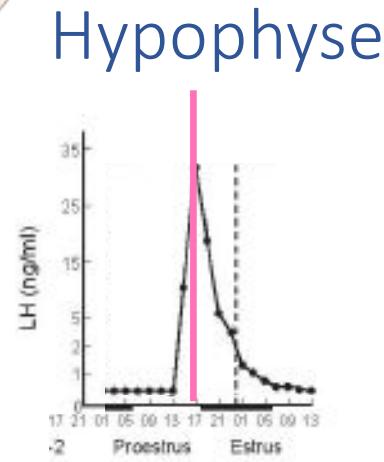
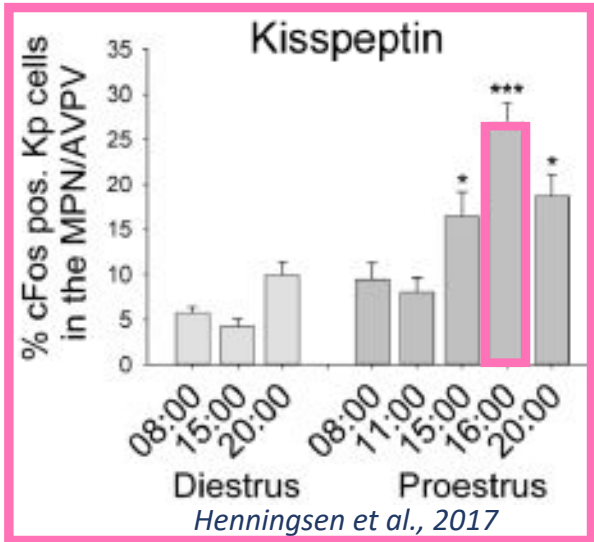
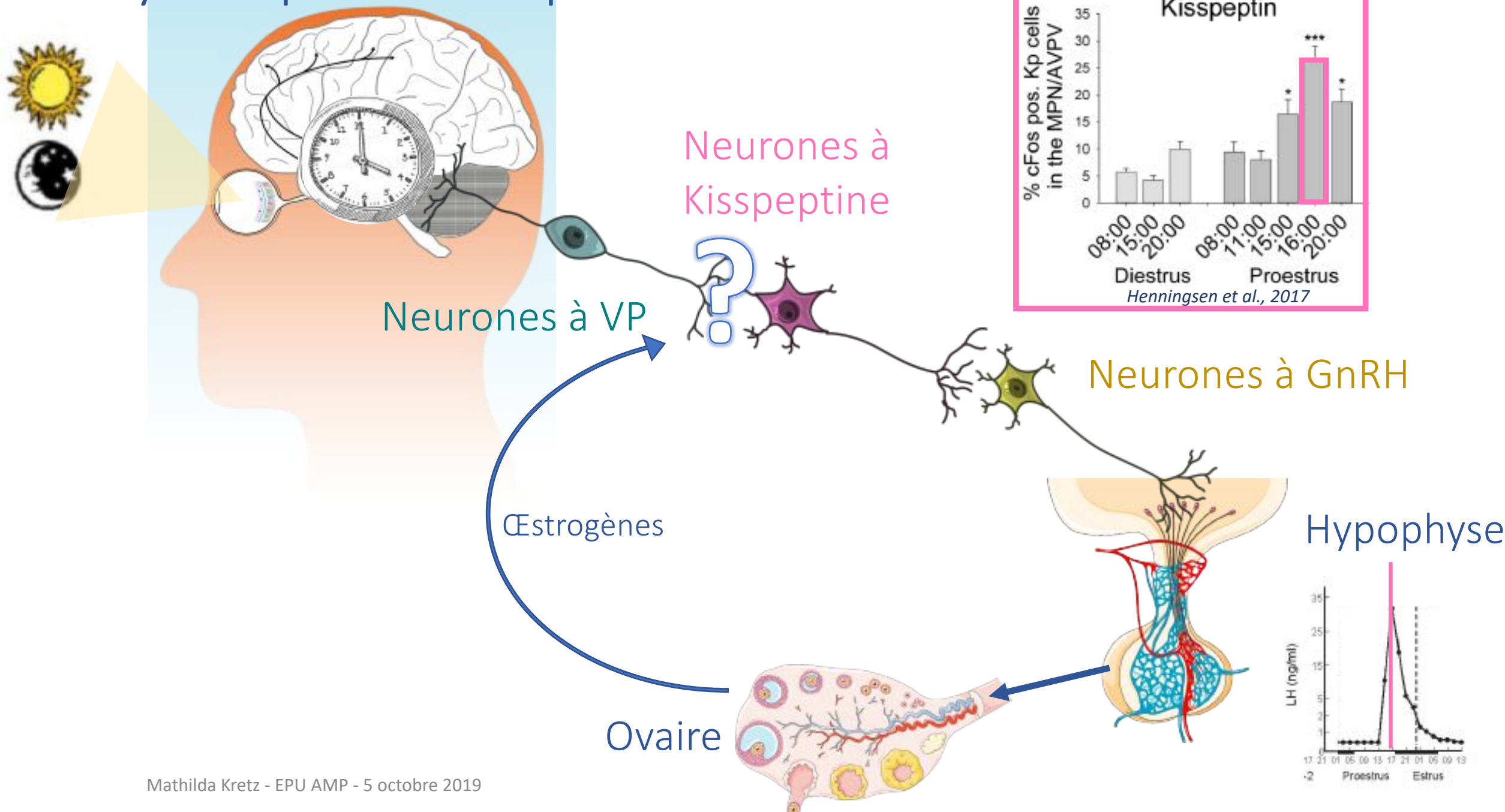
Projet de recherche: problématique



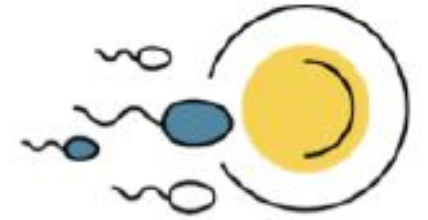
- De nos jours, le système circadien est soumis à de nombreuses altérations: travail en horaires décalés, heures de sommeil insuffisantes, surexposition à la lumière bleue...
- Chez la femme, cela peut mener à des perturbations du cycle ovarien et une baisse de la fertilité (*ANSES, 2016*)
- Actuellement, il y a peu d'études sur les conséquences du travail de nuit/posté sur la fertilité (*Simonneaux and Bahougne, Front Endocrinology, 2015*)



Noyaux suprahypophysaires



Objectifs de mon projet de recherche

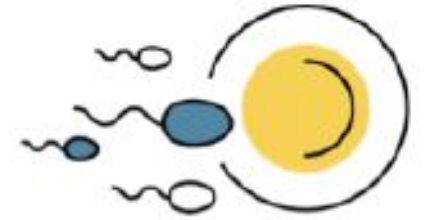


Analyser les mécanismes impliqués dans l'altération des rythmes de la reproduction:

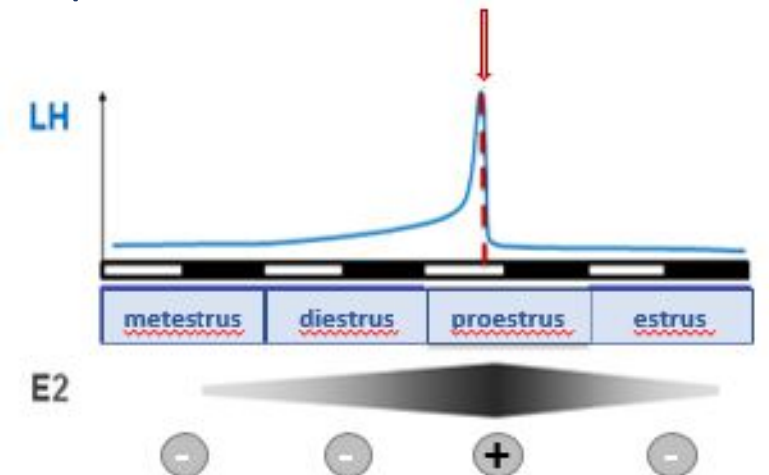
- 1) Est-ce qu'un décalage horaire peut provoquer une altération du système reproducteur?
- 2) Quel est le rôle de la signalisation de l'horloge biologique sur le pic de LH?

Matériels & Méthodes:

Modèle animal: la souris femelle C57BL/6J

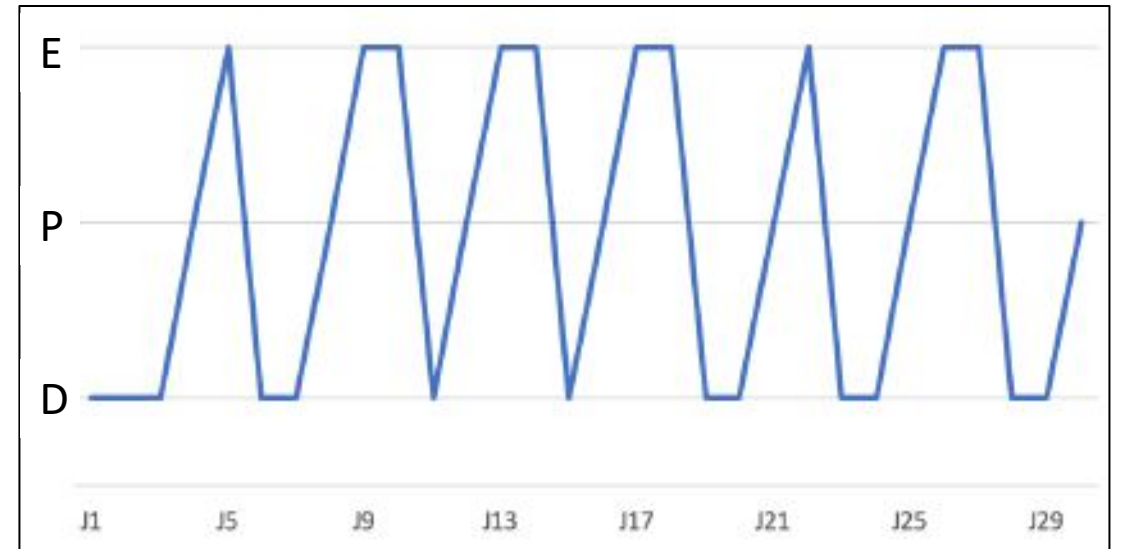
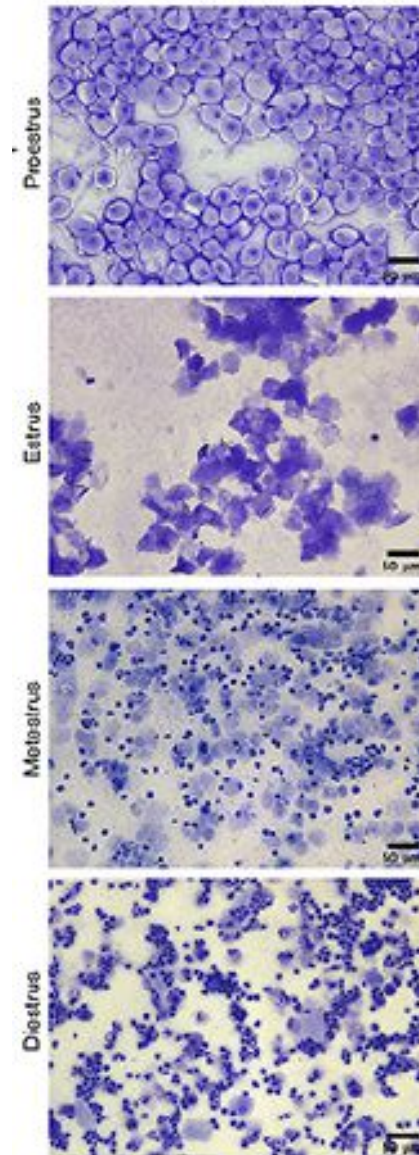


- Nocturne
- Cycle ovarien/estrien d'une durée de 4,5 jours et composé de 3 phases (diestrus, proestrus, estrus)
- Occurrence du pic préovulatoire de LH à la fin de la période de repos (donc à la transition jour/nuit) le jour du proestrus
- Deux paramètres étudiés:
 - Les cycles estriens
 - La sécrétion de LH



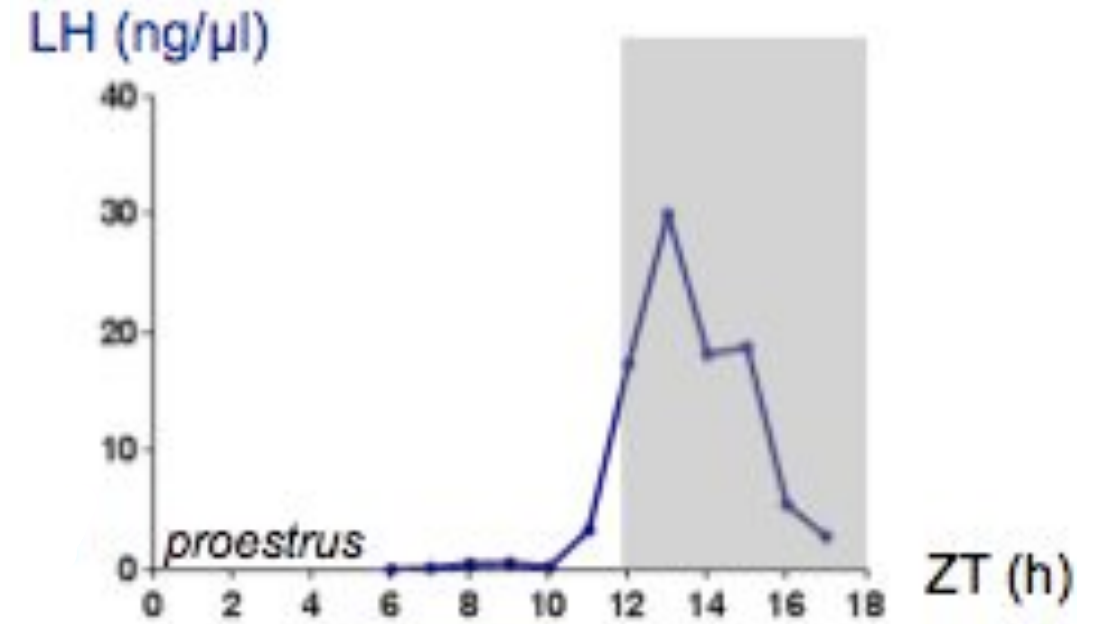
Christian et al., PNAS 2005

Frottis vaginaux



Dosage de la LH par ELISA sandwich

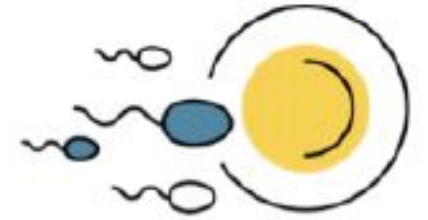
Prélèvement de quelques μL au bout de la queue



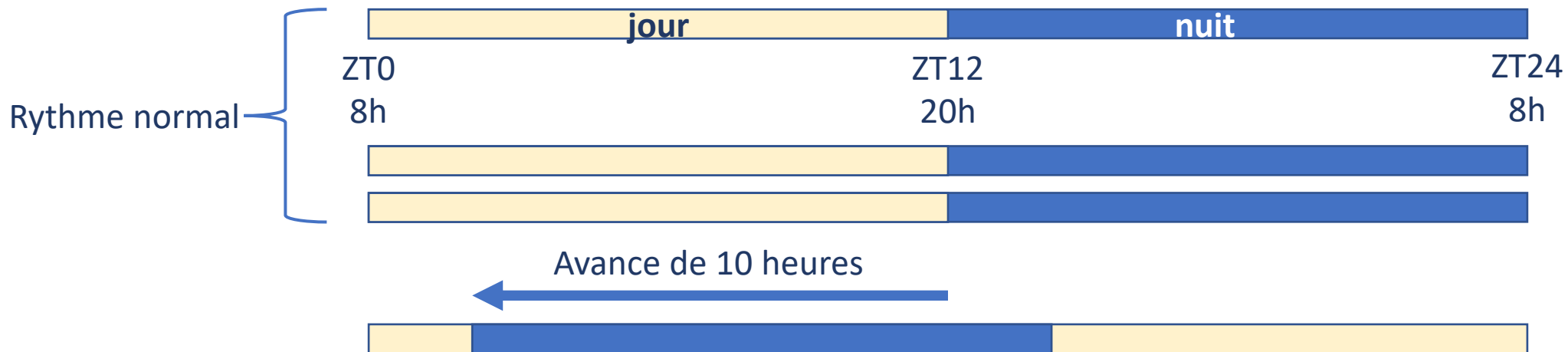
Steyn et al., 2013

---> Eviter le stress des manipulations

Effets du décalage horaire aigu & chronique

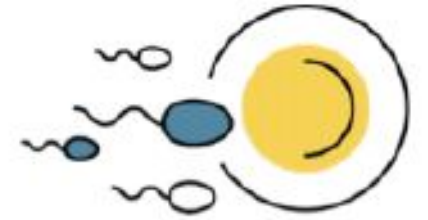


- Souris femelles C57BL/6
- Deux situations expérimentales:
 - 1) Décalage horaire de 10h unique (*jet lag*)
 - a) Une avance de phase

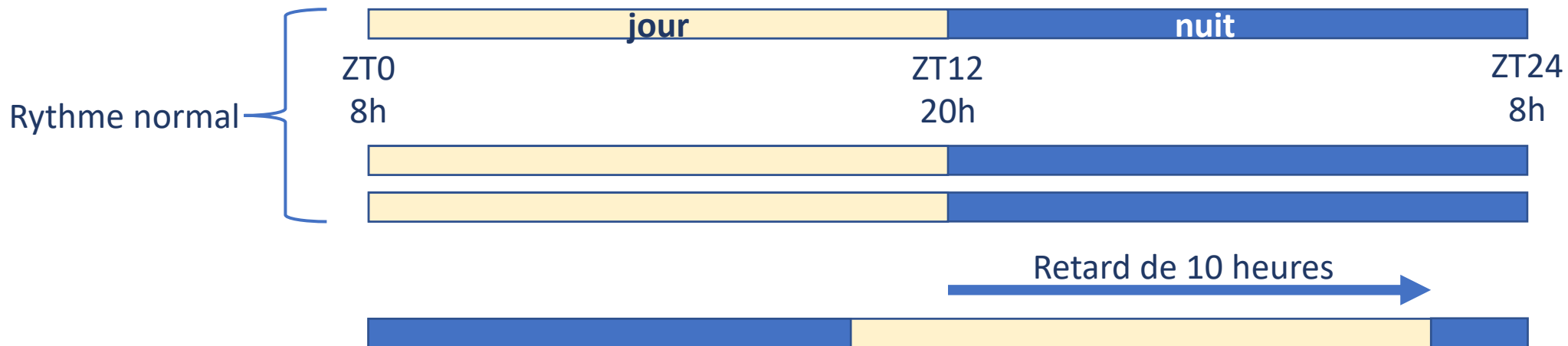


Bahougne & Kretz et al, *en préparation*

Effets du décalage horaire aigu & chronique

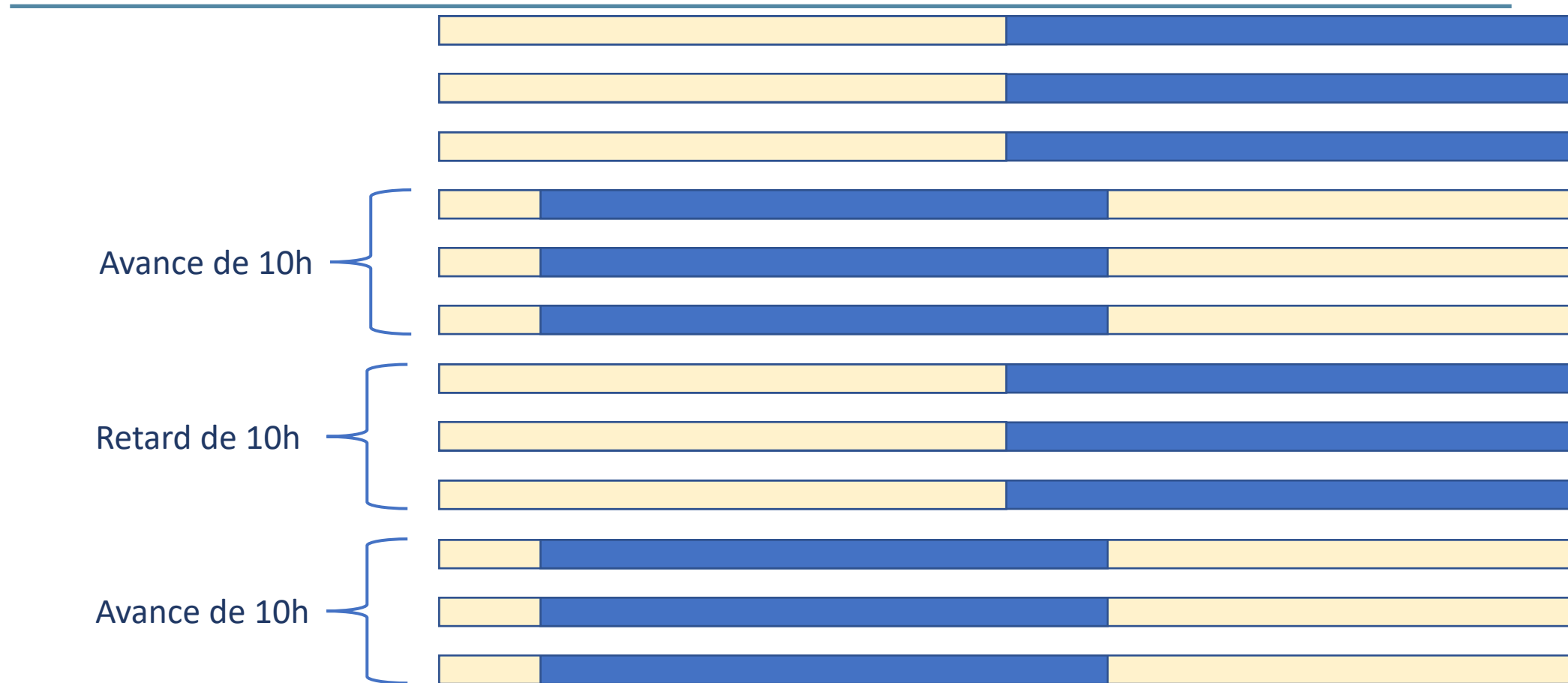
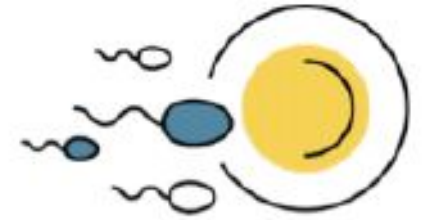


- Souris femelles C57BL/6
- Deux situations expérimentales:
 - 1) Décalage horaire de 10h unique (*jet lag*)
 - b) Un retard de phase

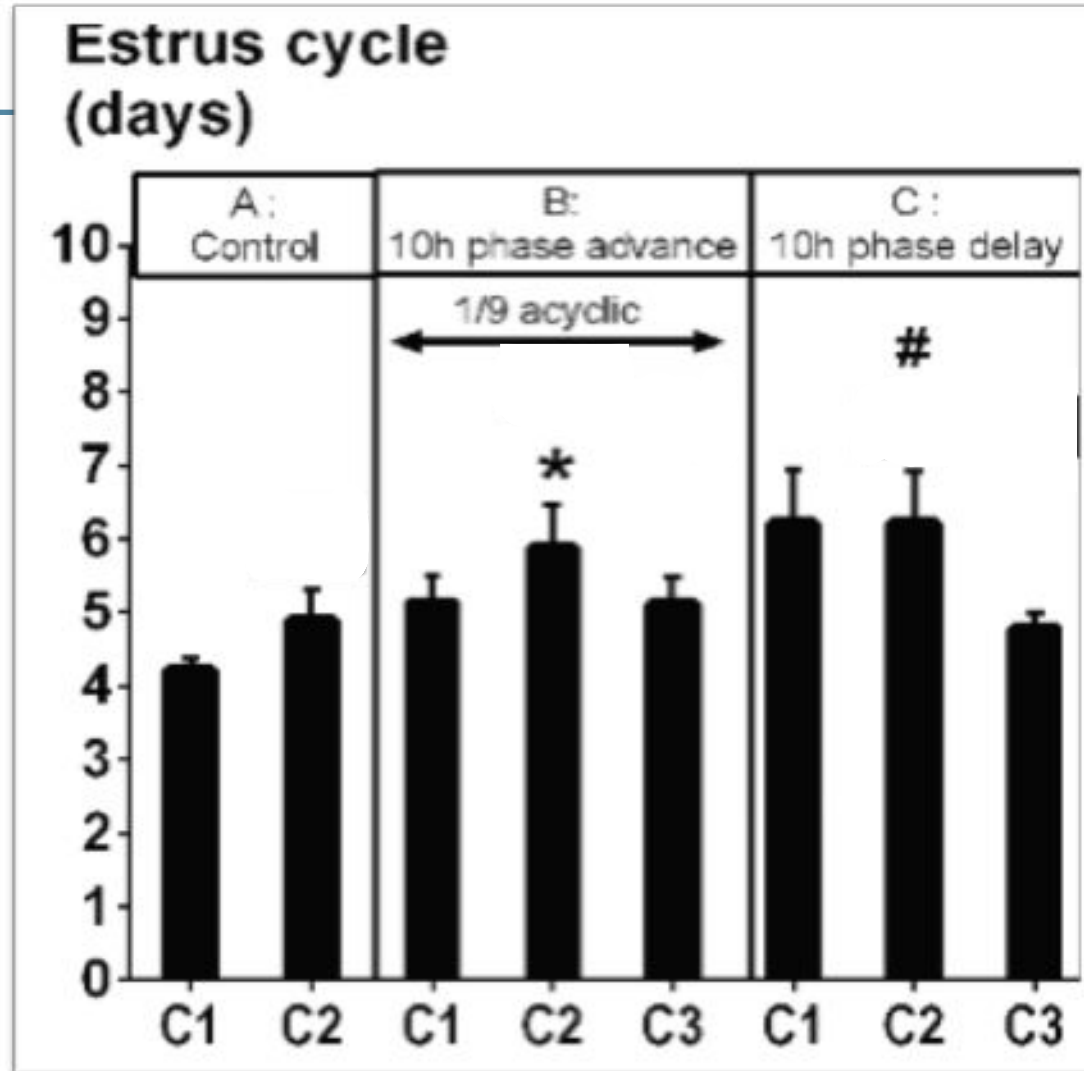
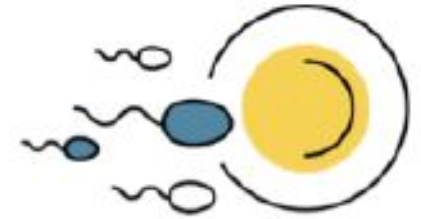


Bahougne & Kretz et al, *en préparation*

2) Une alternance avance/retard de phase de 10h tous les 3 jours (*shift work*)

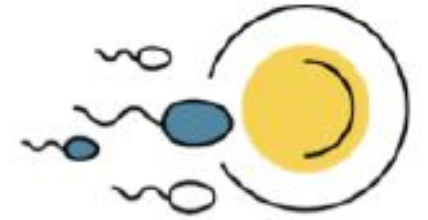


Décalage de phase de 10h unique: Effet sur les cycles estriens



Normalisation à partir du 3ème cycle

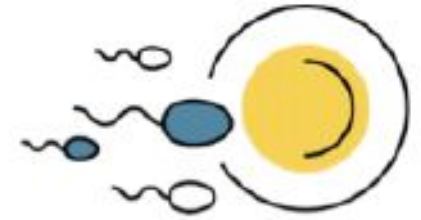
Décalage de phase de 10h unique: Effet sur le pic préovulatoire de LH



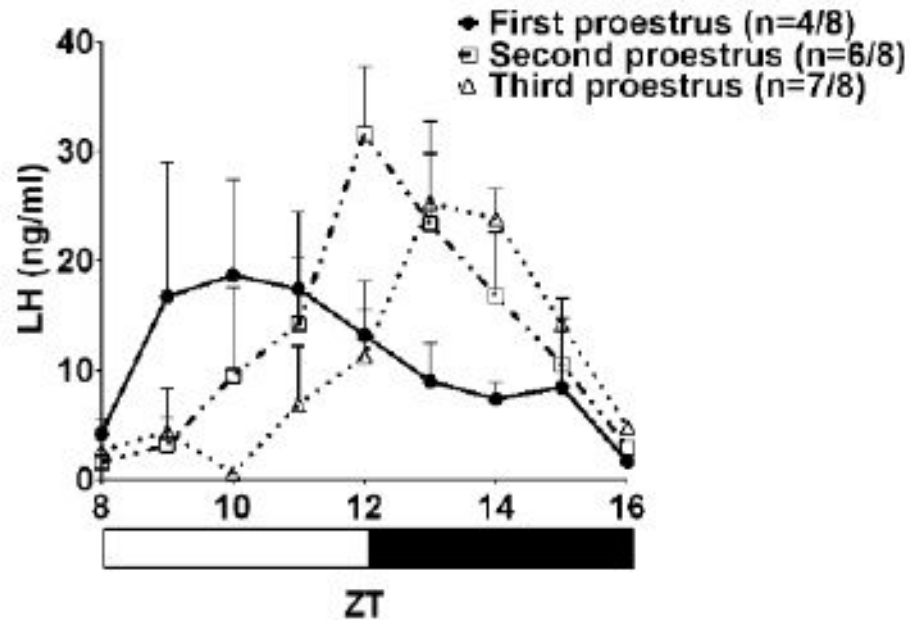
	Contrôle	Avance de phase			Retard de phase		
	P2	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Occurrence d'un pic de LH	89% (n=8/9)	50% (n=4/8)	75% (n=6/8)	88% (n=7/8)	55% (n=5/9)	78% (n=7/9)	89% (n=8/9)

Normalisation quasi complète à partir du 3ème cycle

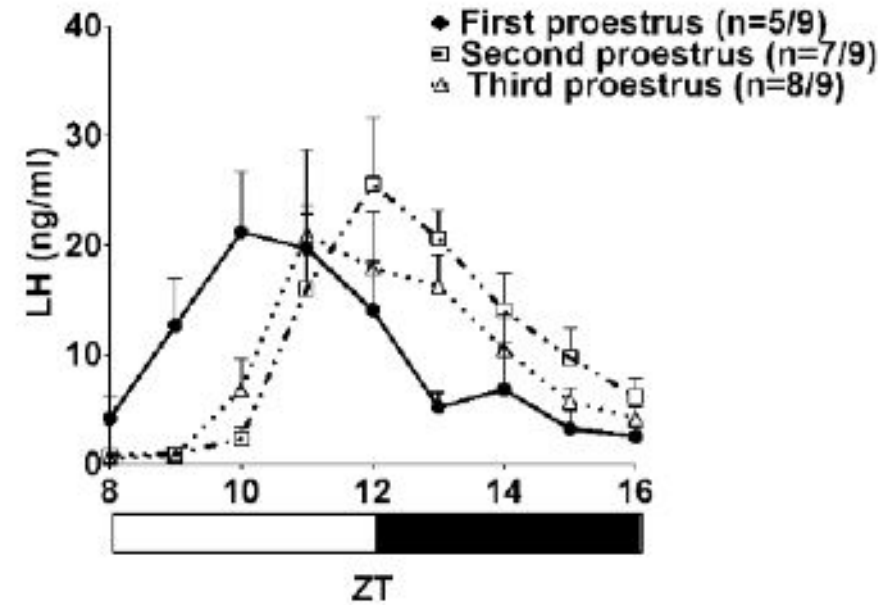
Décalage de phase de 10h unique: Effet sur le pic préovulatoire de LH



10h phase advance

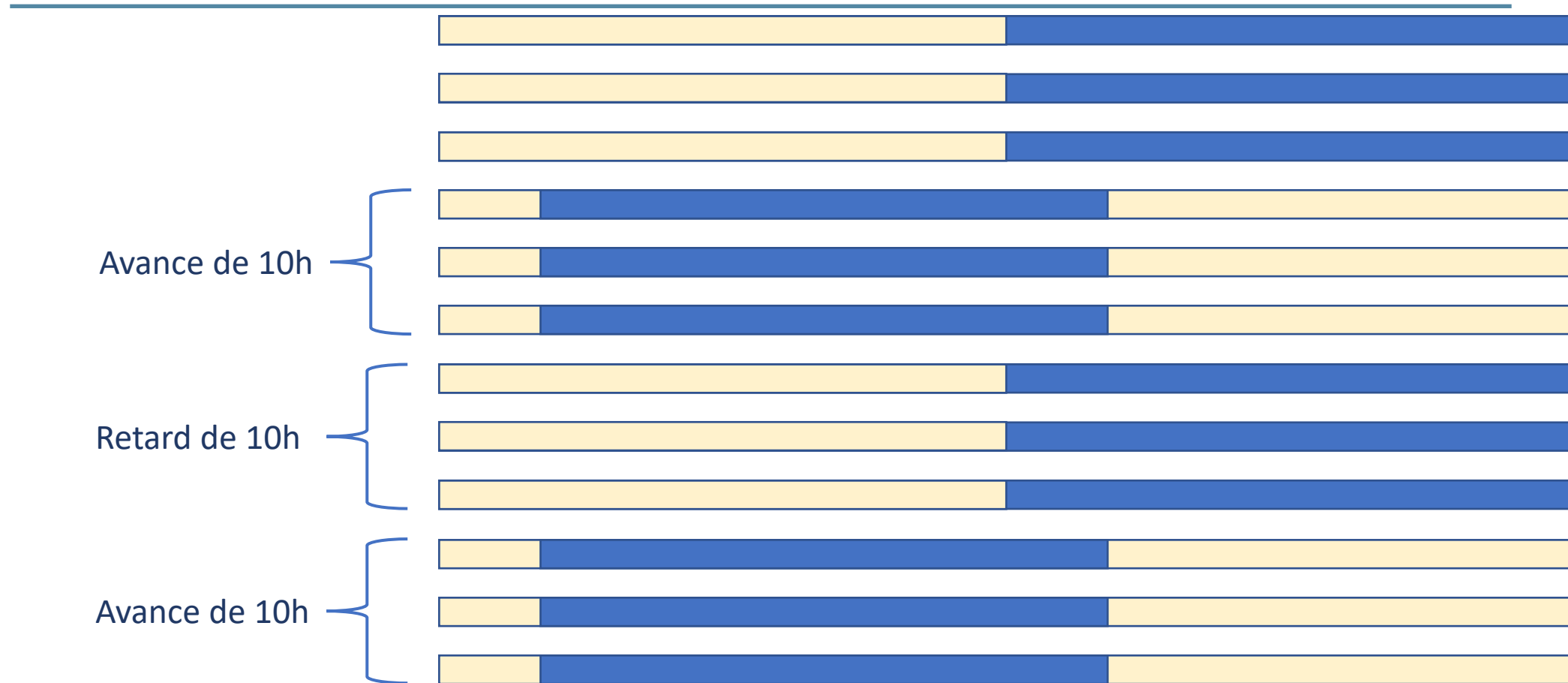
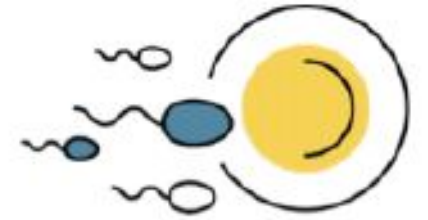


10h phase delay

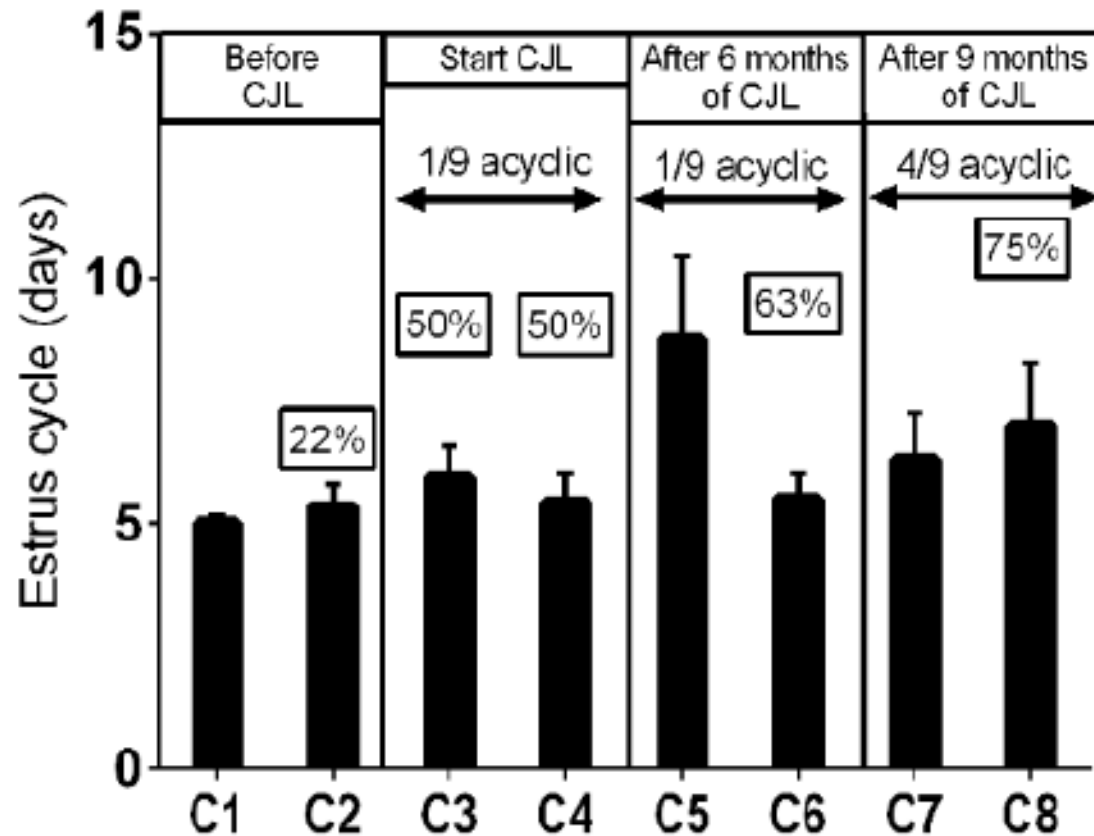
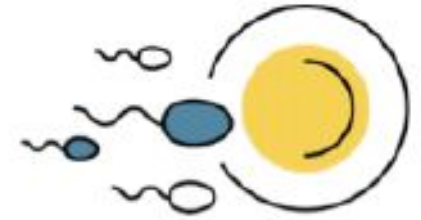


Avance du pic au 1^{er} proestrus puis normalisation

2) Une alternance avance/retard de phase de 10h tous les 3 jours (*shift work*)

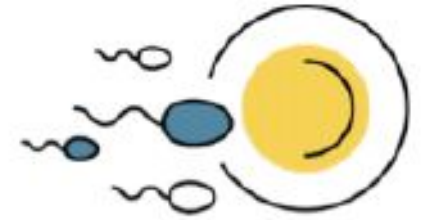


Avance/retard de phase chronique: Effet sur les cycles estriens



Aucune adaptation après 6 mois

Avance/retard de phase chronique : Effet sur la sécrétion de LH

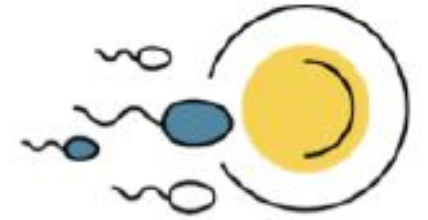


	Avant shift	Au début du shift		Après 6 mois de shift		Après l'arrêt du shift	
	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Occurrence d'un pic de LH	78% (n=7/9)	0% (n=0/8)	25% (n=2/8)	12,5% (n=1/8)	12,5% (n=1/8)	0% (n=0/5)	20% (n=1/5)

Forte perturbation
de l'occurrence du pic de LH

Aucune adaptation après 6 mois

Conclusions intermédiaires



- Un décalage horaire aigu (*jet lag*) perturbe peu le cycle reproducteur des souris femelles avec une adaptation rapide et durable dans le temps
- Un décalage chronique (*shift work*) altère fortement le cycle reproducteur, notamment
 - la régularité du cycle estrien
 - le profil de sécrétion de LH

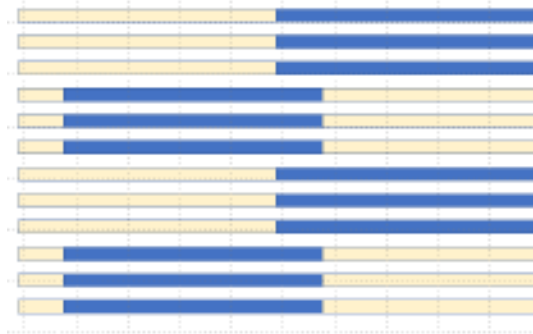
Expérience 1: effet d'un décalage horaire **chronique** sur le système reproducteur



69 souris C57BL/6J

Suivi des cycles oestriens

35 souris en décalage horaire
durant 4 semaines

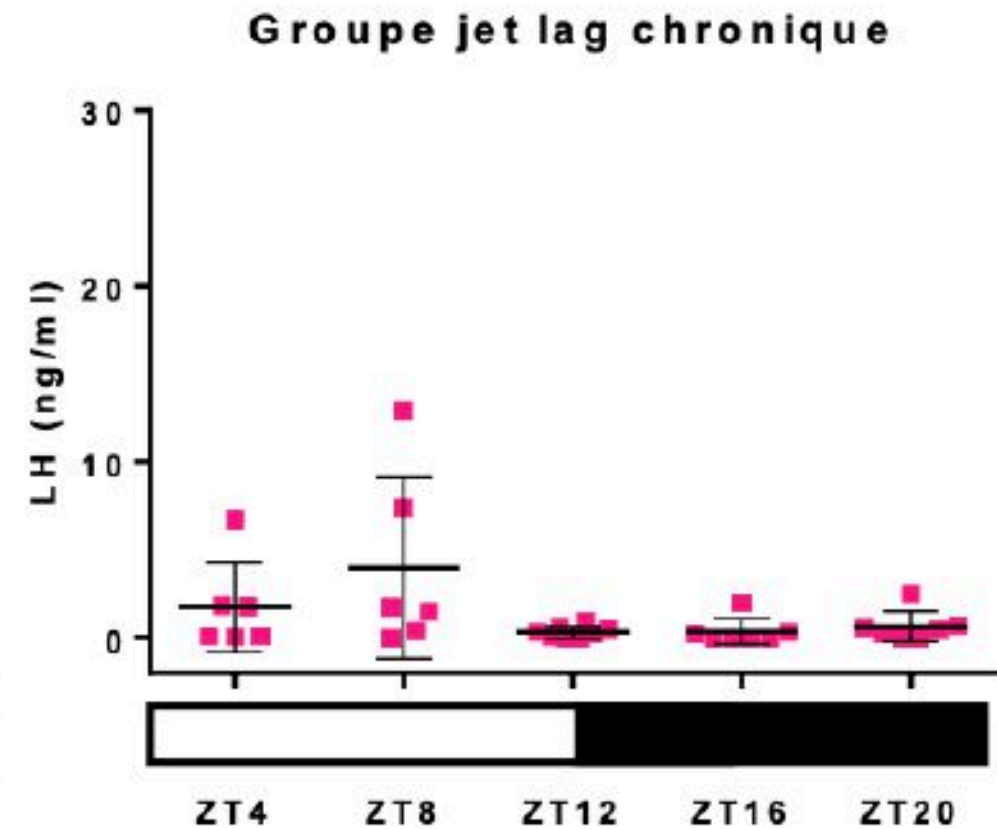
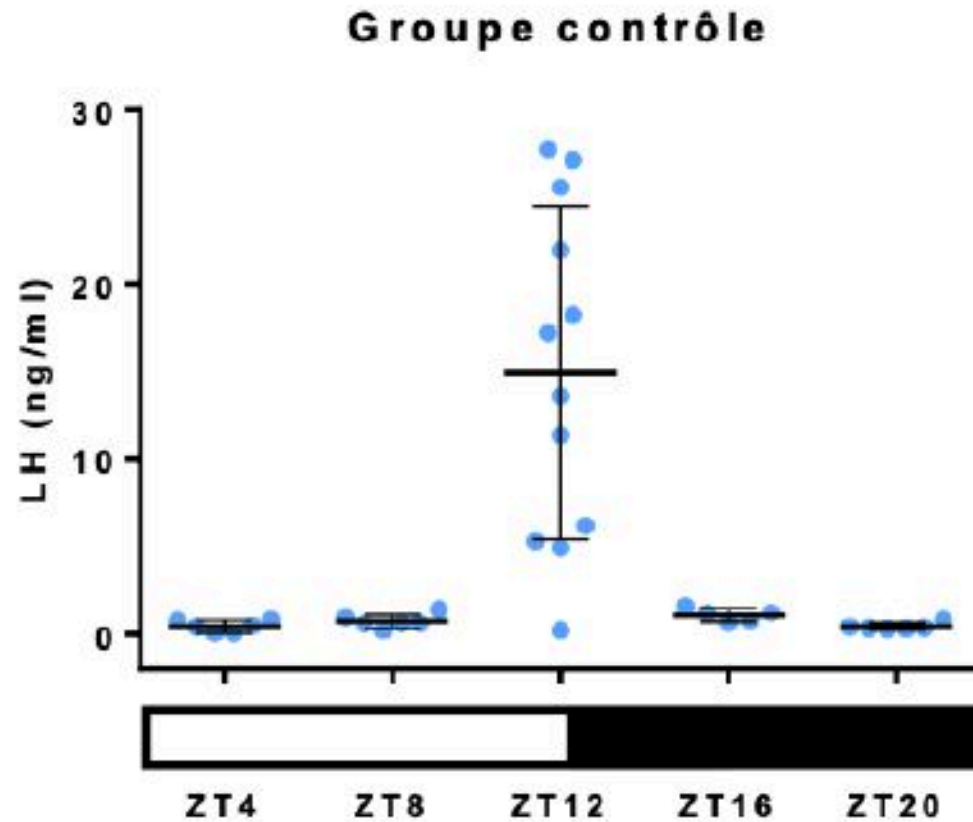
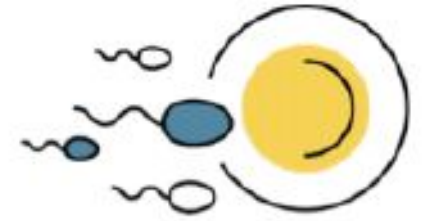


34 souris dans des
conditions lumineuses normales

Le jour du proestrus suivant:
perfusion
dosage de LH
+ double immunomarquage
cFos/Kp à différents points
horaires

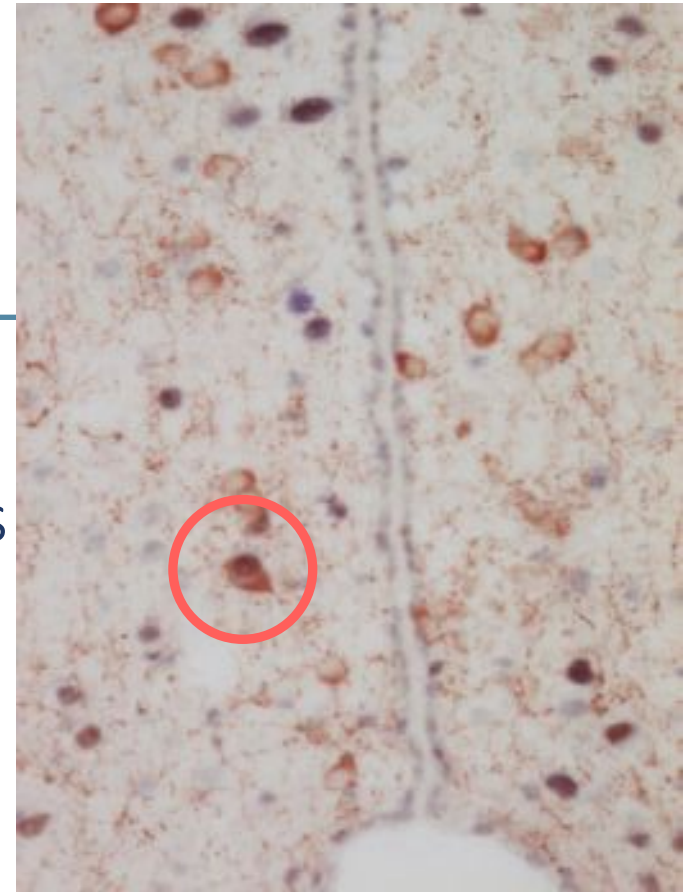
---> Quels sont les effets de ce décalage chronique?

Le décalage horaire chronique perturbe l'occurrence du pic préovulatoire de LH



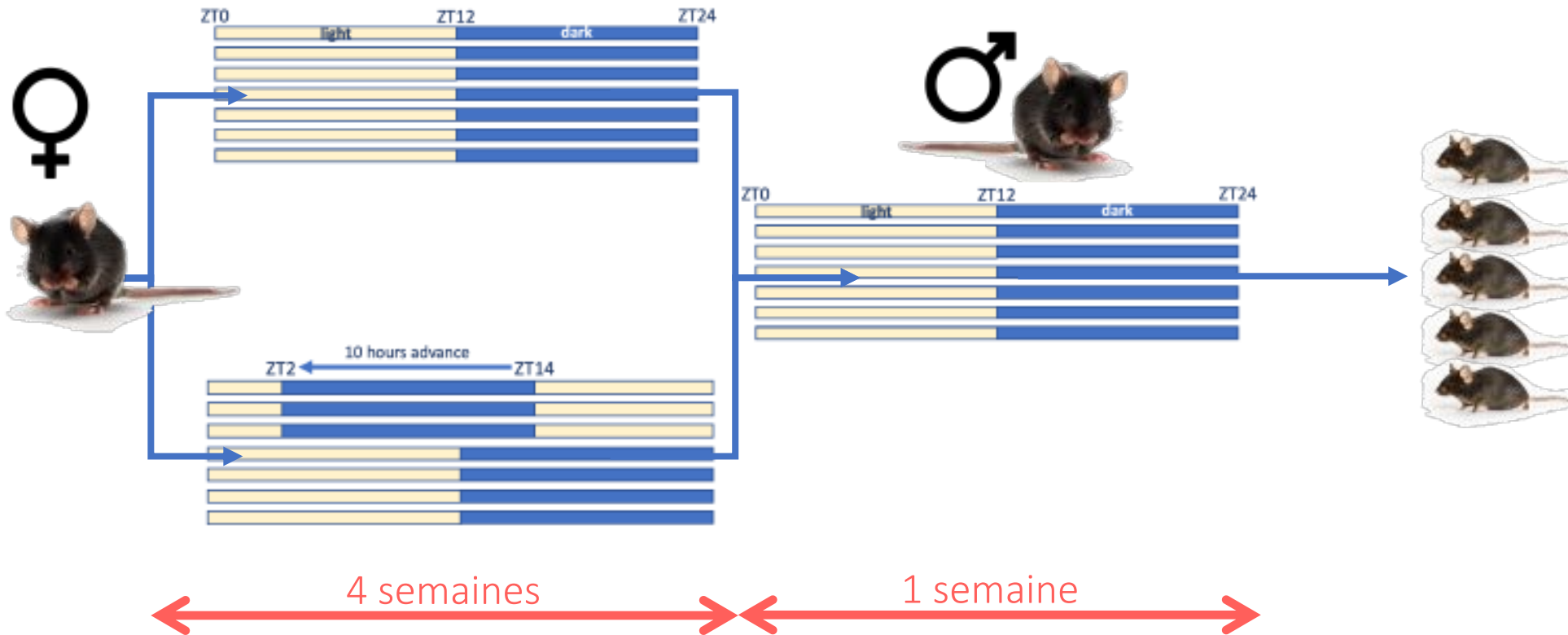
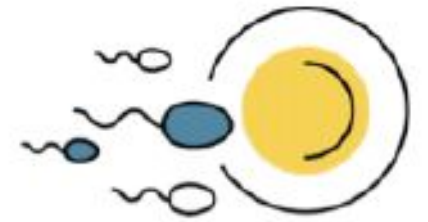
Perspectives 1

- Comparer les activités des neurones à Kp par double immunomarquage Kp/cFOS entre les 2 groupes
 - Technique développée ✓



- Etudes complémentaires sur les plasmas: FSH, œstradiol, prolactine, cortisol...?

Expérience 2: Fertilité spontanée après un jetlag chronique

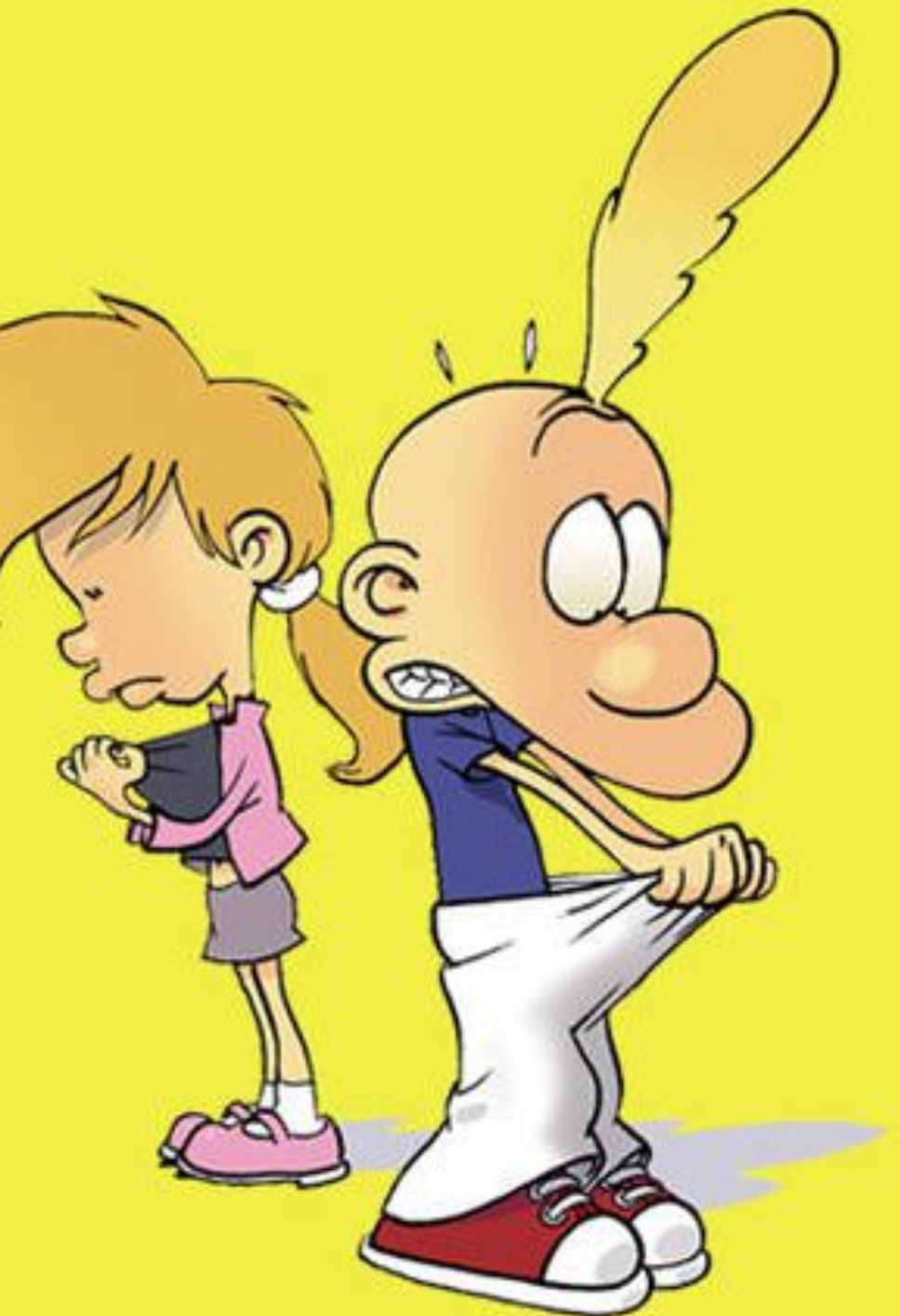


Groupe contrôle:

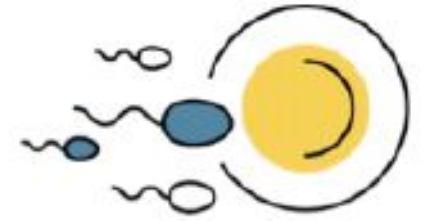
- Taux gestation: 78%
- 7,7 petits par portées

Groupe jetlag:

- Taux gestation: 57%
- Naissances plus **tardives** dans le groupe jetlag
- **5,4** petits par portées



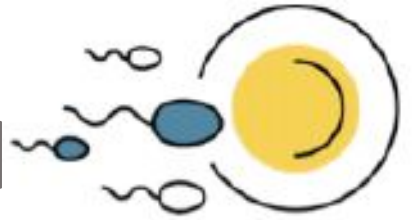
Perspectives 2



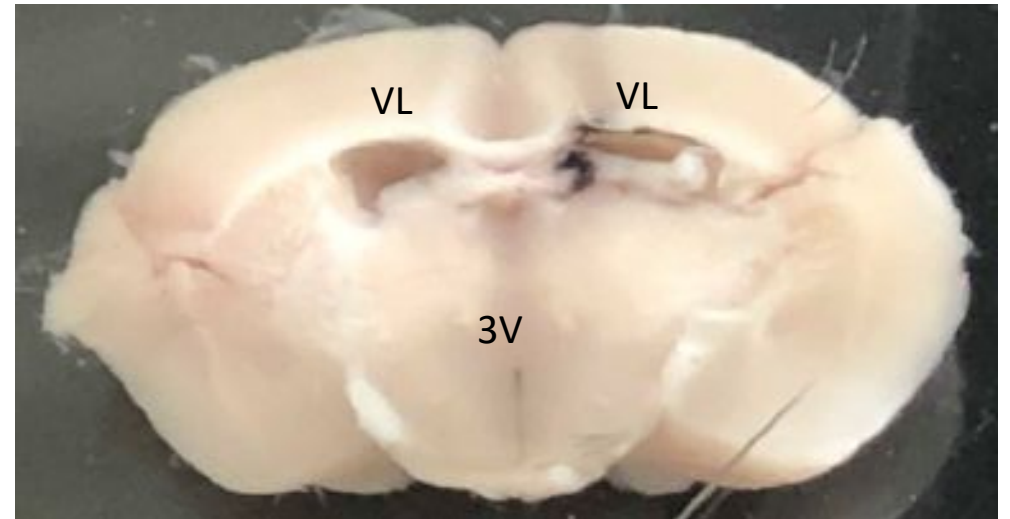
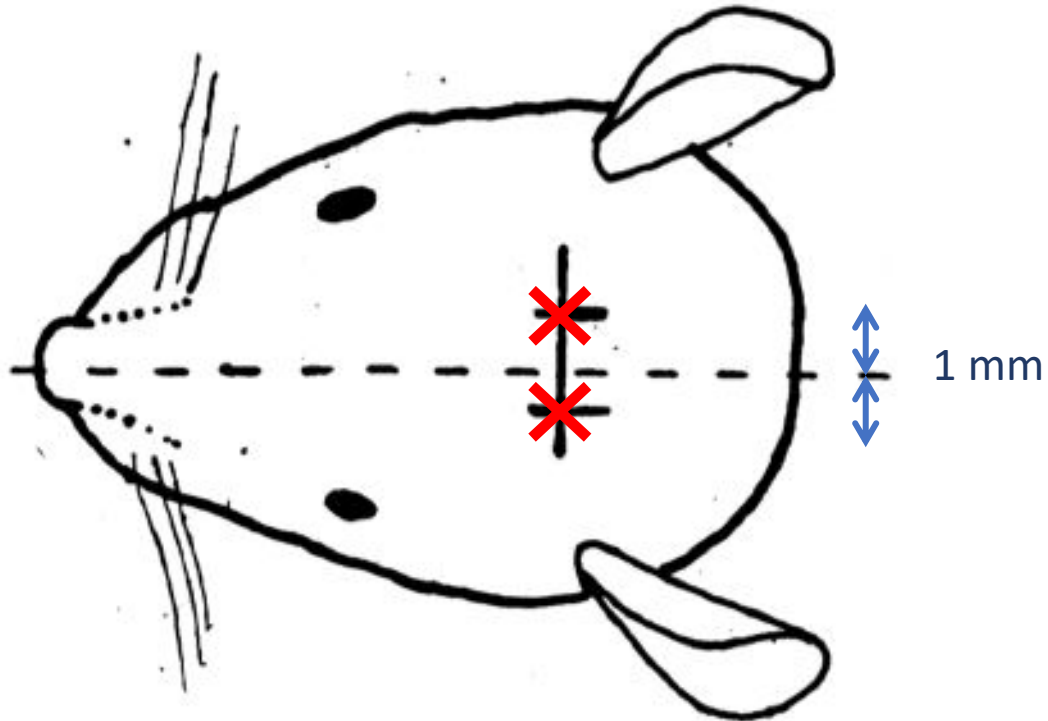
- Analyse de la survenue de la puberté
- Modèle de femelle gestante soumise à un CJL intéressant
 - applicable à différents moments: pré-; per-; post-gestationnel
 - Études de l'impact sur la descendance: puberté, fertilité future, survenue de la ménopause...
 - Études d'épigénétiques ...

Expérience 3:

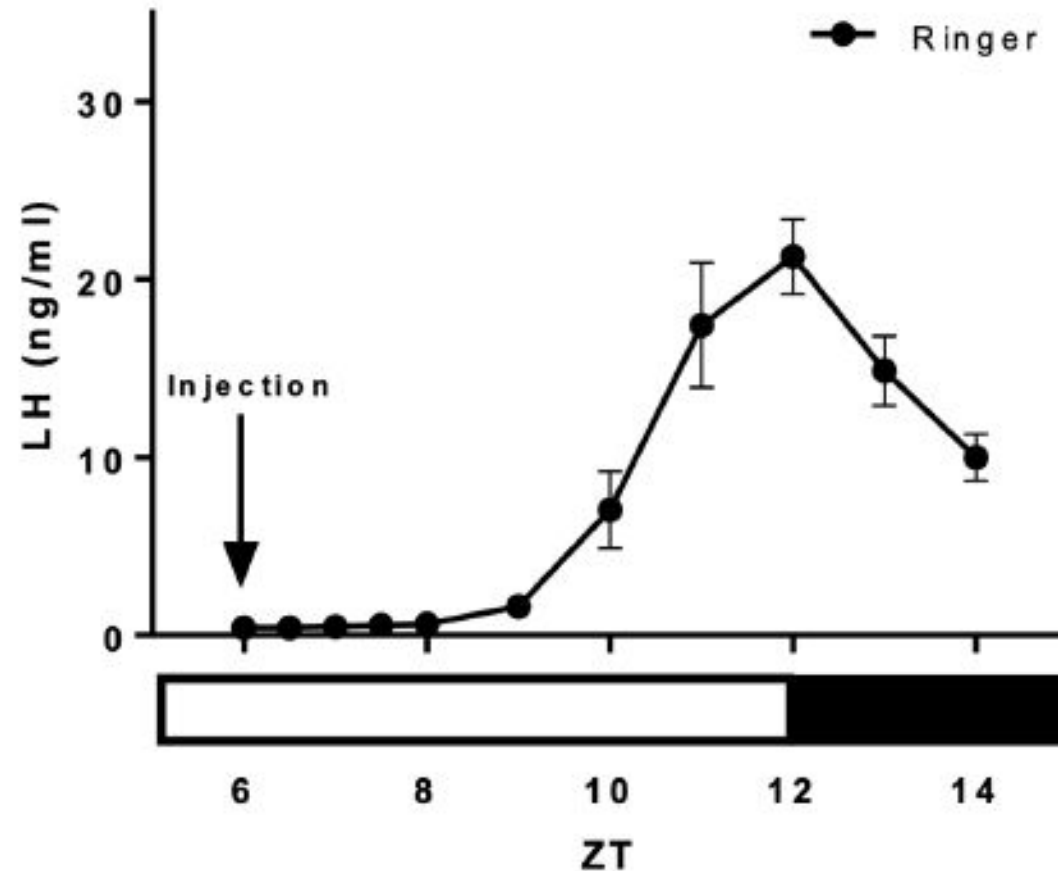
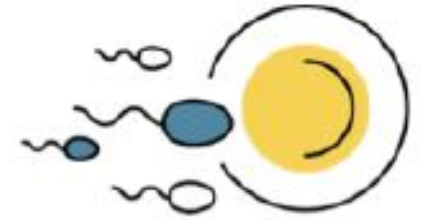
effet de neuropeptides sur la sécrétion de LH



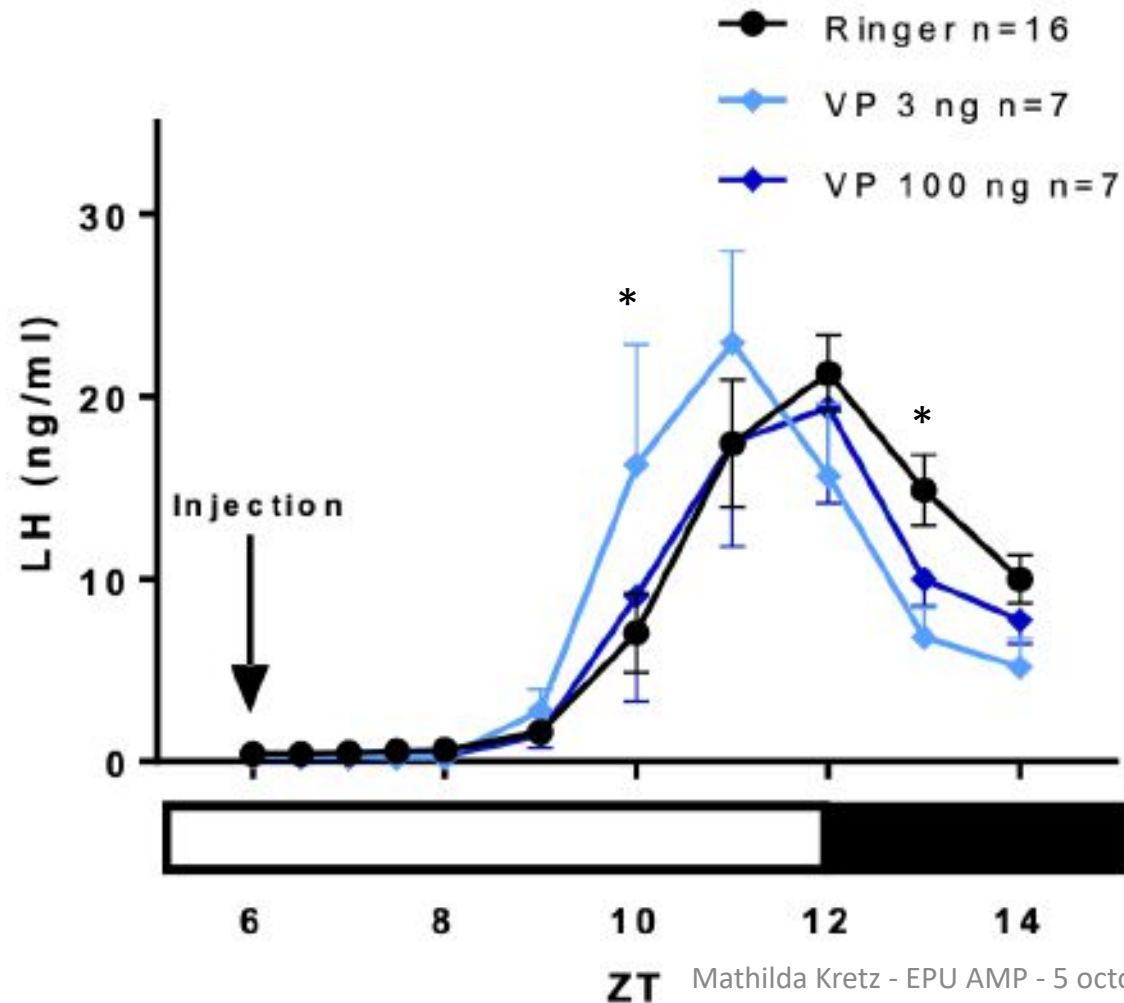
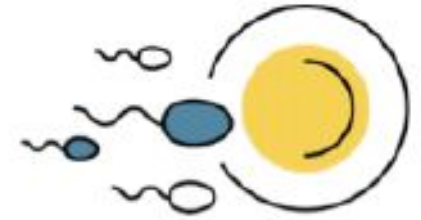
- Injection IntraCérébroVentriculaire (icv) *In Vivo* à ZT6
- Anesthésie gazeuse (isoflurane) durant 15 min (durée de l'injection icv)



Etape 1: Vérifier l'innocuité du protocole

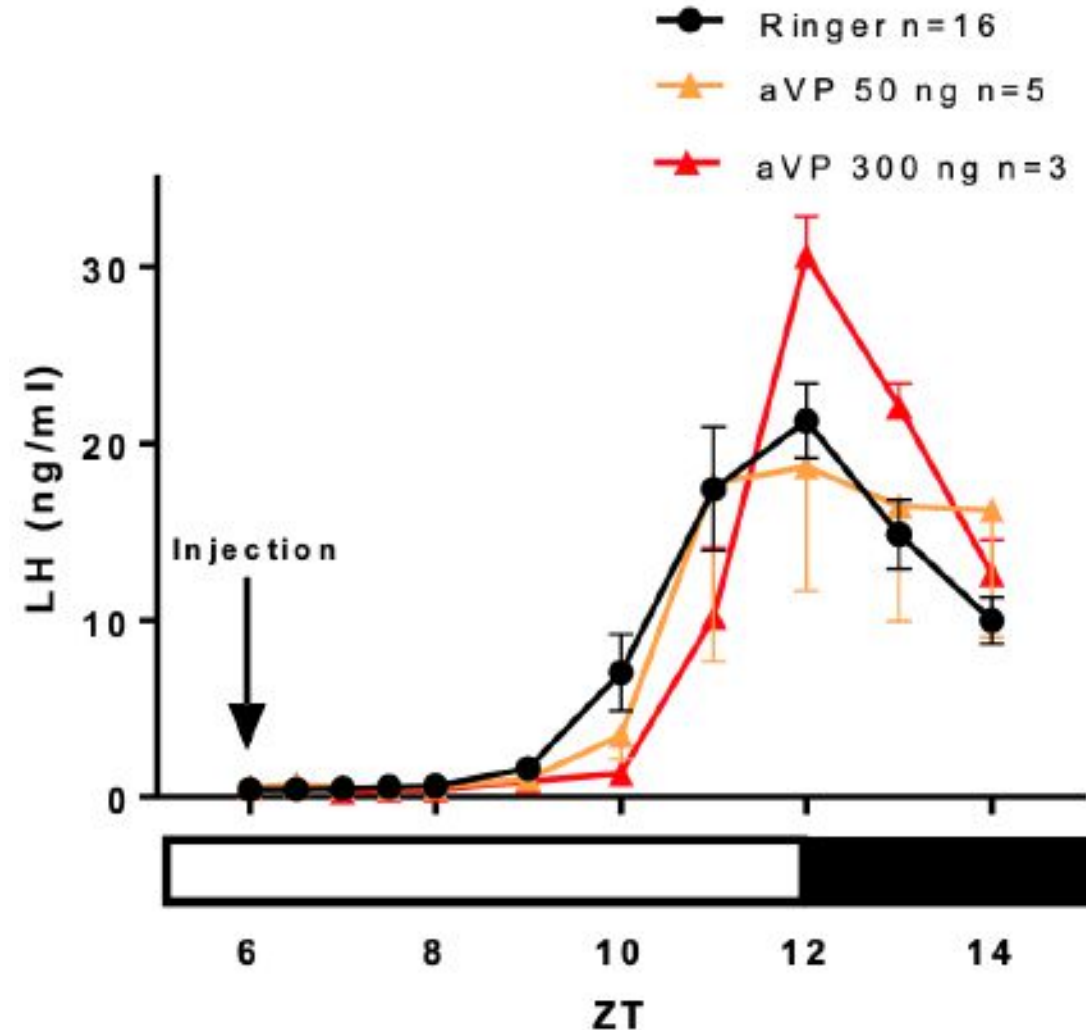
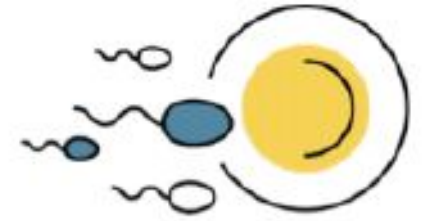


Etape 2: La vasopressine 3 ng avance le pic de LH d'environ 1 heure



---> Comparer l'activation des neurones à Kp entre ZT10 et ZT13 par immunohistochimie après injection de VP/Ringer

Etape 3: L'antagoniste de la VP semble retarder le pic de LH



Perspectives 3



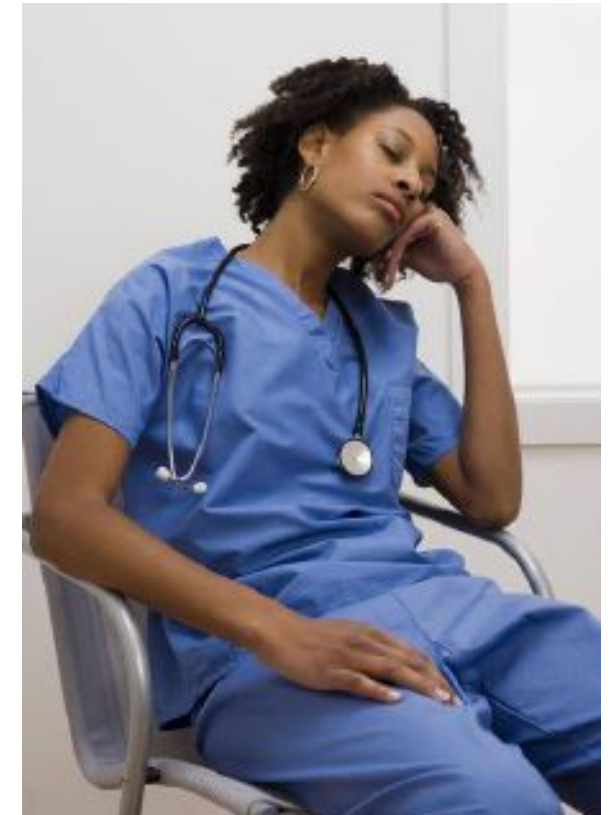
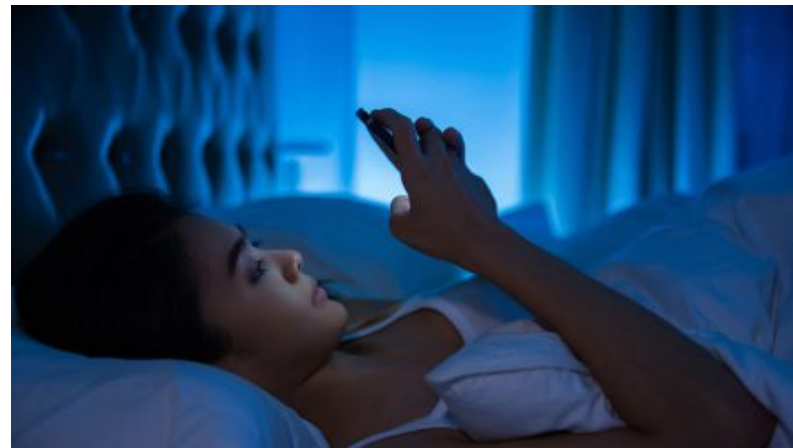
- Augmenter l'effectif
- Comparer les heures d'injection
- Effectuer l'injection d'un autre peptide de l'horloge: le VIP
- Restaurer une rythmicité journalière en jouant sur l'activité de l'horloge?



Avenir



- Intégrer dans l'interrogatoire la notion de rythme biologique:
 - Sommeil
 - Exposition à la lumière bleue
 - Horaires de travail



Night Shift DOCTOR be like

Start of
Shift

End of
Shift



9 pm

1 am

4 am

7 am

Merci pour votre attention