

Mémoire

Auteur : Spenlé, Rachel

Promoteur(s) : Plumier, Jean-Christophe; Cornil, Charlotte

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/16052>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Les effets de la contraception hormonale sur les mécanismes cérébraux associés à la motivation sexuelle et l'anxiété

Rachel Spenlé – août 2022
Département Biologie, Ecologie, Evolution
Faculté des Sciences
Master 2 biologie des organismes et évolution
Finalité approfondie éthologie

Mémoire réalisé dans l'équipe de Dr Charlotte Cornil
Laboratoire de Neuroendocrinologie
GIGA neurosciences
Encadrante : Dr Catherine de Bournonville
Promoteur : Dr Jean-Christophe Plumier
Co-promoteur : Dr Charlotte Cornil



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Charlotte Cornil, qui m'a permis d'intégrer son équipe de recherche dans le cadre de ce mémoire. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a toujours accordée et pour m'avoir accompagnée tout au long de ce projet de recherche. Cette opportunité m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances, la rigueur nécessaire à la matière scientifique, lesquelles me seront fort utiles dans le cadre d'un futur doctorat en neuroendocrinologie.

Je tiens évidemment à remercier l'ensemble de son équipe qui m'a accueillie en son sein et avec laquelle j'ai travaillé durant mes mois de stage. Je remercie tout particulièrement le Dr Catherine de Bournonville, qui m'a encadrée au quotidien, assurant avec bienveillance et pédagogie mon apprentissage des notions, des manipulations, et ce dans un climat de confiance. Sa pédagogie et sa patience m'ont permis de m'investir sereinement dans le travail confié, et de m'approprier les compétences nécessaires à un travail de recherche. Je la remercie, comme je remercie le Dr Charlotte Cornil, pour m'avoir également épaulée et conseillée dans le travail d'écriture de ce mémoire.

Je remercie l'ensemble des chercheurs du GIGA pour leur soutien, leur accueil ainsi que leur bonne humeur au quotidien. Mes journées de stages resteront de très bons souvenirs. J'ai eu l'opportunité de faire de très belles rencontres qui m'ont, entre autres, donné l'envie de continuer dans le monde de la recherche.

Je les remercie de m'avoir soutenue lors de ma période de préparation au concours de l'école doctorale. L'ensemble des personnes avec qui j'ai pu échanger m'ont accompagnée dans mes recherches pour ma thèse et l'attente de mes résultats.

Je quitte alors le GIGA neurosciences et l'équipe du Dr Charlotte Cornil avec beaucoup de bons souvenirs et d'excellentes bases pour m'investir dans un futur sujet de doctorat. J'espère pouvoir les revoir très bientôt à l'occasion de congrès ou de formations.

Résumé

La pilule contraceptive est l'une des méthodes de contraception les plus utilisées, mais de nombreux effets secondaires sont rapportés, incluant une baisse de libido. Ce travail de mémoire a été réalisé de février à août 2022, sous la supervision de Catherine de Bournonville dans l'équipe de Dr Charlotte Cornil, au sein du laboratoire de neuroendocrinologie du GIGA neurosciences. Son objectif était d'étudier les effets de la contraception hormonale sur les mécanismes cérébraux associés à la motivation sexuelle et l'anxiété. Nous nous sommes focalisés sur deux composants classiques des pilules, l'éthinylestradiol (EE) et le lévonorgestrel (LNG), administrés seuls ou combinés.

Une étude précédente du laboratoire d'accueil avait mis en évidence que les femelles traitées au LNG montraient des comportements d'évitement des mâles lors de test de préférence de partenaire. Le traitement LNG diminuait également l'activation neuronale mesurée en réponse aux odeurs de mâles par l'expression de la protéine Cfos dans plusieurs régions du cerveau impliquées dans le contrôle du comportement sexuel, notamment dans les neurones exprimant les récepteurs œstrogéniques alpha ($ER\alpha$). Ces résultats indiquent que l'activation des circuits sensibles aux œstrogènes est nécessaire à la motivation sexuelle et que les traitements hormonaux semblent affecter leur réponse. On peut se demander si les traitements influencent également les circuits impliqués dans la production des neuro-œstrogènes. Ce projet avait donc pour objectif de déterminer si les neurones exprimant l'aromatase, enzyme de synthèse des œstrogènes, sont également affectés par ces composés. Afin de visualiser les neurones qui expriment l'aromatase, nous avons utilisé des souris ARO-IPIN exprimant la bêta galactosidase (BGal) dans les neurones qui expriment l'aromatase.

Les traitements ont été délivrés pendant 5 à 6 semaines à l'aide de mini-pompes osmotiques, remplies avec une formule contraceptive classique (LNG+EE), les composés isolés (LNG ou EE), ou une solution contrôle. Comme attendu, les traitements n'ont pas eu d'effet sur les cycles ovariens nous permettant d'étudier le comportement. Aucun effet n'a également été observé sur les mesures d'anxiété. Le marquage Cfos suggère que la contraception n'aurait pas d'impact sur le traitement des informations olfactives par l'amygdale médiane, BST et cortex piriforme, mais perturberait leur intégration dans l'hypothalamus. Enfin, aucun impact des traitements n'a été détecté sur l'expression de BGal et de la co-expression de BGal et Cfos indiquant que les neurones à aromatase ne sont pas impliqués dans ce processus.

Liste des abréviations

CH	Contraceptifs hormonaux
GnRH	Gonadotrophine releasing hormone
LH	Hormone lutéinisante
FSH	Hormone folliculo-stimulante
EE	Ethinyl estradiol
E2	17 β -œstradiol
LNG	Lévonorgestrel
BGal	β -galactosidase
CT	Animaux contrôles exposés aux odeurs mâles
CTC	Animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée
EPM	Labyrinthe en croix surélevé
OVX	Ovariectomisées
PR	Récepteurs de la progestérone
Er α	Récepteurs œstrogéniques alpha
SHBG	Globuline liant les hormones sexuelles
HHG	Hypothalamo-hypophyso-gonadique
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
BNST	Le noyau du lit de la strie terminale
MeA	Amygdale médiale
MPOA	Aire préoptique médiane
VMN	Noyau ventromédian de l'hypothalamus
VMH	Hypothalamus ventromédian
ARC	Noyau arqué de l'hypothalamus
AVPV	Noyau périventriculaire antéroventral
MePV	Amygdale médiale postéro-ventrale
MePD	Amygdale médiale postéro-dorsale
PirC	Le cortex piriforme
AOB	Bulbe olfactif accessoire
MOB	Bulbe olfactif principal

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
LES CONTRACEPTIFS HORMONAUX	1
AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE	4
LES HORMONES STÉROÏDIENNES CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS	5
<i>Les hormones stéroïdiennes</i>	5
<i>Les neuro-œstrogènes</i>	5
CYCLES OVARIENS ET MENSTRUELS	7
<i>Introduction sur les cycles ovariens et menstruels</i>	7
CYTOLOGIE DU CYCLE OVARIEN DES SOURIS	7
<i>Les rétrocontrôles positifs et négatifs des cycles menstruels et œstraux</i>	9
Les rétrocontrôles chez la femme	9
Les rétrocontrôles chez la souris	10
<i>Mécanismes d'action de la pilule contraceptive en lien avec les rétrocontrôles</i>	11
EFFETS DE LA PILULE CONTRACEPTIVE SUR LA LIBIDO ET L'ANXIÉTÉ.....	11
<i>La pilule et la libido chez la femme</i>	12
<i>Les solutions combinées chez la souris et test de motivation sexuelle</i>	12
<i>L'anxiété et la pilule contraceptive</i>	15
Les hormones stéroïdiennes et l'anxiété chez la souris femelle	15
La pilule contraceptive et l'anxiété chez les femmes	17
QUESTIONS ET OBJECTIFS DU PROJET.....	18
MATERIEL ET METHODES.....	19
ANIMAUX ET HEBERGEMENT	19
LA CYTOLOGIE VAGINALE	19
MINI-POMPES OSMOTIQUES ALZET.....	20
TEST COMPORTEMENTAL.....	21
EXPOSITION AUX ODEURS	22
SACRIFICES, COLLECTE DU CERVEAU ET DU PLASMA.....	23
CRYOSECTION ET IMMUNOFLUORESCENCE.....	23
IMMUNOMARQUAGE.....	24
ANALYSES STATISTIQUES	27
RESULTATS.....	28
CYCLICITE AVANT ET APRES TRAITEMENT.....	28
ABSENCE D'EFFET DES TRAITEMENTS HORMONAUX SUR LES MESURES D'ANXIÉTÉ.....	29
EXPRESSION DE LA BETA-GALACTOSIDASE ET DE CFOS APRES TRAITEMENT	30
DISCUSSION	35
LA CYCLICITE AVANT ET APRES TRAITEMENT.....	35
L'EFFET DES TRAITEMENTS HORMONAUX SUR LES MESURES D'ANXIÉTÉ.....	37
ANALYSE DE L'EXPRESSION DE CFOS EN REPONSE A LA STIMULATION OLFACTIVE ET LES DIFFERENTS TRAITEMENTS	40
L'IMPLICATION DES NEURONES A AROMATASE DANS L'INTEGRATION DE L'INFORMATION OLFACTIVE.....	43
CONCLUSION.....	45

Introduction

Les contraceptifs hormonaux

De nombreux couples et femmes décident d'utiliser un moyen de contraception au quotidien pour prévenir une grossesse non désirée et ceci est devenu facile d'accès pour de nombreuses femmes dans le monde. Par exemple, en France, depuis le 1^{er} janvier 2022, la contraception est gratuite pour les jeunes femmes de moins de 26 ans¹. De nombreuses options et dispositifs sont aujourd'hui proposés. Des méthodes réversibles comme le préservatif masculin ou féminin ou encore des méthodes hormonales sont disponibles sur le marché (Nations, 2015). Il existe en outre des méthodes dites irréversibles : la stérilisation féminine et masculine. Les contraceptifs hormonaux (CH) comprennent différents modes d'administration qui en font l'une des méthodes les plus répandues : les anneaux, les dispositifs intra-utérins, les implants hormonaux, les patchs ou encore les pilules contraceptives orales (Trends in Contraceptive Use Worldwide 2015). En 2019, on estimait que plus de 151 millions de femmes dans le monde utilisaient les contraceptifs hormonaux (Siddall & Emmott, 2021). Ils semblent être le moyen de contraception le plus populaire en Europe et aux Etats-Unis. Environ 25% des femmes âgées de 15 à 44 ans sous contraceptifs aux Etats-Unis utilisent une pilule contraceptive (Cooper et al., 2022). Les contraceptifs oraux combinés - les pilules - sont aussi connus pour leur efficacité, avec un taux de fiabilité supérieur à 99%. Ils permettent également de réduire les douleurs menstruelles, la quantité et la durée des règles (Casado-Espada et al., 2019).

Les contraceptifs combinés hormonaux sont des combinaisons de stéroïdes synthétiques. Ils contiennent un œstrogène et un progestatif, une hormone d'action similaire à la progestérone (Nations, 2015). Les pilules peuvent être monophasiques ou multiphasiques en fonction des quantités d'hormones fournies durant le cycle. Les pilules monophasiques contiennent, par exemple, une même quantité d'hormones. (Christin-Maitre, 2013; Van Vliet et al., 2011). Le progestatif présent dans les pilules inhibe le pic de l'hormone lutéinisante (LH), diminue la sensibilité ovarienne à l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et la production d'estradiol. Les œstrogènes des pilules contraceptives permettent de limiter les effets secondaires connus et néfastes des progestatifs comme les effets anti-gonadotropiques et de limiter la prolifération de l'endomètre. Ils n'ont pas un effet contraceptif en tant que tel (Christin-Maitre, 2013). Si les

¹ Décret n° 2022-258 du 23 février 2022 relatif à la participation des assurés aux frais liés à la contraception et aux frais liés aux passages dans les structures des urgences des établissements de santé

avantages que ceux-ci ont pu amener à la vie de nombreux couples/femmes ne sont plus à démontrer, certains effets négatifs ont aussi été relevés. La mise en lumière d'effets secondaires liés à la prise de pilule contraceptive a entraîné l'évolution des dosages et des combinaisons utilisés.

En 1960 est sortie la première pilule combinée contraceptive orale, Enovid, approuvée par « the Federal Drug Administration » (FDA) américain. Elle contenait 9,85 milligrammes de norethynodrel, une progestine, et 150 microgrammes de mestradol, un œstrogène (Christin-Maitre, 2013; Drucker, 2020). Au fil des décennies, les pilules sont devenues de moins en moins dosées, contenant moins d'éthinyl estradiol (EE), un composé oral très utilisé. La concentration de EE passe de 50, 30 à 15 µg, et l'EE est parfois remplacé par le 17β-œstradiol (E2) en combinaison avec de nouveaux progestatifs synthétiques (Christin-Maitre, 2013). Certaines pilules contiennent également le valérate d'œstradiol ou de l'estétrol (Casado-Espada et al., 2019). En outre, certaines pilules contraceptives ne contiennent que le progestatif (Casado-Espada et al., 2019). Il se lie aux récepteurs de la progestérone (PR) mais également aux récepteurs aux androgènes. Les progestatifs peuvent être classés en fonction de leur pouvoir androgénique. Les progestatifs de première génération, peu commercialisés aujourd'hui, entraînent des effets secondaires comme l'acné, ou la peau grasse en raison de leurs propriétés androgéniques. Au fil des décennies, des progestatifs moins androgéniques ont été développés. On compte des progestatifs de deuxième et troisième générations. Le lévonorgestrel (LNG), encore très androgénique, fait partie des progestatifs de deuxième génération, tandis que le désogestrel ou le norgestimate sont parmi les progestatifs de troisième génération, moins androgéniques (voir Tableau 1) (Christin-Maitre, 2013).

Tableau 1 : Différents progestatifs utilisés dans les pilules contraceptives, classés selon leur pouvoir androgénique (Casado-Espada et al., 2019)

Most Androgenic	Less Androgenic	The Least Androgenic	Antiandrogenic
Norgestrel levonorgestrel	Norethindrone Norethindrone acetate Ethinodiol diacetate	Desogestrel Etonogestrel Norgestimate	Cyproterona acetato Drospirenona Dienogest

Les femmes sont néanmoins encore de plus en plus nombreuses à dénoncer des effets secondaires, tels que la prise de poids, des maux de tête, des nausées, ou encore l'augmentation de l'anxiété et de la dépression (Lundin et al., 2017). Les changements d'humeur, comme l'anxiété et les symptômes dépressifs, toucheraient 4-10% des femmes utilisant la pilule. Parmi ces effets secondaires, on souligne la baisse de la libido et de l'excitation sexuelle chez les femmes sous pilule contraceptive. Ces effets restent très variables d'une femme à l'autre. Bien que l'apparition d'effets non désirés soit redoutée par de nombreuses femmes, la baisse du désir sexuel ne toucherait, en réalité, qu'une minorité d'entre elles. (Schaffir, 2006). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette baisse du désir sexuel et les études concernant l'effet de la pilule contraceptive présentent des résultats mitigés (Schaffir, 2006). La prise de la pilule réduit les niveaux de testostérone circulante en inhibant la synthèse des androgènes ovariens et surrénaliens et en augmentant les concentrations de globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) (Tuiten et al., 2000; Zimmerman et al., 2014). Ces effets pourraient alors expliquer la diminution des désirs sexuels puisque les femmes prenant de la testostérone rapportent souvent une augmentation de leur désir sexuel. La synthèse de SHBG est stimulée par les œstrogènes et inhibée par les androgènes. Le composant œstrogénique présent dans les pilules, comme le EE, entraîne une augmentation de SHBG dans le sang et une diminution des niveaux de testostérone libre. L'augmentation de la synthèse de SHBG induite par l'œstrogène peut être contrecarrée par le progestatif présent, en fonction de son activité androgénique (Zimmerman et al., 2014). Les pilules contenant les progestatifs les plus androgéniques, comme le LNG, causeraient davantage d'effets indésirables (Casey et al., 2017). Ces effets restent toujours une préoccupation significative pour les femmes à l'heure actuelle (Schaffir, 2006). D'après une étude menée en 2015, sur 615 utilisatrices de la pilule contraceptive orale, 65% et 49% des femmes redouteraient respectivement la prise de poids et la baisse de leur libido avec la prise de la pilule (Figure 1) (Fait et al., 2018)

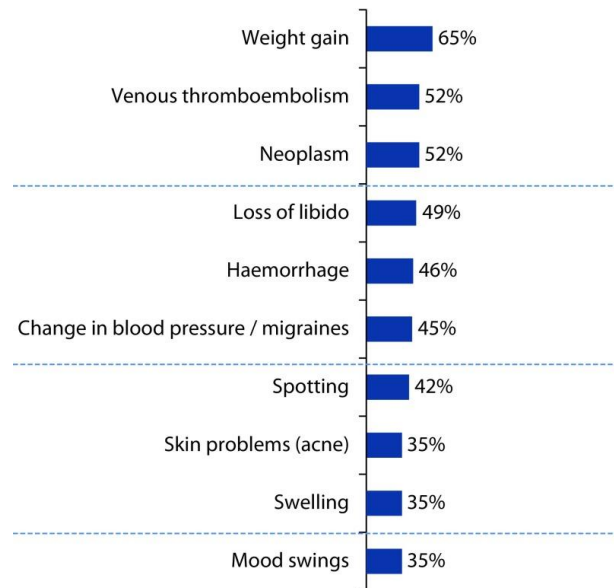


Figure 1 : Principaux effets secondaires redoutés par les femmes utilisant la pilule contraceptive (Fait et al., 2018)

C'est dans ce contexte de santé publique que s'inscrit ce projet de mémoire. Il a pour objectif de mesurer les implications possibles des composés utilisés dans la pilule contraceptive sur deux effets secondaires relevés : l'anxiété et la baisse du désir sexuel chez les femmes utilisant cette contraception hormonale. L'anxiété et la baisse de la motivation sexuelle seront mesurées chez un modèle de souris femelles exposées, à long terme, à deux composés présents dans les pilules, le LNG et le EE.

Axe hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus est une région située à la base antérieure du cerveau et associée à plusieurs fonctions majeures telles que la faim, la prise de nourriture, le métabolisme, la thermorégulation, les réponses au stress mais également la fonction de reproduction. L'hypothalamus est une glande endocrine. Les hormones libérées permettent de contrôler la libération des hormones de l'hypophyse. La gonadotrophine releasing hormone (GnRH) contrôle la libération de la LH et de la FSH par l'hypophyse. La libération de la GnRH est pulsatile, c'est-à-dire épisodique (Marques et al., 2022) et impose donc la libération de la LH et la FSH par l'hypophyse. Ces deux hormones sont, quant à elles, nécessaires à la maturation folliculaire ovarienne, la production d'œstrogènes et de progestérone par les gonades. Elles sont donc indispensables pour la maturation des gonades et la fertilité (Howles, 2000). Cette voie de contrôle des sécrétions hormonales gonadiques par l'hypothalamus porte le nom d'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) (Chachlaki et al., 2017; Messinis, 2006).

Les hormones stéroïdiennes chez l'Homme et la souris

Les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes sont produites par différentes glandes endocrines comme les glandes surrénales, les gonades, le cerveau, ou encore les tissus adipeux. Elles sont toutes dérivées du cholestérol (Charlier et al., 2010). Les stéroïdes à 21 carbones (C21) sont les progestatifs et les corticostéroïdes. Les stéroïdes composés de 19 carbones (C19) sont les androgènes tels que la testostérone. Ils induisent de nombreux effets physiologiques et comportementaux. Les stéroïdes composés de 18 carbones (C18) sont les œstrogènes. Ils sont formés à partir d'androgènes, par un processus appelé aromatisation (Figure 2) catalysé par l'aromatase, une enzyme codée par le gène CYP19A1 (Brann et al., 2021). Les œstrogènes affectent de nombreux paramètres liés à la reproduction comme le développement des caractéristiques sexuelles secondaires, l'activation des comportements reproducteurs ou encore la sécrétion des gonadotrophines (Garcia-Segura, 2008).

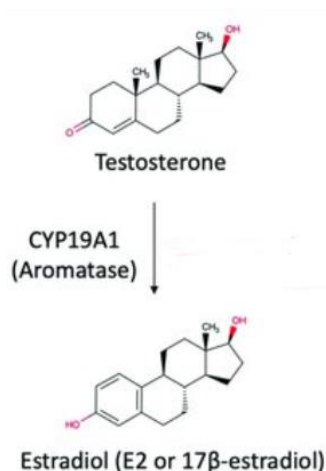


Figure 2 : Schématisation du processus d'aromatisation de la testostérone en estradiol (Jenzer & Sadeghi-Reeves, 2020)

Les neuro-œstrogènes

L'enzyme aromatase est exprimée entre autres dans le cerveau et induit donc une production d'œstrogènes dans plusieurs régions cérébrales (Brann et al., 2021). Cette aromatisation est décrite chez plusieurs espèces de vertébrés, y compris les humains. On parle d'aromatisation centrale et les œstrogènes produits dans le cerveau sont appelés les neuro-œstrogènes. Des études sur la localisation de l'aromatase centrale chez les souris suggèrent qu'elle est abondante dans l'hypothalamus, le noyau du lit de la strie terminale (BNST), l'amygdale médiale (MeA), et l'aire préoptique médiane (MPOA) (Brann et al., 2021; Stanić et al., 2014). Chez les humains,

l'aromatase est exprimée dans le cortex cérébral, dans les terminaisons nerveuses de l'hypothalamus, le thalamus, l'aire préoptique et l'amygdale (Stoffel-Wagner et al., 1998; Yague et al., 2006). Les neuro-œstrogènes contrôlent différentes réponses physiologiques ou comportementales (Figure 3) et modulent notamment les comportements sexuels chez beaucoup d'espèces (Balthazart et al., 2004; Garcia-Segura, 2008). Le rôle de l'aromatisation centrale dans les comportements sexuels est bien établi chez les mâles. L'étude de l'aromatisation centrale chez la femelle est souvent négligée à cause de la forte production d'œstrogènes par les ovaires (Cornil, 2018). Pourtant, les résultats de quelques études suggèrent que cette aromatisation centrale pourrait avoir une réelle fonction. Une étude menée par de Bournonville *et al.* sur la caille, a montré que des femelles ovariectomisées (OVX) et recevant un traitement à la testostérone présentaient une augmentation de leur motivation sexuelle en comparaison avec des femelles OVX. Cet effet suggère l'implication de l'aromatisation non gonadique. De plus, les dosages de l'activité de l'aromatase dans plusieurs régions du cerveau suggèrent que l'aromatisation centrale est impliquée dans l'augmentation de la motivation sexuelle (de Bournonville et al., 2016). Dans une autre étude, les comportements sexuels de femelles musaraignes musquées ovariectomisées sont restaurés par des implants d'estradiol (E2) dans le MPOA et le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMN). Les femelles ayant reçu les implants d'E2 dans le MPOA et le VMN montrent une réceptivité et des latences comportementales significativement plus courtes que les autres femelles ovariectomisées. Cette étude montre que l'aromatisation centrale de la testostérone dans ces deux régions est impliquée dans les comportements sexuels chez la musaraigne (Veney & Rissman, 2000). Enfin, les comportements sexuels sont aussi observés chez des lapines ovariectomisées et traitées avec des implants de benzoate d'œstradiol ciblant l'hypothalamus ventromédian (VMH) (Melo et al., 2008). Ces études suggèrent que l'aromatisation centrale de la testostérone est nécessaire pour le contrôle du comportement sexuel femelle. La baisse de libido observée chez les femmes utilisant des contraceptifs hormonaux périphériques pourrait donc être expliquée en partie par la diminution de l'aromatisation centrale. Mais cette question n'a encore jamais été étudiée spécifiquement.

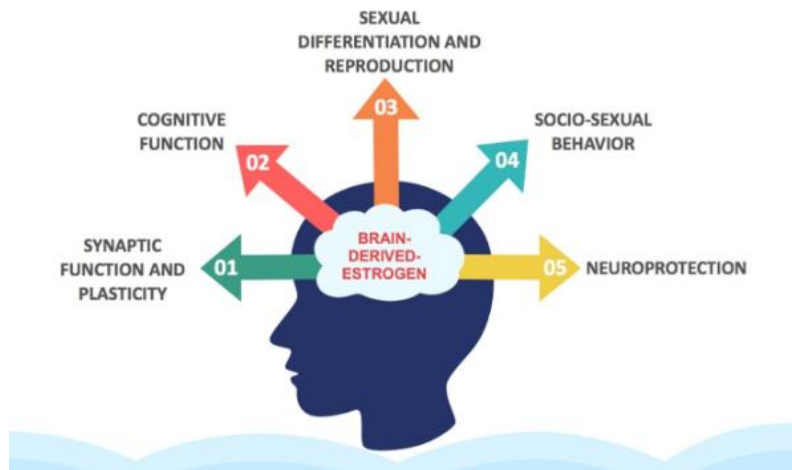


Figure 3 : illustration des différentes actions des neuro- œstrogènes (Brann et al., 2021)

Cycles ovariens et menstruels

Introduction sur les cycles ovariens et menstruels

Durant les cycles menstruels chez la femme et œstraux chez les souris, on observe une communication hormonale entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les ovaires (Herbison, 2020). Les taux d'œstradiol et de progestérone produits par les ovaires contrôlent la sécrétion de la GnRH par les neurones à GnRH et des gonadotrophines, par l'hypophyse (Messinis, 2006). Cette sécrétion de LH/FSH est régulée par la libération épisodique de la GnRH qui varie durant le cycle. Chez la femme comme chez la souris, on observe une sécrétion pulsatile chaque heure pendant la phase folliculaire/diestrus et une sécrétion plus lente, toutes les 3 à 4 heures durant la phase lutéale/œstrale (Herbison, 2020). La LH contrôle principalement la production des œstrogènes et de la progestérone par les ovaires. La FSH contrôle quant à elle principalement la gamétogénèse (Duittoz & Prévot, 2014).

Cytologie du cycle ovarien des souris

Chez les murins, le cycle ovarien est constitué de 4 phases (Figure 4): le métestrus, le diestrus, le proestrus et l'œstrus, qui se répètent tous les 4-5 jours (Cora et al., 2015). Les différentes phases du cycle sont identifiables par des changements macroscopiques de la paroi vaginale. L'analyse de l'abondance de ces cellules dans les frottis vaginaux peut donc être utilisée comme indicateur de la phase du cycle. Cette technique nous permet d'observer les 3 types de cellules vaginales : les leucocytes, les cellules nucléées et les cellules cornifiées (voir Figure 4 ci-dessous; Byers et al., 2012; Cora et al., 2015).

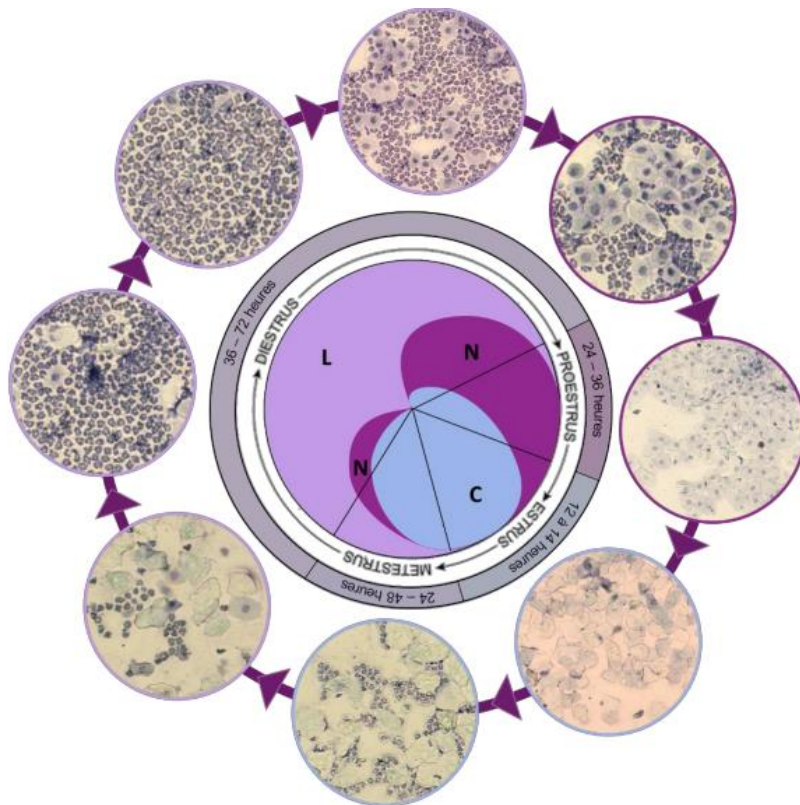


Figure 4 : Schématisation du cycle ovarien de la souris femelle avec différentes observations microscopiques de l'évolution de la proportion des cellules de l'épithélium vaginal ((Essiz, 2021) inspiré de (Byers et al., 2012))

Le diestrus est caractérisé par une abondance de leucocytes. Cette phase du cycle est influencée par le corps jaune. Si la femelle n'est pas fécondée, ce corps jaune dégénère et un nouveau follicule se développe pour la prochaine ovulation (Byers et al., 2012).

Le proestrus est caractérisé par un nouveau follicule qui se développe. Cette phase du cycle est caractérisée par une grande densité de cellules nucléées et quelques cellules cornifiées. A mesure que l'œstrus se rapproche, les cellules cornifiées prédominent (Byers et al., 2012).

L'œstrus se caractérise donc par une majorité de cellules cornifiées dans les frottis. Il correspond à la période de réceptivité sexuelle de la femelle qui peut s'observer à travers le comportement de lordose (positions d'acceptation du mâle) (Byers et al., 2012).

Si le cycle n'est pas interrompu par une gestation, **le métrus** commence et un nouveau corps jaune se forme. Les frottis vaginaux dans cette phase montrent une diminution progressive des cellules cornifiées, l'augmentation de proportions en leucocytes et cellules nucléées (Byers et al., 2012).

L'étude des rétrocontrôles induits par les hormones ovariennes est nécessaire à la compréhension du fonctionnement de la pilule contraceptive et de l'axe HHG durant les cycles. La fréquence et l'amplitude des pulses des gonadotrophines dépendent de la phase du cycle menstruel. Les cycles (Figure 5) durent en moyenne 28 jours chez la femme (Mihm et al., 2011).

La **phase folliculaire** dure environ 15 jours et correspond à la formation d'un nouveau follicule (Buffet et al., 1998). Durant cette phase, on observe une augmentation progressive de la concentration d'estradiol dans les ovaires via la croissance du follicule qui développe sa capacité de synthétiser les œstrogènes. Les cellules épithéliales de l'endomètre prolifèrent sous l'influence de l'estradiol (Buffet et al., 1998). En parallèle, on observe une augmentation de la sécrétion pulsatile de GnRH et de LH (Mihm et al., 2011). Les impulsions se produisent toutes les 1 à 2 heures (Marques et al., 2022). La concentration en estradiol atteint un seuil critique. La stimulation des neurones à GnRH induit un pic de libération de LH et, en conséquence, l'ovulation. A la suite de l'ovulation, le follicule libéré laisse place au corps jaune qui sécrète la progestérone (Buffet et al., 1998; Herbison, 2020). Cette phase est appelée la **phase lutéale** et dure environ 14 jours (Mihm et al., 2011). La progestérone libérée agit sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse pour induire un rétrocontrôle négatif. A la fin de la phase lutéale, si l'ovule n'est pas fécondé, le corps jaune régresse faisant diminuer la sécrétion de progestérone. Le rétrocontrôle induit par la progestérone diminue laissant place aux menstruations, l'augmentation de la libération de LH/FSH initiant un nouveau cycle et une production progressive d'estradiol (Buffet et al., 1998).

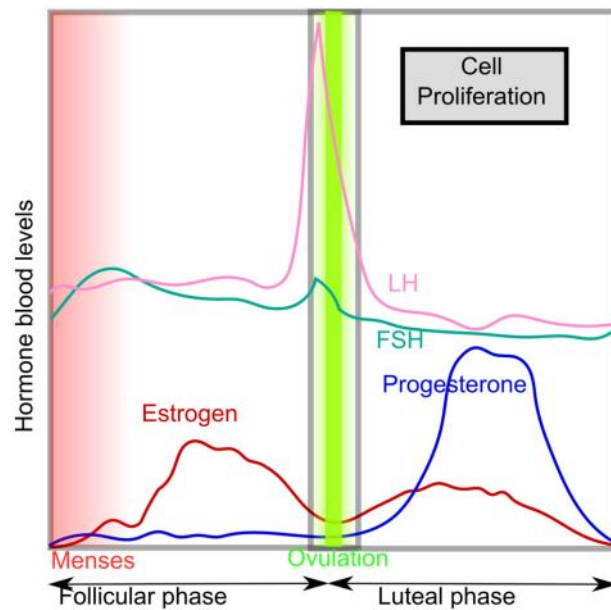


Figure 5 : Illustration du cycle menstruel chez la femme (Briskin et al., 2015)

Les rétrocontrôles chez la souris

Pendant la phase de métestrus (Figure 6), la sécrétion de la LH se produit toutes les 3 à 4 heures (Herbison, 2020). Elle coïncide avec une augmentation continue des concentrations en progestérone. L'entrée en diestrus correspond au pic de production de progestérone exerçant un rétrocontrôle négatif, c'est-à-dire inhibant la stimulation de la libération de GnRH et LH/FSH (McLean et al., 2012). Le **rétrocontrôle négatif** sur les neurones à GnRH est médié par les neurones à kisspeptine présents dans le noyau périventriculaire antéroventral (AVPV) et dans le noyau arqué de l'hypothalamus (ARC) (Delli et al., 2021; Kumar et al., 2015). La régression du corps jaune induit une baisse des taux de progestérone et de ce rétrocontrôle. On observe alors le passage en proestrus qui est caractérisé par une augmentation progressive des concentrations en estradiol agissant sur l'AVPV culminant par la stimulation de la libération de la GnRH et celle de la LH et la FSH. Ce phénomène est appelé **rétrocontrôle positif** (McLean et al., 2012). La sécrétion des gonadotrophines est alors continue (Herbison, 2020). Cette libération de GnRH est régulée par les neurones à kisspeptine présents dans l'AVPV et l'ARC qui expriment des récepteurs aux œstrogènes (Delli et al., 2021; Kumar et al., 2015). La progestérone supprime le rétrocontrôle positif des œstrogènes et la sécrétion de GnRH, de LH et de FSH. Le pic de libération des gonadotrophines caractérise l'entrée en œstrus. On observe ensuite une diminution de ces sécrétions, induite par une diminution de la sécrétion d'estradiol et l'entrée en métestrus (McLean et al., 2012).

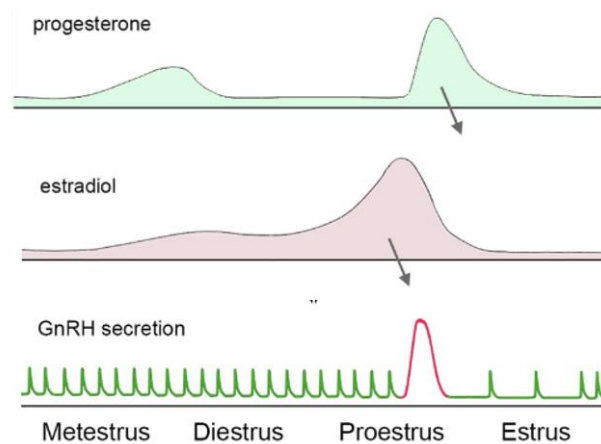


Figure 6 : Schématisation de l'effet des variations hormonales de progestérone et d'estradiol au cours du cycle ovarien du rongeur sur la libération pulsatile de la GnRH (inspiré de (Herbison, 2020))

Mécanismes d'action de la pilule contraceptive en lien avec les rétrocontrôles

Les pilules combinées orales ont de multiples mécanismes d'action en fonction des composés utilisés. En général, ils permettent l'inhibition de l'ovulation en supprimant la sécrétion des gonadotrophines (Casado-Espada et al., 2019). Les progestatifs utilisés inhibent la libération de la GnRH en agissant sur les récepteurs à la progestérone des neurones à kisspeptine, qui régulent la libération de GnRH et donc la production de LH/FSH. Ils inhibent également la libération des œstrogènes durant les cycles. Ils induisent alors un rétrocontrôle négatif en permanence (Delli et al., 2021; Porcu et al., 2019). Ils peuvent permettre l'augmentation de la glaire cervicale et la limitation du transport des spermatozoïdes. Comme cité plus haut, les œstrogènes présents dans les pilules contraceptives permettent quant à eux de limiter les effets secondaires des progestatifs (Christin-Maitre, 2013). L'étude de l'administration chronique de composés oraux combinés chez les murins, tel que le EE et le LNG montre ces mécanismes à travers la diminution de la fonction de l'axe HHG et l'inhibition de l'ovulation (Porcu et al., 2019).

Effets de la pilule contraceptive sur la libido et l'anxiété

Les pilules contraceptives seraient responsables de nombreux effets secondaires tels que les changements d'humeur, la baisse de la libido et l'augmentation des syndromes dépressifs et anxieux. De nombreuses femmes redoutent ces effets et se tournent vers d'autres moyens de contraception (Lundin et al., 2017). La diminution des désirs sexuels et les impacts de la pilule sur l'humeur sont les raisons principales de l'arrêt du traitement contraceptif dès les 6 premiers mois d'utilisation (Porcu et al., 2019; Sanders et al., 2001). Certaines études suggèrent que l'absence de sexualité chez les femmes est plus souvent liée à un manque de désir sexuel plutôt

qu'à une incapacité physique (Holder & Mong, 2017; Roney & Simmons, 2013). Dans cette étude, nous étudierons alors deux des effets secondaires notés par ces femmes : l'augmentation de l'anxiété et la baisse de la libido avec la prise de la pilule.

La pilule et la libido chez la femme

L'impact de la pilule contraceptive sur la diminution des désirs sexuels est discuté. Certaines femmes prenant la pilule contraceptive au quotidien remarquent une amélioration de leur désir sexuel qui peut être expliqué par un sentiment de sécurité (Santoru et al., 2014; Strufaldi et al., 2010). Par ailleurs, d'autres femmes dénoncent une diminution de leur désir et de la fréquence de leurs activités sexuelles (Casado-Espada et al., 2019). De nombreux facteurs comme le stress et les problèmes conjugaux (Bodenmann et al., 2010) jouent évidemment un rôle dans le désir sexuel chez la femme mais de nombreuses études montrent que les hormones stéroïdiennes sont les principales responsables de ces variations du désir (Roney & Simmons, 2013; Schwartz et al., 2012). Les pilules combinées provoquent une diminution des taux d'androgènes circulants en augmentant SHBG et suppriment la production de testostérone par les ovaires. Ces effets sont amplifiés avec un progestatif androgénique. Les pilules induisent aussi une diminution des niveaux d'estradiol et de progestérone libérés par les ovaires. Ces variations hormonales pourraient effectivement expliquer la diminution du désir sexuel (Casado-Espada et al., 2019). Néanmoins, il y a une grande variabilité interindividuelle concernant la production ovarienne d'androgènes et les effets des pilules combinées sur le désir sexuel (Pastor et al., 2013; Schaffir, 2006).

Les solutions combinées chez la souris et test de motivation sexuelle

Quelques études animales menées par Santoru *et al.* ont tenté de déterminer si les composés utilisés dans les pilules contraceptives pouvaient influencer les comportements sexuels femelles. Ils ont mesuré les comportements proceptifs et la réceptivité chez des rats femelles après un traitement de EE et LNG (0,030 mg et 0,125 mg/j) sur le long terme (4 semaines). Ils démontrent une diminution de la fréquence de ces comportements proceptifs avec le traitement (Figure 7) mais pas de diminution de la réceptivité (Santoru et al., 2014a). Ils suggèrent un effet du traitement sur la production d'allopregnanolone, un métabolite de la progestérone qui possède des propriétés anxiolytiques et anesthésiques. Il est montré que l'allopregnanolone peut aussi influencer les comportements sociaux et reproducteurs (Santoru et al., 2014a). L'administration de l'allopregnanolone augmente la réceptivité chez les rats femelles (Brann et

al., 1990). Santoru *et al.* proposent que la diminution de l'alloprégnanolone induite par l'administration du traitement LNG+EE serait la cause des changements de comportements sociaux et sexuels observés. En effet, Follesa *et al.* ont mesuré les concentrations en progestérone et alloprégnanolone dans le cortex cérébral et le plasma de rats ayant été soumis à des injections quotidiennes de EE+LNG (0,030 mg et 0,125 mg/j). Ils observent une diminution de leurs concentrations après 6 semaines de traitement (Figure 8) (Follesa et al., 2002). Ensemble, ces études suggèrent que les composés utilisés dans les contraceptifs hormonaux peuvent influencer la libido. Néanmoins, le mécanisme et les changements cérébraux associés ne sont pas encore complètement élucidés.

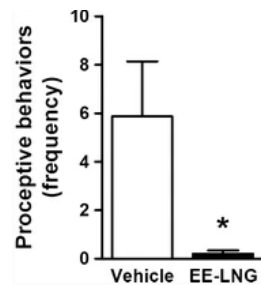


Figure 7 : Effet d'un traitement avec EE+LNG (0,030 mg et 0,125 mg/j) sur les comportements proceptifs des rats femelles (Santoru *et al.*, 2014)

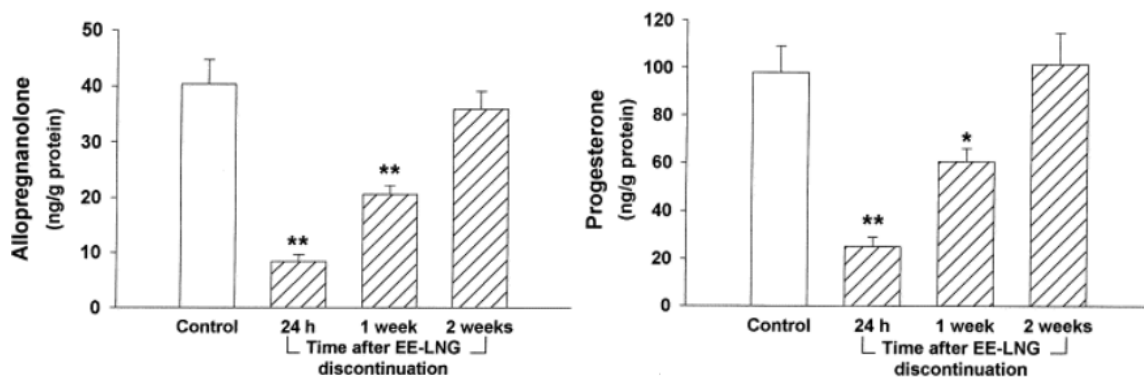


Figure 8 : Concentrations en alloprégnanolone et progestérone dans le cortex cérébral et le plasma de rats femelles après 6 semaines de traitement avec EE+LNG (0,03 et 0,125 mg/j). (Follesa *et al.*, 2002).

Le laboratoire a étudié l'effet des solutions combinées sur la motivation sexuelle de souris femelles soumises à différents traitements : LNG, EE ou LNG/EE. Les traitements étaient délivrés sous forme de mini-pompes osmotiques implantées sous la peau. Un test de préférence de partenaire a été effectué afin d'évaluer la motivation sexuelle des animaux. Les femelles du groupe control (Figure 9) montrent une tendance à préférer le mâle, à l'inverse des femelles traitées au LNG. Il y a, par ailleurs, une différence significative entre le groupe LNG et les deux autres. Ces observations pourraient être en lien avec le fait que le LNG est connu pour avoir une haute activité androgénique et que les pilules de la sorte sont souvent celles pour lesquelles une baisse de la libido est observée (Christin-Maitre, 2013; Sitruk-Ware, 2006). La suite de cette étude avait pour but de déterminer si l'activation neuronale en réponse à des stimuli sexuels variait en fonction du traitement. Pour ce faire, les femelles traitées au LNG, EE, LNGEE ou avec une solution contrôle ont été exposées aux odeurs de litière souillée par un mâle. Une telle stimulation olfactive permet d'induire l'expression de la protéine Cfos, un gène précoce immédiat, marqueur d'activation neuronale (Halem et al., 1999). Les résultats ont confirmé que l'exposition aux odeurs induit une augmentation significative de l'expression de Cfos dans le MPOA et le VMH chez les femelles contrôles. Par ailleurs, une augmentation du nombre de noyau exprimant Cfos a aussi été observée dans le MPOA des femelles traitées au EE et dans le VMH des femelles traitées au EE et au LNGEE (Figure 10). L'étude de la co-expression des récepteurs aux œstrogènes alpha ($ER\alpha$) et du Cfos a permis de montrer une augmentation significative de cette activation chez les femelles soumises à la stimulation aux odeurs (Figure 10). En effet, les femelles des groupes control et EE exposées aux odeurs de mâles montrent une augmentation significative de cette co-expression dans le MPOA. Les femelles contrôles, EE et LNGEE montrent également cette augmentation significative dans le VMH. De façon intéressante, on observe une plus faible co-expression de $ER\alpha$ et Cfos chez les femelles traitées au LNG. Ces résultats suggèrent que les œstrogènes sont impliqués dans la motivation sexuelle et que l'activation des neurones exprimant $ER\alpha$ est affectée par un traitement chronique au LNG.

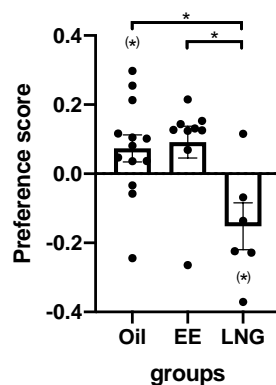


Figure 9 : Résultats du test de préférence de partenaire après implantation des mini-pompes osmotiques délivrant une solution contrôle (oil), une solution de EE ou LNG. Les préférences positives suggèrent une attirance pour le mâle, alors que les scores de préférences négatifs indiquent un comportement d'évitement du mâle (de Bournonville et al. In preparation)

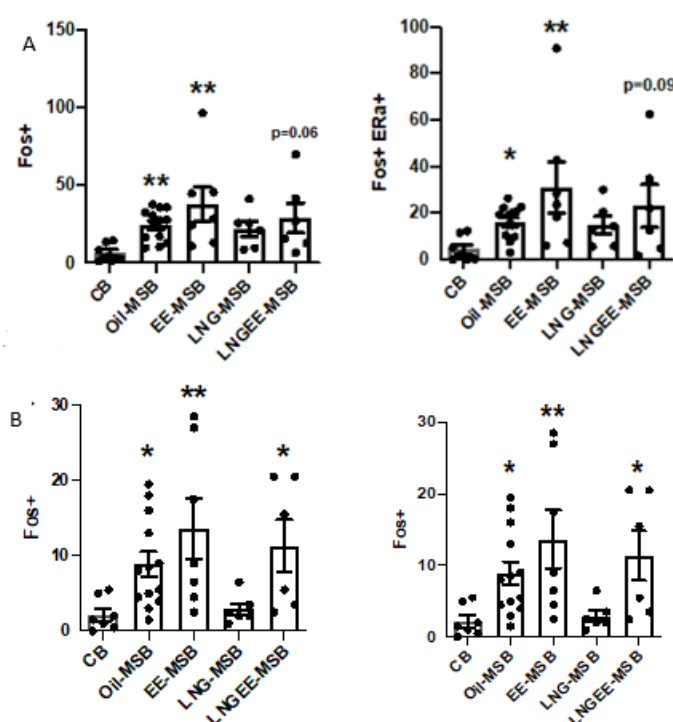


Figure 10 : Résultats de l'immunofluorescence mesurant l'expression de la protéine Cfos (Fos+) et sa co-expression avec les récepteurs œstrogéniques alpha (ERα) dans l'aire préoptique médiane (A) et dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus (B) (de Bournonville et al. In preparation)

L'anxiété et la pilule contraceptive

Les hormones stéroïdiennes et l'anxiété chez la souris femelle

Chez les souris, quelques études ont investigué l'effet de contraceptifs hormonaux sur les comportements anxieux. D'après Porcu *et al.* l'administration de EE-LNG (30-125 µg/j) à long terme (4 semaines) induit un comportement anxieux chez des rats femelles placées dans un labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze, EPM). Néanmoins les auteurs soulignent l'effet potentiel du LNG sur les comportements anxieux observés puisqu'un traitement EE seul,

contrairement à un traitement au LNG seul, ne modifie pas le comportement des femelles. L'EE aurait plutôt un effet anxiolytique (Porcu et al., 2019). Follesa *et al.* montrent également l'augmentation des comportements anxieux de rats femelles traitées au LNG+EE (125 et 30 µg/j) dans un test EPM (Follesa et al., 2002). De façon intéressante, de plus faibles doses d'EE et LNG (10 et 20 µg) ne modifient pas les taux d'estradiol, de progestérone et d'allopregnanolone. Ces doses auraient un effet anxiolytique durant le test EPM (Porcu et al., 2019). C'est également ce que montrent Simone *et al.* Un traitement avec de faibles doses de EE (10 µg), LNG (20 µg) ou LNG+EE diminue significativement l'anxiété lors d'un EPM (Simone et al., 2015).

La relation entre les concentrations circulantes d'œstrogènes et l'anxiété a également fait l'objet d'investigations (Imwalle et al., 2005). Galeeva & Tuohimaa montrent que l'exploration des bras ouverts du test EPM est moins fréquente chez les femelles en diestrus, indiquant que les niveaux d'œstrogènes seraient corrélés avec le niveau d'anxiété (Imwalle et al., 2005). Marcondes *et al.* montrent que les rats femelles en proestrus passent plus de temps dans les bras ouverts de l'EPM mais qu'aucune différence n'est observée entre les femelles en proestrus et diestrus traitées à l'estradiol (Marcondes et al., 2001). Gangitano *et al.* soutiennent que les niveaux d'anxiété plus élevés sont liés à la phase diestrus chez les rats et les souris (Gangitano et al., 2009). Ensemble, ces études suggèrent que l'anxiété varie en fonction du cycle ovarien en lien avec les fluctuations des taux d'œstrogènes, et qu'un traitement chronique progestatif ou œstrogéno-progestatif peut aussi affecter cette réponse (Marcondes et al., 2001).

Chez les femmes, la phase lutéale est caractérisée par une chute en progestérone si l'ovule n'est pas fécondé. Chez les murins, par analogie, la phase diestrus, associée à une plus forte anxiété est accompagnée d'une chute de la concentration de progestérone mais de niveaux bas stables d'œstrogènes. L'allopregnanolone, un métabolite de la progestérone, module les comportements anxieux dans différents modèles d'anxiété comme le labyrinthe surélevé, l'enfouissement, ou encore la transition lumière/obscurité (Galeeva & Tuohimaa, 2001; Rodgers & Johnson, 1998; Schüle et al., 2014; Wieland et al., 1995). En effet, la progestérone et l'allopregnanolone ont des propriétés anxiolytiques et une diminution des taux de ces deux stéroïdes causerait l'augmentation des syndromes anxieux. Des études indiquent alors que la chute de la concentration en progestérone, et par conséquent celle de l'allopregnanolone, pourrait dès lors être la cause des fluctuations du stress et de l'anxiété durant le cycle (Lovick, 2012; Santoru et al., 2014a; Schüle et al., 2014).

La pilule contraceptive et l'anxiété chez les femmes

La dépression et l'anxiété sont des pathologies répandues avec environ 284 millions de personnes dans le monde touchées au moins une fois par une période d'anxiété. Les femmes enceintes, en post-partum ou ménopausées connaissent davantage de périodes d'anxiété et de dépression (Siddall & Emmott, 2021). Les variations des taux d'hormones stéroïdiennes produites naturellement pourraient expliquer ces troubles (Rapkin et al., 2006; Siddall & Emmott, 2021). En outre, l'anxiété et la dépression sont des raisons fréquemment évoquées par les femmes arrêtant la pilule (Cinar et al., 2012). Plusieurs études semblent démontrer en effet que les contraceptifs hormonaux favoriseraient l'apparition de ces problèmes émotionnels (Porcu et al., 2012). Des dépressions sont fortement décrites par les femmes prenant des composés hormonaux fortement dosés en progestatifs (Worsley & Chang, 1978; Young et al., 2007). Toutefois, de nombreuses études sur l'impact des contraceptifs se contredisent, présentant des effets parfois positifs, parfois négatifs ou l'absence d'effet (Siddall & Emmott, 2021).

Les progestatifs utilisés dans les pilules contraceptives ne permettent pas la synthèse d'alloprégnanolone. Les femmes utilisant la pilule ne bénéficieraient pas de ces effets anxiolytiques par la métabolisation de la progestérone naturelle. Les niveaux continuellement élevés de progestatif par utilisation de la pilule expliqueraient cette sensibilité accrue au stress corrélée avec les troubles dépressifs (Siddall & Emmott, 2021). Les effets respectifs des progestatifs et des œstrogènes contenus dans les contraceptifs ne sont donc pas clairs et mériteraient d'être étudiés plus en profondeur.

Questions et objectifs du projet

Les expériences préliminaires de notre laboratoire ont déjà permis de cibler certains composés combinés impactant la motivation sexuelle des souris femelles. Parmi ceux-ci, le LNG a une haute activité androgénique et semble induire des comportements d'évitement du mâle. Le EE, un œstrogène utilisé dans de nombreuses pilules, est également ciblé dans le cadre de ce projet de mémoire. Les premières recherches ont mis en lumière que l'activation neuronale dans différentes régions en réponse à des odeurs mâles pouvait être affectée par le traitement, notamment chez les souris exposées au LNG. De plus, cette activation diminuée a été observée au sein des neurones sensibles aux œstrogènes (exprimant ER α). Ces résultats confirment que l'action des œstrogènes est nécessaire pour la motivation sexuelle et que les composés des pilules hormonales affectent cette réponse, en atténuant la réponse cérébrale normalement observée en réponse à des stimuli sexuels. Si l'action des œstrogènes est nécessaire au contrôle de la motivation sexuelle, on peut se demander quels sont les effets de la pilule contraceptive sur cette motivation sexuelle. Une hypothèse serait qu'elle influence la production des neuro-œstrogènes. Nous cherchons à savoir si un traitement au LNG, EE ou LNGEE peut impacter l'activation neuronale en réponse à une stimulation olfactive dans les zones du cerveau impliquées dans le traitement des odeurs et la motivation sexuelle. Nous cherchons également à déterminer si un traitement EE, LNG ou LNGEE impacte les niveaux d'anxiété.

Matériel et méthodes

Animaux et hébergement

Chez les rongeurs, il est impossible de mettre l'aromatase en évidence de façon fiable par immunohistochimie. Pour ces manipulations, nous avons donc utilisé une lignée de souris rapportrices appelées aromatase-IRES-plap-IRES-nuclear lacZ (ARO-IPIN). Ces souris expriment le gène nLacZ qui code pour la β -galactosidase (BGal) dans les neurones exprimant l'aromatase (Wu et al., 2009).

Cette expérience a été réalisée sur deux cohortes de souris (34 et 15 femelles CB57BL/6J ARO IPIN) placées dans les mêmes conditions à 6 semaines d'intervalle. Les souris âgées de 12 et 14 semaines ont été hébergées dans des cages communes (6-8 femelles par cages) avant le début des manipulations, dans un cubicule maintenu à température constante (20-22 °C) et en cycle jour/nuit inversé (12h :12h). Les lumières s'éteignaient à 9 heures du matin et s'allumaient à 21 heures. La nourriture et l'eau étaient à disposition *ad libitum* (SDS RM3 801002 – Special Diets Services). Les souris ont été habituées à être manipulées pendant environ 2 semaines pour diminuer le stress durant l'expérience. Les tests comportementaux et la collecte des cerveaux ont été réalisés durant la phase active des animaux. Cette expérience a été réalisée dans le respect des règles d'Ethique Européenne et a été approuvée par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Liège (Dossier #2158).

La cytologie vaginale

Pour caractériser le cycle ovarien des souris, des frottis vaginaux ont été réalisés quotidiennement, entre 9h30 et 10h30. Les souris étaient âgées de 13 à 15 semaines au début des manipulations. Des frottis ont été effectués durant 17 jours consécutifs pour constituer une ligne de base et établir, pour chaque femelle, le nombre de cycles et leur durée, calculée par le nombre de jours séparant deux œstrus. Le même procédé a été appliqué 18 jours après l'implantation des mini-pompes osmotiques (voir section suivante) diffusant les traitements. Nous avons appliqué ce délai de 18 jours pour respecter le même protocole que l'expérience précédente (Mémoire de Yuksel Essiz, 2020-2021).

Les frottis ont été réalisés à l'aide d'un écouvillon métallique à extrémité ronde que l'on plonge dans de l'eau milli Q avant de l'insérer doucement dans la cavité vaginale. L'échantillon a été ensuite déposé sur une lame (Figure 11) avant de rincer à nouveau l'écouvillon dans de l'eau milli Q pour éviter les contaminations entre chaque femelle.

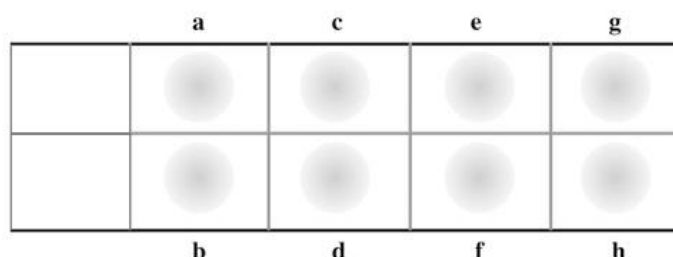


Figure 18 : Représentation schématique d'une lame de frottis. Adaptée de (Goldman et al., 2007)

Les lames ont ensuite été séchées quelques minutes puis colorées en appliquant du bleu de Toluidine 0,1%, pendant 5 min. Cette technique ne nécessite aucun rinçage. Le surplus du bleu de Toluidine est simplement éliminé et les lames sont à nouveau séchées. L'analyse microscopique de ces lames permet l'évaluation de la proportion des types cellulaires de l'échantillon : les leucocytes, les cellules cornifiées et les cellules nucléées. Cette proportion permet d'identifier dans quelle phase du cycle se situent les femelles (Caligioni, 2009; Cora et al., 2015). Grâce à cette technique, la cyclicité des femelles a donc pu être évaluée tout au long de l'expérience, avant et après traitement.

Mini-pompes osmotiques ALZET

Une mini-pompe osmotique Alzet® modèle 2006 (volume maximum 200 µl) DURECT™ Corporation, Cupertino, CA 95014, <https://www.alzet.com/> a été implantée sous la peau de chacune des femelles (Figure 12). Ces pompes délivrent 0,15 µl de solution par heure pendant 42 jours. Les différents traitements (EE, LNG et LNG+EE) ont été dilués dans une solution de propylène glycol avec 5% d'éthanol, constituant également les solutions contrôles. Les pompes ont ensuite été amorcées dans une solution saline stérile et placées dans une étuve à 37°C pendant 48 heures. Tous les instruments utilisés dans le remplissage, l'amorçage et l'implantation ont été préalablement stérilisés. Les chirurgies se sont déroulées après la ligne de base permettant de vérifier la cyclicité des femelles.

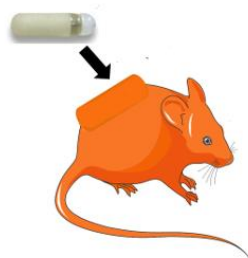


Figure 19 : Illustration de l'implantation sous cutanée d'une mini-pompe osmotique

Les groupes de femelles ont été constitués de façon semi-aléatoire et l'absence de différence préalable entre les groupes formés a été vérifiée à l'aide d'un test ANOVA, afin que les différents groupes aient une durée de cycle moyenne équivalente.

De plus, le choix de la dose utilisée pour remplir les pompes a permis de ne pas bloquer les cycles ovariens tout en ayant un effet comportemental.

Tableau 2 : Groupes et traitements délivrés avec la mini pompe osmotique. MSB : male soiled bedding (ajout de litière de mâle 90 minutes avant la perfusion) ; CB : clean bedding (ajout de litière propre 90 minutes avant la perfusion) ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; EE : groupe éthynyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthynyl estradiol + lévonorgestrel

Groupe	Solution et conditions	Nombre de femelles	Concentrations délivrées
Groupe 1	CTC - CB	N= 7	Propylène glycol + 5% d'éthanol
Groupe 2	CT - MSB	N=7	Propylène glycol + 5% d'éthanol
Groupe 3	EE - MSB	N=6	0,6 µg/Kg/jour
Groupe 4	LNG - MSB	N=7	30 µg/Kg/jour
Groupe 5	LNGEE - MSB	N=7	30+0,6 µg/Kg/jour

Test comportemental

Le test du labyrinthe surélevé, plus communément appelé « Elevated plus maze » (EPM, Figure 13) est un test comportemental largement utilisé en laboratoire pour mesurer l'anxiété chez les souris. Il est basé sur la réponse spontanée de l'animal à une situation nouvelle vecteur de stress (Rodgers & Dalvi, 1997). La structure est composée de 2 bras fermés (munis de parois latérales) et de 2 bras ouverts placés perpendiculairement les uns des autres. Le temps passé dans les bras

fermés et ouverts nous permet d'établir le niveau d'anxiété des souris (Pawlak et al., 2012). Un individu plus anxieux aura tendance à passer davantage de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts (Komada et al., 2008; Pawlak et al., 2012).

Le test a été réalisé entre le jour 18 et le jour 22 post-implantation. Chaque matin, les femelles en diestrus ont été sélectionnées et placées dans une nouvelle pièce, lumières allumées. La lumière ajoute un niveau de stress chez l'animal et nécessite un temps d'adaptation. Le test a alors été effectué 5 minutes après cette durée d'adaptation. La femelle a ensuite été placée au centre de la croix, la tête vers un bras ouvert. Le temps passé au centre, dans les bras fermés et dans les bras ouverts a été chronométré pendant 5 minutes. A la suite de ces 5 minutes de test, la femelle a été retirée de la structure et replacée dans sa cage d'hébergement et la structure nettoyée à l'éthanol 70% entre chaque femelle testée.

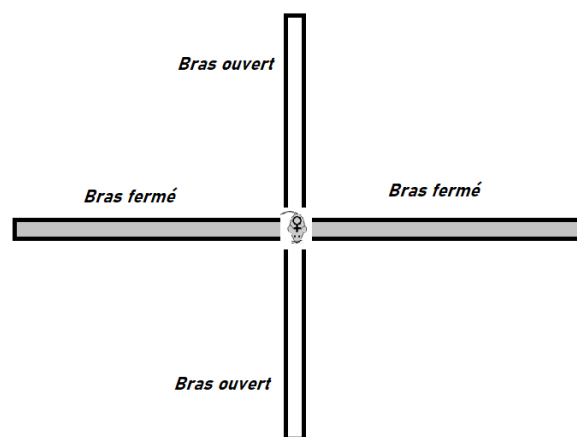


Figure 110 : Représentation schématique (vue de haut) du test du labyrinthe en croix surélevé

Exposition aux odeurs

A la suite du test comportemental, les femelles ont été isolées dans des cages individuelles contenant de la litière propre dans une pièce sans mâles. Les femelles du groupe contrôle ne devant pas être stimulées ont été placées dans une armoire fermée dans la pièce de test durant l'ensemble des stimulations afin d'éviter les échanges d'odeurs. Trois jours après l'isolement, la phase d'exposition aux odeurs a commencé et a duré du jour 22 post-implantation au jour du sacrifice. De la litière souillée de plusieurs mâles et de la litière propre ont été prélevées quelques jours avant le début des stimulations aux odeurs et congelées à -80°C pour la conserver. Chaque matin, les femelles en œstrus ont été sélectionnées et ont été exposées à de la litière souillée de mâle ou de la litière propre décongelée. La litière a été disposée dans les

cages des femelles 90 minutes avant l'euthanasie. Le temps d'exposition aux odeurs de mâles correspond au temps optimal pour induire l'expression de Cfos dans les zones d'intérêt (Halem et al., 1999).

Sacrifices, collecte du cerveau et du plasma

Les femelles ont été endormies 80 minutes après l'exposition à la litière de mâles avec une injection intra-péritonéale d'euthasol 15% (pentobarbital 362,9 mg/ml, Euthasol Vet). Du sang a été collecté dans l'oreillette droite à l'aide d'une seringue préalablement héparinée (5000 IE/ml) pour empêcher sa coagulation. Les tubes contenant le sang ont été centrifugés pendant 10 minutes à 10000 rpm pour en extraire le plasma qui a ensuite été congelé à -80°C (Figure 14). Le plasma récupéré permettra de doser les traitements dans le sang et confirmer la présence des composés délivrés par la pompe osmotique. Les animaux ont ensuite été perfusés avec une solution de saline et puis une solution de PAF 4% (Paraformaldehyde et PBS 0,01M) permettant la fixation des tissus. Les cerveaux ont été collectés et post-fixés pendant 2 heures dans une solution de PAF 4%. Deux rinçages au PBS 0,01M (phosphate-buffered saline) ont ensuite été réalisés durant 5 minutes. A la suite des rinçages, les cerveaux ont été placés dans une solution de sucrose 30% (en Phosphate-Buffered 0,1M) pendant 48 heures avant d'être congelés à -80°C.

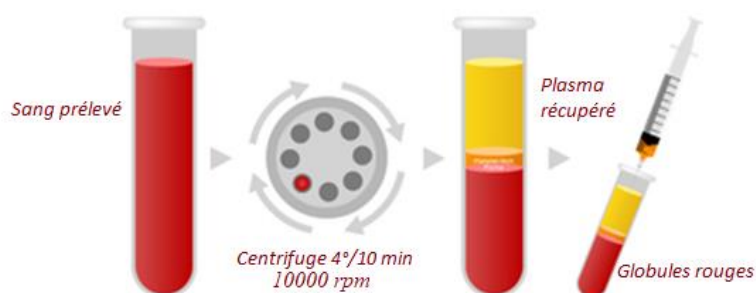


Figure 111 : Schématisation du processus de récupération du plasma des échantillons sanguins récoltés

Cryosection et immunofluorescence

Les cerveaux ont été fixés sur une plateforme avec de l'OCT (optimal cutting temperature compound) et coupés au cryostat Nx70 en coupes coronales de 30 µm. Les coupes ont été disposées dans des puits contenant du tampon PBS 0,01M puis transférées dans une solution antigel (5g polyvinyl pyrrolidone, 150g saccharose, 150ml Éthylène glycol, PBS 0,01M) et été conservées à -20°C jusqu'à la réalisation de l'immunomarquage.

Immunomarquage

Deux anticorps primaires ont été utilisés : un anticorps polyclonal dirigé contre la bêta-galactosidase généré chez le poulet (1/1000, Abcam ab134435 #GR105546-51, Lot 1821-2921) et un anticorps polyclonal anti-cfos généré chez le cochon d'inde (Synaptic Systems 226-004, lot 3-31). Les deux anticorps secondaires utilisés sont : un anticorps anti-poulet conjugué à un Alexa fluor 488 généré chez l'âne (1/500, Jackson ImmunoResearch 703-545-155, lot 14 23 55) et un anticorps anti-cochon d'Inde Alexa Fluor 546 généré chez la chèvre (1/500, Invitrogen A11074, lot 2008411). Les coupes ont été préalablement rincées dans des bains de PBS. Lors de l'étape de blocage, les échantillons ont ensuite été placés pendant 1 heure dans des puits de 1,5 ml contenant 5% de sérum d'âne (Normal Donkey serum NDS, Jackson ImmunoResearch 017-000-121, lot 131881) et 5% sérum de chèvre (Normal Goat serum NGS, Vector lab #5-1000, lot ZH0928) dans du PBST (Phosphate-Buffered Saline avec 0,3% Triton). Les échantillons ont ensuite été incubés 24 heures à 4°C dans du PBST contenant les deux anticorps primaires. Le deuxième jour, trois rinçages ont été effectués avant d'incuber les coupes pendant 2 heures dans des puits contenant les anticorps secondaires ainsi qu'une solution de DAPI (solution stock à 10mg/ml, diluée 20 fois ; Sigma-Aldrich, #D9542). Les échantillons ont finalement été rincés dans des bains de PBS. Le DAPI est un marqueur ciblant les noyaux cellulaires. Il nous permet alors d'observer l'ensemble des structures de chaque coupe de cerveau.

Les sections ont ensuite été montées sur des lames microscopiques. Une fois les sections séchées, les lames ont été recouvertes d'une lamelle avec quelques gouttes d'Aqua-Poly/Mount (#18606 Polysciences) avant l'observation finale des protéines d'intérêt avec un microscope confocal (Nikon A1R). La visualisation en fluorescence nous a permis d'observer l'expression de BGal et Cfos dans les aires d'intérêts. Le comptage des cellules a été fait avec le logiciel Imaris (x64 9.5.1). Pour chaque femelle, 2 photos ont été prises par région (hémisphère gauche et droit). Pour chacun des animaux, le nombre final de cellules comptées par région a été obtenu en faisant la moyenne des cellules comptées sur les 2 photos. Les photos ont été prises avec un grossissement X20 résultant en un champ de 636.4 um X 636.4 um (Figure 15). Certaines sections ont été perdues dans le processus de marquage/montage. D'autres étaient inexploitable et ne permettaient pas de quantifier les cellules dans les régions d'intérêt. Ces sections n'ont alors pas été prises en compte dans le processus de quantification.

La position du champ des photos de chacune des aires a été ciblée sur l'intensité maximale du marquage BGal :

- MPOA (Bregma 0.14 mm, figure 30 (Paxinos & Franklin, 2019) ; le champ de quantification a été placé latéralement au 3^{ème} ventricule et le plancher de la section contenant l'extension maximale de la commissure antérieure (1 photo a été prise par hémisphère)
- BST (Bregma 0.02 mm, figure 31 (Paxinos & Franklin, 2019) ; le champ de quantification a été placé dans la section immédiatement caudale à celle contenant la fin de la commissure antérieure, sa portion dorsale étant alignée sur ventricule latéral (1 photo a été prise par hémisphère)
- Cortex piriforme (PirC) (Bregma -1.34 mm, figure 42 (Paxinos & Franklin, 2019) ; le champ de quantification a été placé sur le plancher du cerveau de manière adjacente à la branche latérale du corps calleux (1 photo a été réalisée par hémisphère)
- Amygdale médiane postéro-dorsale (MePD) (Bregma -1.70 mm, figure 45 (Paxinos & Franklin, 2019) ; le champ de quantification a été placé sur la partie ventrale de MePD, de manière adjacente au tractus optique, le bas du champ étant aligné avec la partie ventrale du tractus optique sur la section qui contient un hippocampe dont l'extension latérale est alignée avec la portion latérale du tractus optique (1 photo a été réalisée par hémisphère)
- Amygdale médiale postéro-ventrale (MePV) (Bregma -2.06 mm, figure 48 (Paxinos & Franklin, 2019) ; le champ de quantification a été placé sur une section plus caudale à celle sélectionné pour MePD, sur le plancher du cerveau de manière presque adjacente au tractus optique (1 photo a été réalisée par hémisphère)
- Hippocampe (Bregma -2.92 mm, figure 55 (Paxinos & Franklin, 2019) ; le champ de quantification a été placé dans sa portion ventrale latéralement par rapport au ventricule latéral (1 photo a été réalisée par hémisphère)

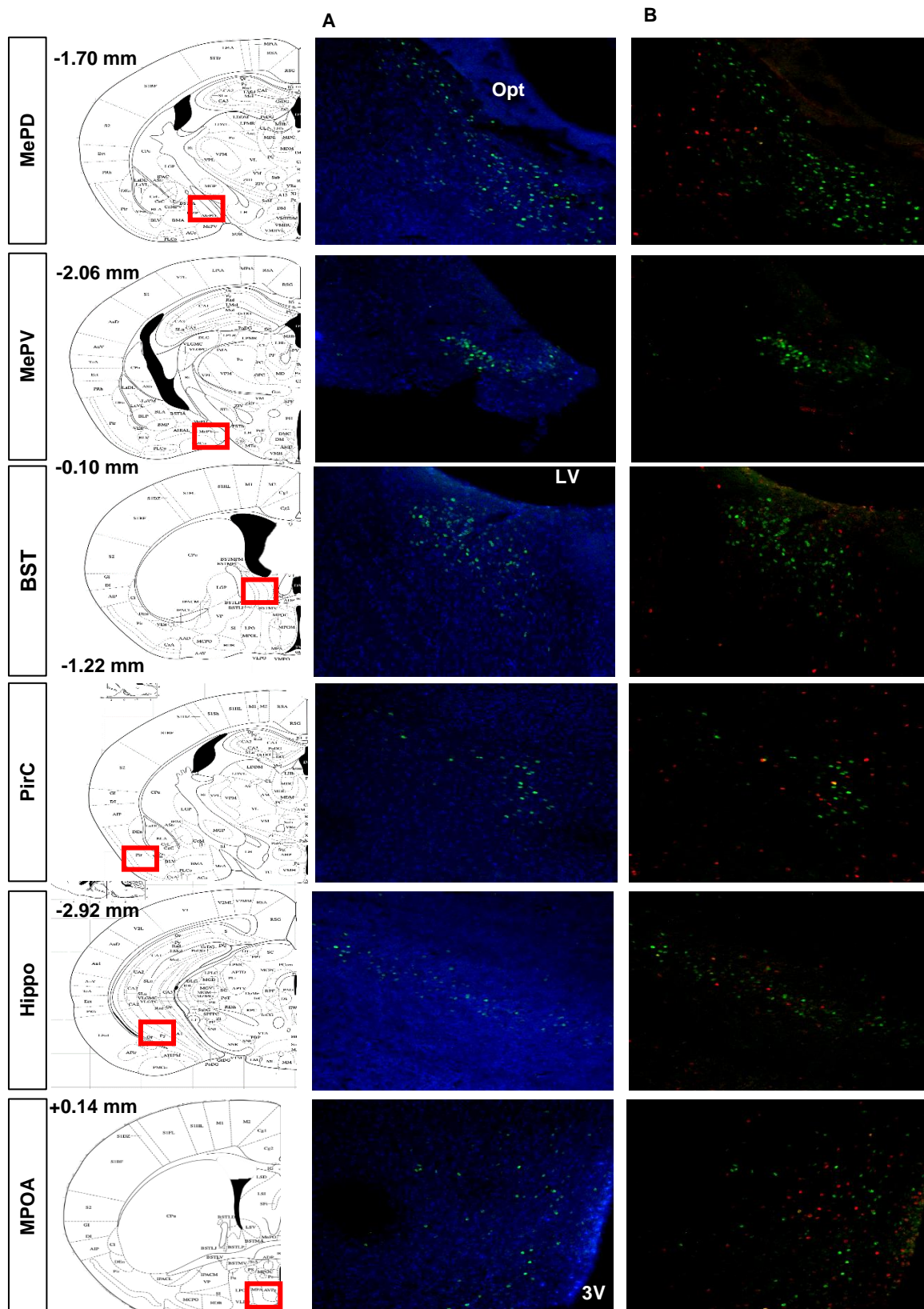


Figure 112 : Marquage par immunofluorescence de la BGal (A) et de sa co-expression avec Cfos (B) dans les différentes aires de l'étude chez une femelle contrôle exposée aux odeurs de mâles ; opt : partie ventrale du tractus optique ; LV : ventricule latéral ; 3V : 3ème ventricule

Analyses statistiques

La durée des cycles ovariens avant et après l'implantation des mini-pompes osmotiques a été analysée par un test de Kruskal-Wallis, la condition d'homoscédasticité n'étant pas respectée. Les résultats du test du labyrinthe en croix surélevé ont été analysés à l'aide d'une ANOVA simple, car les données présentaient une distribution normale (tests de Shapiro-Wilk) et la condition d'homoscédasticité était respectée (test de Bartlett). Pour les 6 régions sélectionnées, le nombre de cellules exprimant la BGal, la protéine Cfos et la co-expression des deux ont également été analysées par des tests ANOVA simples. Si l'ANOVA montrait un résultat significatif du traitement, les groupes contrôle, EE, LNG et LNGEE exposés à de la litière de mâle souillée ont été comparés au groupe de femelles ayant été exposées aux odeurs contrôles par des comparaisons a posteriori.

Résultats

Cyclicité avant et après traitement

Les différents groupes expérimentaux ont été créés à l'aide des frottis réalisés en ligne de base, afin qu'aucune différence ne soit observée dans la durée des cycles de base (Figure 16 A; $H_{(5)} = 0,3949$, $p = 0,983$). Après l'implantation des mini-pompes ALZET, la durée moyenne des cycles ne différait pas entre les groupes (Figure 16 B ; $H_{(5)} = 2,763$, $p = 0,598$). Des exemples de cyclicité représentatifs pour chacun des groupes sont illustrés dans la figure 17.

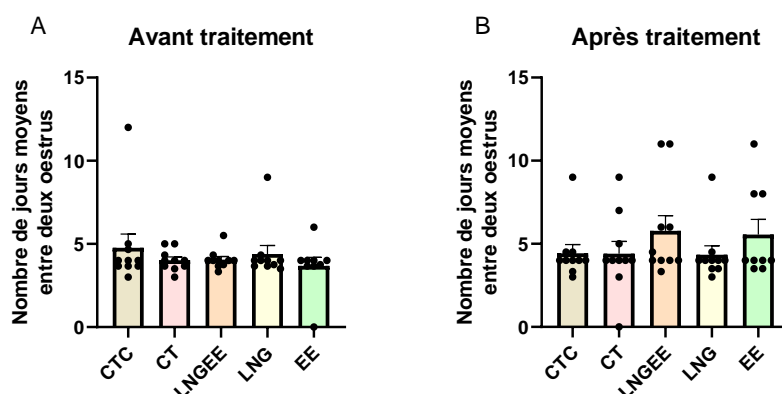


Figure 136 : Durée moyenne des cycles pour les femelles des différents groupes expérimentaux avant le début du traitement (A) et après traitement (B ; J18 à J29). Ces durées moyennes correspondent à la moyenne des nombres de jours séparant deux œstrus. EE : éthinyl estradiol ; LNG : Lévonorgestrel ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs de mâles ; CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; LNGEE : éthinyl estradiol + lévonorgestrel

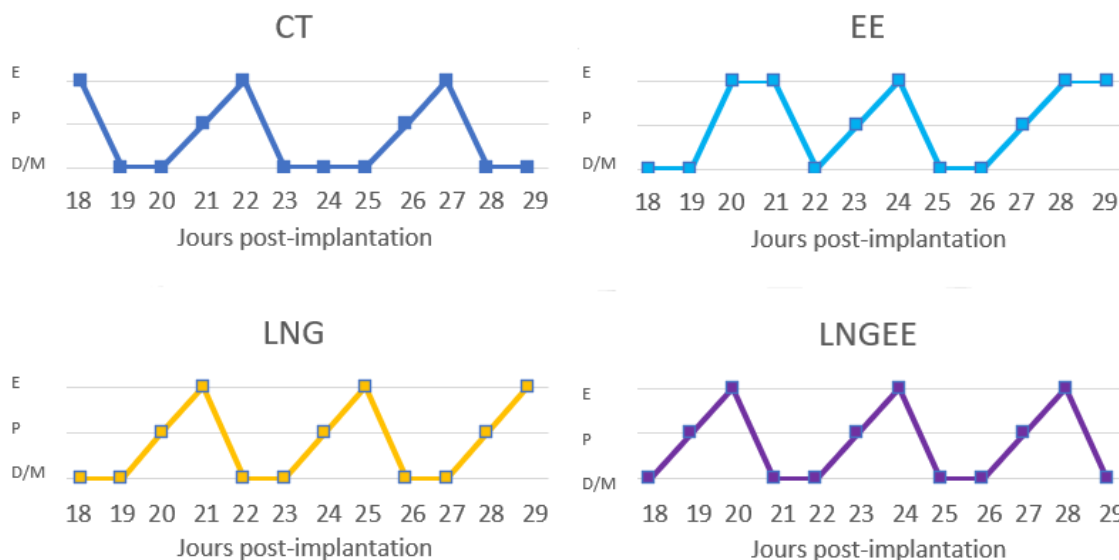


Figure 17 : Cycles œstraux 18 jours après le début du traitement observés sur 4 femelles représentatives des différents groupes. E : œstrus ; P : proœstrus ; D/M : diœstrus et méœstrus. EE : éthinyl estradiol ; LNG : Lévonorgestrel ; CT : solution contrôle ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel

Absence d'effet des traitements hormonaux sur les mesures d'anxiété

Les résultats du test du labyrinthe en croix surélevé ont été analysés selon deux méthodes différentes. Dans un premier temps, le temps total passé dans les bras ouverts a été calculé. L'analyse statistique suggère que le traitement n'a pas d'effet sur le temps passé dans les bras ouverts (Figure 18 panel A; $F_{3,44} = 0,437$, $p = 0,728$).

Dans un second temps, la préférence entre les bras ouverts et fermés a été analysée. De manière générale, la majorité des femelles de chacun des groupes présentent une préférence pour l'exploration des bras fermés (Figure 18, panel B). Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les groupes ($F_{3,30} = 0,483$, $p = 0,697$). Cependant, on observe que les animaux des groupes CT et LNG montrent une tendance à être différents de 0 (CT : $t = 1,871$, $p = 0,084$; LNG : $t = 2,324$, $p = 0,059$) suggérant une préférence pour les bras fermés, alors que les autres groupes ne montraient aucune préférence significative (EE : $t = 1,862$, $p = 0,122$; LNGEE : $t = 0,780$, $p = 0,465$).

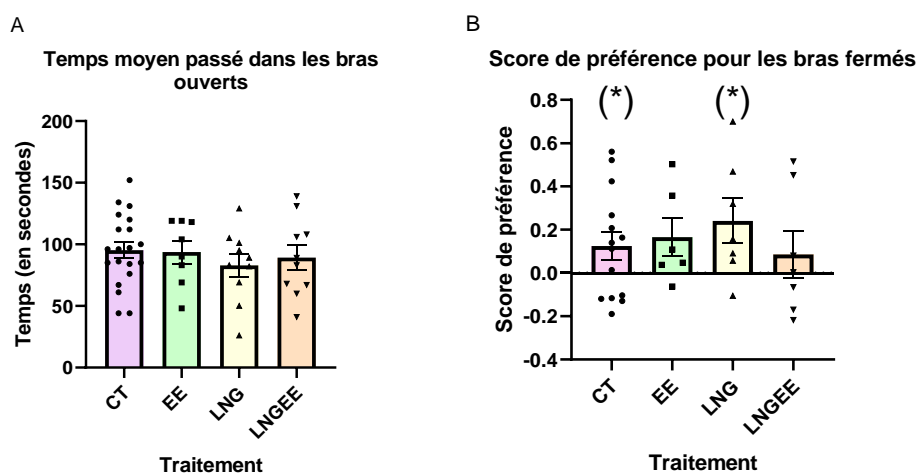


Figure 18 : Résultats observés pour les différents groupes expérimentaux dans le labyrinthe en croix surélevé ; Temps moyen passé à explorer les bras ouverts (A). Score de préférence des femelles de chacun des groupes (B). Un score de préférence positif indique une tendance à davantage explorer les bras fermés. EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; CT : groupe control ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. (*) $p < 0,1$ comparé à un score de préférence de 0 (one sample t test).

Expression de la bêta-galactosidase et de Cfos après traitement

Les résultats montrent que le traitement influence significativement l'expression de Cfos dans MePD (Figure 19 ; $F_{4,36} = 2,946$, $p = 0.033$). Plus précisément, l'expression de Cfos était plus importante chez les animaux traités au EE ($p = 0,027$) et au LNG ($p = 0,045$) en comparaison aux animaux contrôles exposés à de la litière non-souillée. On observe également que l'expression de Cfos tend à être plus importante chez les animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ($p = 0,059$) et chez les animaux traités au LNGEE ($p = 0,078$) en comparaison aux animaux contrôles exposés à de la litière non-souillée. Le traitement ne semble pas influencer significativement l'expression de la BGal ($F_{3,37} = 1,250$, $p = 0,305$), ni la co-expression des deux protéines ($F_{4,36} = 0,854$, $p = 0,500$).

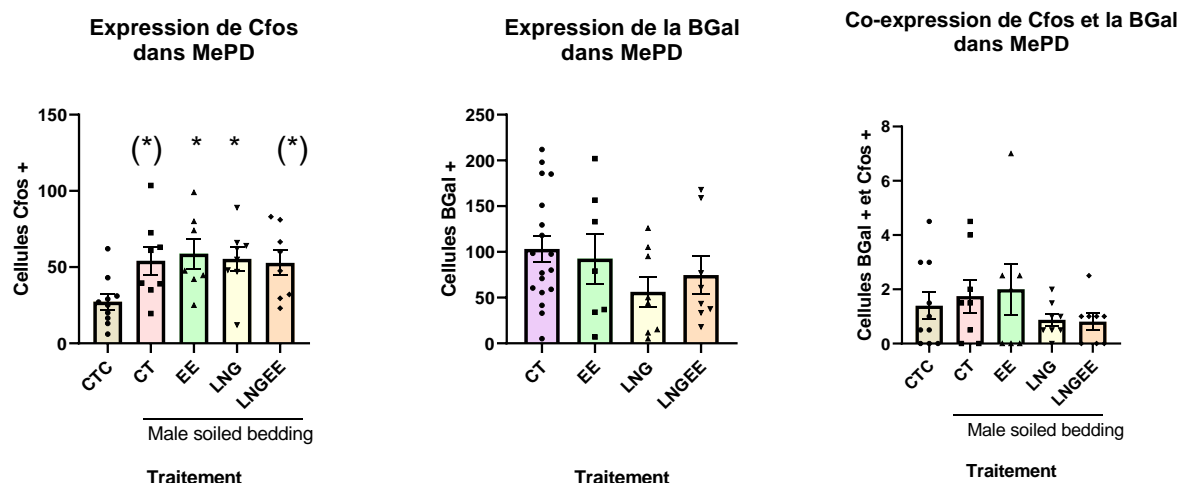


Figure 19 : Effet de l'exposition aux odeurs mâles et du traitement sur le nombre de cellules exprimant Cfos et BGal dans MePD. CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. Male soiled bedding : animaux exposés à de la litière souillée de mâle. (*) $p < 0,1$, vs groupe CTC ; * $p < 0,05$, vs groupe CTC après un effet significatif de l'ANOVA

Dans la région MePV (Figure 20), l'exposition aux odeurs ne semble pas influencer l'expression de Cfos ($F_{4,34} = 1,322$, $p = 0,282$). Il n'y a pas non plus d'effet du traitement sur l'expression de la BGal ($F_{3,35} = 0,675$, $p = 0,573$), ou sur la co-expression des deux protéines ($F_{4,34} = 0,869$, $p = 0,493$).

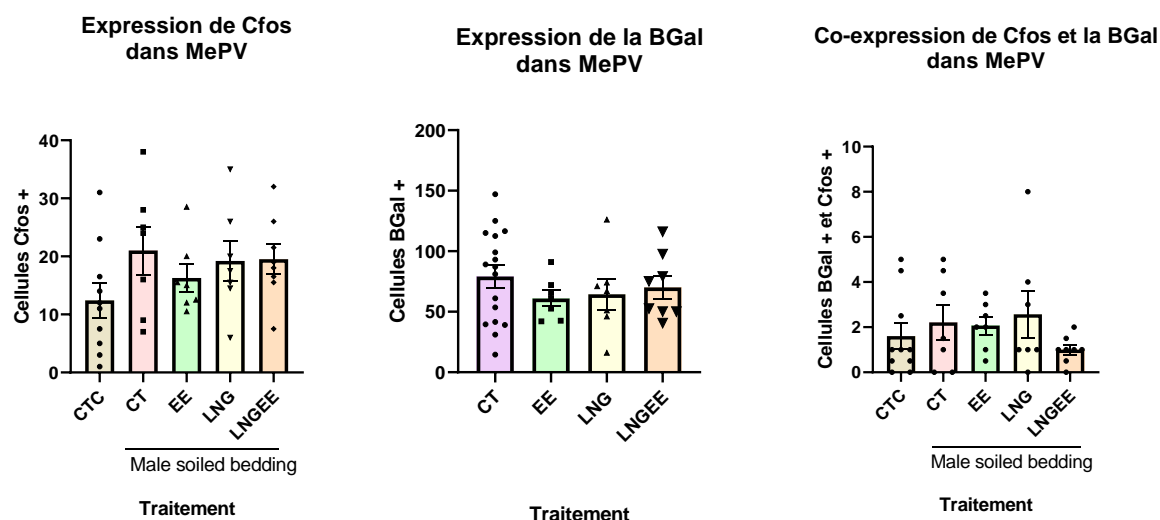


Figure 20 : Effet de l'exposition aux odeurs mâles et du traitement sur le nombre de cellules exprimant Cfos et BGal dans le MePV. CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. Male soiled bedding : animaux exposés à de la litière souillée de mâle.

Dans MPOA, les résultats montrent que le traitement influence significativement l'expression de Cfos (Figure 21 ; $F_{4,42} = 3.252$, $p = 0.021$). Plus précisément, l'expression de Cfos était significative chez les animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ($p = 0.004$), et non significative chez les femelles traitées au LNG, EE ou LNGEE ($p > 0.154$) en comparaison aux animaux contrôles exposés à de la litière non-souillée. Le traitement ne semble pas influencer l'expression de la BGal ($F_{3,43} = 0,619$, $p = 0,568$), ni la co-expression des deux protéines ($F_{4,42} = 0,256$, $p = 0,904$).

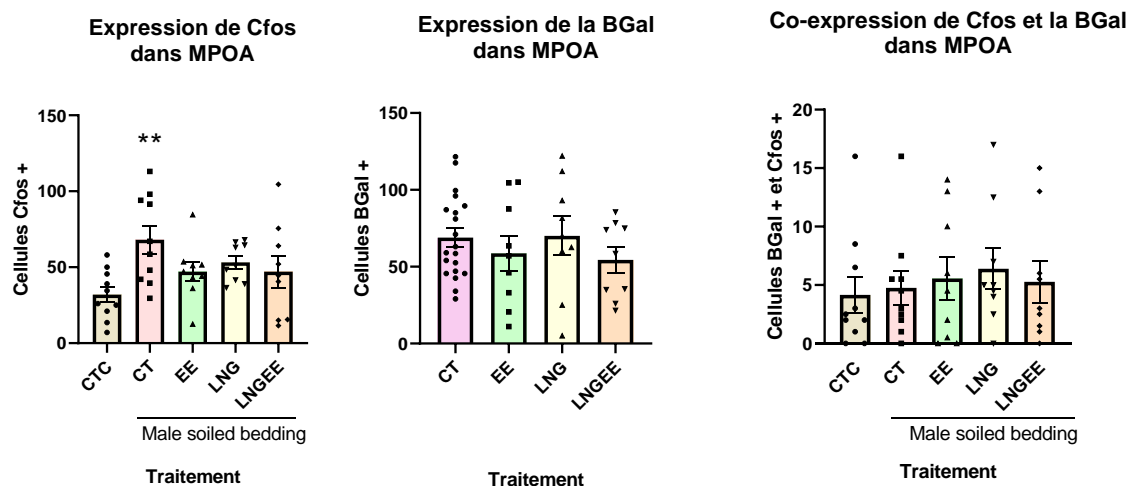


Figure 21 : Effet de l'exposition aux odeurs mâles et du traitement sur le nombre de cellules exprimant Cfos et BGal dans MPOA. CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. Male soiled bedding : animaux exposés à de la litière souillée de mâle. ** $p < 0.05$, vs groupe CTC après un effet significatif de l'ANOVA

Dans le BST (Figure 22), on observe que l'expression de Cfos tend à être plus importante chez les animaux contrôles exposés aux odeurs mâles en comparaison aux animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée. Cependant, aucun effet du traitement sur l'expression de Cfos n'a été identifié par l'analyse ($F_{4,42} = 2,201$, $p = 0.085$). Le traitement ne semble pas influencer non plus l'expression de la BGal ($F_{3,43} = 0,235$, $p = 0,871$), ni la co-expression des deux protéines ($F_{4,42} = 0,719$, $p = 0,584$).

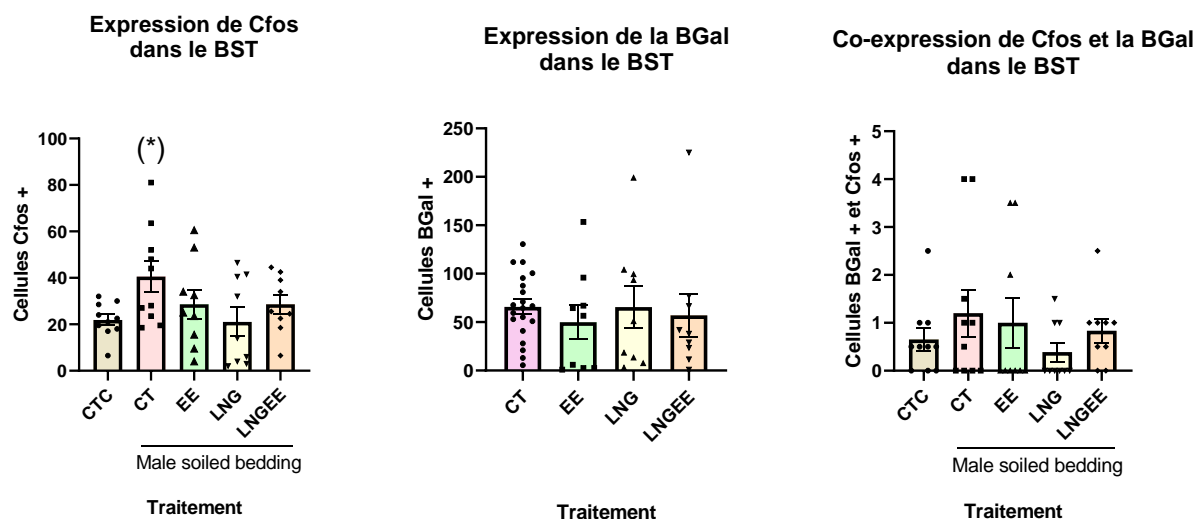


Figure 22 : Effet de l'exposition aux odeurs mâles et du traitement sur le nombre de cellules exprimant Cfos et BGal dans le BST. CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. Male soiled bedding : animaux exposés à de la litière souillée de mâle. (*) $p < 0,1$, vs groupe CTC

Les résultats montrent que le traitement influence significativement l'expression de Cfos dans le cortex piriforme (Figure 23 ; $F_{4,42} = 3.177$, $p = 0.023$). Plus précisément, l'expression de Cfos était plus importante chez les animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ($p = 0.008$) et chez les animaux exposés au LNGEE ($p = 0,024$) en comparaison aux animaux contrôles exposés à de la litière propre. Les animaux du groupe traité au LNG présentent une tendance à exprimer davantage de cellules Cfos par rapport aux animaux contrôles exposés à de la litière non-souillée ($p = 0,095$). L'expression de Cfos des femelles traitées au EE n'était pas significativement différente des niveaux de Cfos observés chez les animaux contrôles exposés aux odeurs neutres ($p > 0.182$). Le traitement ne semble pas influencer significativement l'expression de la BGal ($F_{3,43} = 1,599$, $p = 0,204$). Le traitement tend à influencer la co-expression de la BGal et la Cfos.

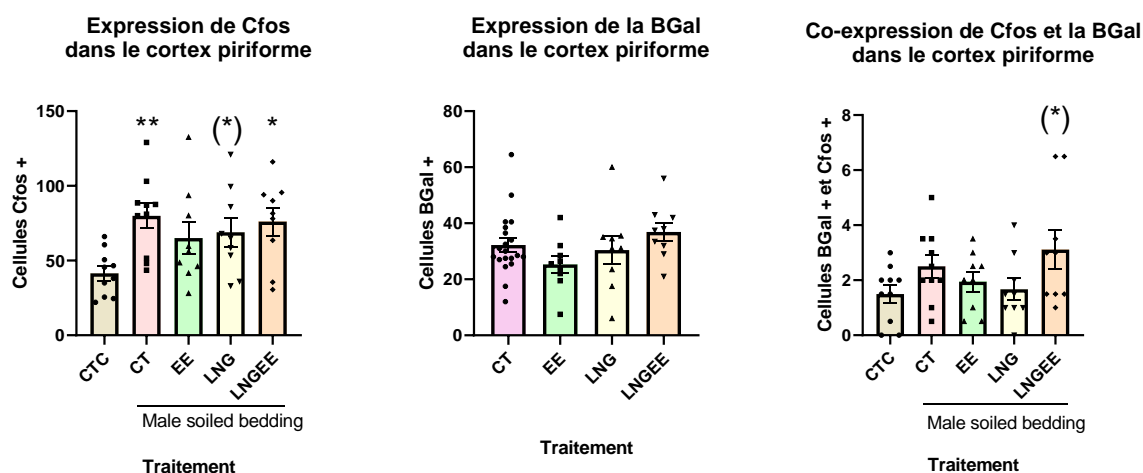


Figure 23 : Effet de l'exposition aux odeurs mâles et du traitement sur le nombre de cellules exprimant Cfos et BGal dans le cortex piriforme. CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. Male soiled bedding : animaux exposés à de la litière souillée de mâle. (*) $p < 0,1$, vs groupe CTC ; * $p < 0,05$, vs groupe CTC ; ** $p < 0,05$, vs groupe CTC après un effet significatif de l'ANOVA.

Enfin, dans l'hippocampe (Figure 24), le traitement ne semble pas influencer significativement l'expression de Cfos ($F = 0,156$, $p = 0,956$), de la BGal ($F = 0,732$, $p = 0,553$), ou de la co-expression des deux ($F = 0,200$, $p = 0,933$).

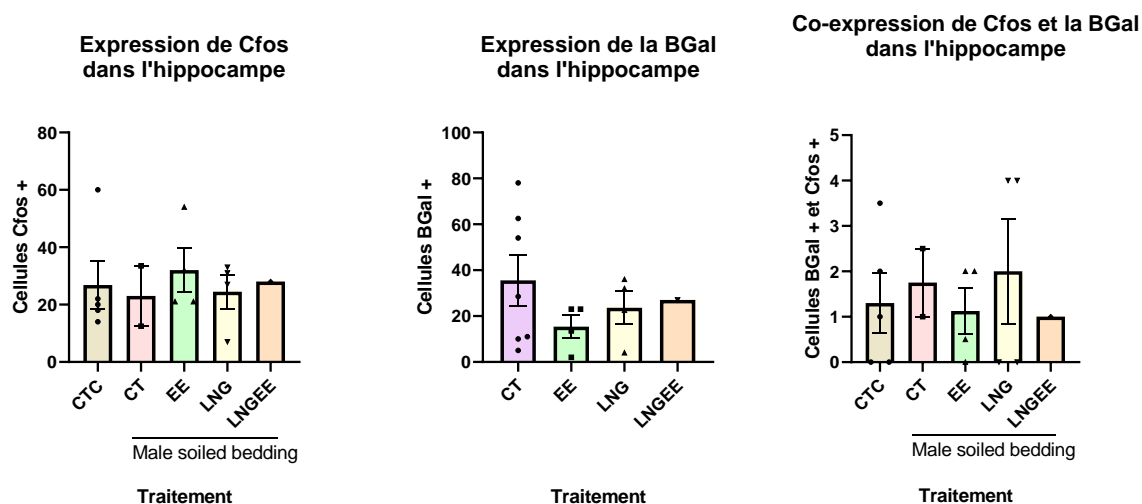


Figure 24 : Effet de l'exposition aux odeurs mâles et du traitement sur le nombre de cellules exprimant Cfos et BGal dans les hippocampes. CTC : animaux contrôles exposés à des odeurs de litière non-souillée ; CT : animaux contrôles exposés aux odeurs mâles ; EE : groupe éthinyl estradiol ; LNG : groupe Lévonorgestrel ; LNGEE : groupe éthinyl estradiol + lévonorgestrel. Male soiled bedding : animaux exposés à de la litière souillée de mâle.

Discussion

Le sujet de recherche dans lequel s'inscrit ce mémoire fait partie d'un projet global visant à modéliser la prise chronique de contraceptifs hormonaux oraux chez la souris de laboratoire, d'évaluer ses effets comportementaux, et d'étudier les aires cérébrales impliquées dans le contrôle de ces comportements. Pour ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux effets potentiels de deux composés, le LNG (30 µg/Kg/jour) et le EE (0,6 µg/Kg/jour), sur l'anxiété et les mécanismes cérébraux associés à la motivation sexuelle. Les traitements ont été délivrés pendant 5 à 6 semaines à l'aide de mini-pompes osmotiques. Les résultats obtenus montrent que le EE, le LNG ou la combinaison LNGEE aux doses utilisées n'impactent pas la durée et la régularité des cycles ovariens. Lors de l'analyse comportementale, nous observons une absence d'effet des traitements hormonaux sur les mesures d'anxiété. Enfin l'expression de Cfos en réponse à la stimulation olfactive semble être modulée par les traitements dans l'hypothalamus (MPOA) mais pas dans les aires projetant vers cette région (amygdale). L'expression de la BGal et la co-expression des deux marqueurs ne semblent pas impactées par les différents traitements. Les résultats concernant les différentes mesures effectuées dans cette étude seront discutés un à un ci-dessous.

La cyclicité avant et après traitement

Suite à l'implantation des mini-pompes osmotiques, la durée moyenne des cycles œstraux ne différait pas entre les groupes. Ces résultats indiquent que les doses du traitement LNGEE étaient insuffisantes pour inhiber la cyclicité. Une étude préliminaire du laboratoire, qui utilisait pourtant les mêmes composés aux mêmes doses, avait mis en évidence que les femelles traitées avec la combinaison de LNG et de EE montraient une inhibition du cycle, c'est à dire qu'elles étaient bloquées dans la phase de diestrus (6 femelles sur 6) et ce après 2 semaines de traitement. Par contre, le LNG et l'EE utilisés seuls ne semblaient pas affecter la cyclicité (Essiz, 2021). Les femelles de l'expérience précédente n'étaient cependant pas placées exactement dans les mêmes conditions expérimentales, puisqu'elles avaient été hébergées dans des armoires ventilées. Cet environnement est la source de nombreuses nuisances sonores qui peuvent être responsables de l'augmentation de l'anxiété chez les souris (Lauer et al., 2009). Une récente étude menée par Butler-Struben *et al.* met en avant l'importance de « variables cachées », comme les cycles lumière-obscurité, les ventilations des cages, les environnements sociaux,

pouvant expliquer la variabilité des résultats physiologiques et comportementaux des publications (Butler-Struben et al., 2022). De plus, de nombreuses études soulignent l'impact du stress sur le fonctionnement de l'axe HHG. Par exemple, le stress a un effet inhibiteur sur la sécrétion d'œstrogènes et de testostérone (Melón & Maguire, 2016; Toufexis et al., 2014). Keen-Rhinehart *et al.* montrent que le stress a de nombreuses conséquences comportementales, physiologiques et reproductives comme la dérégulation de la cyclicité, la libération de GnRH et l'ovulation (Keen-Rhinehart et al., 2009). L'ensemble de ces études permettent de suggérer qu'un environnement présentant de nombreuses nuisances sonores augmente les niveaux de stress et peut expliquer la dérégulation de la cyclicité des femelles de l'expérience précédente. Plus précisément, le système de ventilation des cages, utilisé pour la première étude, peut être une source de stress supplémentaire expliquant l'inhibition du cycle ovarien.

Plusieurs études montrent, en outre, que les femmes utilisant la contraception hormonale orale présentent une réponse altérée de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et des réponses significativement atténuées en cortisol, suite à un épisode de stress tel que la prise de parole en public (Kirschbaum et al., 1995; Mordecai et al., 2017; Rohleder et al., 2003). De plus, Roche *et al.* indiquent qu'en plus de cette réponse atténuée en cortisol, les femmes sous contraceptifs oraux ont un rythme de cortisol diurne matinal altéré avec un pic retardé et des niveaux plus élevés (Roche et al., 2013). Cette dérégulation de la libération du cortisol serait principalement due à une augmentation de la globuline liant les corticostéroïdes en circulation induite par les contraceptifs oraux (Kirschbaum et al., 1996, 1999). Porcu *et al.* montrent que des rats soumis à un traitement à long-terme de LNGEE sont plus sujets à l'anxiété lors de tests comportementaux (Porcu et al., 2012), appuyant les résultats des études précédentes. Si un traitement LNGEE peut affecter la réponse au stress, il est possible que cela rende les souris sensibles aux conditions d'hébergement, expliquant l'inhibition de la cyclicité dans la première expérience (conditions d'hébergement stressantes) mais pas dans celle-ci. Cette hypothèse est néanmoins en contradiction avec nos résultats sur l'anxiété (voir partie suivante) puisqu'un traitement LNGEE ne semble pas avoir un effet anxiogène par rapport aux animaux contrôles.

Une autre hypothèse expliquant cette incohérence des effets du traitement LNGEE sur la cyclicité serait que ces deux expériences ont été menées sur deux souches de souris différentes. En effet, le fond génétique peut influencer les comportements anxieux des souris (Sartori et al., 2011). Les souris utilisées pour l'étude précédente (Essiz, 2021) étaient des C57BL/6N. Les souris utilisées dans le cadre de ce mémoire sont des B6.129SCyp1c9a1 et proviennent du

croisement entre les souches C57BL/6N et 129/SJL sur plus de 10 générations. Homanics *et al.* soulignent que le fond génétique des souris peut influencer les comportements anxieux (Homanics et al., 1999). Cette différence de fond génétique pourrait à elle seule expliquer les différences observées dans les effets du traitement LNGEE sur l'anxiété et la cyclicité.

L'effet des traitements hormonaux sur les mesures d'anxiété

Le test EPM, tout comme le test en « open field » ou le test de la transition jour/nuit, est un test couramment utilisé pour étudier les comportements anxieux chez la souris (Carola et al., 2002). Une distinction doit être apportée entre les comportements anxieux et le stress, par exemple lié à la peur (Gouveia Jr et al., 2004). Le stress peut être défini comme un état d'urgence d'un organisme face à une situation particulière. Cet état physiologique peut s'accompagner d'une réponse émotionnelle. La peur, par exemple, est une réaction normale face à une situation menaçante. Lorsque ce sentiment persiste lors de situations inappropriées ou apparaît de façon chronique, on parle d'anxiété : l'anticipation d'une menace (Bourin et al., 2007; Daviu et al., 2019). Les comportements anxieux peuvent être influencés par les rythmes circadiens ainsi que par la structure et les conditions dans lesquelles le test est effectué. La phase jour/nuit dans laquelle les souris sont testées peut par exemple entraîner des résultats comportementaux différents. L'éclairage de la pièce, la présence de l'expérimentateur durant le test, la position du dispositif de test dans le cubicule, la manipulation ou les changements de conditions d'hébergement précédant le test peuvent également constituer des facteurs impactant les résultats comportementaux (Rodgers & Dalvi, 1997; Walf & Frye, 2007). Dans une étude de Mora *et al.*, l'éclairage de la salle de test avait une influence sur leurs résultats puisque le test effectué avec un éclairage puissant réduisait fortement le temps d'exploration des bras ouverts (Mora et al., 1996). De nombreux facteurs peuvent alors influencer les résultats comportementaux, expliquant les variations entre les résultats comportementaux des études et les résultats des tests d'anxiété effectués pour ce projet (voir paragraphes suivants).

Les résultats de la première étude du laboratoire suggéraient que les femelles du groupe LNGEE allaient rester bloquées en diestrus (Essiz, 2021). C'est également la phase la plus longue du cycle œstral (Byers et al., 2012), facilitant la réalisation des tests. Pour ces raisons, toutes les femelles ont été testées dans la même phase du cycle : le diestrus. Plusieurs études sur l'anxiété associée au cycle œstral montrent que durant les phases du cycle ovarien, les comportements anxieux varient. Les femelles en proestrus et en œstrus passent significativement plus de temps

dans les bras ouverts en comparaison avec celles en métrus et diestrus (Mora et al., 1996). Pour ce mémoire, les souris femelles alors testées lors de la phase de diestrus présenteraient d'ores et déjà une augmentation de l'anxiété lors du test, indépendamment du traitement administré. Néanmoins, certaines études ne montrent pas de variations de l'anxiété entre les différentes phases du cycle (Marcondes et al., 2001; Nomikos & Spyraiki, 1988).

Le temps passé, par les différents groupes, dans les bras ouverts n'était pas significativement plus long par rapport au groupe CT. Les traitements administrés dans le cadre de ce projet étaient sous-dosés par rapport aux pilules contraceptives et permettaient de continuer d'observer des cycles ovariens. Les pilules contraceptives empêchent l'ovulation chez la femme (Casado-Espada et al., 2019). Les effets qu'on observerait dans ce test d'anxiété pourraient alors être plus marqués à plus fortes doses. En effet, l'administration de faibles doses de EE et de LNG ne diminuerait pas les taux de progestérone et d'alloprégnanolone, connus pour avoir des effets anxiolytiques (Porcu et al., 2012; Santoru et al., 2014b). Par ailleurs, le test EPM effectué par Simone *et al.* montre qu'à faibles doses, les femelles traitées avec du EE (10 µg), du LNG (20µg) et du LNGEE augmenteraient le temps passé dans les bras ouverts. Ils montrent alors un effet anxiolytique de ces 2 composés à faibles doses. Ces 2 composés administrés à plus haute dose induisent tout de même des réponses anxiogènes lors du test (Simone et al., 2015). Ces observations suggèrent que les résultats des tests d'anxiété dépendent fortement de la dose administrée. Elles nous permettent d'expliquer l'absence d'effet significatifs des traitements de notre étude. Dans leur étude, Porcu *et al.* montrent que des rats exposés à du LNG (0,125 mg) ou LNGEE (0,125 mg et 0,03 mg) à long terme (4 semaines) présentent des comportements plus anxieux que les contrôles, avec une diminution de 56% et 52% du temps passé dans les bras ouverts d'un EPM (Porcu et al., 2012). C'est également ce que montre Follesa et al. chez les rats femelles traitées au LNGEE (125 et 30 µg/j) (Follesa et al., 2002). Les résultats obtenus pour la cyclicité, développés dans la partie précédente, nous permettent de supposer qu'un traitement LNGEE peut affecter la cyclicité et la réponse au stress, supportant les résultats de Porcu *et al.* Les doses utilisées dans le cadre de ce projet ne seraient alors pas suffisantes pour observer une différence des niveaux d'anxiété des femelles, expliquant l'absence d'effets des traitements sur l'anxiété.

D'autres hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'effets des traitements sur le temps passé dans les bras ouverts. Tout d'abord, les méthodes d'administration des traitements hormonaux diffèrent selon les études. Pour ce mémoire, nous avons utilisé des mini-

pompes osmotiques. Dans les études citées précédemment, les traitements ont été délivrés par injections quotidiennes (Porcu et al., 2012; Simone et al., 2015) ou administrations orales (Santorù et al., 2014b). Le temps d'exposition aux traitements diffère également entre les études. Dans le cadre de ce mémoire, les tests ont été réalisés entre le jour 18 et le jour 22 post-implantation. Les études citées testent les femelles à 21 jours (Simone et al., 2015) ou 4 semaines (Porcu et al., 2012; Santorù et al., 2014b) après le début des traitements. Ces différences de protocole pourraient expliquer les variations des résultats observés.

En plus du temps passé dans les bras ouverts, la préférence pour les bras ouverts et fermés a été analysée. Les groupes LNG et contrôle de ce mémoire présentent une tendance de préférence pour les bras fermés. À l'inverse, bien que les effets ne soient pas significatifs, les souris traitées au EE et au LNGEE ne montrent pas cette tendance à préférer les bras fermés. En outre, un effet anxiolytique de l'EE est mentionné dans la littérature (Porcu et al., 2012) et de nombreux d'articles mettent en évidence le rôle protecteur des œstrogènes dans les symptômes dépressifs et anxieux chez les rongeurs (Díaz-Véliz et al., 1997; Nomikos & Spyraiki, 1988). En effet, selon Porcu *et al.* l'EE n'augmenterait pas l'anxiété alors qu'un traitement LNGEE induirait l'augmentation de l'anxiété par rapport aux contrôles, suggérant un effet anxiogénique du LNG et un effet protecteur de l'EE (Porcu et al., 2012).

L'étude des cycles menstruels et de l'anxiété permet aussi d'observer ce rôle protecteur des œstrogènes. Les changements des taux d'œstrogènes circulants durant les cycles menstruels chez les femmes sont associés aux symptômes anxieux (Fink et al., 1996; Pearlstein, 1995). Plus précisément, à l'approche de la fin des cycles menstruels, les syndromes prémenstruels tels que l'augmentation de l'irritabilité et de l'anxiété sont associés à la chute en œstrogènes circulants. Néanmoins d'autres études portant sur l'effet de l'estradiol (E2) montrent des résultats controversés. Les effets de ce composé sur l'anxiété dépendraient aussi bien de la dose administrée que du test utilisé (Simone et al., 2015).

Les différentes études nous permettent de suggérer que l'absence d'effets des traitements sur le temps passé dans les bras ouverts et l'absence de résultats significatifs pour l'étude de la préférence pour les bras ouverts et fermés, pourraient s'expliquer par un dosage trop faible des traitements administrés. Il est également possible que les différences entre les résultats obtenus et ceux des études s'expliquent par des différences de méthodes d'administration des traitements hormonaux et de temps d'exposition aux traitements.

Analyse de l'expression de Cfos en réponse à la stimulation olfactive et les différents traitements

Le système olfactif joue un rôle important dans l'établissement des comportements sexuels et permet de détecter plus de 100 000 odeurs différentes (McClintock, 1998). Les cellules sensorielles exprimant des récepteurs olfactifs projettent vers le bulbe olfactif principal (MOB) ou vers le bulbe olfactif accessoire (AOB) (Pardo-Bellver et al., 2012). Le AOB est généralement connu pour être impliqué dans la détection des phéromones par l'organe voméronasal et influençant les comportements reproducteurs (Keller et al., 2009). Les informations olfactives de AOB sont envoyées vers l'amygdale médiane (MeA), relayant les informations au BNST, qui, à son tour, projette vers le MPOA (une région clé dans l'activation des comportements sexuels mâles et femelles) (Hull et al., 1999; Micevych & Meisel, 2017) et vers le VMH (Halem et al., 1999; Ishii & Touhara, 2019). Le noyau amygdalien médial, subdivisé en plusieurs régions, reçoit les projections convergentes des bulbes olfactifs principaux (MOB) et accessoires (AOB). Une de ses subdivisions, le MePD, projette les informations vers les aires contrôlant les comportements reproducteurs, tels que le BST postéro-médial et le MPOA (Pardo-Bellver et al., 2012). Le MePV transmet ces informations vers des structures impliquées davantage dans les comportements défensifs comme le BST postéromédial. (Pardo-Bellver et al., 2012). Le MOB projette également vers le cortex piriforme et les noyaux corticaux antérieurs et postéro-corticaux de l'amygdale (Ishii & Touhara, 2019; Meredith, 1998). Le cortex piriforme est responsable de l'encodage des odeurs et de leur apprentissage (Srinivasan & Stevens, 2018). Il permet de coder l'identité et l'intensité d'une odeur (Blazing & Franks, 2020). Il envoie principalement ces informations vers l'hippocampe (Martínez-García et al., 2012). Parada *et al.* indiquent que le cortex piriforme fait partie des régions du cerveau qui traitent également les informations génitosensorielles et la récompense (Parada et al., 2010).

Les résultats de ce mémoire ont tout d'abord montré que la stimulation aux odeurs a induit l'effet attendu. L'expression de Cfos est significativement plus élevée dans le cortex piriforme ainsi que dans le MPOA et tend à être plus élevée dans le MePD et le BST chez les animaux du groupe contrôle exposés aux odeurs de mâles en comparaison aux animaux exposés à des odeurs neutres. Toutefois, la stimulation aux odeurs n'a pas eu d'effet sur l'expression de Cfos dans le MePV et l'hippocampe. Les résultats précédents du mémoire de Yüskel Essiz montraient une

induction de l'expression de Cfos avec la stimulation olfactive dans le MPOA, le VMH et le MeA. Ils ne montraient pas non plus d'augmentation significative de Cfos dans le BST en réponse à la stimulation olfactive, coïncidant avec nos résultats actuels (Essiz, 2021). L'expression de Cfos en fonction de différents types de stimulation olfactive est bien documentée (Brock et al., 2012; Hull et al., 1999; Keller et al., 2006; Piekarski et al., 2013). De nombreuses études soutiennent nos résultats et montrent une activation neuronale marquée via l'induction de Cfos dans différentes régions, dont le MePD, MeA et le MPOA, suite à une exposition directe à un mâle, aux urines de mâles, ou de la litière souillée (Flanagan-Cato & McEwen, 1995; Halem et al., 1999; Keller et al., 2006). L'étude de Brock *et al.* montre également que l'exposition à l'urine de mâles induit significativement plus de cellules exprimant la protéine Cfos dans le cortex piriforme (Brock et al., 2012). Les études sur l'induction de Cfos avec une stimulation olfactive dans le BST sont plus mitigées, montrant un effet variable (Brock et al., 2012; Halem et al., 1999; Keller et al., 2006), nous permettant d'expliquer l'absence significative d'effet de la stimulation dans cette aire cérébrale. Beaucoup d'études sur l'induction de Cfos dans l'hippocampe suite à une stimulation olfactive ne montrent également pas non plus d'effet dans cette région (Brock et al., 2012; Halem et al., 1999; Keller et al., 2006).

L'effet des traitements hormonaux a été étudié sur l'expression de la protéine Cfos induite par une stimulation olfactive. L'effet du traitement ne sera discuté que pour les noyaux où un effet de la stimulation olfactive a été observé. Pour la région MePD, bien que chez les animaux contrôles exposés aux odeurs de mâles ne montrent pas d'induction significative de Cfos, ils tendent à en exprimer davantage. Le traitement LNGEE tend également à induire cette expression. Les traitements EE ou LNG seuls induisent aussi l'expression de la protéine en réponse aux odeurs mâles. Ces résultats suggèrent alors que les traitements n'influencent pas l'expression de Cfos dans cette aire. Des résultats préliminaires du laboratoire montraient pour le MeA une augmentation du nombre de cellules exprimant Cfos chez les femelles contrôles exposées aux odeurs de mâles, mais une atténuation de cette réponse avec les différents traitements (Essiz, 2021). Bien que les données de cette expérience précédente montraient un effet du traitement sur l'expression de la protéine Cfos, les résultats de ce mémoire suggèrent que l'exposition à des contraceptifs n'affecte pas l'activation de la protéine dans le MePD.

Dans le MPOA, on observe que les 3 traitements hormonaux impactent l'expression de Cfos dans cette région. L'étude précédente du laboratoire a également montré que l'activation dans cette région était moindre chez les animaux exposés au LNG (Essiz, 2021). Ensemble, ces résultats confirment un effet des contraceptifs hormonaux sur cette aire.

De manière intéressante, l'étude précédente du laboratoire, menée par Yüksel Essiz, montrait un effet marqué du traitement et de la stimulation aux odeurs pour le MPOA et le VMH, mais un effet moindre pour le MeA (Essiz, 2021). C'est également ce que montrent nos résultats actuels. Les traitements n'ont pas impacté significativement l'expression de Cfos dans le MePD, contrairement au MPOA. Ces données suggèrent alors que le relais des informations olfactives par l'amygdale est toujours présent mais que l'intégration dans l'aire préoptique et l'hypothalamus semble affectée par les traitements hormonaux.

L'étude du BST montre qu'une stimulation aux odeurs tend à induire l'expression de Cfos et que les traitements ne semblent pas impacter cette expression. Des résultats précédents du laboratoire ne montraient pas non plus d'effet significatif, appuyant nos données (Essiz, 2021). Celles-ci suggèrent alors que les traitements hormonaux n'impactent pas l'expression de la protéine et l'activation neuronale dans cette région.

Dans le cortex piriforme, la stimulation aux odeurs et les traitements semblent impacter l'expression de Cfos. Les femelles du groupe exposées au LNGEE, tout comme les femelles contrôles exposées aux odeurs de mâles, expriment davantage la protéine. Toutefois, cet effet n'est pas observé dans le groupe exposé à l'EE et est observé, de manière non significative, dans le groupe exposé au LNG. Ces résultats suggèrent que les traitements hormonaux diminuent l'activation neuronale, et notamment le EE et le LNG seul.

Enfin, l'étude de l'hippocampe ne montre pas d'effet de la stimulation aux odeurs sur l'expression de Cfos. Les traitements n'impactent pas non plus l'expression de la protéine. Rappelons que de nombreuses études sur l'induction de Cfos suite à une stimulation olfactive ne montrent pas d'effet dans l'hippocampe (Brock et al., 2012; Halem et al., 1999; Keller et al., 2006). De plus, de nombreuses sections ont été perdues dans le processus de l'immunofluorescence et certaines étaient inexploitables, il est donc difficile d'interpréter les résultats au vu du faible nombre de sujets.

Les données de ce mémoire nous permettent de proposer que le relais des informations olfactives au niveau de l'amygdale médiane, BST et cortex piriforme n'est pas impacté par les traitements, mais que l'intégration dans l'hypothalamus (MPOA) semble affectée par les contraceptifs hormonaux. Un des mécanismes par lesquels la contraception affecterait la libido est la diminution de l'intégration de l'information sensorielle par des noyaux centraux qui répondent habituellement à des stimulus sexuels.

L'implication des neurones à aromatase dans l'intégration de l'information olfactive

L'aromatisation permet la synthèse d'œstrogènes qui médient leurs effets via les récepteurs œstrogéniques. L'expérience précédant ce mémoire visait à mesurer l'activation des neurones exprimant ER α dans le cerveau des souris femelles, traitées au LNG, EE ou LNGEE, après une stimulation olfactive. Les résultats montraient une augmentation de l'activation de ces neurones avec une exposition aux odeurs de mâles. De plus, un traitement chronique avec du LNG diminuait l'activation de ces récepteurs, de façon marquée dans le VMH et le MPN, suggérant que la sensibilité de ces neurones était impactée par le traitement. Pour ce mémoire, nous avons utilisé une lignée de souris rapportrices appelées aromatase-IRES-plap-IRES-nuclear lacZ (ARO-IPIN). Ces souris expriment le gène nLacZ qui code pour la β -galactosidase – BGal – dans les neurones exprimant l'aromatase. Nous nous sommes intéressés à l'activation des neurones permettant la synthèse des œstrogènes pour observer l'impact potentiel des différents traitements.

Les résultats de ce mémoire montrent que les traitements, associés à une stimulation aux odeurs, n'impactent pas l'expression de la BGal dans les aires cérébrales étudiées. Dans une étude, Wu *et al.* visaient à visualiser les neurones exprimant l'aromatase dans le cerveau de souris ARO-IPIN en quantifiant également l'expression de la BGal. Utilisant le même modèle de souris que dans ce projet, cette étude est alors intéressante. Ils ont montré que l'aromatase était clairement exprimée dans le MPOA, le BNST et le MeA (Wu et al., 2009). Stanić et al. ont également étudié l'expression de l'aromatase dans le cerveau de souris transgéniques ; la transcription de la protéine fluorescente verte améliorée (eGFP) se produit suite à l'activation du gène *Cyp19A1*, permettant de marquer le soma et les fibres des cellules exprimant l'aromatase. Ils ont trouvé une expression de l'aromatase élevée dans le BNST, le MPOA, le MePD et le MePV. L'expression de l'aromatase était également plus rare dans l'hippocampe. La distribution des neurones exprimant l'aromatase dans leur étude est similaire à celle décrite dans l'étude de Wu

et al. (Stanić et al., 2014). Ensemble, ces études mettent en avant l'expression de l'aromatase dans plusieurs régions du cerveau ciblées pour ce mémoire. Néanmoins, nos résultats suggèrent que la stimulation aux odeurs et les traitements hormonaux n'impactent pas l'activation neuronale et l'expression de la BGal dans ces régions. Ces résultats semblent indiquer que les neurones à aromatase ne sont pas impliqués dans ce processus d'intégration olfactive des phéromones sexuels.

Cependant, une hypothèse peut être envisagée pour expliquer ces résultats. En effet, il est possible que l'information olfactive induise des changements rapides de l'activité de l'aromatase, que nous ne pouvons observer. Cornil *et al.* montrent que l'inhibition de l'aromatase entraîne des changements rapides comportementaux chez des cailles mâles intacts mais également castrés et traités avec de la testostérone. Ils supposent alors que ces comportements résultent des changements rapides dans la synthèse cérébrale des œstrogènes plutôt que dans leur production gonadique (Cornil et al., 2006). Une deuxième étude soutenant les changements rapides de l'activité de l'aromatase montre que cette activité est significativement modifiée dans le MPOA chez des cailles mâles, 5 minutes après des interactions visuelles ou sexuelles avec une femelle (De Bournonville et al., 2013). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité de l'aromatase centrale est rapidement régulée. L'absence d'effets des traitements sur l'expression de la BGal et la co-expression de Cfos et de la BGal pourrait alors être expliquée par le fait que pour étudier l'activation neuronale via l'induction de Cfos, les souris sont sacrifiées 90 minutes après la stimulation olfactive. Or l'activité de l'aromatase centrale étant rapidement régulée, passé 90 minutes, nous ne serions pas en mesure de mesurer de différences dans l'expression de Cfos dans les neurones exprimant l'aromatase.

Conclusion

La recherche pour ce mémoire visait à modéliser et mettre en évidence certains effets secondaires de la pilule contraceptive de manière expérimentale.

Nos résultats ont montré que les femelles ont continué à cycler à la suite des différents traitements hormonaux nuanciant les résultats préliminaires et suggérant peut-être un effet des conditions d'hébergements. Les tests d'anxiété n'ont pas montré un effet de ce comportement avec la prise chronique de EE, LNG ou LNGEE. D'autres études suggèrent cependant qu'un traitement chronique œstrogéno-progestatif pourrait favoriser l'anxiété. Enfin, l'observation de l'induction de l'expression de la protéine Cfos a permis de confirmer l'effet d'une stimulation olfactive sur l'expression de cette protéine et l'impact d'un traitement hormonal sur cette activation neuronale dans plusieurs régions du cerveau impliquées dans les comportements reproducteurs femelles. Les données ne montrent pas d'effet d'une stimulation olfactive et des contraceptifs hormonaux sur l'expression de la BGal ou sur la co-expression de Cfos et de la BGal dans les neurones exprimant l'aromatase. Les données des marquages au niveau du cerveau amènent néanmoins des pistes de réflexion quant aux mécanismes régulant ces effets comportementaux par les contraceptifs, qui sont inconnus à l'heure actuelle.

Bibliographie

1. Balthazart, J., Baillien, M., Cornil, C. A., & Ball, G. F. (2004). Preoptic aromatase modulates male sexual behavior : Slow and fast mechanisms of action. *Physiology & behavior*, 83(2), 247-270.
2. Blazing, R. M., & Franks, K. M. (2020). Odor coding in piriform cortex : Mechanistic insights into distributed coding. *Current opinion in neurobiology*, 64, 96-102.
3. Bodenmann, G., Atkins, D. C., Schär, M., & Poffet, V. (2010). The association between daily stress and sexual activity. *Journal of Family Psychology*, 24(3), 271.
4. Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 21(6), 567-574.
5. Brann, D. W., Lu, Y., Wang, J., Zhang, Q., Thakkar, R., Sareddy, G. R., Pratap, U. P., Tekmal, R. R., & Vadlamudi, R. K. (2021). Brain-derived estrogen and neural function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 132, 793-817.
6. Brann, D. W., Putnam, C. D., & Mahesh, V. B. (1990). γ -Aminobutyric AcidA Receptors Mediate 3α -Hydroxy-5 α -Pregnan-20-one-Induced Gonadotropin Secretion. *Endocrinology*, 126(4), 1854-1859.
7. Briskin, C., Hess, K., & Jeitziner, R. (2015). Progesterone and overlooked endocrine pathways in breast cancer pathogenesis. *Endocrinology*, 156(10), 3442-3450.
8. Brock, O., Keller, M., Douhard, Q., & Bakker, J. (2012). Female mice deficient in alpha-fetoprotein show female-typical neural responses to conspecific-derived pheromones. *PloS one*, 7(6), e39204.
9. Buffet, N. C., Djakoure, C., Maitre, S. C., & Bouchard, P. (1998). Regulation of the human menstrual cycle. *Frontiers in neuroendocrinology*, 19(3), 151-186.
10. Butler-Struben, H. M., Kentner, A. C., & Trainor, B. C. (2022). What's wrong with my experiment? : The impact of hidden variables on neuropsychopharmacology research. *Neuropsychopharmacology*, 47(7), 1285-1291.

11. Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4), e35538.
12. Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*, 48(1), A-4I.
13. Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural brain research*, 134(1-2), 49-57.
14. Casado-Espada, N. M., de Alarcón, R., de la Iglesia-Larrad, J. I., Bote-Bonaechea, B., & Montejo, Á. L. (2019). Hormonal contraceptives, female sexual dysfunction, and managing strategies : A review. *Journal of clinical medicine*, 8(6), 908.
15. Casey, P. M., MacLaughlin, K. L., & Faubion, S. S. (2017). Impact of contraception on female sexual function. *Journal of Women's Health*, 26(3), 207-213.
16. Chachlaki, K., Garthwaite, J., & Prevot, V. (2017). The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(9), 521-535.
17. Charlier, T. D., Cornil, C. A., Ball, G. F., & Balthazart, J. (2010). Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(10), 1094-1105.
18. Christin-Maitre, S. (2013). History of oral contraceptive drugs and their use worldwide. *Oral Contraceptive Drugs*, 27(1), 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.11.004>
19. Cinar, N., Harmanci, A., Demir, B., & Yildiz, B. O. (2012). Effect of an oral contraceptive on emotional distress, anxiety and depression of women with polycystic ovary syndrome : A prospective study. *Human reproduction*, 27(6), 1840-1845.
20. Cooper, D. B., Patel, P., & Mahdy, H. (2022). Oral contraceptive pills. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
21. Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse : Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>

22. Cornil, C. A. (2018). On the role of brain aromatase in females : Why are estrogens produced locally when they are available systemically? *Journal of Comparative Physiology A*, 204(1), 31-49.
23. Cornil, C. A., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., Baillien, M., & Balthazart, J. (2006). Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. *Behavioural brain research*, 166(1), 110-123.
24. Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of stress*, 11, 100191.
25. De Bournonville, C., Dickens, M. J., Ball, G. F., Balthazart, J., & Cornil, C. A. (2013). Dynamic changes in brain aromatase activity following sexual interactions in males : Where, when and why? *Psychoneuroendocrinology*, 38(6), 789-799.
26. de Bournonville, C., Balthazart, J., Ball, G. F., & Cornil, C. A. (2016). Non-ovarian aromatization is required to activate female sexual motivation in testosterone-treated ovariectomized quail. *Hormones and behavior*, 83, 45-59.
27. Delli, V., Silva, M. S., Prévot, V., & Chachlaki, K. (2021). The KiNG of reproduction : Kisspeptin/nNOS interactions shaping hypothalamic GnRH release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 532, 111302.
28. Díaz-Véliz, G., Alarcón, T., Espinoza, C., Dussaubat, N., & Mora, S. (1997). Ketanserin and anxiety levels : Influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(3), 637-642.
29. Drucker, D. J. (2020). *Contraception : A concise history*. MIT Press.
30. Duittoz, A., & Prévot, V. (2014). *Développement, neuroanatomie et fonction des neurones à Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)*.
31. Essiz, Y. (2021). *Thesis, COLLÉGIALITÉ*.
32. Fait, T., Buryak, D., Cirstoiu, M.-M., Luczai, E., & Janczura, R. (2018). Needs and preferences of women users of oral contraceptives in selected countries in Central and Eastern Europe. *Drugs in context*, 7.

33. Fink, G., Sumner, B. E., Rosie, R., Grace, O., & Quinn, J. P. (1996). Estrogen control of central neurotransmission : Effect on mood, mental state, and memory. *Cellular and molecular neurobiology*, 16(3), 325-344.
34. Flanagan-Cato, L. M., & McEwen, B. S. (1995). Pattern of Fos and Jun expression in the female rat forebrain after sexual behavior. *Brain research*, 673(1), 53-60.
35. Follesa, P., Porcu, P., Sogliano, C., Cinus, M., Biggio, F., Mancuso, L., Mostallino, M., Paoletti, A. M., Purdy, R., & Biggio, G. (2002). Changes in GABAA receptor $\gamma 2$ subunit gene expression induced by long-term administration of oral contraceptives in rats. *Neuropharmacology*, 42(3), 325-336.
36. Galeeva, A., & Tuohimaa, P. (2001). Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroids. *Behavioural brain research*, 119(1), 41-47.
37. Gangitano, D., Salas, R., Teng, Y., Perez, E., & De Biasi, M. (2009). Progesterone modulation of $\alpha 5$ nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle. *Genes, Brain and Behavior*, 8(4), 398-406.
38. Garcia-Segura, L. M. (2008). Aromatase in the brain : Not just for reproduction anymore. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 705-712.
39. Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle : Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97.
40. Gouveia Jr, A., dos Santos, U. D., Felisbino, F. E., de Afonseca, T. L., Antunes, G., & Morato, S. (2004). Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behavioural processes*, 67(2), 167-171.
41. Halem, H., Cherry, J., & Baum, M. (1999). Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *Journal of neurobiology*, 39(2), 249-263.
42. Herbison, A. E. (2020). A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Frontiers in neuroendocrinology*, 57, 100837.

43. Holder, M. K., & Mong, J. A. (2017). The role of ovarian hormones and the medial amygdala in sexual motivation. *Current sexual health reports*, 9(4), 262-270.
44. Homanics, G. E., Quinlan, J. J., & Firestone, L. L. (1999). Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 63(1), 21-26.
45. Howles, C. M. (2000). Role of LH and FSH in ovarian function. *Molecular and cellular endocrinology*, 161(1-2), 25-30.
46. Hull, E. M., Lorrain, D. S., Du, J., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K., & Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioural brain research*, 105(1), 105-116.
47. Imwalle, D. B., Gustafsson, J.-Å., & Rissman, E. F. (2005). Lack of functional estrogen receptor β influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiology & behavior*, 84(1), 157-163.
48. Ishii, K. K., & Touhara, K. (2019). Neural circuits regulating sexual behaviors via the olfactory system in mice. *Neuroscience Research*, 140, 59-76.
49. Keen-Rhinehart, E., Michopoulos, V., Toufexis, D., Martin, E., Nair, H., Ressler, K., Davis, M., Owens, M., Nemeroff, C., & Wilson, M. (2009). Continuous expression of corticotropin-releasing factor in the central nucleus of the amygdala emulates the dysregulation of the stress and reproductive axes. *Molecular psychiatry*, 14(1), 37-50.
50. 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. *Behavioural brain research*, 200(2), 268-276.
51. Keller, M., Douhard, Q., Baum, M. J., & Bakker, J. (2006). Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chemical senses*, 31(4), 315-323.
52. Kirschbaum, C., Kudielka, B. M., Gaab, J., Schommer, N. C., & Hellhammer, D. H. (1999). Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychosomatic medicine*, 61(2), 154-162.

53. Kirschbaum, C., Pirke, K., & Hellhammer, D. H. (1995). Preliminary evidence for reduced cortisol responsivity to psychological stress in women using oral contraceptive medication. *Psychoneuroendocrinology*, 20(5), 509-514.
54. Kirschbaum, C., Schommer, N., Federenko, I., Gaab, J., Neumann, O., Oellers, M., Rohleder, N., Untiedt, A., Hanker, J., & Pirke, K.-M. (1996). Short-term estradiol treatment enhances pituitary-adrenal axis and sympathetic responses to psychosocial stress in healthy young men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(10), 3639-3643.
55. Komada, M., Takao, K., & Miyakawa, T. (2008). Elevated plus maze for mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 22, e1088.
56. Kumar, D., Candlish, M., Periasamy, V., Avcu, N., Mayer, C., & Boehm, U. (2015). Specialized subpopulations of kisspeptin neurons communicate with GnRH neurons in female mice. *Endocrinology*, 156(1), 32-38.
57. Lauer, A. M., May, B. J., Hao, Z. J., & Watson, J. (2009). Analysis of environmental sound levels in modern rodent housing rooms. *Lab animal*, 38(5), 154-160.
58. Lovick, T. (2012). Estrous cycle and stress : Influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 314-320.
59. Lundin, C., Danielsson, K. G., Bixo, M., Moby, L., Bengtsdotter, H., Jawad, I., Marions, L., Brynhildsen, J., Malmborg, A., & Lindh, I. (2017). Combined oral contraceptive use is associated with both improvement and worsening of mood in the different phases of the treatment cycle—A double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Psychoneuroendocrinology*, 76, 135-143.
60. Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & behavior*, 74(4-5), 435-440.
61. Marques, P., Skorupskaite, K., Rozario, K. S., Anderson, R. A., & George, J. T. (2022). Physiology of GNRH and gonadotropin secretion. *Endotext [Internet]*.
62. Martínez-García, F., Novejarque, A., Gutiérrez-Castellanos, N., & Lanuza, E. (2012). Piriform cortex and amygdala. *The mouse nervous system*, 140-172.

63. McClintock, M. K. (1998). On the nature of mammalian and human pheromones. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 390-392.
64. McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 67, e4389.
65. Melo, A. I., Chirino, R., Jiménez, A., Cuamatzi, E., Beyer, C., & González-Mariscal, G. (2008). Effect of forebrain implants of testosterone or estradiol on scent-marking and sexual behavior in male and female rabbits. *Hormones and behavior*, 54(5), 676-683.
66. Melón, L. C., & Maguire, J. (2016). GABAergic regulation of the HPA and HPG axes and the impact of stress on reproductive function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 160, 196-203.
67. Meredith, M. (1998). Vomeronasal, Olfactory, Hormonal Convergence in the Brain : Cooperation or Coincidence ? A. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 349-361.
68. Messinis, I. E. (2006). Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Human reproduction update*, 12(5), 557-571.
69. Micevych, P. E., & Meisel, R. L. (2017). Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. *Frontiers in systems neuroscience*, 11, 42.
70. Mihm, M., Gangooly, S., & Muttukrishna, S. (2011). The normal menstrual cycle in women. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 229-236.
71. Mora, S., Dussaubat, N., & Díaz-Véliz, G. (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 21(7), 609-620.
72. Mordecai, K. L., Rubin, L. H., Eatough, E., Sundermann, E., Drogos, L., Savarese, A., & Maki, P. M. (2017). Cortisol reactivity and emotional memory after psychosocial stress in oral contraceptive users. *Journal of neuroscience research*, 95(1-2), 126-135.
73. Nations, U. (2015). Trends in contraceptive use Worldwide. *Obtenido de The Department of Economic and Social Affairs*.

74. Nomikos, G. G., & Spyraiki, C. (1988). Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. *Neuropharmacology*, 27(7), 691-696.
75. Parada, M., Chamas, L., Censi, S., Coria-Avila, G., & Pfaus, J. G. (2010). Clitoral stimulation induces conditioned place preference and Fos activation in the rat. *Hormones and behavior*, 57(2), 112-118.
76. Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Frontiers in neuroanatomy*, 6, 33.
77. Pastor, Z., Holla, K., & Chmel, R. (2013). The influence of combined oral contraceptives on female sexual desire: A systematic review. *The European journal of contraception & reproductive health care*, 18(1), 27-43.
78. Pawlak, C. R., Karrenbauer, B. D., Schneider, P., & Ho, Y.-J. (2012). The elevated plus-maze test: Differential psychopharmacology of anxiety-related behavior. *Emotion Review*, 4(1), 98-115.
79. Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.
80. Pearlstein, T. B. (1995). Hormones and depression: What are the facts about premenstrual syndrome, menopause, and hormone replacement therapy? *American Journal of Obstetrics and gynecology*, 173(2), 646-653.
81. Piekarski, D. J., Zhao, S., Jennings, K. J., Iwasa, T., Legan, S. J., Mikkelsen, J. D., Tsutsui, K., & Kriegsfeld, L. J. (2013). Gonadotropin-inhibitory hormone reduces sexual motivation but not lordosis behavior in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Hormones and behavior*, 64(3), 501-510.
82. Porcu, P., Mostallino, M. C., Sogliano, C., Santoru, F., Berretti, R., & Concas, A. (2012). Long-term administration with levonorgestrel decreases allopregnanolone levels and alters GABAA receptor subunit expression and anxiety-like behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(2), 366-372.

83. Porcu, P., Serra, M., & Concas, A. (2019). The brain as a target of hormonal contraceptives : Evidence from animal studies. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 55, 100799.
84. Rapkin, A. J., Morgan, M., Sogliano, C., Biggio, G., & Concas, A. (2006). Decreased neuroactive steroids induced by combined oral contraceptive pills are not associated with mood changes. *Fertility and sterility*, 85(5), 1371-1378.
85. Roche, D. J., King, A. C., Cohoon, A. J., & Lovallo, W. R. (2013). Hormonal contraceptive use diminishes salivary cortisol response to psychosocial stress and naltrexone in healthy women. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 109, 84-90.
86. Rodgers, R., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 801-810.
87. Rodgers, R., & Johnson, N. (1998). Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(1), 221-232.
88. Rohleder, N., Wolf, J., Piel, M., & Kirschbaum, C. (2003). Impact of oral contraceptive use on glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production after psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 28(3), 261-273.
89. Roney, J. R., & Simmons, Z. L. (2013). Hormonal predictors of sexual motivation in natural menstrual cycles. *Hormones and behavior*, 63(4), 636-645.
90. Sanders, S. A., Graham, C. A., Bass, J. L., & Bancroft, J. (2001). A prospective study of the effects of oral contraceptives on sexuality and well-being and their relationship to discontinuation. *Contraception*, 64(1), 51-58.
91. Santoru, F., Berretti, R., Locci, A., Porcu, P., & Concas, A. (2014a). Decreased allopregnanolone induced by hormonal contraceptives is associated with a reduction in social behavior and sexual motivation in female rats. *Psychopharmacology*, 231(17), 3351-3364.
92. Santoru, F., Berretti, R., Locci, A., Porcu, P., & Concas, A. (2014b). Decreased allopregnanolone induced by hormonal contraceptives is associated with a reduction in social behavior and sexual motivation in female rats. *Psychopharmacology*, 231(17), 3351-3364.
93. Sartori, S. B., Landgraf, R., & Singewald, N. (2011). The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future neurology*, 6(4), 531-571.

94. Schaffir, J. (2006). Hormonal contraception and sexual desire : A critical review. *Journal of sex & marital therapy*, 32(4), 305-314.
95. Schüle, C., Nothdurfter, C., & Rupprecht, R. (2014). The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in neurobiology*, 113, 79-87.
96. Schwartz, D. H., Romans, S. E., Meiyappan, S., De Souza, M. J., & Einstein, G. (2012). The role of ovarian steroid hormones in mood. *Hormones and behavior*, 62(4), 448-454.
97. Siddall, J. R., & Emmott, E. H. (2021). *Hormonal Oral Contraceptive Use and Depression and Anxiety in England*.
98. Simone, J., Bogue, E. A., Bhatti, D. L., Day, L. E., Farr, N. A., Grossman, A. M., & Holmes, P. V. (2015). Ethinyl estradiol and levonorgestrel alter cognition and anxiety in rats concurrent with a decrease in tyrosine hydroxylase expression in the locus coeruleus and brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 265-278.
99. Sitruk-Ware, R. (2006). New progestagens for contraceptive use. *Human reproduction update*, 12(2), 169-178.
100. Srinivasan, S., & Stevens, C. F. (2018). The distributed circuit within the piriform cortex makes odor discrimination robust. *Journal of Comparative Neurology*, 526(17), 2725-2743.
101. Stanić, D., Dubois, S., Chua, H. K., Tonge, B., Rinehart, N., Horne, M. K., & Boon, W. C. (2014). Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors α and β , and androgen receptors. *PloS one*, 9(3), e90451.
102. Stoffel-Wagner, B., Watzka, M., Steckelbroeck, S., Schwaab, R., Schramm, J., Bidlingmaier, F., & Klingmüller, D. (1998). Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in the human temporal lobe. *Biochemical and biophysical research communications*, 244(3), 768-771.
103. Toufexis, D., Rivarola, M. A., Lara, H., & Viau, V. (2014). Stress and the reproductive axis. *Journal of neuroendocrinology*, 26(9), 573-586.
104. Tuiten, A., Van Honk, J., Koppeschaar, H., Bernaards, C., Thijssen, J., & Verbaten, R. (2000). Time course of effects of testosterone administration on sexual arousal in women. *Archives of General Psychiatry*, 57(2), 149-153.

105. Van Vliet, H. A., Grimes, D. A., Lopez, L. M., Schulz, K. F., & Helmerhorst, F. M. (2011). Triphasic versus monophasic oral contraceptives for contraception. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11.
106. Veney, S., & Rissman, E. (2000). Steroid implants in the medial preoptic area or ventromedial nucleus of the hypothalamus activate female sexual behaviour in the musk shrew. *Journal of neuroendocrinology*, 12(11), 1124-1132.
107. Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), 322-328.
108. Wieland, S., Lan, N. C., Belluzzi, J. D., & Stein, L. (1995). Comparative behavioral characterization of the neuroactive steroids 3 α -OH, 5 α -pregnan-20-one and 3 α -OH, 5 β -pregnan-20-one in rodents. *Psychopharmacology*, 118(1), 65-71.
109. Worsley, A., & Chang, A. (1978). Oral contraceptives and emotional state. *Journal of psychosomatic research*, 22(1), 13-16.
110. Wu, M. V., Manoli, D. S., Fraser, E. J., Coats, J. K., Tollkuhn, J., Honda, S.-I., Harada, N., & Shah, N. M. (2009). Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell*, 139(1), 61-72.
111. Yague, J., Munoz, A., de Monasterio-Schrader, P., Defelipe, J., Garcia-Segura, L., & Azcoitia, I. (2006). Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience*, 138(2), 389-401.
112. Young, E. A., Kornstein, S. G., Harvey, A. T., Wisniewski, S. R., Barkin, J., Fava, M., Trivedi, M. H., & Rush, A. J. (2007). Influences of hormone-based contraception on depressive symptoms in premenopausal women with major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 32(7), 843-853.
113. Zimmerman, Y., Eijkemans, M., Coelingh Bennink, H., Blankenstein, M., & Fauser, B. (2014). The effect of combined oral contraception on testosterone levels in healthy women : A systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 20(1), 76-105.