

La GnRH

GnRH

M.L. Kottler
N. Richard

Département Génétique et Reproduction,
CHU de Caen. F 14033
<Kottler-ml@chu-caen.fr>
EA 2608 –USC INRA- Université de Caen.
F 14032
<Kottler-ml@chu-caen.fr>

Résumé. La GnRH est l'acteur principal de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. La GnRH est sécrétée sous la forme d'une pré-pro-hormone de 92 acides aminés qui est clivée pour générer la GnRH et le GAP. Les neurones à GnRH se développent à partir de l'épithélium olfactif et migrent durant l'embryogenèse afin d'établir des connexions avec l'éminence médiane. La GnRH est un peptide très ancien dans l'évolution et des travaux récents ont mis en évidence la présence d'un second système exprimant un variant appelé chicken GnRH II dont les fonctions sont largement méconnues. La sécrétion de GnRH est modulée par différents facteurs tels que la GnRH elle-même, les stéroïdes sexuels et la leptine. D'autres facteurs sécrétés par les cellules gliales modèleraient l'excrétion dans le système porte hypophysaire. La découverte récente du couple GRP54/kisspeptine a éclairé d'un jour nouveau le contrôle de la sécrétion de la GnRH. La GnRH agit sur les cellules gonadotropes via un récepteur spécifique couplé aux protéines G. La déficience en GnRH est responsable d'hypogonadismes hypogonadotropes (HH). Des anomalies de la migration des neurones à GnRH avec les neurones olfactifs expliquent le tableau d'HH avec anosmie. Des mutations perte de fonction du récepteur à la GnRH et de GPR54 sont associées à un tableau d'HH isolé.

Mots clés : GnRH, GAP, stéroïde sexuel, GnRH récepteur

Abstract. As a major actor of the brain-pituitary-gonad axis, GnRH has received considerable attention. GnRH gene encodes for a 92 aminoacid precursor protein which is proteolytically processed to generate GnRH and GAP. The corresponding neurons develop from the olfactory epithelium and migrate into the fore brain during embryogenesis to establish connections with the median eminence. GnRH appears as very ancient peptide. However, all vertebrates possess a second GnRH system, expressing a variant known as chicken GnRH II whose function are still under debate. GnRH secretion is modulated by different factors mainly GnRH itself, sex-steroids, leptine as well as other factors released by glial cells that can modulate the direct access of GnRH neuroendocrine terminals to the vascular wall. A crucial role in GnRH secretion has been recently assigned to a new hypothalamic signalling pathway, which involves the G-protein-coupled receptor GPR54 and its natural ligands, the kisspeptine product of the KiSS-1 gene. The action of GnRH in the anterior pituitary gland are mediated by a G protein-coupled receptor (GnRH-R). Hypogonadotropic hypogonadism (HH) results from impaired secretion or action of GnRH. Abnormality in the migratory processes of the GnRH neurones with the olfactory neurons explains the association of the HH with anosmia. Loss of function mutation of GnRH-R as well as GPR54 are associated with isolated HH.

Key words: GnRH, GAP, sex-steroids, GnRH receptor

Le déclenchement de la puberté est une étape critique du développement et complète la différenciation phénotypique entre les sujets masculins et féminins. Cette étape dépend de la sécrétion gonadique des stéroïdes sexuels induite par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique qui est sous le contrôle de la sécrétion en GnRH par des neurones situés dans la région antérieure de l'hypothalamus. Les neurones à GnRH émettent leurs axones vers les vaisseaux portes de l'éminence mé-

diane afin d'y déverser la GnRH qui stimule l'excrétion et la synthèse des hormones gonadotropes LH et FSH par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. Cette stimulation se fait via le récepteur à la GnRH (R-GnRH). LH et FSH induisent le développement des gonades, stimulent la sécrétion des stéroïdes sexuels et la gamétogenèse (figure 1).

La déficience congénitale en GnRH entraîne un défaut de sécrétion des gonadotrophines, une absence d'activité gonadique induisant une

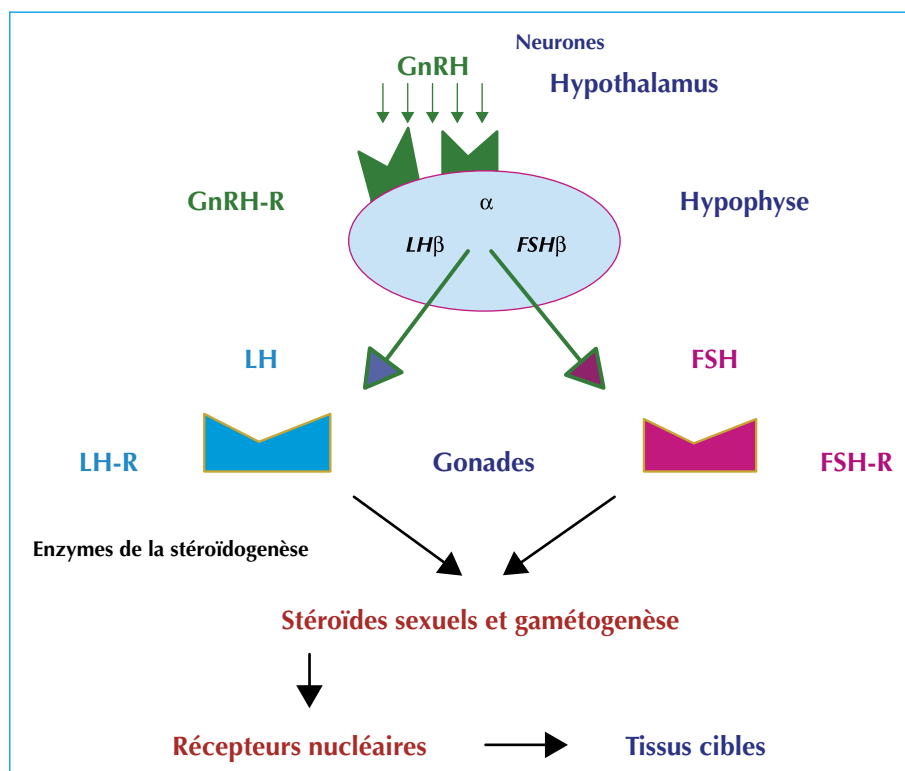


Figure 1. Organisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

absence de développement pubertaire et une infertilité, tableau d'un hypogonadisme hypogonadotrope.

La GnRH

L'existence de la GnRH, ou LH-RH (*luteinizing hormone releasing hormone*), ou gonadolibérine, a été suggérée en 1950 par Harris [1], mais sa présence dans le cerveau du porc et du mouton n'a été montrée que dans les années 1970 après une compétition acharnée entre deux groupes américains, l'un dirigé par A. Schally [2] et l'autre par R. Guillemin [3], au prix du traitement de centaines de milliers d'hypothalamus récupérés dans les abattoirs. Depuis, un nombre considérable d'articles a été consacré à divers aspects biologiques de ce peptide, pour en connaître ses fonctions et pour développer des thérapeutiques adaptées pour le contrôle de la fonction de reproduction non seulement dans l'espèce humaine mais aussi en agro-alimentaire soulignant son rôle essentiel : sans GnRH, il n'y a pas de reproduction.

Les travaux pionniers de l'équipe de Knobil chez le singe Rhesus [4] ont montré un mode de sécrétion original car pulsatile, à l'origine du développement de thérapeutiques soit inhibitrices soit activatrices [5] : seul ce mode de sécrétion permet la stimulation de la libération des gonadotrophines, alors qu'une sécrétion continue provoque une désensibilisation des cellules gonadotropes induisant

un hypogonadisme hypogonadotrope secondaire appelé ici « castration chimique ». Les mécanismes qui contrôlent sa sécrétion restent encore mal connus particulièrement *in vivo* du fait de la difficulté d'accès des neurones à GnRH et des différences existant entre les modèles expérimentaux, la récente découverte des kisspeptines ouvrant cependant de nouvelles pistes d'investigations.

Structure

La GnRH décrite chez les mammifères est un décapeptide issu d'une préprohormone de 92 acides aminés (aa), comprenant de son extrémité N-terminale (N-ter) à son extrémité C-terminale (C-ter) : un peptide signal (23 aa) caractéristique des protéines sécrétées, la GnRH (10 aa), un site GKR (glycine, lysine, arginine) caractéristique des sites enzymatiques d'amidation et de maturation protéique, et le GAP (*GnRH-associated peptide*) (56 aa), co-sécrété avec la GnRH et dont le rôle propre reste mal connu (*figure 2*). Lors de la maturation de cette pré-prohormone, le peptide signal est éliminé, et la GnRH séparée du GAP par une pro-hormone convertase 2 reconnaissant le site GKR. Enfin, une carboxypeptidase E, détache successivement l'arginine et la lysine du site de maturation.

La séquence biologiquement active de la GnRH est représentée (*figure 3*) [6]. La glycine N°6 est un acide aminé qui possède un carbone symétrique ce qui confère à la molécule une flexibilité essentielle à son activité

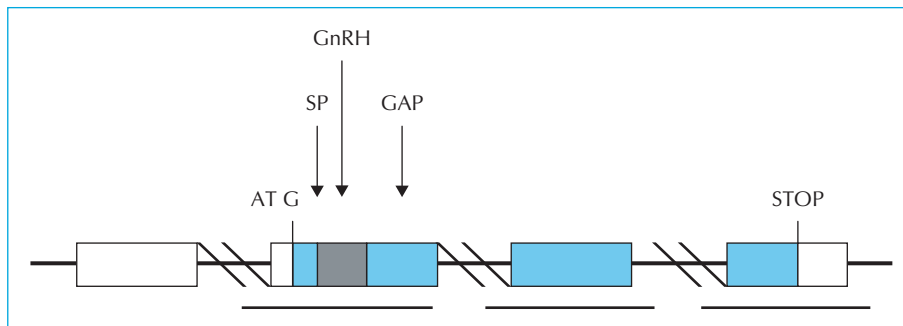


Figure 2. Structure du gène de la gonadolibérine (GnRH), SP : peptide signal, GAP : GnRH associated peptide, les rectangles représentent les exons.

biologique. Cette caractéristique a été exploitée pour la synthèse d'agoniste de la GnRH en remplaçant cette glycine par un aa aromatique qui augmente la stabilité de la molécule. La maturation complète de la GnRH nécessite la transformation de la glutamine en N-ter en résidu pyroglutamyl par l'intervention d'une glutaminy cyclase, et l'amidation de la glycine en C-ter sous l'effet d'une monooxygénase peptidyl-glycine amidante. Ces modifications post-traductionnelles sont indispensables à son activité biologique et lui confèrent une résistance à la dégradation par des exopeptidases.

La demi-vie de la GnRH reste cependant brève dans le sang : de l'ordre de 5 minutes.

Gène et ARN messenger (ARNm)

La GnRH-I est codée par un gène unique situé sur le bras court du chromosome 8. (8 p21-p11.2). C'est un petit gène de 5,1 kb, formé de 4 exons et 3 introns (figure 2). Le premier exon code pour une partie de la région 5' non traduite (5'UTR) ; le second exon code pour le peptide signal, la GnRH et les 11 aa N-terminaux du GAP ; le troisième exon code pour les aa 12 à 43 du GAP et le quatrième pour les 13 aa C-terminaux du GAP et une région 3' non traduite (3'UTR) [7]. Les gènes de l'homme

et du rat présentent une forte homologie dans les régions 3'UTR. De même, les régions codantes et la position des introns sont identiques.

La GnRH au travers du règne animal

La séquence de la GnRH est identique chez tous les mammifères. Des études phylogéniques ont montré la présence d'un peptide proche de la GnRH (avec au moins 50 % d'homologie) (figure 3) chez des espèces qui ont divergé il y a plus de 500 millions d'années, positionnant la GnRH au cœur d'un processus essentiel au développement. La GnRH est un exemple de peptide dont le gène a évolué du fait de phénomène de duplications donnant naissance à de nouvelles séquences codantes aboutissant à de nouvelles formes de GnRH. Dans toutes les séquences de vertébrés, les résidus en position 1-4, 6, 9-10 sont très conservés ce qui suggère que ces acides aminés ont un rôle déterminant dans l'activation du récepteur.

À l'heure actuelle, on distingue trois grandes familles de GnRH, qui diffèrent par leur affinité et leur capacité à induire la sécrétion des gonadotrophines, mais seuls les représentants de deux d'entre elles, les GnRH de type I et II sont exprimés dans l'espèce humaine, avec un rôle prépondérant de la GnRH type I.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mammals	PyroGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Chicken I	PyroGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂
Chicken II	PyroGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂
Catfish	PyroGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH ₂
Salmon	PyroGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
Lamproie	PyroGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂

Figure 3. La GnRH au travers du règne animal.

La deuxième forme de GnRH (GnRH-II) est identique au cGnRH II initialement caractérisée chez le poulet [8]. Son gène est situé sur le chromosome 20p13. Il est surtout exprimé en dehors du cerveau, dans les reins, la moelle osseuse, la prostate. En l'absence de récepteur spécifique fonctionnel, son efficacité pour induire une réponse de la LH *in vivo* repose sur sa capacité à activer le récepteur de la GnRH de type I [9]. Celle-ci étant modeste (15 à 20 % celle de la GnRH I), c'est à la GnRH de type I que revient le rôle majeur dans le contrôle neurohormonal de la fonction gonadotrope.

Ontogenèse du système GnRH

Chez tous les vertébrés, la population de neurones à GnRH prend son origine en dehors du cerveau, propriété unique de ces neurones endocrines. Les travaux de Schwanzel-Fukuda et al. (1992) [10] ont permis de préciser chez la souris le cheminement embryonnaire des neurones à GnRH.

Les neurones à GnRH trouvent leur origine au niveau de la placode olfactive où on peut les identifier par immunohistochimie dès la 6^e semaine de gestation chez l'homme et d'où ils vont migrer. Ils sont dans le cerveau antérieur dès le 46^e jour de gestation [11], migrant en étroite association avec les neurones olfactifs primaires à travers la plaque cribreuse et ils atteignent vers la 14^e semaine leur localisation finale dans l'hypothalamus. Cette migration est terminée vers la 19^e semaine.

Les axones se développent pour rejoindre l'éminence médiane. Enfin, il existe une certaine plasticité morphologique dans la mise en place des contacts entre les cellules endothéliales des capillaires du système porte et les terminaisons axonales qui pourrait être sous la dépendance de facteurs hormonaux en particulier au moment de l'ovulation.

La maturation en parallèle du système enzymatique au cours du développement est nécessaire à la maturation du peptide.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette étape migratrice ont pu être précisés chez l'animal (souris, brebis) et vérifiés chez l'homme grâce à un modèle de déficience en GnRH, le syndrome de Kallmann-de-Morsier (KS, cf. C. Dodé, p. 131) associant hypogonadisme hypogonadotrope et anosmie. Parmi les molécules dont la déficience ou la perte de fonction ne permet pas la migration correcte des neurones, certaines ont pu être identifiées par des techniques de clonage positionnel chez l'homme ou d'inactivation génique chez la souris.

L'anosmine-1 est une glycoprotéine exprimée localement par certaine matrice extra-cellulaire durant l'organogénèse. Elle est synthétisée par le gène KAL-1, situé dans la zone pseudoautosomique du chromosome Xp22.3, qui fut le premier gène identifié comme associé au KS lié à l'X [12]. Le récepteur de type 1 du FGR (FGFR1) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, actif

sous forme de dimère. Le gène est situé en 8p11-p12. Au cours de la migration neuronale, l'anosmine interagirait dans la signalisation du FGFR1. Des mutations perte de fonction de FGFR1 sont responsables d'une forme dominante de syndrome de Kallmann [13].

Les prokinétines (PKs) doivent leur nom à leur fonction biologique initialement décrite d'induction de contraction des muscles lisses du tractus gastro-intestinal. Ultérieurement, la structure de PK1 s'est avérée identique à celle du VEGF (*vascular endothelial growth factor*). PK1 et PK2 sont deux molécules proches (44 % d'homologie de séquence protéique) : elles possèdent une séquence N-ter commune essentielle à leur activité et comportent 5 ponts di-sulfure. Elles agissent *via* des récepteurs à 7 passages transmembranaires PKR1 et PKR2, couplés aux protéines Gq. PK2 est exprimé dans le système nerveux central et dans le bulbe olfactif où elles concourent à la neurogenèse. L'étude de modèle de souris KO pour PK2 et son récepteur PKR2 a montré une hypoplasie des bulbes olfactifs, une absence de GnRH dans l'hypothalamus et une atrophie du tractus reproducteur modèle proche du KS ce qui a conduit à l'identification de mutations chez l'homme [14].

Régulation de la sécrétion de la GnRH

La concentration de la GnRH dans le sang porte est déterminée par l'amplitude et la fréquence des pulses, le taux de transcription du gène, la maturation de la préprohormone en GnRH, le taux de dégradation du peptide, et celui de sa libération dans le système porte. Ces niveaux de régulation sont affectés par les hormones gonadiques (boucle longue) et d'autres hormones périphériques telles que la leptine, les facteurs sécrétés par l'hypophyse (boucle courte), la GnRH elle-même (boucle ultra-courte) et les neurotransmetteurs libérés par les neurones connectés aux neurones à GnRH [15].

La GnRH

Des analogues de la GnRH ont été ajoutés à des cultures de neurones à GnRH isolés ou de cellules GT1-7, dans lesquels une coexpression du GnRH et du R-GnRH avait été démontrée [16]. Il est apparu que les agonistes diminuent la fréquence mais aussi augmentent l'amplitude des pulses de GnRH, alors que le blocage des récepteurs par des antagonistes inhibe toute pulsativité. Ces résultats suggèrent donc que la régulation de la sécrétion de la GnRH, par la GnRH sécrétée par les neurones voisins, serait nécessaire au maintien de la pulsativité. De plus, les interconnexions établies entre les neurones à GnRH, permettraient la synchronisation de l'activité pulsatile de ces neurones.

Les neurotransmetteurs et facteurs de croissance

Parmi les mieux connus, le glutamate et ses analogues (NMDA, acide kaïnique, ainsi que la noradrénaline (NA),

stimulent à la fois l'expression du gène et la libération du peptide. Par contre, le GABA et les opiacés diminuent la sécrétion du peptide. De plus, le monoxyde d'azote (NO) synthétisé par une NO synthase (NOS 1.) exprimée de façon constitutive dans différentes populations neuronales pourrait réprimer la transcription du gène de la GnRH. Dans l'éminence médiane, il jouerait un rôle de médiateur des effets de la NA, du glutamate, et du GABA, sur la libération du peptide [15].

La leptine

La leptine est une hormone synthétisée par le tissu adipeux, modulant, entre autres, les sécrétions hypothalamo-hypophysaires. Des récepteurs à la leptine ont été décrits sur les cellules GT1-7 [17], et il a été montré que cette hormone stimulerait la libération de GnRH sur des fragments d'hypothalamus médio-basal en culture [18, 19]. Cette stimulation se ferait via la sécrétion de NO, puisqu'elle est bloquée par l'ajout d'inhibiteurs de la NOS au milieu d'incubation. Le rôle de la leptine fait l'objet d'un chapitre propre dans cette revue.

Les stéroïdes sexuels

Ils modulent à la fois la libération de la GnRH et l'expression de son gène. De façon plus générale, la castration de l'animal mâle ou femelle induit une augmentation de la sécrétion du GnRH et des niveaux de ses ARNm [20] avec un retour à la normale après administration, chez le mâle, de testostérone (T) et chez la femelle, d'œstradiol (E2) et/ou de progestérone (P).

Les stéroïdes sexuels exercent donc un rétrocontrôle négatif sur l'expression du GnRH dans l'hypothalamus. Mais ils peuvent également exercer un rétrocontrôle positif. Ainsi, chez la femelle cyclée, l'augmentation de E2 pendant la phase du cycle précédant l'ovulation (proœstrus chez la rate), s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour la GnRH, ainsi que d'une augmentation de la fréquence des pulses de GnRH, aboutissant à la décharge ovulante de LH. De plus, la présence de P est indispensable à la survenue du pic préovulatoire de LH, car elle déclenche la libération de la GnRH par les terminaisons nerveuses des neurones. Or, la synthèse des récepteurs de P est stimulée par les œstrogènes. Il est donc vraisemblable que dans la phase précédant l'ovulation, E2 et P agissent en synergie pour stimuler la sécrétion de GnRH.

L'existence de récepteurs spécifiques à l'œstradiol (ER) sur les neurones à GnRH est controversée. L'hypothèse actuellement retenue par certains auteurs, est que les ER ne seraient présents que dans un petit nombre de neurones à GnRH, ainsi que dans des lignées cellulaires productrices de GnRH [21].

Le mode de régulation par la testostérone est en revanche encore controversé. On ignore si ses effets s'exercent directement *via* un récepteur aux androgènes (AR) présent sur les neurones ou indirectement *via* les ER α ou β , après

la conversion de T en E2 par l'aromatase. Des travaux récents sur des souris mâles invalidées pour le gène de ER α (souris ERKO) [22], montrent l'absence totale de sensibilité de ces souris à E2, ceci suggérant que ER β ne jouerait aucun rôle dans la régulation des niveaux de GnRH. De plus, les niveaux de GnRH sont identiques chez ces souris par rapport aux souris sauvages, et la castration entraîne chez elles une augmentation des niveaux de GnRH, restaurés après administration de T. Ceci suggère donc que chez ces souris, le rétrocontrôle de T sur la GnRH, s'exercerait directement *via* les AR.

Les kisspeptines

Une des avancées majeures dans la régulation de la fonction de reproduction de ce début de siècle est sans aucun doute la découverte d'un nouveau couple ligand/récepteur qui exerce la fonction de gardien de l'axe hypothalamo-hypophyso gonadique : KiSS-1 et son récepteur GPR54 appelé encore AXOR12 ou KiSS-1 récepteur (KiSS1R). Le récepteur GPR54 identifié dans le cerveau de rat par des techniques de PCR à l'aide d'amorces dégénérées, par l'équipe de Lee en 1999 [23] est longtemps resté orphelin. Des études de screening pharmacologique ont permis de modéliser des ligands putatifs puis après interrogation de banques de données protéiques, une molécule appelée métastatine fut identifiée comme ligand putatif de GPR54 [24]. La métastatine a d'abord été identifiée comme molécule associée à un pouvoir anti-métastatique dans des lignées cancéreuses comme le mélanome ou le cancer du sein, d'où son nom.

Il s'agit d'un peptide de 54 acides aminés (kisspeptine-54) dérivé par protéolyse d'un précurseur de 145 AA. La métastatine est le produit du gène *KISS-1* situé sur le chromosome 1, comportant 3 introns et 4 exons dont le premier est non codant. La découverte des mutations perte de fonction de GPR54 chez l'homme [25] et la réalisation de modèles murins Knock-Out (souris KO) pour *KISS-1* [26] et *GPR54* [27] ont permis de mettre en évidence leur rôle déterminant dans la fonction de reproduction en régulant la sécrétion de la GnRH.

Nous résumerons brièvement leur rôle dans la fonction de reproduction car un article est consacré aux kisspeptines dans cette revue.

La famille des kisspeptines est un stimulateur puissant de la sécrétion de LH. Ceci a été démontré à la fois chez la souris et le rat, chez le mâle et la femelle, et aussi chez des rats prépubères, pubères, et adultes [28-35]. Ces effets sont observés à la fois après une administration centrale (ICV, intracérébroventriculaire) mais aussi après une administration périphérique.

Les effets des kisspeptines sur la sécrétion de LH peuvent être bloqués par l'utilisation d'un antagoniste de la GnRH ceci à la fois chez les rongeurs mais aussi chez les mammifères non humains [28, 31, 34, 35]. Ceci suggère

que les kisspeptines agissent *via* la GnRH et son récepteur pour stimuler la libération de LH (effet hypothalamique) ;

Chez les souris KO en GPR54 (GPR54^{-/-}) les neurones à GnRH sont intacts (il n'y a pas d'anomalie de la migration de ces neurones à la différence de ce qui est observé au niveau du gène KAL1) [27]. Ces mêmes souris KO ont une réponse normale au test de stimulation par la GnRH, avec élévation de la sécrétion de LH.

Des études d'hybridation *in situ* ont montré que KiSS-1 est exprimé dans les zones hypothalamiques impliquées dans la régulation neuroendocrine de sécrétion des gonadotrophines, incluant le noyau antérovntal périventriculaire (AVPV), le noyau périventriculaire (PEN), et le noyau arqué (ARC) [28].

Le complexe KiSS-1/GPR54 jouerait un rôle dans l'initiation de la puberté. En effet, on observe des niveaux d'expression hypothalamique de KiSS1 et GPR54 maximum à la puberté chez le rat [33]. D'autre part, des administrations centrales chroniques de kisspeptines chez des rates immatures entraînent une activation précoce de l'axe gonadotrope [30].

Les expressions hypothalamiques en ARNm de KiSS-1 et à un degré moindre de GPR54 sont régulées par les stéroïdes sexuels [33, 36, 37] et ceci de façon différentielle en fonction du site de production : l'expression de KiSS est stimulée au niveau des noyaux AVPV par l'estradiol alors qu'elle est diminuée dans les noyaux ARC. La mise en jeu de ce contrôle au cours du cycle n'est toujours pas élucidée.

Le récepteur de la GnRH (R-GnRH)

Structure

L'analyse de sa séquence primaire, montre que le R-GnRH est une protéine appartenant à la superfamille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires couplés aux protéines G (figure 4) [38].

Cette famille de récepteurs se caractérise par une région N-ter extracellulaire plus ou moins longue, 7 segments hydrophobes transmembranaires reliés par des boucles intra et extracellulaires, et une extrémité C-ter intracellulaire. Le couplage de ces récepteurs aux protéines G fait intervenir essentiellement la troisième boucle intracytoplasmique et, dans une moindre mesure, la deuxième, tandis que l'interaction hormone-récepteur est en majeure partie assurée par les régions transmembranaires.

Chez l'homme, la séquence du R-GnRH est de 328 aa. Cette séquence primaire est conservée à 85 % entre les mammifères : homme, souris, rat, mouton, vache et porc, et cette homologie atteint près de 100 % dans les régions transmembranaires. En revanche, elle est relativement faible entre le R-GnRH et les récepteurs de la même famille (27 % avec le récepteur le plus proche, celui de l'ocytocine).

Gène et ARNm

Son gène est situé sur le chromosome 4 en position q21.1 [39]. Le gène codant pour le R-GnRH comporte, chez le rat comme chez l'homme, trois exons et deux introns et présente une taille d'environ 20 kb.

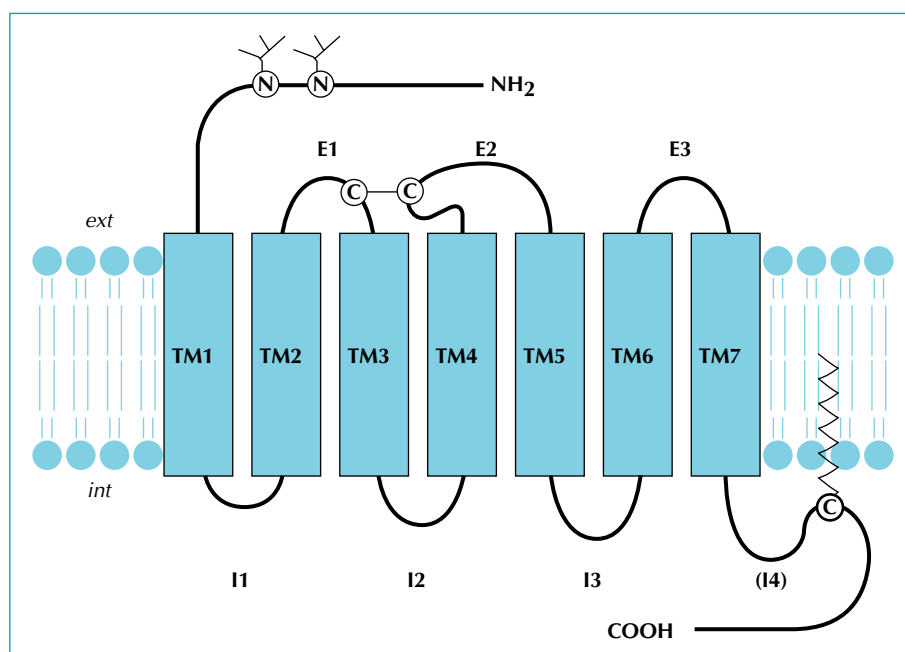


Figure 4. Schéma général d'un récepteur couplé aux protéines G.

D'autre part, un récepteur à la GnRH de type II a été identifié chez l'homme mais, à la différence de quelques autres mammifères, il n'est pas fonctionnel, car il existe un codon non-sens dans l'exon 2 générant une protéine tronquée.

Régulations hormonales

Régulation par la GnRH

Des expériences *in vitro* et *in vivo*, montrent que l'action de la GnRH sur son récepteur est dépendante de ses modalités d'administration.

Lorsque des cellules hypophysaires en culture sont incubées avec de faibles doses de GnRH (10 à 100 pM) pendant une courte période, on observe une augmentation transitoire du nombre de récepteurs à la surface des cellules, appelée « *up-regulation* ». Par contre, une stimulation par des doses plus élevées (1 à 10 nM), et/ou pour une plus longue période, entraîne une chute, dans les trois premières heures, du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules, appelée « *down-regulation* ».

Depuis les travaux de Knobil, il est connu que l'administration pulsatile de GnRH (1 pulse/60 min. ou 1 pulse/90 min.), est associée au maintien de la synthèse et de la libération des gonadotrophines, alors qu'une administration continue ou à une pulsativité plus élevée (1 pulse/15 minutes), résulte en une diminution de la sécrétion, appelée « désensibilisation ». Il a été montré que ce mécanisme de désensibilisation peut être associé à une *down-regulation* des R-GnRH, mais d'autres mécanismes sont également mis en jeu. Lors de la liaison normale de la GnRH, les R-GnRH, qui étaient distribués de façon aléatoire à la surface des cellules, s'agrègent et les complexes formés s'internalisent. Ils sont ensuite dégradés ou recyclés à la surface de la cellule, et de nouveaux récepteurs peuvent être synthétisés. Mais il a été montré que même si on bloque le mécanisme d'internalisation, ou si on attend que le nombre de récepteurs retourne à la normale, on observe malgré tout une chute de la sécrétion des gonadotrophines.

Il en résulte que la désensibilisation serait associée aussi à un effet au niveau de la transduction du signal, et/ou à une étape postérieure.

En conditions non désensibilisantes, les agonistes stimulent l'expression du gène du R-GnRH de façon dose-dépendante et induisent une augmentation du nombre des R-GnRH mais la voie de transduction empruntée est encore mal définie. Cette observation est importante pour comprendre les mécanismes de régulation de la sécrétion des hormones gonadotropes LH et FSH lorsqu'il existe des mutations du gène du récepteur de la GnRH entraînant une perte de fonction partielle.

Régulation par les stéroïdes sexuels

Les résultats restent contradictoires entre une régulation directe ou indirecte médiée par la GnRH. Des études

« *in vitro* » suggèrent un effet positif direct mais des études « *in vivo* » chez l'animal castré présentant une lésion de l'hypothalamus, plaident pour un effet négatif [40-42].

Voies de transduction

Les voies de transduction du signal sont complexes car le GnRH est couplé à plusieurs protéines Gα : une Gq/11 qui active la voie de la phospholipase C (PLC) et une Gs qui active l'adénylate cyclase [43]. La voie de la PLC régulerait la transcription des gènes des hormones gonadotropes et leur excrétion via la mobilisation du calcium intracellulaire, alors que la voie de l'AMPc serait mise en jeu dans les phénomènes d'*up-régulation*.

La GnRH régule de façon différentielle la sécrétion de LH et de FSH. Les travaux de Kaiser 1995 [44] et Bedecarrats 2003 [45], exploitant des modèles « *in vitro* » et « *in vivo* » chez l'animal et chez l'homme, ont montré l'existence d'une sensibilité différente des promoteurs des gènes des sous-unités β des hormones gonadotropes à l'action de la GnRH. Dans des expériences de transfection, ces auteurs montrent une relation entre le rapport LH/FSH et le nombre de récepteurs exprimés à la surface de la membrane. Par ailleurs, la quantité de GnRH nécessaire pour obtenir 50 % d'augmentation est plus faible pour FSHβ que pour LHβ. [46]. Chez des patients déficients en GnRH recevant de façon pulsatile de la GnRH, le ratio LH/FSH augmente avec la fréquence des bolus [47]. Ces résultats indiquent donc le rôle majeur de la GnRH dans le contrôle de la sécrétion de LH laquelle nécessite une signalisation GnRH optimale (plus de GnRH et plus de récepteur). Ces données éclairent les résultats observés chez l'homme dans les tests de stimulation par la LHRH en période pré-pubertaire (stimulation préférentielle de FSH) et post-pubertaire (stimulation préférentielle de LH). En effet, après la puberté, l'expression des récepteurs est stimulée à la fois par la sécrétion des stéroïdes sexuels et l'effet up-régulateur de la GnRH, d'où une meilleure sensibilité hypophysaire. Ils permettent aussi de mieux comprendre les phénotypes observés chez les patients avec déficit partiel de la fonction biologique du récepteur de la GnRH par mutation : hypogonadisme chez l'homme par défaut de sécrétion de testostérone qui est sous le contrôle de la LH, mais volume testiculaire quasi normal (sous la dépendance de la FSH) ; développement pubertaire chez la femme (sécrétion d'estrogène par les follicules sous la dépendance de la FSH) mais absence d'ovulation (sous le contrôle de la LH).

Pathologie : déficience en GnRH

Il existe de nombreuses formes de déficience en GnRH responsables d'hypogonadisme hypogonadotrope dans le diagnostic desquelles la génétique a apporté un nouvel éclairage.

Il peut s'agir d'une anomalie de maturation de la protéine par déficit en pro-convertase, le plus souvent associée à d'autres anomalies hormonales, d'une anomalie de migration des neurones à GnRH qui restent en position ectopique et ne peuvent atteindre les vaisseaux porte de l'éminence médiane, situation réalisée dans le syndrome de Kallmann. Il peut s'agir d'un défaut de stimulation de la sécrétion (mutations perte de fonction de GPR54) ou d'un défaut de la réceptivité hormonale (mutations perte de fonction de GnRHR).

Alors qu'il existe un modèle de souris déficiente en GnRH du fait d'une large délétion de son gène [48], aucune mutation de la GnRH n'a été décrite à ce jour chez l'homme. Après séquençage systématique des 4 exons du gène chez 30 patients présentant un HHI, nous avons retrouvé une substitution G/C au niveau du codon 16 de l'exon 2 qui entraîne le remplacement d'un tryptophane par une sérine au niveau du signal peptide. Cependant, la fréquence de cette substitution est retrouvée identique chez les patients et dans une population de référence ce qui permet de conclure qu'il s'agit d'un simple polymorphisme [49].

Enfin la production inappropriée de GnRH est à l'origine de puberté précoce d'origine centrale. L'étiologie la plus fréquente est celle de tumeur (craniopharyngiome). La découverte récente d'une mutation « gain de fonction » de GPR54 [50] souligne l'intérêt des explorations génétiques pour la découverte de nouvelles molécules impliquées dans la fonction de reproduction.

Références

- Harris GW. Oestrous rhythm. Pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat. *J Physiol* 1950 ; 111 : 347-60.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971 ; 43 : 1334-9.
- Burgus R, Butcher M, Amoss M, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci USA* 1972 ; 69 : 278-82.
- Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson LE, Knobil E. Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 1970 ; 87 : 850-3.
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978 ; 202 : 631-3.
- Bond CT, Hayflick JS, Seeburg PH, Adelman J-P. The rat gonadotropin-releasing hormone : SH locus : structure and hypothalamic expression. *Mol Endocrinol* 1989 ; 3 : 1257-62.
- Seeburg PH, Adelman J-P. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 1984 ; 311 : 666-8.
- White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 305-9.
- Densmore VS, Urbanski HF. Relative effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II on gonadotropin release. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 88 : 2126-34.
- Schwanzel-Fukuda M, Jorgenson KL, Bergen HT, Weesner GD, Pfaff DW. Biology of normal luteinizing hormone-releasing hormone neurons during and after their migration from olfactory placode. *Endocr Rev* 1992 ; 13 : 623-34.
- Quinton R, Hasan W, Grant W, et al. Gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the nasal epithelia of adults with Kallmann's syndrome and isolated hypogonadotropic hypogonadism and in the early midtrimester human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 ; 82 : 309-14.
- Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 1991 ; 67 : 423-35.
- Dode C, Levilliers J, Dupont JM, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 463-5.
- Dode C, Teixeira L, Levilliers J, et al. Kallmann syndrome : mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS genetics* 2006 ; 2 : e175.
- Gore AC, Roberts JL. Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Front Neuroendocrinol* 1997 ; 18 : 209-45.
- Krsmanovic LZ, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK, et al. Autocrine regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 1999 ; 140 : 1423-31.
- Magni P, Vettor R, Pagano C, et al. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *Endocrinology* 1999 ; 140 : 1581-5.
- Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 1023-8.
- Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997 ; 138 : 5055-8.
- Levine JE, Duffy MT. Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology* 1988 ; 122 : 2211-21.
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 1990 ; 5 : 1-10.
- Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol* 2003 ; 17 : 1039-53.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999 ; 446 : 103-7.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001 ; 411 : 613-7.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10972-6.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 10714-9.

27. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 1614-27.
28. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004 ; 145 : 4073-7.
29. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 1761-6.
30. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, *et al.* Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004 ; 561 : 379-86.
31. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling : a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 2129-34.
32. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, *et al.* Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005 ; 146 : 2976-84.
33. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004 ; 145 : 4565-74.
34. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 320 : 383-8.
35. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004 ; 80 : 264-72.
36. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, *et al.* Differential Regulation of KiSS-1 Gene Expression by Sex Steroids in the Brain of the Male Mouse. *Endocrinology* 2005.
37. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. *Endocrinology* 2005.
38. Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 189 : 289-95.
39. Kottler ML, Lorenzo F, Bergametti F, Commercon P, Souchier C, Counis R. Subregional mapping of the human gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) gene to 4q between the markers D4S392 and D4S409. *Hum Genet* 1995 ; 96 : 477-80.
40. Conn PM, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D, Jennes L. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vitam Horm* 1995 ; 50 : 151-214.
41. Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1993 ; 133 : 931-4.
42. Pieper DR, Gala RR, Regiani SR, Marshall J-C. Dependence of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors on GnRH secretion from the hypothalamus. *Endocrinology* 1982 ; 110 : 749-53.
43. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors : structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 1994 ; 15 : 462-99.
44. Kaiser UB, Sabbagh E, Katzenellenbogen RA, Conn PM, Chin WW. A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 12280-4.
45. Bedecarrats GY, Kaiser UB. Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells : role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* 2003 ; 144 : 1802-11.
46. Meysing AU, Kanasaki H, Bedecarrats GY, *et al.* GNRHR mutations in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism highlight the differential sensitivity of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 ; 89 : 3189-98.
47. Spratt DI, Finkelstein JS, Butler JP, Badger TM, Crowley Jr. WF. Effects of increasing the frequency of low doses of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on gonadotropin secretion in GnRH-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987 ; 64 : 1179-86.
48. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, *et al.* A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 1986 ; 234 : 1366-71.
49. Kottler ML, Hamel A, Malville E, Richard N. [GnRH deficiency : new insights from genetics]. *J Soc Biol* 2004 ; 198 : 80-7.
50. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, *et al.* A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 709-15.