



**HAL**  
open science

# IMPACT DE L'HYPERCORTICISME SUR L'AXE GONADOTROPE FEMELLE

Mohsen Ayrout

► **To cite this version:**

Mohsen Ayrout. IMPACT DE L'HYPERCORTICISME SUR L'AXE GONADOTROPE FEMELLE. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS262 . tel-01898478

**HAL Id: tel-01898478**

**<https://theses.hal.science/tel-01898478>**

Submitted on 18 Oct 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# IMPACT DE L'HYPERCORTICISME SUR L'AXE GONADOTROPE FEMELLE

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°568 Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie  
(Biosigne)  
Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre, le 19 septembre 2018, par

**Mohsen AYROUT**

Composition du Jury :

Monsieur le Dr **Michael SCHUMACHER**

DR Inserm, Université Paris-Saclay

Président

Madame la Dr **Françoise LENFANT**

DR Inserm, Université de Toulouse

Rapporteur

Monsieur le Dr **Massimiliano BELTRAMO**

DR INRA, Centre du Val de Loire

Rapporteur

Madame la Dr **Sophie CHRISTIN-MAITRE**

PU-PH, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Examineur

Madame la Dr **Stéphanie CHAUVIN**

CR Inserm, Université Paris-Sud

Directeur de thèse



# Remerciements

Ce travail de Thèse a été rendu possible grâce à la participation et au soutien de nombreuses personnes que je tenais à remercier ici.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail qui me tient à cœur.

Monsieur le Professeur Michael SCHUMACHER pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de présider ce jury.

Madame le Docteur Françoise LENFANT pour avoir eu la gentillesse de juger ce travail depuis le mi-parcours de thèse, pour vos conseils avisés sur mon projet doctoral qui nous a permis d'avancer.

Monsieur le Docteur Massimiliano BELTRAMO, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury en tant que rapporteur et d'avoir accepté la lourde charge d'évaluer ce travail de thèse.

Madame le Docteur Sophie CHRISTIN-MAITRE pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'en être l'examinatrice.

Je tiens à remercier particulièrement Marc LOMBES pour son accueil chaleureux au sein de l'unité INSERM 1185 et pour son implication directe dans la progression de mon sujet. Merci pour tes conseils, tes encouragements, ta pluridisciplinarité, ton humour, ta disponibilité au quotidien (même si t'es en vacances) et surtout ton amour pour les libanais et la bouffe libanaise.

Merci du fond du cœur à ma directrice de thèse, Stéphanie CHAUVIN. Je te remercie de m'avoir pris sous ton aile pendant ces quatre années, et de m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la physiologie endocrinienne. Tu as su me motiver à m'engager dans ce travail, puis à persévérer dans les moments difficiles. Je te remercie pour la qualité de ton encadrement et pour m'avoir secoué (plusieurs fois) afin de faire ressortir le meilleur de moi-même. Je te remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir écouté, soutenu et épaulé d'un point de vue scientifique et personnel. Ton souci du détail m'a changé la vie. J'ai muri sous ta direction. Je suis heureux d'avoir croisé ton chemin.

Ensuite, je voudrais remercier Nadine BINART et toute son équipe dans laquelle j'ai eu la chance de travailler durant cette thèse. Merci à Valérie, Charlotte, Isabelle, Françoise, Lucie, Jérôme B, Fabien pour votre disponibilité, pour avoir répondu si régulièrement à mes questions et couvrir mes petites bêtises.



Merci à Jérôme F, Damien et Leila pour votre soutien, ainsi que pour les discussions pluridisciplinaires toujours constructives et enrichissantes.

Merci à Larbi et Luc pour votre motivation continue. Avec vous j'ai appris l'importance de joindre l'utile à l'agréable.

Merci Say pour ton aide, tes conseils et ta disponibilité. Ton 'to do liste' me stresse toujours, mais je te félicite pour ton organisation et ton implication dans la vie du laboratoire. Grâce à toi, le tigre qui pleure est devenu mon plat préféré.

Merci à ma compatriote Mirrela et au breton bitcho qui ont rendu mon séjour inoubliable avec leur façon de régler les problèmes à travers le concombre martini.

Merci à Charlotte P et Bruno pour m'apprendre à m'intégrer en France (Sputinik) *via* toutes les leçons d'histoires françaises et européennes (Triple Karmeliet).

Merci également à tous les membres de l'Unité U1185, Géraldine, Laurence, Clémence, Cindy, Meriem, Julie, Thi-An, Simon, Annabelle, Florian et Patrick pour leur gentillesse et leur disponibilité qui m'ont permis de travailler dans d'excellentes conditions.

Au final, à la femme à laquelle je tiens le plus : Ma grand-mère Sonia, Merci pour ta présence constante à mes côtés.



## **Présentations orales / affichées à des congrès internationaux et nationaux**

- ▶ **Formation d'introduction à l'éthique de la recherche et à l'intégrité scientifique 2018**
- ▶ **Formation de médiation scientifique 2017**
- ▶ **Journée de l'école doctorale Kremlin Bicêtre 2017**
- ▶ **GDR Tours 2017**
- ▶ **Journée de l'école doctorale Kremlin Bicêtre 2016**
- ▶ **ESE Summer School on Endocrinology Bregenz-Autriche 2016**
- ▶ **6th Nuclear Receptor Meeting Paris 2016**
- ▶ **Doctoriales de Mars 2016**
- ▶ **SFE Angers 2015**
- ▶ **Journée de l'école doctorale Kremlin Bicêtre 2015**





<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>2</b>
<b>AVANT PROPOS .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>I-Régulation neuroendocrine de l'axe gonadotrope chez la femelle .....</b>	<b>9</b>
A- Le système GnRH .....	9
1- La GnRH .....	9
2- Les neurones à GnRH .....	11
3- Mode de sécrétion de la GnRH .....	12
4- Sites d'action et effets de la GnRH .....	14
a. Le récepteur de la GnRH .....	14
b. Effets de la GnRH .....	14
B- Les gonadotropines .....	18
1- Lieu de synthèse et de sécrétion .....	18
2- Rôle des gonadotropines .....	19
C- Physiologie du cycle œstrien : régulation par les stéroïdes sexuels .....	20
1- Le cycle œstrien .....	20
2- Rôle des stéroïdes .....	21
a. La progestérone .....	21
b. Les œstrogènes (E2) .....	22
D- Les neurorégulateurs clés de la sécrétion de la GnRH .....	23
1- Les peptides RF-amidés : Kisspeptine et RFamide-Related Peptide-3 .....	24
a. La kisspeptine (Kiss1) .....	24
b. Les peptides liés RFamide-3 (RFRP-3) .....	32
2- Les autres facteurs .....	34
a. Neuropeptide Y (NPY) .....	34
b. L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) .....	35
<b>II- L'axe corticotrope et les glucocorticoïdes .....</b>	<b>37</b>
A- L'axe corticotrope .....	37
1- Organisation fonctionnelle .....	37
2- Régulation de l'axe corticotrope .....	38
a. Rythmicité .....	38
b. Rétrocontrôle .....	38
B- Les glucocorticoïdes .....	39
1- Biosynthèse, circulation et métabolisme des glucocorticoïdes .....	39
2- Rôle des glucocorticoïdes .....	41
C- Les récepteurs des glucocorticoïdes .....	42
1- Le gène <i>NR3C1</i> .....	42
2- La protéine GR, interface entre ligand, ADN, et partenaires transcriptionnels .....	44
a. Le domaine N-terminal (NTD) .....	44
b. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) .....	44
c. La région charnière .....	45
d. Le domaine de liaison du ligand (LBD) .....	45
3- Mutations et polymorphismes du GR .....	45
4- Régulation de l'expression de GR .....	46
a. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle .....	46



b. Régulation post-traductionnelle.....	48
5- Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.....	50
a. Actions génomiques transcriptionnelles.....	51
b. Actions non génomiques .....	53
<b>III- Impact de l'hypercorticisme sur l'activité de l'axe gonadotrope.....</b>	<b>55</b>
A- Etiologie de l'hypercorticisme .....	55
1- Le Syndrome de Cushing .....	55
2- Le stress chronique .....	56
B- Effets de l'hypercorticisme sur l'axe gonadotrope.....	57
1- Effets sur l'hypothalamus.....	57
2- Effets sur l'hypophyse .....	59
3- Effets sur les fonctions ovariennes.....	59
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>63</b>
<b>1<sup>ère</sup> partie : Etude des effets des glucocorticoïdes sur l'expression de différents neurorégulateurs de la GnRH au cours du cycle œstrien</b>	
I-Contexte et objectifs de l'étude .....	65
<b><u>Article 1 : Glucocorticoids stimulate hypothalamic dynorphin expression accounting for stress-induced impairment of GnRH secretion during preovulatory period</u></b>	
II-Conclusion-Discussion-Données complémentaires.....	69
<b>2<sup>ème</sup> partie : Identification d'une nouvelle signalisation rapide des glucocorticoïdes dans les cellules gonadotropes</b>	
I-Contexte et objectifs de l'étude .....	75
<b><u>Article 2 : A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells</u></b>	
II-Conclusion-Discussion-Données complémentaires.....	80
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>94</b>



## Table des Illustrations

- Figure 1** : L'axe gonadotrope chez la femelle
- Figure 2** : Structure primaire des 14 isoformes de GnRH chez les vertébrés
- Figure 3** : Organisation du gène précurseur de la GnRH-I
- Figure 4** : La GnRH stimule l'expression et la libération des gonadotropines hypophysaires
- Figure 5** : Les gonadotropines hypophysaires régulent en partie la croissance folliculaire
- Figure 6** : Les gonadotropines stimulent la stéroïdogenèse ovarienne
- Figure 7** : Profils de sécrétion de certaines hormones au cours du cycle œstrien chez les rongeurs
- Figure 8** : Produits du gène *KISS1*
- Figure 9** : Analyse macroscopique des ovaires et cornes utérines de souris contrôles ou invalidées pour Kiss1R<sup>(-/-)</sup>
- Figure 10** : Rétrocontrôles de l'E2 sur les neurones à Kiss1 au sein de l'hypothalamus de rongeurs femelles
- Figure 11** : Colocalisation de la Kisspeptine, de la Neurokinine B et de la Dynorphine A dans de nombreux neurones de l'ARC chez la brebis
- Figure 12** : Représentation schématique de l'interaction entre la Neurokinine B et la Kisspeptine
- Figure 13** : Structure des dynorphines issues du gène PDYN de la prodynorphine
- Figure 14** : Cascades de modifications de la protéine précurseur des peptides RF-amides
- Figure 15** : L'axe corticotrope chez le rongeur
- Figure 16** : La rythmicité de la sécrétion des glucocorticoïdes chez les rongeurs
- Figure 17** : La corticosurrénale synthétise les glucocorticoïdes
- Figure 18** : Rôle multiple des glucocorticoïdes et pathologies associées
- Figure 19** : Organisation et isoformes du récepteur des glucocorticoïdes
- Figure 20** : Signalisation génomique et non génomique des glucocorticoïdes
- Figure 21** : L'axe corticotrope chez des individus sains ou chez des patients atteints de la maladie de Cushing
- Figure 22** : Les caractéristiques cliniques du Syndrome de Cushing
- Figure 23** : Les avantages des modèles cellulaires hypothalamiques
- Figure 24** : Schéma représentatif du système d'incubation des tranches de cerveaux de souris
- Figure 25** : Hypothèse d'interaction entre les GC et l'E2 dans les cellules GT1-7
- Figure 26** : La dexaméthasone n'augmente pas l'expression du RFRP-3 (*Npvf*) dans les cellules GT1-7
- Figure 27** : Le cortisol inhibe la sécrétion pulsatile de LH chez la brebis
- Figure 28** : La palmitoylation présente un caractère réversible
- Figure 29** : Mise en évidence de la palmitoylation
- Figure 30** : La coloration à l'hématoxyline-éosine d'hypophyses antérieures des souris ne montre pas de changements morphologiques ayant pu survenir durant la durée du protocole expérimental (3 heures)
- Figure 31** : La cystéine palmitoylée de ER $\alpha$  est un résidu conservé au sein du LBD du GR
- Figure 32** : Evaluation de la localisation membranaire et du niveau de palmitoylation des différents mutants du récepteur des glucocorticoïdes
- Figure 33** : Représentation schématique des modes d'actions des GC, en présence ou en absence de GnRH dans les cellules gonadotropes
- Figure 34** : Les glucocorticoïdes agissent au niveau hypothalamique et hypophysaire pour freiner l'ovulation



## Liste des abréviations

11 $\beta$ HSD	11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
2-Br	2-Bromopalmitate
5'-UTR	5'-Untranslated region (région non traduite en 5')
ACTH	Adrenocorticotrop hormone (adrénocorticotrophine)
AF-1	Fonction d'activation 1
AF-2	Fonction d'activation 2
AKAP-79	A-kinase anchoring protein 79
AMP <sub>c</sub>	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Hétérodimère Jun/Fos
AP-2	Activating protein 2
AP-MS	Affinity-Purification Mass Spectrometry
AR	Récepteur des androgènes
ARC	Noyaux arqué
ARE	Eléments riches en adénylate et uridylate
Arg	Arginine
AVP	Arginine–Vasopressin Peptide
AVPV	Noyaux antéroventral périventriculaire
BRG1	BRM-associated factor
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmoduline dependent kinase II
CARM1	Co-activator-associated Arg methyltransferase 1
CBG	Corticosteroid Binding Globulin
CBP	CREB-binding protein
CG	Chorionic Gonadotropin (Hormone Chorionique)
Cga	Sous-unité $\alpha$ commune à LH, FSH et TSH
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
Cort	Corticostérone
Cort-BSA	Corticostérone couplée à la BSA
COS-7	Monkey kidney fibroblast-like cell
CRE	Eléments de réponse à l'AMP <sub>c</sub>
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CRH1R	Récepteur du CRH de type 1
CSP	Cystein-String Protein
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DMH	Noyau dorsomédian de l'hypothalamus
Dyn A 1-17	Dynorphine A
Dyn A 1-32	Grande dynorphine
Dyn A	Dynorphine A
Dyn B 1-13	Dynorphine B
Dyn B 1-29	Leumorphine
E2	Œstrogènes
Egr1	Early growth response-1 protein
ER	Récepteur de l'œstrogène
ERR	Estrogen-related receptors
ERE	Eléments de réponses aux œstrogènes
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2





FAS	Free $\alpha$ subunit (sous-unité $\alpha$ libre)
FGFR1	Récepteur de type 1 du FGF
FSH	Follicle-Stimulating Hormone (Hormone Folliculo-Stimulante)
GABA	Acide $\gamma$ aminobutyrique
GAP	GnRH-Associated Peptide
GAP-43	Growth Associated Protein 43
GC	Glucocorticoïdes
GH	Growth Hormone (Hormone de croissance)
GnIH	GnRH-Inhibitory Hormone
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
GR	Glucocorticoid Receptor (Récepteur des glucocorticoïdes)
GRi	GR intracellulaire
GRm	GR membranaire
GSK-3	Glycogène synthase kinase-3
HAM	Hydroxylamine
HAT	Histone acétyltransférase
HDACs	Histone désacétylases
HEK293T	Human Embryonic Kidney
hGR	GR humain
HH	Hypogonadisme Hypogonadotrope
HPA	Axe Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien
hpg	hypogonadotropes
Hsp90	Heat shock protein
IP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-triposphate
JNK1/2	c-Jun-N-terminal Kinase 1/2
K	Lysine
Kb	Kilo-bases
Kiss1	Kisspeptine
KOR	Récepteur $\kappa$ -opioïdes
LBD	Domaine de liaison au ligand
Leu	Leucine
LH	Luteinizing-Hormone (Hormone Lutéinisante)
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MC2R	Melanocortin-2-receptor
miRNA	micro-ARN
MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
Nab1/2	Ngfi-A binding proteins
NcoR1	Nuclear receptor co-repressor
NEM	N-Ethylmaléimide
NMM	N-Methylmaléimide
nGRE	Eléments de réponses négatifs aux GC
NK3R	Récepteur de la Neurokinine B de type 3
NKB	Neurokinine B
NLS	Nuclear Localisation Signal
NMDA	Acide N-methyl D-aspartique
NO	Oxyde nitrique
NPY	Neuropeptide Y
NTD	Domaine N-terminal
P	Phosphorylation
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PAT	Palmitoyl-transférase



pb	paire de bases
PCAF	p300 associated factor
Pdyn	Précurseur de la dynorphine
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
POA	Preoptic Area (Aire préoptique)
POMC	Pro-opiomélanocortine
PP	Protéines phosphatases
PR	Récepteur de la progestérone
PRL	Prolactine
PROK2	Prokinéticine 2
PROKR2	Récepteur de la Prokinéticine 2
PSD-95	Post-synaptique density protein 95
PTE	Palmitoyl-thioesterase
PVN	Noyau paraventriculaire
RE	Réticulum Endoplasmique
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RFRP-3	RFamide-Related Peptide-3
R-FSH	Récepteur de la FSH
R-GnRH	Récepteur de la GnRH
R-LH	Récepteur de la LH
RP3V	Région périventriculaire rostrale du troisième ventricule
SCN	Noyau supra-chiasmatique
SMRT	Silencing mediator of retinoic and thyroid receptors
Sp1	Protéine spécifique 1
SRC	Steroid Receptor Co-regulator
STAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
Stat3	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone (Thyréostimuline)
VIP	Vasoactif intestinal peptide
YY1	Yin Yang 1
$\alpha$ -NE	$\alpha$ -néoendorphine



# **AVANT PROPOS**

L'infertilité humaine est devenue un problème de santé publique majeur en Europe. La France reste néanmoins le pays le plus fécond avec un taux de fécondité de 1,96 enfant par femme en 2016 (INSEE, 17/01/2017). En France, 15% de la population (1/6 couple) rencontrent des difficultés à concevoir un enfant et consultent pour infertilité (Belaisch-Allart, 2011; Brzakowski et al., 2009). Malheureusement le problème s'aggrave : les couples signalant une infertilité dans les centres européens augmentent de 8 à 9% par an (Ferraretti et al., 2013). Environ 21% des cas d'infertilité peuvent être attribués à des facteurs liés aux hommes et 33% à des facteurs liés aux femmes, 39% sont attribués à une combinaison des deux, et 7% des cas sont inexplicables, rendant souvent difficile un diagnostic exact (Hesam et al., 2017; Thonneau et al., 1991). L'augmentation de l'incidence de l'infertilité du couple est multifactorielle, essentiellement due à l'âge de désir d'enfant plus tardif, des facteurs environnementaux (pollution et perturbateurs endocriniens) et du mode de vie (tabagisme, alcoolisme, sédentarité, fatigue et stress) (Brzakowski et al., 2009). L'infertilité liée au stress attire de plus en plus l'attention. Les statistiques ont montré que parmi les couples infertiles, les femmes sont plus vulnérables aux effets du stress que les hommes (Casu and Gremigni, 2016).

Du point de vue physiologique, la fonction de reproduction est assurée par la sécrétion de la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone). L'influence de facteurs extérieurs ou environnementaux, mais également internes (hormones, neuropeptides) sont à l'origine de la modulation de cette sécrétion. Dans ce cadre, les hormones glucocorticoïdes (GC) jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie. Néanmoins, une hypersécrétion ou une hyposécrétion de GC entraîne des troubles de la fertilité observés respectivement chez des patients atteints d'un syndrome de Cushing (majoritairement à cause d'une tumeur de la glande hypophysaire) ou de la maladie d'Addison (essentiellement due à une insuffisance surrénalienne liée à une atteinte corticale auto-immune) (Whirledge and Cidlowski, 2017a). De la même manière, un stress chronique, agit au niveau du système nerveux central pour déclencher une hypersécrétion de GC surrénaliens, pouvant être responsable d'un déficit de la synthèse et de la sécrétion des gonadotropines hypophysaires LH (Luteinizing-Hormone) et



FSH (Follicle-Stimulating Hormone) entraînant un hypogonadisme, révélé par une anomalie de la puberté, un arrêt de la cyclicité ou une infertilité (Akhter et al., 2016; Lynch et al., 2014; Unuane et al., 2011).

Ainsi, compte tenu de l'importance physiologique et physiopathologique des GC dans la régulation de la reproduction et dans la genèse de l'infertilité, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les GC agissent sur les fonctions de reproduction en particulier chez la femme.

Dans ce manuscrit, je vous présente le fruit d'un travail de quatre années (Master 2 puis trois années de Thèse) réalisé au sein de l'Unité Inserm 1185. L'ensemble de ce travail a conduit à la publication d'un article en 2017 et à la soumission d'un second article en 2018, dont je suis le premier auteur, et à la participation à des formations et à des congrès scientifiques nationaux. Ce mémoire de thèse est subdivisé en 3 grandes parties : une Introduction bibliographique, une partie réunissant les Résultats que j'ai obtenus, une dernière partie de Discussion et de Conclusion générales.

L'introduction bibliographique est structurée en 3 grands chapitres. Le premier présente la physiologie de la régulation neuroendocrine de l'axe gonadotrope chez la femelle, en introduisant les différents acteurs de l'axe gonadotrope ainsi les neurorégulateurs clés. Le deuxième chapitre de l'introduction générale est consacré à la physiologie de l'axe corticotrope, en décrivant l'acteur principal, les GC, leurs rôles pléiotropes et leur récepteur, le récepteur des glucocorticoïdes (GR). Cette partie se poursuit par la description moléculaire des voies de signalisation par lesquelles les GC exercent leurs effets physiologiques. Enfin, le troisième chapitre de l'introduction est axé sur le lien entre l'hypercorticisme et l'infertilité. Cette partie introductive sera suivie par les objectifs de mes travaux de thèse.

Le corps du manuscrit, qui présentera l'ensemble des résultats originaux obtenus au cours du doctorat, est divisé en 2 grandes parties. Chaque article publié ou soumis est précédé d'une introduction rappelant le contexte et les hypothèses sur lesquelles notre travail s'est reposé, afin d'exposer les objectifs de notre travail et finir par une discussion, accompagnée de résultats complémentaires et de perspectives. Ces deux grandes parties forment un ensemble cohérent à travers lequel nous avons évalué et exploré l'impact des GC sur l'axe de reproduction, au niveau hypothalamique et hypophysaire : dans la première partie nous montrons les effets des GC sur l'expression de différents neurorégulateurs hypothalamiques





de la GnRH à différentes périodes du cycle œstrien. Les résultats de cette partie viennent d'être soumis pour publication en 2018. Dans la deuxième partie, nous identifions une nouvelle signalisation rapide des GC impliquant un récepteur membranaire palmitoylé dans les cellules gonadotropes, qui pourrait interférer avec la signalisation GnRH. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en 2017 dans Scientific Reports.

Enfin, le manuscrit sera conclu par une discussion et une conclusion générale synthétisant l'ensemble des résultats de ce travail.







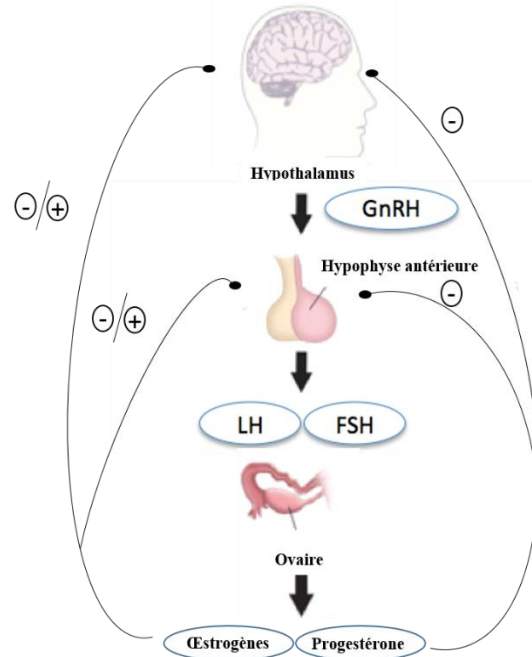
# **INTRODUCTION**

## Figure 1 : L'axe gonadotrope chez la femelle

L'hypothalamus sécrète la GnRH qui exerce son action sur les cellules gonadotropes hypophysaires en stimulant la sécrétion de gonadotropines (LH et FSH). Ces hormones agissent à leur tour sur l'ovaire.

La progestérone et les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif/positif sur l'hypophyse et l'hypothalamus. Néanmoins, chez la femme, le rétrocontrôle des œstrogènes est biphasique au cours du cycle menstruel : négative puis positif en fin de phase folliculaire.

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone ; LH : Luteinizing Hormone ; FSH : Follicle Stimulating Hormone.



## Figure 2 : Structure primaire des 14 isoformes de GnRH chez les vertébrés

Il existe 14 isoformes moléculaires de la GnRH. Toutes ces formes sont composées de 10 acides aminés et contiennent un pyroglutamate en position N-terminale et un résidu glycinamide en position C-terminale. Les zones ombrées indiquent les régions conservées avec la forme ancestrale (mammifère, mGnRH).

Adapté de Okubo and Nagahama, 2008.

### Différents GnRH

Mammifère (mGnRH)  
 Porc (gpGnRH)  
 Poulet (cGnRH-I)  
 Grenouille (frGnRH)  
 Poisson-Chat (cfGnRH)  
 Dorade (sbGnRH)  
 Hareng (hrGnRH)  
 Medaka (mdGnRH)  
 Poisson-Blanc (wfGnRH)  
 Poulet (cGnRH-II)  
 Saumon (sGnRH)  
 Rousette (dfGnRH)  
 Lamproie (lGnRH-I)  
 Lamproie (lGnRH-III)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Mammifère (mGnRH)	pE	H	W	S	Y	G	L	R	P	G-NH <sub>2</sub>
Porc (gpGnRH)	pE	Y	W	S	Y	G	V	R	P	G-NH <sub>2</sub>
Poulet (cGnRH-I)	pE	H	W	S	Y	G	L	Q	P	G-NH <sub>2</sub>
Grenouille (frGnRH)	pE	H	W	S	Y	G	L	W	P	G-NH <sub>2</sub>
Poisson-Chat (cfGnRH)	pE	H	W	S	H	G	L	N	P	G-NH <sub>2</sub>
Dorade (sbGnRH)	pE	H	W	S	Y	G	L	S	P	G-NH <sub>2</sub>
Hareng (hrGnRH)	pE	H	W	S	H	G	L	S	P	G-NH <sub>2</sub>
Medaka (mdGnRH)	pE	H	W	S	F	G	L	S	P	G-NH <sub>2</sub>
Poisson-Blanc (wfGnRH)	pE	H	W	S	Y	G	M	N	P	G-NH <sub>2</sub>
Poulet (cGnRH-II)	pE	H	W	S	H	G	W	Y	P	G-NH <sub>2</sub>
Saumon (sGnRH)	pE	H	W	S	Y	G	W	L	P	G-NH <sub>2</sub>
Rousette (dfGnRH)	pE	H	W	S	H	G	W	L	P	G-NH <sub>2</sub>
Lamproie (lGnRH-I)	pE	H	W	S	H	D	F	K	P	G-NH <sub>2</sub>
Lamproie (lGnRH-III)	pE	H	Y	S	L	E	W	K	P	G-NH <sub>2</sub>

## **I-Régulation neuroendocrine de l'axe gonadotrope chez la femelle**

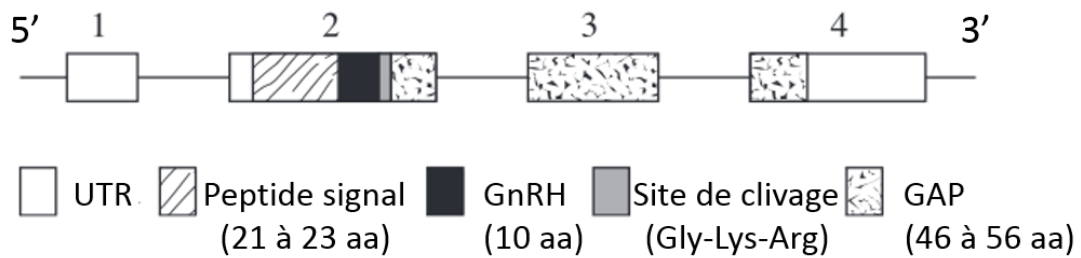
L'axe Hypothalamo-hypophyso-gonadique ou axe gonadotrope comporte 3 structures distinctes interconnectées (hypothalamus, hypophyse et gonades) dont la synchronisation et la régulation permet d'assurer la fonction de reproduction (**Figure 1**). Bien que les mécanismes spécifiques de régulation de l'activité de la reproduction puissent varier selon les espèces, les neurones hypothalamiques à GnRH restent les chefs d'orchestre de l'activité de cet axe. Les neurones à GnRH se projettent dans l'éminence médiane et secrètent la GnRH dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire pour atteindre l'antéhypophyse (Hahn and Coen, 2006). L'hypophyse antérieure regroupe cinq types cellulaires qui se distinguent selon l'hormone qu'elles produisent : les cellules thyroïdiques (TSH, Thyroid-Stimulating Hormone), gonadotropes (LH et FSH), corticotropes (ACTH, adrenocorticotropie hormone), lactotropes (PRL, prolactin) et somatotropes (GH, Growth Hormone). La GnRH, avec son mode de sécrétion pulsatile, agit sur les cellules gonadotropes pour réguler de façon différentielle la synthèse et la sécrétion des gonadotropines hypophysaires LH et FSH (Thibault and Levasseur, 2014). Les gonadotropines secrétées servent ensuite de relais dans le contrôle des fonctions exocrines et endocrines des gonades (stéroïdogénèse et gamétogénèse). Les hormones sexuelles produites par l'ovaire (stéroïdes et peptides gonadiques) peuvent alors exercer un rétrocontrôle négatif ou positif au niveau hypothalamique ou hypophysaire, et ainsi réguler finement l'activité gonadotrope.

### **A- Le système GnRH**

#### **1- La GnRH**

La GnRH, initialement isolée d'hypothalamus porcins et ovins, a été décrite pour la première fois en 1971 par les groupes de Schally et Guillemin (Amoss et al., 1971; Schally et al., 1971). Néanmoins, dès 1979, King et Millar ont identifié une seconde forme de GnRH à partir de cerveaux d'oiseaux, de reptiles et ainsi de suite... (King and Millar, 1979). Aujourd'hui, 14 formes moléculaires de GnRH sont connues chez les vertébrés (**Figure 2**). Toutes ces isoformes sont composées de 10 acides aminés très conservés (Okubo and Nagahama, 2008) avec 4 résidus identiques (position 1, 4, 9 et 10). Elles possèdent toutes un pyro-glutamate (pE) en position N-terminale et un résidu glycinamide en position C-terminale (G-NH<sub>2</sub>), suggérant l'importance fonctionnelle de ces deux résidus dans l'activité du décapeptide (Belsham and Lovejoy, 2005; Urbanski, 2012). La variation majeure porte sur les





**Figure 3 : Organisation du gène précurseur de la GnRH-I**

Le gène de la GnRH-I est composé de quatre exons et trois introns. Les boîtes représentent les exons et les lignes horizontales représentent les introns.

La GnRH provient d'un polypeptide précurseur appelé prépro-GnRH, regroupant un peptide signal, le décapeptide GnRH, un site de clivage et un peptide associé à la GnRH (GAP). UTR : Région Non Traduite.

Adapté de Okubo and Nagahama, 2008.

acides aminés 5, 7 et 8 qui sont à l'origine des différences dans les propriétés de liaison de ces différentes isoformes avec des récepteurs non homologues de l'espèce (inter-spécificité). Chez l'ensemble des vertébrés, une ou plusieurs formes de GnRH peuvent s'exprimer dans différentes régions du cerveau. La forme ancestrale, retrouvée chez tous les vertébrés, est la forme mammalienne ou GnRH-I, qui s'exprime dans l'ensemble de l'hypothalamus alors que les autres formes sont majoritairement retrouvées dans les régions extra-hypothalamiques.

Les gènes des différents GnRHs (*GNRH*, 8p21.2 chez l'homme) partagent la même organisation générale, leur structure est formée de 4 exons et 3 introns (**Figure 3**), suggérant une origine ancestrale commune. Seule la longueur des introns a largement varié, celle-ci augmentant depuis les poissons jusqu'aux mammifères (Andersen and Klungland, 1993). Le produit de la traduction des transcrits est constitué de 3 parties principales : un peptide signal, le peptide GnRH proprement dit, et un peptide dit « associé au GnRH » (GAP : GnRH-Associated Peptide), ces deux derniers étant séparés par 3 acides aminés formant le site de clivage nécessaire à l'amidation de la GnRH. Le premier exon code une partie 5' non traduite (5'-UTR). L'exon 2 code l'extrémité N-terminale d'une pré-prohormone de 92 acides aminés, contenant le peptide signal (de 21 à 23 acides aminés), la totalité du GnRH (10 acides aminés), le site protéolytique (Gly-Lys-Arg) et une partie du GAP (les 11 premiers acides aminés). L'exon 3 et une partie de l'exon 4 codent la fin du GAP (acides aminés 12 à 43 pour l'exon 3 et les 13 derniers acides aminés pour l'exon 4). Le rôle du GAP n'est pas très bien connu. Il semblerait néanmoins permettre le maintien de la structure et de la stabilité du précurseur de la GnRH plutôt qu'avoir une fonction propre (Okubo and Nagahama, 2008). La fonction hypophysiotrope est essentiellement portée par la GnRH-I pour laquelle nous porterons notre attention dans la suite de ce manuscrit et que nous appellerons GnRH.

La première preuve du rôle majeur de la GnRH dans la physiologie de la reproduction a été apportée en 1977 par l'analyse et la description d'une mutation naturelle de la GnRH chez des souris hypogonadotropes (souris hpg) (Cattanach et al., 1977; Mason et al., 1986). Les souris hpg sont caractérisées par une délétion des exons 3 et 4 du gène précurseur de la GnRH. Ces souris produisent des taux extrêmement faibles de LH et FSH qui sont à l'origine d'un dysfonctionnement gonadique. Presque 30 ans de recherche étaient nécessaires avant que deux groupes montrent finalement que des mutations très rares de la GnRH chez l'homme pouvaient aussi être responsable d'hypogonadismes hypogonadotropes (HH, définie comme un déficit de production, de sécrétion ou d'action de la GnRH) (Bouligand et al., 2009; Chan



et al., 2009). Parmi une cohorte de 150 patients atteints d'HH sans anosmie (absence de défauts de localisation des neurones à GnRH), seuls deux patients issus de la même famille roumaine se sont révélés posséder une mutation homozygote dans le gène précurseur de la GnRH (insertion d'une adénine en position 18 dans la séquence codant le peptide signal), responsable d'un décalage du cadre de lecture et donc d'une absence de décapeptide GnRH fonctionnel. Ces deux patients, frère et sœur, présentaient une absence de développement pubertaire spontané associée à de faibles taux de stéroïdes sexuels et de gonadotropines (Bouligand et al., 2009). Sachant que le reste de la famille hétérozygote est fertile, ces données suggèrent qu'une seule copie du gène du précurseur de la GnRH est suffisante pour obtenir une sécrétion normale de GnRH. Dans une seconde étude sur 310 patients HH sans anosmie (Chan et al., 2009), la délétion homozygote d'une paire de bases entraîne la production d'une forme tronquée de la GnRH dans sa région C-terminale, la rendant donc inactive. Des mutations de gènes régulant l'activité de la GnRH sont aussi décrites chez l'homme et responsables d'HH. C'est le cas par exemple de mutations du gène *PCSK1*, codant la prohormone convertase 1/3, qui conduisent à une absence de protéolyse de la prohormone précurseur de la GnRH, et donc à une GnRH inactive (Jackson et al., 1997).

## 2- Les neurones à GnRH

Au cours de l'embryogenèse, les neurones à GnRH dérivés de la placode olfactive vont migrer tout le long du nerf olfactif vers le septum nasal pour coloniser le cerveau antérieur (Wray, 2002). Durant la période post-natale, les neurones à GnRH forment des structures dendritiques complexes qui se transforment en cellules uni- ou bi-polaires dans le cerveau adulte (Cottrell et al., 2006). Chez la plupart des mammifères, et en raison de la migration des neurones pendant le développement, les neurones à GnRH ne se sont pas localisés dans une structure bien définie et limitée. Ils sont principalement dispersés dans le diencephale au sein de l'aire préoptique (POA) et dans l'hypothalamus médiobasale (Constantin, 2011). Le succès de la migration de ces cellules souches dépend de l'expression de molécules d'adhésion ou de ligands/récepteurs spécifiques (l'anosmine-1 (gène *KALI*), le récepteur de type 1 du FGF (gène *FGFR1*), la prokinétine 2 et son récepteur de type 2 (gènes *PROK2/PROKR2*) (Dodé et al., 2006; Boehm et al., 2015)), produits par des cellules non-neuronales adjacentes, dont le rôle est de leur servir de guide. Un défaut d'expression de ces protéines est responsable de certaines déficiences, notamment chez l'homme d'une anosmie associée à un hypogonadisme, qui caractérisent le syndrome de De Morsier-Kallmann (Ballabio and Camerino, 1992).



Les longues excroissances dendritiques de ces neurones se projettent principalement dans la zone externe de l'éminence médiane où la GnRH est libérée de manière synchronisée dans les capillaires du système porte (Caldani et al., 1988). Une meilleure compréhension de la morphologie et de la fonction des neurones à GnRH a été établie par l'équipe de Herbison et Campbell. Ces derniers ont utilisé des approches de traçage à la biotine pour montrer l'interaction entre les différentes terminaisons dendritiques des neurones à GnRH, pouvant expliquer la synchronisation de l'activité de ces neurones (Constantin, 2017; Campbell and Suter, 2010; Campbell et al., 2009). De nombreux travaux ont montré que la sécrétion pulsatile de la GnRH n'est pas seulement dictée par l'activité intrinsèque de ces neurones mais exige également la contribution d'afférences hypothalamiques (Maeda et al., 2010; Terasawa et al., 2010). Un équilibre dynamique entre les afférences excitatrices et inhibitrices serait à l'origine de la sécrétion pulsatile de la GnRH (Ojeda et al., 2006, 2010). Des techniques d'immunohistochimie ont montré la présence de nombreuses afférences hypothalamiques sur les neurones à GnRH (Campbell and Suter, 2010; Herbison and Moenter, 2011). Ces afférences libèrent différents neuromédiateurs tels que l'acide  $\gamma$  aminobutyrique (GABA), les opioïdes endogènes, le neuropeptide Y (NPY) ou les peptides de type RFamide (RFRP-3, Kisspeptine) (Clarke et al., 2009; García-Galiano et al., 2012; Lehman et al., 2010a; Navarro et al., 2006; Pralong, 2010; Smith and Clarke, 2010). Ces populations neuronales régulant la sécrétion de la GnRH chez les mammifères seront décrites dans la partie I-D-2 de ce manuscrit.

### 3- **Mode de sécrétion de la GnRH**

La compréhension du mode de sécrétion de la GnRH s'est principalement appuyée sur des techniques de prélèvements sanguins réalisés sur les capillaires du système porte hypophysaire de mouton (Caraty and Locatelli, 1988; Clarke and Cummins, 1982). Etant donné la petite taille de ces vaisseaux chez les autres espèces, la libération de la GnRH ne peut pas être directement mesurée. La synchronisation entre la libération de la GnRH et celle de la LH permettra, chez ces espèces, d'évaluer la fréquence de sécrétion de la GnRH en suivant celle de la LH dosée dans la circulation générale (Clarke and Cummins, 1982; Weems et al., 2015) ; la LH devenant le marqueur de l'activité pulsatile de la GnRH. Chez l'homme, ce marqueur a été remplacé par le dosage de la sous-unité  $\alpha$  libre (« free  $\alpha$  subunit » ou FAS) car sa demi-vie est plus longue que celle de la LH (formée du dimère  $\alpha/\beta$ LH) (Hirsch et al., 2010).

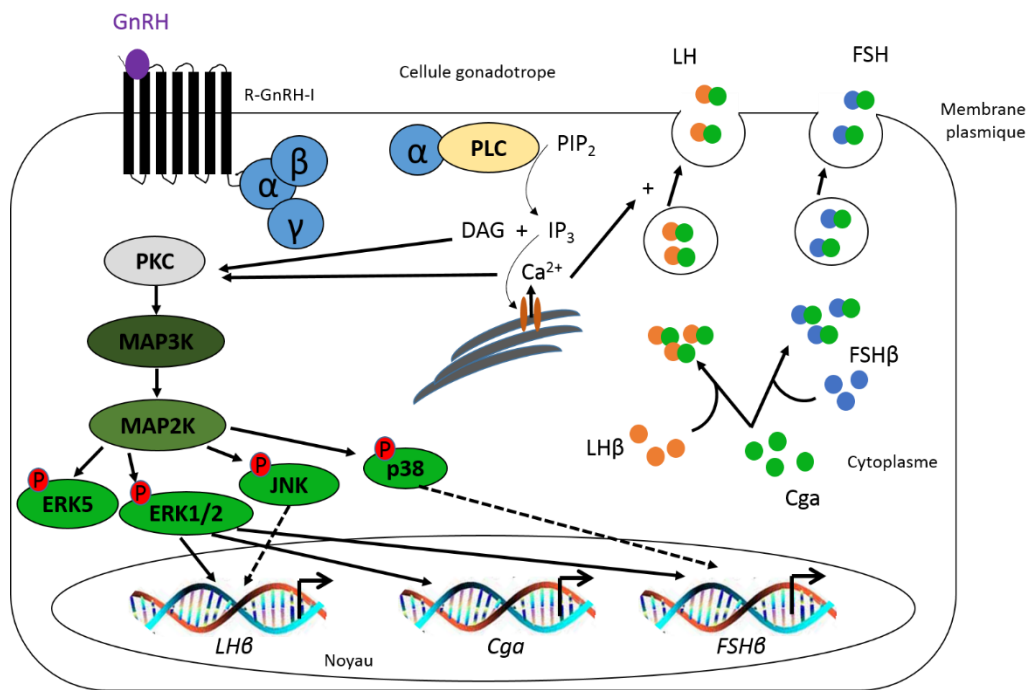


La GnRH est libérée de manière pulsatile au niveau des terminaisons nerveuses dans la région de l'éminence médiane et reflète l'activité synchrone de l'ensemble des neurones la produisant (Maeda et al., 2010). Ces pulses se produisent à des intervalles de 30 à 120 minutes selon les espèces et durent quelques minutes à quelques dizaines de minutes. Pour induire une sécrétion soutenue de LH et/ou de FSH, la GnRH doit être délivrée en direction de l'hypophyse de façon intermittente, selon une fréquence propre à chaque espèce, celle-ci étant elle-même susceptible de régulation en fonction de conditions physiologiques spécifiques. Ainsi, la fréquence des pulses de GnRH varie au passage de la puberté (accroissement) et pendant le cycle œstrien (Cohen-Tannoudji et al., 2012). De façon générale, la sécrétion de LH est favorisée par une pulsativité de fréquence élevée alors que celle de la FSH (moins marquée) l'est à plus basse fréquence (Czieselsky et al., 2016; Millar, 2005).

La nature pulsatile de la GnRH est essentielle pour un maintien physiologique de la fonction gonadotrope et cette propriété est utilisée dans l'élaboration des thérapies. Ainsi, l'administration intermittente de GnRH à une fréquence optimale trouve chez l'homme une application dans le traitement d'impubérismes ou d'infertilités (Andreyko et al., 1987). A l'inverse, l'administration continue de GnRH ou d'analogues superactifs produit une inhibition de la libération des gonadotropines (désensibilisation), provoquant une « gonadectomie » réversible, car non chirurgicale, utilisable pour le traitement des pubertés précoces ou des pathologies diverses liées à la production des stéroïdes sexuels (ex, cancer de la prostate, hirsutisme,...) (Msaouel et al., 2007; Ruchhoft et al., 1996).

De nombreux troubles de la reproduction peuvent être associés à un défaut de pulsativité de la GnRH (Stamatiades and Kaiser, 2018). En effet, la persistance de fréquence élevée de pulsativité de la GnRH augmente le rapport LH /FSH et contribue ainsi à une production excessive d'androgènes ovariens et une altération de l'ovulation. Ces effets sont observés dans le cas du syndrome des ovaires polykystiques, une pathologie affectant 6 à 10% des femmes (Dumesic et al., 2015; McCartney and Marshall, 2016). Inversement, une pulsativité à faible fréquence en GnRH conduisant à des taux anormaux en gonadotropines est généralement associée aux aménorrhées hypothalamiques (Marshall et al., 2001; Reame et al., 1985). Ces exemples mettent en évidence l'importance du mode de sécrétion de la GnRH et de sa pulsativité dans la régulation différentielle de la LH et de la FSH, afin d'assurer une fonction de reproduction adaptée.





**Figure 4 : La GnRH stimule l'expression et la libération des gonadotropines hypophysaires**

De façon schématique, dans les cellules gonadotropes, la liaison de la GnRH avec son récepteur stimule la protéine G<sub>αq</sub> qui permet

- 1) la libération des gonadotropines *via* une mobilisation calcique et
- 2) l'activation de l'expression de chacune des sous-unités (α et β spécifique) des gonadotropines *via* la cascade PKC-MAPK.

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone ; R-GnRH : Récepteur de la GnRH ; LHβ : sous-unité β de Luteinizing Hormone ; FSHβ : sous-unité β de Follicle stimulating Hormone ; Cga : sous-unité α commune ; PLC : phospholipase C ; PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ; DAG : diacylglycerol ; IP<sub>3</sub> : phosphatidylinositol-triphosphate ; Ca<sup>2+</sup>: calcium ; ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinases 1/2 ; JNK : c-jun-N-terminal kinases ; MAP2K : MAPK Kinases ; MAP3K : MAP2K kinases ; P: phosphorylation ; α,β,γ : sous-unités des protéines G.

#### 4- Sites d'action et effets de la GnRH

##### a. Le récepteur de la GnRH

La signalisation de la GnRH est initiée à la surface membranaire des cellules gonadotropes après liaison à son récepteur. Le récepteur de la GnRH (R-GnRH) est un membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) de type rhodopsine, caractérisés par sept hélices transmembranaires (Pierce et al., 2002). Le gène du R-GnRH (*GNRHR*, 4q13.2-3) possède trois exons et deux introns. Le récepteur bovin, ovin et humain sont constitués de 328 acides aminés alors que celui de la souris et du rat n'en possède que 327, en raison de l'absence d'un résidu (Lys191) dans la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire. Chez les espèces non-mammaliennes, ce récepteur compte 370 acides aminés et se distingue des récepteurs mammaliens par la présence d'une queue carboxy-terminale de 49 acides aminés. Le R-GnRH mammalien est caractérisé par l'absence d'une queue C-terminale habituellement impliquée dans l'internalisation des récepteurs, leur dégradation ou leur recyclage (Cronshaw et al., 2010). Ce récepteur ne suit donc pas le processus classique d'internalisation après son activation par la GnRH et est lentement désensibilisé, permettant une stimulation puissante et prolongée par la GnRH (Millar, 2005). Le niveau d'expression du R-GnRH est néanmoins régulé par le mode de pulsativité de la GnRH. Ainsi, une fréquence élevée en GnRH (intervalle de 30 min) stimule la synthèse du gène codant le R-GnRH (*Gnrhr*) (Stamatiades and Kaiser, 2018). Des sites de liaison à la GnRH de plus faibles affinités ont également été décrits dans le système nerveux central, les gonades, le placenta et les tissus tumoraux, mais leur rôle reste mal connu (Cheung and Wong, 2008; Perrett and McArdle, 2013).

A la différence de la GnRH (seulement deux mutations), une vingtaine de mutations perte de fonction du R-GnRH, à l'état homozygote ou hétérozygote, sont décrites pour être à l'origine d'HH (sporadique et familiale) sans anosmie (Layman et al., 1998; Noel and Kaiser, 2011; de Roux et al., 1997). Ces mutations sont réparties dans les différents domaines du R-GnRH, en particulier dans les régions transmembranaires, et ont permis d'étudier les corrélations structure-fonction de ce récepteur (Kim et al., 2010).

##### b. Effets de la GnRH

Au niveau des cellules gonadotropes, la GnRH régule à la fois la synthèse et la libération des gonadotropines (**Figure 4**). L'utilisation de lignées gonadotropes (LβT2 et αT3 développées par Pamela Mellon, USA) et de cultures primaires hypophysaires ont permis de



mieux comprendre la signalisation induite par la GnRH. Néanmoins, il reste encore de nombreuses études à mener pour mieux comprendre comment la cellule gonadotrope traduit le codage de la pulsativité de la GnRH en mode de régulation LH vs FSH.

- **Stimulation de l'expression des gènes des gonadotropines**

L'expression des gènes de chacune des sous-unités des gonadotropines (*Cga*, sous-unité  $\alpha$  commune, et *Lhb* ou *Fshb* sous-unités  $\beta$  spécifiques) dépend de la fréquence des pulses de la GnRH ; de faibles fréquences (intervalles maximum de 120 minutes) stimulent préférentiellement l'expression de *Fshb* (Dalkin et al., 1989; Haisenleder et al., 1991), alors que de fortes fréquences (intervalles maximum de 30 minutes) induisent préférentiellement l'expression de *Lhb* (Burger et al., 2008). Quant à l'expression de *Cga*, elle est moins sujette au contrôle par la fréquence de la pulsativité de la GnRH (Ferris and Shupnik, 2006). Le contrôle de la synthèse de la LH et de la FSH est donc étroitement corrélé à l'expression de leur sous-unité  $\beta$  respective.

La GnRH stimule de très nombreuses cascades de signalisation, activant sélectivement l'expression des sous-unités des gonadotropines. La liaison GnRH/R-GnRH stimule principalement la protéine  $G\alpha_{q/11}$  qui conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC). Plusieurs sous-types de PKC sont exprimées dans les cellules gonadotropes (Naor, 1990; Vasilyev et al., 2002). Parmi les différents médiateurs activés par les PKC, les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) jouent un rôle majeur dans l'induction de la synthèse des sous-unités des gonadotropines (**Figure 4**) (Bliss et al., 2010). Au sein de la famille des MAPK, la GnRH stimule en particulier les protéines ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2), JNK1/2 (c-Jun-N-terminal Kinase 1/2) ou p38 MAPK. L'activation de l'une ou de l'autre de ces MAPK dépend de la fréquence de la pulsativité de la GnRH. Les MAPK activées peuvent alors phosphoryler une grande variété de substrats, y compris des facteurs de transcription, permettant ainsi un lien direct entre la signalisation cytoplasmique et la transcription des gènes (Su and Karin, 1996). Dans des cultures primaires hypophysaires ou des lignées cellulaires gonadotropes, l'expression de *LHb* dépend de ERK1/2 et de JNK (Burger et al., 2009; Harris et al., 2002; Yokoi et al., 2000), alors que l'expression de *FSHb* induite par la GnRH dépend de ERK1/2 et de p38 (Bonfil et al., 2004; Gregory et al., 2005; Kanasaki et al., 2005). Par ailleurs, la GnRH active l'expression de *Cga* à travers l'activation de ERK1/2 (Haj et al., 2017; Roberson et al., 1995). Néanmoins, des études réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques spécifiquement invalidées dans



l'hypophyse pour ERK1/2 montrent une faible expression de *LHβ* et de *Cga*, avec une altération partielle de l'expression de *FSHβ* (Bliss et al., 2009). Ces données suggèrent qu'*in vivo*, ERK1/2 pourrait être plus important pour l'expression de *LHβ* que pour celle de *FSHβ*, ou bien qu'il existe d'autres voies de signalisation activées par la GnRH compensant la perte de la fonction ERK1/2 chez ces animaux. L'activation de ERK1/2 par la GnRH agit ensuite sur l'expression de *LHβ* par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que « Early growth response-1 protein » ou Egr1. Egr1 est un facteur clé dans la régulation de l'expression de *LHβ* après stimulation par la GnRH (Lawson et al., 2007). Dans les cellules gonadotropes LβT2, une pulsativité à haute fréquence en GnRH stimule fortement l'expression de *Egr1* et de *LHβ* (Kanasaki et al., 2005). A l'inverse, les corépresseurs Nab1/2 (Ngfi-A binding proteins, co-répresseurs des protéines Egr) sont préférentiellement stimulés par de faible fréquence de pulses de GnRH (Lawson et al., 2007). La régulation différentielle de Egr1 et de Nab1/2 par des fréquences variables de pulsativité de la GnRH suggère que la régulation de la synthèse et de la disponibilité de Egr1 pourrait jouer un rôle important dans la régulation différentielle de *LHβ* (Tsutsumi and Webster, 2009). Ces résultats sont corroborés par le phénotype de souris transgéniques déficientes pour Egr1 qui montrent une expression réduite du gène *LHβ* ainsi qu'une infertilité (Lee et al., 1996b).

La GnRH active également la protéine  $G\alpha_s$  qui permet la production/activation d'adénosine monophosphate cyclique ( $AMP_c$ )/protéine kinase A (PKA) pouvant activer les protéines CREB ( $cAMP$  response element binding protein), facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, en particulier ceux des gonadotropines (Avet et al., 2013; Borgeat et al., 1975; Horton and Halvorson, 2004; Thompson et al., 2013, 2013). La partie proximale du promoteur de *FSHβ* contient des éléments de réponse à l' $AMP_c$  (CRE) et des sites liant l'hétérodimère Jun/Fos ou AP-1 (Cicccone et al., 2008). Plusieurs études ont montré que l'activation des MAPK induite par la GnRH entraîne l'activation des membres de la famille AP-1 (Coss et al., 2004; Xie et al., 2005). Néanmoins, le rôle des facteurs de transcription AP-1 dans la stimulation de l'expression de *FSHβ* par la GnRH reste controversé (Cicccone et al., 2010; Huang et al., 2001; Strahl et al., 1997; Thompson and Kaiser, 2014).

D'autres protéines kinases sont aussi activées après stimulation par la GnRH, comme la protéine kinase dépendante du calcium ( $Ca^{2+}$ ) et de la calmoduline II (CaMKII) (Melamed et al., 2012). La forte mobilisation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire induite par la GnRH permet



l'activation, après liaison avec la calmoduline, de la CaMKII. De façon intéressante, l'inhibition de l'activité de la CaMKII sur des cultures primaires hypophysaires de rat conduit à l'inhibition de la stimulation de la synthèse de *Cga*, *LHβ* et *FSHβ*, démontrant ainsi l'importance de cette kinase dans la régulation de l'expression des gonadotropines (Haisenleder et al., 2003a, 2003b). D'autres études montrent que la GnRH régule positivement l'activation de la CaMKII indépendamment de son mode de pulsativité (Burger et al., 2008). Toutefois, la cinétique d'inactivation rapide de la CaMKII implique que l'activité prolongée de la CaMKII se produirait préférentiellement au cours d'une pulsativité rapide de GnRH, favorisant ainsi l'expression de *LHβ* au dépend de celle de *FSHβ* (Thompson and Kaiser, 2014).

- **Stimulation différentielle de la sécrétion de LH et FSH**

Les cellules gonadotropes sont capables de décoder les variations de pulsativité de la GnRH pour favoriser ou non la sécrétion de l'une ou l'autre des deux gonadotropines. L'activation du R-GnRH par son ligand stimule principalement la protéine  $G\alpha_{q/11}$  qui active la PKC et la libération de  $Ca^{2+}$  intracellulaire stocké dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'intermédiaire du phosphatidylinositol-triposphate ( $IP_3$ ) (**Figure 4**) (Kiesel et al., 1986; Schrey, 1985; Spät et al., 1986). La production d' $IP_3$  et l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire sont biphasiques et oscillatoires : une phase rapide et massive de libération du  $Ca^{2+}$  du RE est suivie d'une phase prolongée caractérisée par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et voltage-indépendants localisés à la surface des cellules gonadotropes (Tasaka et al., 1988; Tse and Hille, 1992). La libération de LH et une grande partie de la sécrétion de FSH sont dépendantes du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Watanabe et al., 1993). L'administration d'un sérum anti-GnRH chez des brebis ovariectomisées bloque la sécrétion pulsatile de la LH, alors que celle de la FSH reste détectable (Caraty et al., 1984). La sécrétion de la LH est régulée, alors que celle de la FSH est majoritairement constitutive (Cohen-Tannoudji et al., 2012; Farnworth, 1995). Dans les cellules gonadotropes, la LH mature est stockée dans des vésicules associées à la sécrétogranine II, caractéristique des vésicules d'exocytose stimulées par la signalisation calcique (Watanabe et al., 1993). En revanche, la FSH est principalement stockée dans de grandes vésicules exprimant la chromogranine A, impliquée dans la sécrétion constitutive (Halban and Irminger, 1994; Nicol et al., 2004). Le niveau de FSH circulant reflète principalement la quantité de FSH synthétisée à un moment donné, alors que le niveau de LH reflète la fréquence du stimulus régulant sa libération (Bernard et al., 2010). La



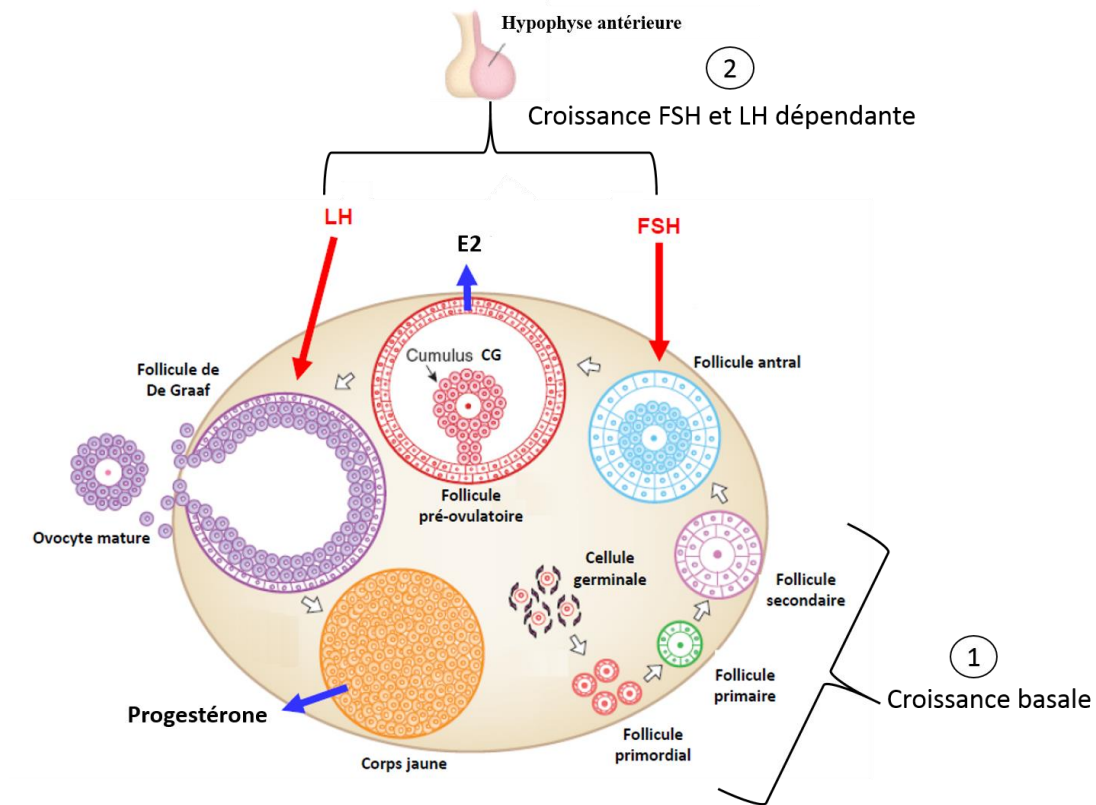


différence du lieu de stockage des gonadotropines et les régulations paracrine/autocrine/endocrines telles que celles exercées par l'activine, l'inhibine, la follistatine, le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) ou les stéroïdes sexuels contribuent aussi à la régulation différentielle des gonadotropines (Bilezikjian et al., 2006).

## **B- Les gonadotropines**

### **1- Lieu de synthèse et de sécrétion**

Les cellules gonadotropes qui produisent LH et FSH constituent environ 10 à 15% de la population cellulaire totale de l'antéhypophyse. Des techniques d'immunohistochimie ont permis de distinguer des cellules gonadotropes mono ou bi-hormonales, cependant on admet que toutes les cellules gonadotropes ont la potentialité de produire les deux hormones (McNeilly et al., 2003). Les gonadotropines appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques, caractérisées par l'association non covalente d'une sous-unité  $\alpha$  commune à toutes les hormones glycoprotéiques (TSH, chorionic gonadotropine (CG), LH, FSH) et d'une sous-unité  $\beta$  spécifique. La sous-unité  $\alpha$  est codée par un seul gène, alors que les sous-unités  $\beta$  sont codées par des gènes différents (Cahoreau et al., 2015). A l'image des autres hormones peptidiques destinées à la sécrétion, chaque sous-unité des gonadotropines possède un peptide signal (18 à 24 acides aminés) lui permettant de pénétrer dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Pierce and Parsons, 1981; Walton et al., 2001). Dans le RER, la formation de liaisons disulfures entre les résidus cystéines induit le repliement des sous-unités des gonadotropines, créant ainsi leur structure caractéristique en "nœud de cystéines" (Chung et al., 1975; Tsunasawa et al., 1977). Cet arrangement est critique pour l'assemblage des hormones en dimères : l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\beta$  entoure la sous-unité  $\alpha$  *via* un pont disulfure intra-chaine et confère une résistance structurelle à ces dimères (Fox et al., 2001). Par ailleurs, la glycosylation des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  est indispensable à l'acquisition de leur structure tridimensionnelle. Les gonadotropines portent des chaînes N-saccharidiques sur leurs sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La glycosylation se produit dans le RER au cours de la traduction et le repliement de ces protéines (Fetherston and Boime, 1982; Kourides et al., 1980). Au niveau de l'appareil de Golgi, les gonadotropines glycosylées subissent des maturations qui varient selon la gonadotropine (Baenziger and Green, 1988). Cette maturation conduit à des structures ramifiées complexes caractérisées par le N-acetyl glucosamine/sulfate pour la LH et le galactose/acide sialique pour la FSH (Parsons and Pierce, 1980). La



**Figure 5 : Les gonadotropines hypophysaires régulent en partie la croissance folliculaire**

La croissance folliculaire (ou folliculogénèse) est un processus ovarien complexe qui se caractérise par deux phases. Une croissance basale qui regroupe les follicules primordiaux jusqu'au stade follicule secondaire. A partir de ce stade, les follicules deviennent sensibles aux gonadotropines (FSH puis LH). Les cellules de la granulosa (CG) produisent progressivement de l'E2, qui au-delà d'un certain seuil induit la sécrétion de LH permettant l'ovulation. Le corps jaune résiduel produit alors de la progestérone.

Adapté de Matzuk and Lamb, 2002.

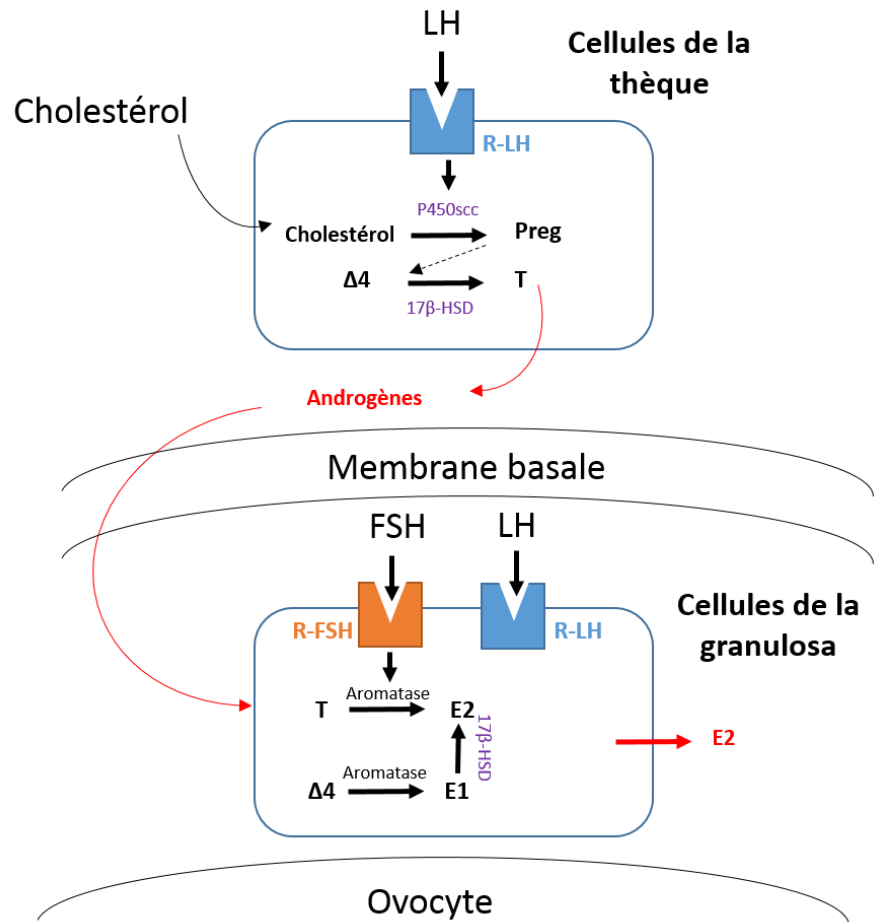
LH : Luteinizing Hormone ; FSH : Follicle Stimulating Hormone ; CG : Cellules de la granulosa ; E2: œstradiol.

différence entre les chaînes saccharidiques matures de LH et FSH joue un rôle déterminant dans leur demi-vie, qui est de 60 minutes pour la FSH, comparée à 30 minutes pour la LH (Baenziger et al., 1992; Wide et al., 2009). La reconnaissance spécifique des chaînes saccharidiques sulfatées de la LH par un récepteur situé à la surface des cellules endothéliales hépatiques semble être responsable de la disparition rapide de la LH plasmatique (Fiete et al., 1991; Mi et al., 2008). Une perturbation des mécanismes de glycosylation, peut alors contribuer à des physiopathologies de l'infertilité (Castro-Fernández et al., 2000; Goverman et al., 1982; Padmanabhan et al., 1988).

Une infertilité est aussi retrouvée chez des patientes présentant des mutations inactivatrices du gène de *LHβ* (Du et al., 2012; Lofrano-Porto et al., 2007; Valdes-Socin et al., 2017). Des mutations inactivatrices de *FSHβ* ont été aussi décrites et conduisent à un phénotype légèrement moins sévère, avec une aménorrhée primaire, une puberté partielle ou une infertilité (Layman et al., 2002; Matthews and Chatterjee, 1997; Salvi and Pralong, 2010). Ces femmes possèdent de faibles concentrations d'œstrogènes (E2) et de progestérone circulants (Nagirnaja et al., 2010).

## 2- Rôle des gonadotropines

Les gonadotropines jouent un rôle essentiel dans la régulation des fonctions de reproduction, puisqu'elles régulent la folliculogénèse et la stéroïdogénèse gonadiques. Au cours de la vie néonatale, les cellules germinales prolifèrent et se bloquent en prophase I de la première division méiotique. A ce stade, l'ovocyte s'entoure d'une couche cellulaire appelée cellules de la granulosa pour former un « follicule primordial » (**Figure 5**). Ces follicules primordiaux poursuivent alors leur folliculogénèse ou rentrent en apoptose. Au cours de la folliculogénèse, les cellules de granulosa prolifèrent et l'ovocyte augmente de volume pour former des « follicules primaires ». Les cellules de la granulosa continuent ensuite leur prolifération pour constituer deux couches autour de l'ovocyte et former un follicule secondaire ; la couche externe portera le nom de cellules de la thèque et sera le support de la vascularisation du follicule. Au stade « follicule secondaire », les follicules deviennent sensibles aux gonadotropines (**Figure 5**). Les cellules de la granulosa commencent alors à exprimer les récepteurs de la FSH (R-FSH), nécessaires à la maturation et à la préparation de l'expulsion de l'ovocyte (Borum, 1961) ainsi qu'au recrutement des follicules (les plus gros étant les plus sensibles). La FSH permet l'acquisition de l'activité aromatasase et l'expression des récepteurs de la LH (R-LH). La LH quant à elle, exerce initialement ses effets sur les



**Figure 6 : Les gonadotropines stimulent la *stéroïdogénèse* ovarienne**

Au début de la phase folliculaire, la LH exerce ses effets uniquement sur les cellules de la thèque exprimant le récepteur de la LH (R-LH). La LH stimule la protéine P450scc, permettant la production de la prégnéolone (Prég, précurseur de la progestérone) et d'androgènes. Dans les cellules de granulosa adjacentes, la FSH permet la synthèse de l'aromatase qui convertit les androgènes en œstradiol (E2) et en œstrone (E1).

Adapté de Erickson and Shimasaki, 2001.

Preg : Prégnéolone ; 17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde-déshydrogénase ; T : testostérone ; Δ4 : Δ4-androsténedione ; E1 : œstrone ; E2 : œstradiol.

cellules de la thèque qui expriment le R-LH (**Figure 6**) et stimule les enzymes de la stéroïdogénèse permettant la conversion du cholestérol en prégnénolone (précurseur de la progestérone) puis en androgènes (**Figure 5**). Les cellules de la granulosa qui expriment l'aromatase convertissent alors les androgènes en E2. L'augmentation des concentrations d'E2 en fin de phase folliculaire permet un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire déclenchant ainsi un pic préovulatoire de LH. Le R-LH s'exprime sur les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires en milieu de phase folliculaire. Au moment du pic de sécrétion de la LH, l'ovocyte expulsé (ovulation) reprend la méiose jusqu'au stade de métaphase II et les cellules de la thèque se transforment en corps lutéal produisant la progestérone nécessaire à la future nidation (Erickson and Shimasaki, 2001; Raju et al., 2013).

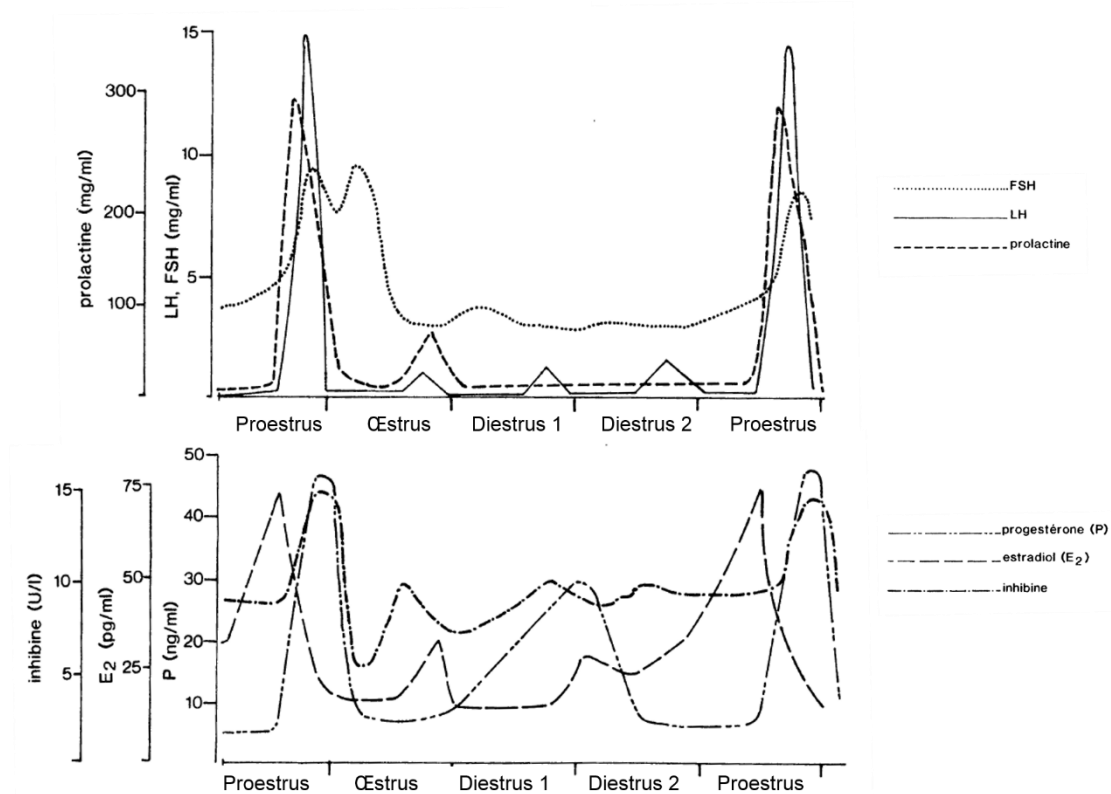
Des mutations perte de fonction des récepteurs des gonadotropines ont été rapportées et sont aussi associées à des HH (Ilgaz et al., 2015; Mitri et al., 2014; Nagirnaja et al., 2010; Raju et al., 2013; Valdes-Socin et al., 2017).

## **C- Physiologie du cycle œstrien : régulation par les stéroïdes sexuels**

### **1- Le cycle œstrien**

Chez les mammifères, le cycle d'activité de l'ovaire est mis en évidence par l'apparition périodique d'un comportement d'œstrus (cycle œstrien) ou d'un saignement utérin (ou menstruation et cycle menstruel chez les primates (Thibault and Levasseur, 2001)). Ce cycle résulte d'interactions complexes entre le système circadien, des neuropeptides hypothalamiques, les gonadotropines et les stéroïdes sexuels. Cette cyclicité est également dépendante du nombre initial de follicules ovariens, de leur rythme d'entrée en croissance ou en atresie. Cette réserve décroît tout au long de la vie par des processus d'apoptose ; près de 99,9% des follicules sont destinés à disparaître (Broekmans et al., 2009).

Le cycle œstrien chez la ratte ou le cycle menstruel chez la femme dure environ 4 à 5 jours ou 28 jours respectivement, et peut être divisé en deux phases : la phase folliculaire, qui correspond à l'intervalle entre la régression du corps jaune (lutéolyse) et l'ovulation, et la phase lutéale qui couvre la période séparant l'ovulation de la lutéolyse. Conventionnellement, chez les rongeurs, le jour 0 du cycle œstrien est le jour de l'ovulation qui sépare les deux phases. Chacune de ces phases (œstrus, diestrus 1, diestrus 2, proestus) est caractérisée par



**Figure 7 : Profils de sécrétion de certaines hormones au cours du cycle œstrien chez les rongeurs**

Chez les rongeurs, le cycle œstrien dure environ 4 jours et se compose de 4 stades : diestrus 1, diestrus 2, œstrus et proestrus. Les niveaux relatifs des hormones gonadotropes (LH, FSH), des stéroïdes (E2, P) et des peptides (inhibine) gonadiques sont représentés par les différentes lignes pointillées légendées dans la figure.

Thibault and Levasseur, 2001.

LH : Luteinizing Hormone ; FSH : Follicle Stimulating Hormone ; P : Progestérone ; E2 : œstradiol.

des variations des concentrations hormonales hypophysaires et ovariennes spécifiques (**Figure 7**). Au cours de la phase folliculaire, la FSH stimule la maturation des follicules qui vont produire une quantité croissante d'E2. Au milieu du proestrus (fin de phase folliculaire), les niveaux d'E2 vont atteindre un seuil critique qui entraîne un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, à l'origine du pic préovulatoire de LH menant à l'ovulation. En absence de fécondation, le cycle progresse vers la phase lutéale ou lutéolyse. Durant cette phase, le corps jaune commence à dégénérer et à produire de l'E2 et de la progestérone qui exercent à ce stade un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH et de FSH.

Chez les mammifères saisonniers, il existe une période annuelle de reproduction, variable selon les espèces (liée à la longueur de la gestation) contrôlée par la photopériode (variation de durée du jour) ; par exemple, la brebis se reproduit durant les jours courts, de septembre à février alors que le hamster se reproduit du mois d'avril au mois de septembre (jours longs). En dehors de ces périodes, ces animaux saisonniers sont en phase de repos sexuel (ou anœstrus saisonnier) avec une disparition des cycles ovariens chez la femelle et du volume testiculaire chez le mâle, associés à une absence de comportement sexuel (Marie Saint-Dizier, 2014).

## 2- **Rôle des stéroïdes**

L'activité de l'axe gonadotrope est finement régulée par les hormones stéroïdiennes sécrétées par l'ovaire qui vont exercer des rétrocontrôles négatifs ou positifs en fonction du type d'hormone et de sa concentration (Herbison, 1998, 2016; Zalányi, 2001).

### **a. La progestérone**

La progestérone joue deux rôles essentiels dans la régulation du cycle œstrien. D'une part, la progestérone est nécessaire pour l'induction du pic préovulatoire de LH (Krey et al., 1973). D'autre part, la progestérone exerce un rétrocontrôle négatif sur la libération de la GnRH et de LH pendant le reste du cycle (Goodman and Karsch, 1980; Leipheimer et al., 1984; McCartney et al., 2002).

La progestérone exerce ses effets *via* son interaction avec deux isoformes de récepteurs spécifiques (PR), PR-A et PR-B. Les PR, issus d'un même gène, font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agissent comme des facteurs de transcription. Ces récepteurs régulent la transcription des gènes en se liant à des séquences régulatrices présentes





dans les régions promotrices des gènes (McKenna and O'Malley, 2001). Les rôles respectifs des isoformes du PR ne sont pas encore complètement élucidés, malgré des données récentes sur la contribution relative des deux isoformes, notamment dans la pathologie du cancer du sein (Bellance et al., 2013; Khan et al., 2012). L'invalidation sélective de l'expression de PR-A (PR-A<sup>-/-</sup>) chez la souris entraîne des anomalies ovariennes et utérines qui conduisent à l'infertilité (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004). En revanche, l'invalidation de PR-B n'affecte pas les réponses ovariennes et utérines à la progestérone (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004). Ainsi, PR-A semble être essentiel pour la fertilité. Néanmoins, les souris femelles dépourvues de PR-A et de PR-B sont infertiles et présentent un phénotype plus sévère que pour PR-A<sup>-/-</sup> avec un blocage de l'ovulation, des altérations du comportement sexuel, de la fonction utérine et de la morphogénèse de la glande mammaire (Gal et al., 2016; Lydon et al., 1995; Mulac-Jericevic and Conneely, 2004). L'expression du PR dans l'hypothalamus s'est avérée nécessaire à l'induction œstrogénique de pic préovulatoire de LH (Chappell and Levine, 2000). PR est néanmoins absent des neurones à GnRH (Dufourny and Skinner, 2002). Les neurones à kisspeptine (Kiss1) de l'hypothalamus (décrit dans la partie I-D-1a) ont récemment été découverts et contrôlent principalement la sécrétion de la GnRH. L'invalidation spécifique des PR dans les neurones à Kiss1 conduit à une infertilité caractérisée par une absence d'ovulation et une altération de la cyclicité (Gal et al., 2016). La progestérone, sous le contrôle de l'E2, régulerait la sécrétion de Kiss1 et indirectement celle de la GnRH (Gal et al., 2016). La progestérone régule également l'expression d'un opioïde endogène, la dynorphine A (Dyn A) (décrit dans la partie I-D-1a), pour exercer son rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la GnRH (Goodman et al., 2004).

### **b. Les œstrogènes (E2)**

L'E2 exerce un rétrocontrôle positif au niveau de l'hypothalamus en fin de phase folliculaire pour induire le pic préovulatoire de GnRH/LH, alors que pendant le reste du cycle, il a l'effet inverse (Christian and Moenter, 2010; Levine and Ramirez, 1980).

Deux récepteurs spécifiques, nommés ER $\alpha$  et ER $\beta$ , relayent principalement les effets physiologiques de l'E2. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et présentent une distribution tissulaire variable (Radovick et al., 2012). Le rôle de ces récepteurs dans la reproduction a été mis en évidence sur une lignée de souris transgéniques invalidées pour ER $\alpha$  (ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>). Les souris ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> sont infertiles ; l'absence de rétrocontrôle de l'E2 conduit à une hypoplasie de l'utérus, une atrésie folliculaire importante

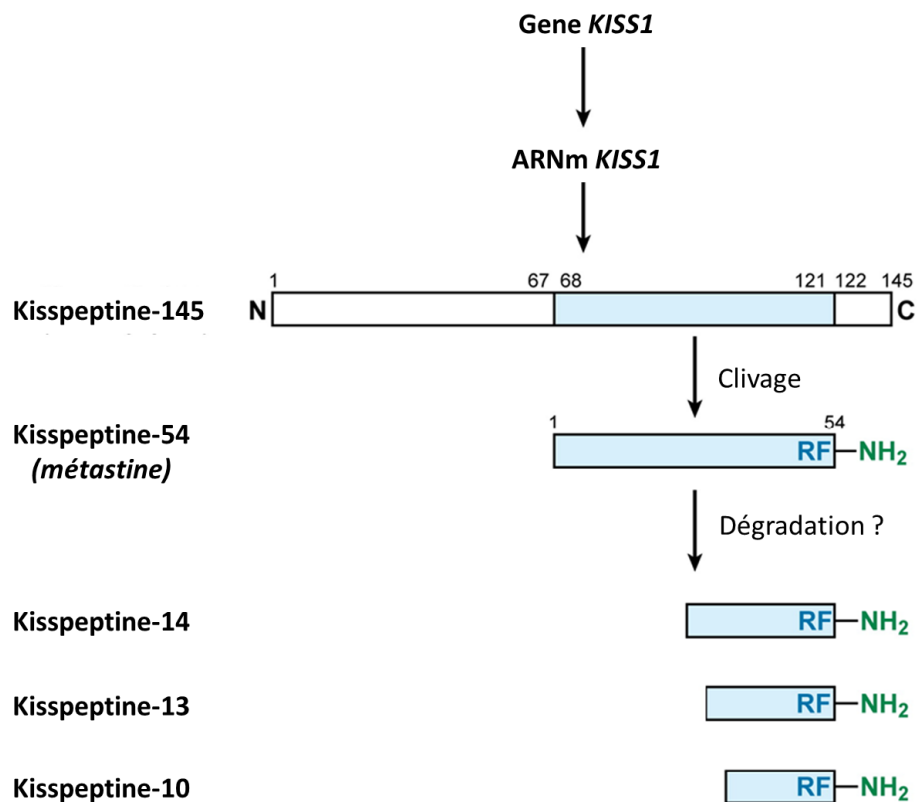


et une absence du pic préovulatoire de LH (Couse et al., 2003; Dorling et al., 2003; Dubois et al., 2015; Krege et al., 1998; Lubahn et al., 1993; Wersinger et al., 1999; Wintermantel et al., 2006a). De même, l'inactivation spécifique de ER $\alpha$  dans l'hypophyse conduit à des souris infertiles ou subfertiles, avec une absence de cycle œstrien, une augmentation des concentrations basales de LH (4 fois supérieures aux souris contrôles) (Scully et al., 1997) et une absence de pic de LH (Singh et al., 2009), suggérant le rôle majeur des rétrocontrôles (négatif et positif) de l'E2 sur l'hypophyse. En ce qui concerne les souris invalidées pour ER $\beta$  (ER $\beta^{-/-}$ ), elles ont un phénotype plus discret que celui des souris ER $\alpha^{-/-}$ , avec une chute de leur fertilité liée à des dysfonctionnements ovariens (Couse et al., 2003; Krege et al., 1998; Maneix et al., 2015). L'inactivation spécifique de ER $\beta$  dans les précurseurs des cellules gliales et neuronales a permis de montrer que ER $\beta$  serait important dans le déclenchement de la puberté (Naulé and Mhaouty-Kodja, 2016) et dans le comportement sexuel chez la souris mâle (Naulé et al., 2016).

En conclusion, les rétrocontrôles positif et négatif de la progestérone et de l'E2 sur la sécrétion de la GnRH et de LH s'exercent essentiellement *via* PR-A/-B et ER $\alpha$ , absents des neurones à GnRH (Dufourny and Skinner, 2002) mais exprimés dans les neurones hypothalamiques à Kiss1 et dans les cellules gonadotropes hypophysaires. La présence de ER $\beta$  dans les neurones à GnRH pourrait aussi participer de façon indirecte à ces processus (Wolfe and Wu, 2012).

#### **D- Les neurorégulateurs clés de la sécrétion de la GnRH**

L'absence de ER $\alpha$  et des PR dans les neurones à GnRH suggère que la progestérone et l'E2 agissent sur ces neurones de façon indirecte. Parmi elles, deux populations neuronales hypothalamiques exprimant Kiss1 (une dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) et l'autre dans le noyau arqué (ARC)) sont essentielles aux rétrocontrôles stéroïdiens (Lehman et al., 2010b). D'autres populations neuronales sensibles à l'E2 et à la progestérone sont aussi impliquées dans la régulation de la sécrétion de GnRH. Ces afférences, de nature excitatrice ou inhibitrice, régulent la sécrétion de la GnRH en sécrétant le RFamide-Related Peptide-3 (RFRP-3) (Ubuka et al., 2012a), la dynorphine A (Simerly, 1991), le Neuropeptide Y (NPY) (Hahn et al., 1998), le glutamate (Eyigor et al., 2004) ou l'Acide  $\gamma$  aminobutyrique (GABA) (Herbison, 1997).



**Figure 8 : Produits du gène *KISS1***

La kisspeptine-145, une pré-proprotéine de 145 acides aminés, est le produit de transcription et de traduction du gène *KISS1*. Elle subit un clivage qui conduit à la production d'un peptide amidé (RF-NH<sub>2</sub>), la kisspeptine-54 ou méstastine. L'absence de sites de clivage sur la kisspeptine-54 suggère que les peptides les plus courts (Kisspeptine-14, Kisspeptine-13, Kisspeptine-10) sont des produits de dégradation. Adapté de Popa et al., 2008.

## 1- Les peptides RF-amidés : Kisspeptine et RFamide-Related Peptide-3

Les peptides RF-amidés sont caractérisés par la présence d'une séquence "Arginine-Phénylalanine-NH<sub>2</sub>" à l'extrémité C-terminale. Cette séquence est essentielle à leur activité. Ces peptides constituent une famille de 5 groupes de neuropeptides codés par 5 gènes différents (Ayachi and Simonin, 2014). Nous intéresserons dans la suite du manuscrit au rôle de deux neuropeptides (Kiss1 et RFRP-3) essentiels dans la reproduction.

### a. La kisspeptine (Kiss1)

- **Structure et localisation**

En 1996, le gène codant la kisspeptine (*KISS1*, 1q32.1 chez l'homme) a été découvert par Lee et ses collaborateurs (Lee et al., 1996a). Initialement connu pour ses propriétés anti-métastatiques, la Kiss1 était nommée métastine jusqu'au 2003. Puis, la découverte de mutations dans le récepteur de Kiss1 (GPR54) a permis de révéler son rôle essentiel dans la fonction de reproduction (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003).

Le gène *Kiss1* contient 4 exons, dont les 2 premiers sont des exons non traduits (Nabi et al., 2015; West et al., 1998). Ce gène produit une pré-proprotéine de 145 acides aminés qui est clivée en un fragment actif de 54 acides aminés nommé kisspeptin-54 ou métastine. Le kisspeptin-54 subit alors plusieurs clivages successifs pour donner des peptides biologiquement actifs de tailles différentes, kisspeptin-14, kisspeptin-13 et kisspeptin-10 (**Figure 8**) (Kotani et al., 2001).

Chez les rongeurs, ainsi que chez les autres mammifères, les corps cellulaires des neurones à Kiss1 sont principalement localisés dans deux régions de l'hypothalamus : l'ARC et la région périventriculaire rostrale du troisième ventricule (RP3V) contenant l'AVPV et le POA (Gottsch et al., 2004; Mason et al., 2007; Smith et al., 2005a, 2005b). La distribution des neurones à Kiss1 présente un dimorphisme sexuel. En effet, le RP3V contient deux fois plus de neurones à Kiss1 chez la femelle que chez le mâle. C'est au cours du développement post-natal que ce dimorphisme sexuel (défématisation neuronale chez le mâle) se met en place (González-Martínez et al., 2008; Kauffman et al., 2007a; Poling and Kauffman, 2013). Pendant la période périnatale ou «période critique», l'E2 maternel ainsi que la testostérone (convertie en E2 par l'aromatase) masculinisent les neurones à Kiss1 chez le mâle (Szymanski and Bakker, 2012), alors que les femelles sont protégées par la présence de fortes concentrations d' $\alpha$ -fétoprotéine qui lie les œstrogènes (González-Martínez et al., 2008; Poling



and Kauffman, 2013). En revanche, pendant la période pré-pubertaire, l'E2 possède un effet « féminisant » sur les neurones à Kiss1 et induit une augmentation de leur population dans l'AVPV. Ceci reflète l'importance de ces neurones dans la régulation de l'axe gonadotrope au cours du cycle œstrien (Yeo et al., 2016). L'ARC, quant à lui, contient autant de neurones à Kiss1 chez le mâle que chez la femelle, avec une distribution plus concentrée dans sa partie caudale (Yeo et al., 2016). Les axones provenant de la RP3V se projettent dans le POA et l'ARC, alors que les axones en provenance de l'ARC se projettent dans de nombreuses régions, y compris l'AVPV et le POA, suggérant ainsi une interaction potentielle entre ces deux structures. Les neurones à Kiss1 ont aussi des contacts avec les corps cellulaires ou les terminaisons axonales des neurones à GnRH, ce qui leur permettent de réguler directement la sécrétion de la GnRH (Uenoyama et al., 2011).

Chez l'homme, les neurones à Kiss1 présentent également un dimorphisme sexuel et sont majoritairement localisés dans le noyau infundibulaire (équivalent de l'ARC des rongeurs) et une seconde population est retrouvée dans le POA rostrale, avec des projections sur l'hypothalamus médian et sur la tige pituitaire (Hrabovszky, 2014; Skorupskaite et al., 2014a).

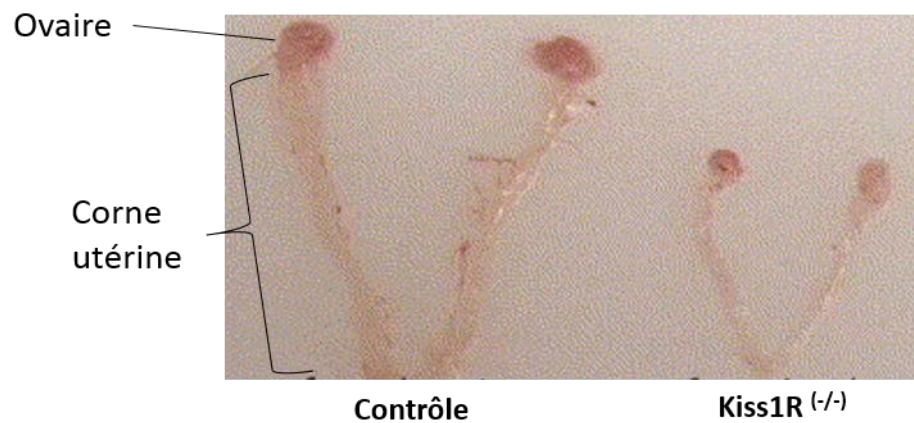
- **Site de fixation de Kiss1 et mode d'action**

Kiss1 se lie à un récepteur couplé à une protéine G (GPR54) de 398 acide aminés, composé de 7 hélices transmembranaires, connu sous le nom de Kiss1R (Kotani et al., 2001; Mikkelsen and Simonneaux, 2009). Ce récepteur est principalement exprimé dans le POA, le bulbe olfactif, l'AVPV et l'ARC (Higo et al., 2016). Dans la majorité des espèces, les neurones à GnRH, situés dans le POA, expriment les ARNm codant *Kiss1r* (Han et al., 2005; Irwig et al., 2004). Le Kiss1R est couplé à la protéine  $G\alpha_q$  qui active la PLC et conduit à la production d' $IP_3$  et la mobilisation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, responsable de la dépolarisation des neurones et de la sécrétion de GnRH. La fixation de Kiss1 sur son récepteur entraîne également l'activation des MAPK (ERK1/2 et p38) (Castellano et al., 2006; Han et al., 2005) qui régulent la transcription de gènes spécifiques.

- **Rôle de Kiss1-Kiss1R dans la reproduction**

Le couple Kiss1-Kiss1R joue un rôle clé dans la fertilité et le déclenchement de la puberté (Pinilla et al., 2012a). Chez l'homme, la découverte de mutations perte de fonction du gène *KISS1R* (3 mutations faux-sens L102P-L148S-\*399R, une mutation non-sens R331\* et





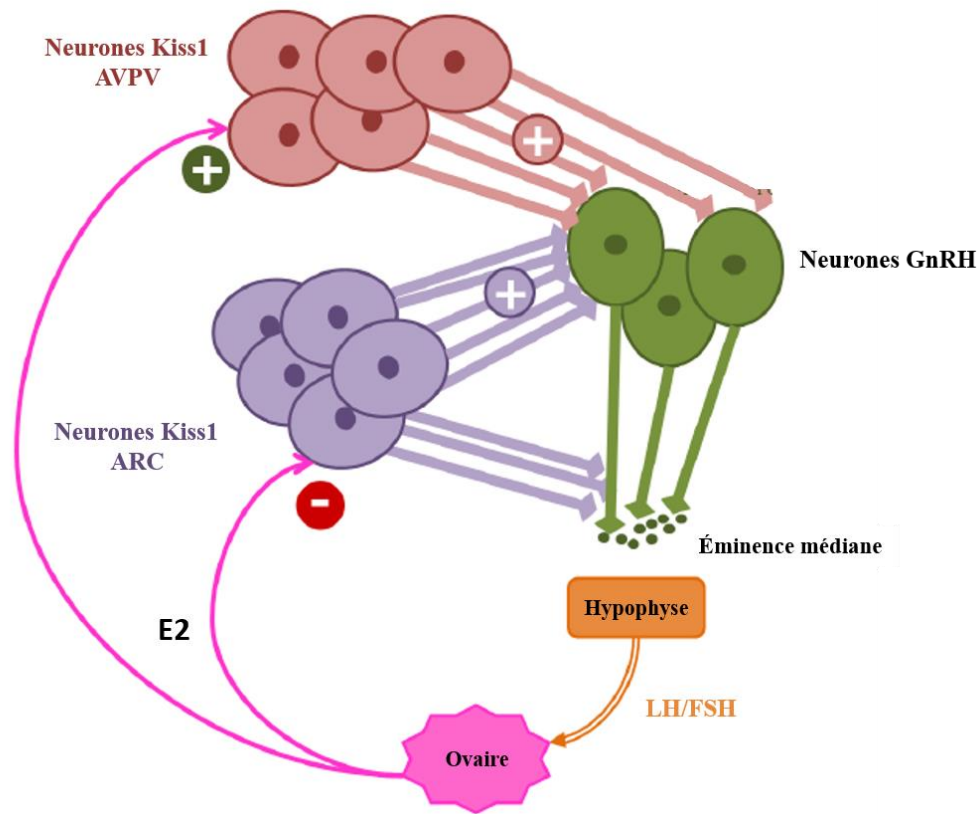
**Figure 9 : Analyse macroscopique des ovaires et cornes utérines de souris contrôles ou invalidées pour Kiss1R <sup>(-/-)</sup>**

Les cornes utérines et les ovaires de souris homozygotes invalidées pour Kiss1R sont réduits, en comparaison avec ceux des souris contrôles.

Funes et al., 2003.

une délétion supprimant un site d'épissage) chez des patients atteints d'HH, a permis de révéler le rôle majeur d'une autre hormone que la GnRH dans la reproduction (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). De même, chez la souris, l'absence d'expression du gène *Kiss1* (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007) ou de son récepteur (Funes et al., 2003; Kauffman et al., 2007b) sont décrits pour entraîner des troubles du développement utérin et ovarien (**Figure 9**) ainsi que des anomalies de la folliculogénèse. Après traitement par la Kiss1, environ 80% des neurones à GnRH expriment *c-fos* traduisant l'activité neuronale (Herbison et al., 2010; Messenger et al., 2005). La Kiss1 est un puissant sécrétagogue de la GnRH (Irwig et al., 2004; Navarro et al., 2009). En effet, l'administration intracérébrale ou intraveineuse de Kiss1 entraîne une augmentation du taux circulant des gonadotropines chez les rongeurs (Gottsch et al., 2004; Navarro et al., 2005a, 2005b) ou chez la femme respectivement (Dhillon et al., 2007). De même, l'administration de kisspeptine-10 (1,5 µg/kg/h) pendant 24 heures à des patientes atteintes d'HH associées à une hyperprolactinémie, a permis de montrer l'effet bénéfique de Kiss1 sur la sécrétion de LH et de FSH chez la femme (Millar et al., 2017). Chez la ratte, l'injection d'anticorps dirigés contre la Kiss1 conduit à une disparition du pic préovulatoire de LH et un arrêt du cycle œstrien (Adachi et al., 2007; Kinoshita et al., 2005). De même, l'administration d'un antagoniste de Kiss1R bloque le pic préovulatoire de LH chez la ratte (Pineda et al., 2010a; Smith et al., 2011). L'ensemble de ces données est donc la preuve du rôle essentiel de Kiss1 dans la régulation pulsatile de GnRH et de LH.

L'expression de Kiss1 et de son récepteur est régulée par la photopériode (durée de l'alternance jour-nuit) perçue par le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (SCN) (Lightman, 2008). Le SCN est situé dans l'hypothalamus antérieur juste à l'arrière du chiasma optique. Il reçoit la lumière de la région optique à travers le tractus rétino-hypothalamique. Cette entrée de lumière synchronise le SCN afin de générer un cycle circadien d'environ 24 heures, processus biologique qui régule l'homéostasie physiologique chez les mammifères (Laraya et al., 2015). En fonction de l'exposition à la lumière et à l'obscurité, le SCN contrôle de façon différentielle la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale (Chan and Debono, 2010; Stavreva et al., 2009). Ainsi, la mélatonine régule l'expression de Kiss1 en fonction de la photopériode et se révèle être un élément essentiel pour la reproduction des mammifères saisonniers (Ando et al., 2018; Revel et al., 2007).



**Figure 10 : Rétrocontrôles de l'E2 sur les neurones à Kiss1 au sein de l'hypothalamus de rongeurs femelles**

Les populations neuronales de Kiss1 localisées dans l'ARC et l'AVPV jouent des rôles différents dans l'intégration des rétrocontrôles induits par l'E2. Les neurones de l'ARC constituent le site d'action des effets négatifs de l'E2. En fin de la phase folliculaire, le rétrocontrôle d'E2 devient positif et cible les neurones à Kiss1 de l'AVPV pour générer le pic préovulatoire de GnRH/LH.

AVPV : Noyau antéro-ventral-périvericulaire ; ARC : Noyau arqué ; LH : Luteinizing Hormone ; FSH : Follicle Stimulating Hormone.

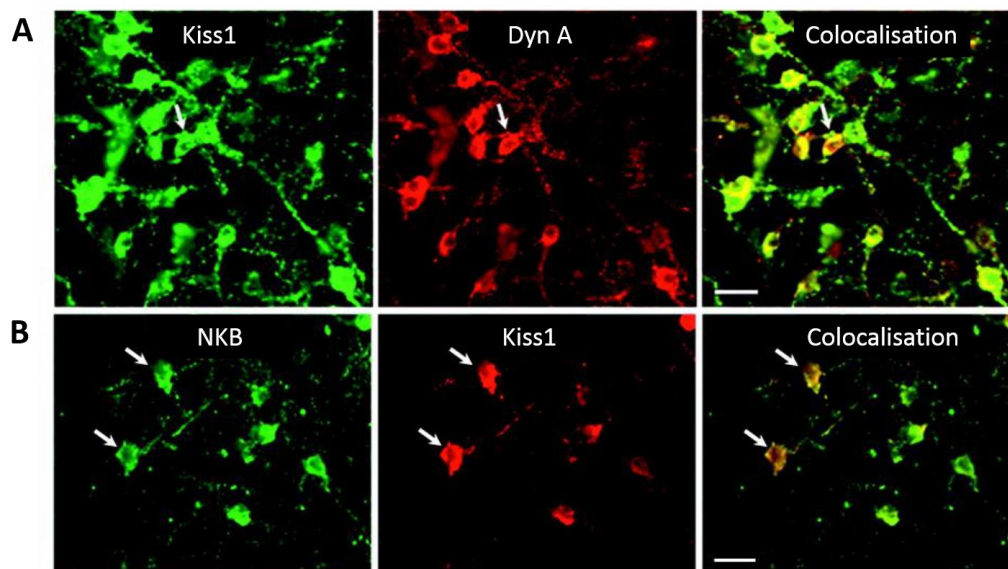
- **Les neurones à Kiss1, centre intégrateur des stéroïdes sexuels**

Dans la mesure où les neurones à GnRH n'expriment pas ER $\alpha$  ni les PR (Fox et al., 1990; Herbison et al., 1996; Huang and Harlan, 1993; Shivers et al., 1983), de nombreuses preuves se sont accumulées pour montrer que les neurones à Kiss1 sont des intermédiaires majeurs entre les stéroïdes sexuels et les neurones à GnRH. Chez les rongeurs, l'activité des neurones à Kiss1 de l'AVPV (exprimant pour la très grande majorité ER $\alpha$  (Smith et al., 2005a) et PR (Clarkson et al., 2008)) et de l'ARC (exprimant tous ER $\alpha$  (Smith et al., 2005a)) sont différemment régulés par les stéroïdes gonadiques.

- **Neurones à Kiss1 de l'AVPV**

Il est maintenant bien établi que les neurones à Kiss1 de l'AVPV sont impliqués dans le rétrocontrôle positif des stéroïdes sexuels et sont responsables de la genèse du pic préovulatoire de GnRH/LH. Chez la souris, l'ovariectomie réduit l'expression de Kiss1 au niveau de l'AVPV alors que le traitement par les stéroïdes sexuels l'augmente (Ansel et al., 2010; Smith et al., 2005b). Les neurones à Kiss1 de l'AVPV projettent directement leurs axones sur le soma et les dendrites proximaux des neurones à GnRH (**Figure 10**) (Wintermantel et al., 2006b; Yeo et al., 2016). Au cours du pic préovulatoire, les neurones à Kiss1 de l'AVPV et les neurones à GnRH sont activés (marquage de *c-fos*) simultanément à la fin du proestrus (Adachi et al., 2007; Clarkson et al., 2008; de Croft et al., 2012; Messenger et al., 2005).

De façon intéressante, l'invalidation spécifique des PR ou de ER $\alpha$  dans les neurones à Kiss1 de l'AVPV chez la souris fait disparaître le pic préovulatoire de LH, démontrant ainsi le rôle indispensable de la progestérone et de l'E2 dans l'activité des neurones à Kiss1 (Stephens et al., 2015; Wintermantel et al., 2006b). Récemment, différentes études ont montré une coopération entre l'E2 et la progestérone dans la genèse du pic préovulatoire de LH. En effet, la progestérone, *via* un PR membranaire, activerait des voies de signalisation de type ERK1/2 et Src et stimulerait ainsi l'action de l'E2 sur la synthèse et la libération de Kiss1 (Leite et al., 2016; Mittelman-Smith et al., 2015, 2018). C'est ainsi que durant la fin du proestrus, l'E2 stimule la transcription de *Kiss1*, *via* des mécanismes génomiques dépendants des éléments de réponses aux œstrogènes (ERE) (Gottsch et al., 2009).



**Figure 11 : Colocalisation de la Kisspeptine, de la Neurokinine B et de la Dynorphine A dans de nombreux neurones de l'ARC chez la brebis**

(A) La Kisspeptine est colorée en vert et la Dynorphine en rouge.

(B) La Neurokinine B est colorée en vert et la Kisspeptine en rouge.

Les flèches blanches indiquent des cellules co-exprimant deux peptides (Kisspeptine (Kiss1)/Dynorphine A (Dyn A) ou Kisspeptine (Kiss1)/Neurokinine B (NKB)).

Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Images modifiées de Goodman et al, 2007.

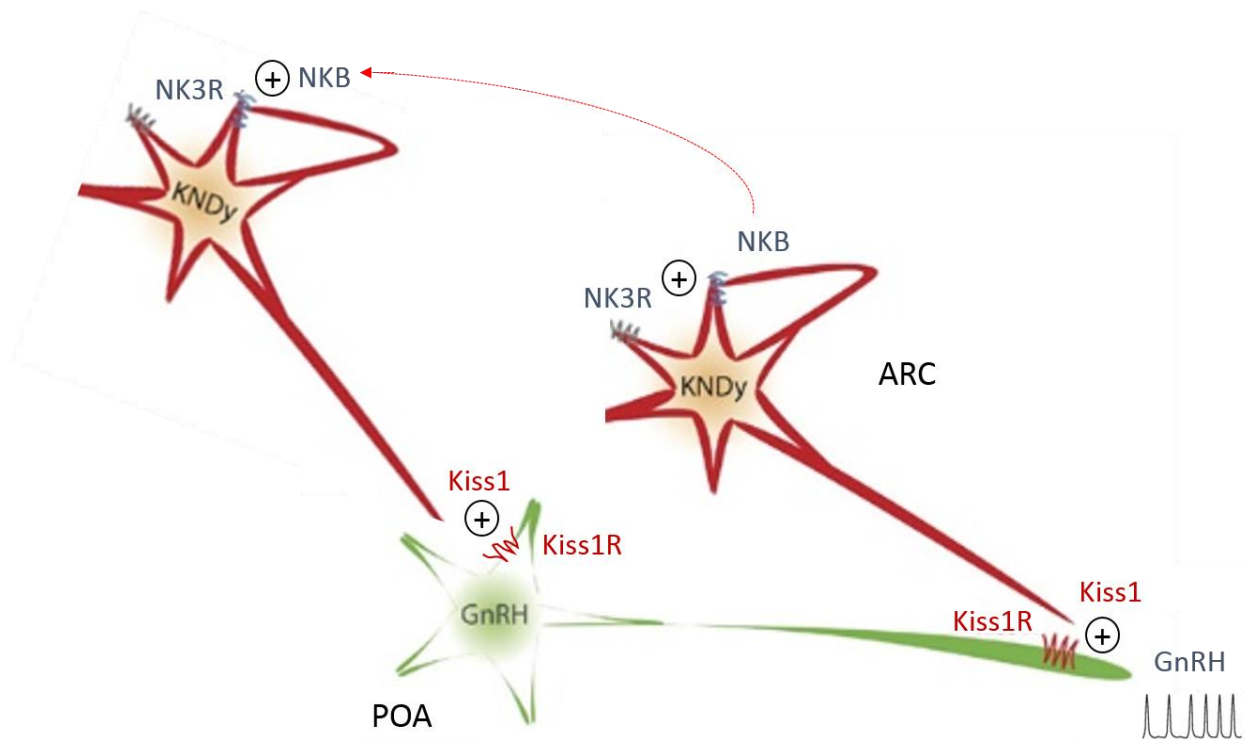
- **Neurones à Kiss1 de l'ARC : Rôle des neurones KNDy**

Les neurones à Kiss1 de l'ARC sont, quant à eux, impliqués dans le rétrocontrôle négatif des stéroïdes sexuels qui régulent la sécrétion basale et pulsatile de la GnRH (**Figure 10**) (Navarro et al., 2009; Uenoyama et al., 2011; Yeo et al., 2016). En effet, l'ovariectomie augmente l'expression de Kiss1 dans l'ARC chez la souris (Smith et al., 2005b), le rat (Smith et al., 2006) et la brebis (Smith et al., 2007). Ce phénomène est aussi observé chez 3 femmes ménopausées (faible concentration de stéroïdes sexuels) après hybridation *in situ* de différentes régions de leur hypothalamus (Rometo and Rance, 2008). Chez la souris, l'effet de l'ovariectomie sur l'expression de Kiss1 dans l'ARC est inhibé par l'administration d'E2 (ARNm de *Kiss1* diminue) et semble être relayé par ER $\alpha$  (Dorling et al., 2003; Navarro et al., 2004; Smith et al., 2005b). La synthèse de Kiss1 dans ces neurones serait modulée par l'E2 selon des mécanismes dépendant et indépendant des ERE (Goto et al., 2015; Gottsch et al., 2009; Tomikawa et al., 2012; Yang et al., 2017). Le rétrocontrôle négatif de l'E2 est exercé tout au long du cycle œstrien à l'exception du proestrus. De nombreuses études ont montré une synchronisation parfaite entre l'activité électrique des neurones de l'ARC et le rythme de libération de la GnRH et de LH (Kinsey-Jones et al., 2008; Ohkura et al., 2009); ces observations sont donc à l'origine de la nomination de l'ARC comme le centre de "générateur de pulsation" de la GnRH (Knobil, 1980; Mori et al., 1991).

Une caractéristique anatomique particulière des neurones à Kiss1 de l'ARC est la parfaite colocalisation de Kiss1 avec deux autres neuropeptides, la neurokinine B (NKB) et la Dyn A, dont chacun joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion de GnRH/LH (Goodman et al., 2007). La colocalisation de ces trois neuropeptides a d'abord été identifiée chez la brebis (**Figure 11**) (Goodman et al., 2007), et par la suite chez les rongeurs (Burke et al., 2006; Navarro et al., 2009; True et al., 2011) et chez la femme (Rance, 2009). Cette population neuronale spécifique de l'ARC a été nommée neurones KNDy (pour Kiss1, NKB, Dyn A) (Lehman et al., 2010a).

- La NKB

L'administration intracérébrale de NKB chez la brebis en anoestrus provoque une activation des neurones à Kiss1 de l'ARC (évaluée par la protéine c-fos) (Sakamoto et al., 2012) et une libération de LH (Goodman et al., 2013; Wakabayashi et al., 2010). Cet effet stimulant de NKB nécessite la présence de Kiss1, car l'invalidation de la signalisation



**Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre la Neurokinine B et la Kisséptine**

La Neurokinine B (NKB) exerce un effet autocrine/paracrine sur les neurones KNDy localisés dans le noyau arqué (ARC) pour stimuler la libération de Kisséptine (Kiss1). Kiss1 interagit ensuite sur son récepteur (Kiss1R) localisé sur les neurones à GnRH pour stimuler la sécrétion pulsatile de GnRH.

GnRH : Gonadotrophin-releasing hormone ; Kiss1 : Kisséptine 1 ; Kiss1R : Récepteur de Kiss1 ; NKB : Neurokinine B ; NK3R: Récepteur de la NKB ; POA : Aire préoptique ; ARC : Noyau arqué.

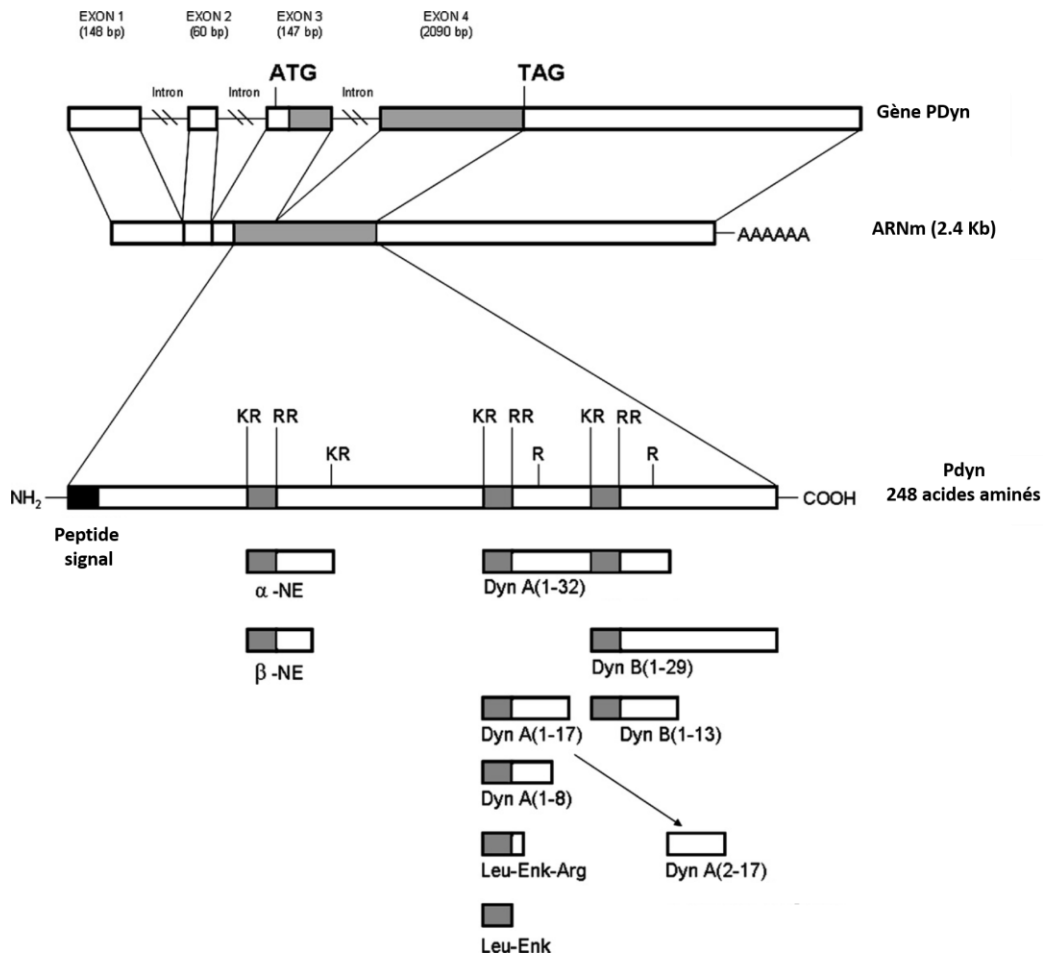
kisspeptidergique empêche la libération de LH par la NKB (García-Galiano et al., 2012). Le récepteur de NKB est absent des neurones à GnRH (Navarro, 2012) mais fortement exprimé dans les neurones KNDy (Goodman et al., 2013), suggérant que la NKB agirait de façon autocrine/paracrine sur les neurones Kiss1 et régulerait ainsi positivement la libération de Kiss1 et *in fine* celle de la GnRH (**Figure 12**).

La NKB est un peptide de dix acides aminés et membre de la famille des peptides tachykinines. Les tachykinines sont caractérisées par une séquence d'acides aminés C-terminale commune (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>). Elles comprennent la substance P, la neurokinine A et la NKB, ainsi que le neuropeptide K, le NPY et l'hémokinine-1. Les tachykinines sont fortement exprimées et sont retrouvées dans le cerveau, les poumons, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la prostate, l'utérus, le placenta, les testicules et les ovaires (Hu et al., 2014). La NKB est la seule tachykinine synthétisée à partir du gène de la pré-protachykinine-B (Almeida et al., 2004; Rance et al., 2010) désigné comme *TAC3* chez l'homme/les primates non humains, les bovins et les chiens et *Tac2* chez les rongeurs. L'ARNm précurseur de *TAC3* contient sept exons, dont cinq sont traduits pour former le peptide de pré-protachykinine B. Ce pré-propeptide subit un clivage enzymatique pour former la pro-neurokinine B, puis la NKB.

Les trois récepteurs de la tachykinine (NK1R, NK2R et NK3R) appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et partagent une homologie structurelle considérable (Rance et al., 2010). La NKB se lie préférentiellement à NK3R, codé par le gène *TACR3* (humain) (ou *Tacr2* chez les rongeurs). La liaison de la NKB à son récepteur conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation dépendantes des protéines G $\alpha_q$  et G $\alpha_s$  (Satake and Kawada, 2006).

En 2009, des patients présentant un retard pubertaire ou une absence de puberté ainsi que des HH congénitaux sans anosmie sont décrits pour porter des mutations dans le gène codant *TAC3* ou son récepteur *TACR3* (Guran et al., 2009; Maione et al., 2017; Topaloglu et al., 2009; Young et al., 2010). Ces patients présentent un phénotype similaire à celui observé dans le cas des mutations du gène *KISS1* ou de son récepteur (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003).





**Figure 13 : Structure des dynorphines issues du gène PDYN de la prodynorphine**

Le gène de la prodynorphine (*Pdyn*) contient 4 exons séparés par 3 introns. La protéine précurseur subit différents clivages et produit de nombreux peptides: l'α-néoendorphine (α-NE), la grande dynorphine (Dyn A 1-32), la leuorphine (Dyn B 1-29), la dynorphine A (Dyn A 1-17), la dynorphine B (Dyn B 1-13), la leucine-enképhaline-arginine (Leu-Enk-Arg) et la leucine-enképhaline (Leu-Enk).

Les sites de clivage des acides aminés basiques sont désignés par leur code (K, lysine; R, arginine) dans la protéine précurseur.

Adapté du Handbook of Biologically Active Peptides, Second Edition, (2013).

## - La Dyn A

La Dyn A joue un rôle important dans la reproduction. Ce peptide a initialement été décrit chez la brebis pour être le relais du rétrocontrôle négatif de la progestérone exercé sur la libération de la GnRH (Goodman et al., 2004). Chez la brebis, l'ovariectomie fait chuter l'expression du précurseur de la dynorphine (la prodynorphine, *Pdyn*) dans l'ARC, et diminue la sécrétion de Dyn A dans le liquide cérébral (Foradori et al., 2005). Chez la souris, l'administration d'un antagoniste du récepteur de la Dyn A stimule la sécrétion de la LH, alors que l'administration de la Dyn A inhibe l'activité des neurones KNDy et la sécrétion de la LH (Navarro et al., 2009). On observe également une diminution des ARNm de *Pdyn* dans l'ARC de femmes post-ménopausées (Rance, 2009; Rometo and Rance, 2008).

Chez la brebis, 95% des neurones exprimant la Dyn A dans l'ARC et le POA coexpriment PRA/PRB (Foradori et al., 2002) et tous les neurones à Dyn A de l'ARC coexpriment Kiss1 et NKB (correspondant aux neurones KNDy) (Foradori et al., 2006; Goodman et al., 2007). Néanmoins, chez l'homme, des études morphologiques montrent une faible présence de la Dyn A dans les neurones KNDy (Skrapits et al., 2015). Le récepteur de la Dyn A, quant à lui, est exprimé dans la majorité des neurones KNDy et dans les neurones à GnRH chez les rongeurs et les ovins (Ruka et al., 2013; Weems et al., 2016). Ces résultats suggèrent que la Dyn A inhibe la sécrétion LH par une action paracrine/autocrine au sein des neurones KNDy et/ou agit de façon directe sur les neurones à GnRH (Lehman et al., 2010b).

La Dyn A, isolée en 1979 par l'équipe de Golstein, est un opioïde endogène de 17 acides aminés (Goldstein et al., 1979). Ce peptide est issu d'une protéine précurseur, la prodynorphine, de 248 acides aminés (**Figure 13**). La séquence du gène de la prodynorphine a été identifiée dans plusieurs espèces, y compris chez l'homme (*PDYN*, 20p13). Le gène *PDYN* contient 4 exons séparés par 3 introns. Les exons 1 et 4 contiennent des séquences non traduites alors que les exons 3 et 4 correspondent aux régions codantes. Les dynorphines comprennent de multiples peptides bioactifs générés à partir de la prodynorphine et sous l'action de protéines convertases (clivage au niveau d'un ou deux résidus basiques (Lysine et/ou Arginine)) et de carboxypeptidases (suppression des acides aminés basiques de l'extrémité C-terminale des peptides) (Douglass et al., 1994). Les dynorphines générées par ces clivages comptent l' $\alpha$ -néoendorphine ( $\alpha$ -NE), la grande dynorphine (Dyn A 1-32), la leumorphine (Dyn B 1-29), la dynorphine A (Dyn A 1-17), la dynorphine B (Dyn B 1-13), la

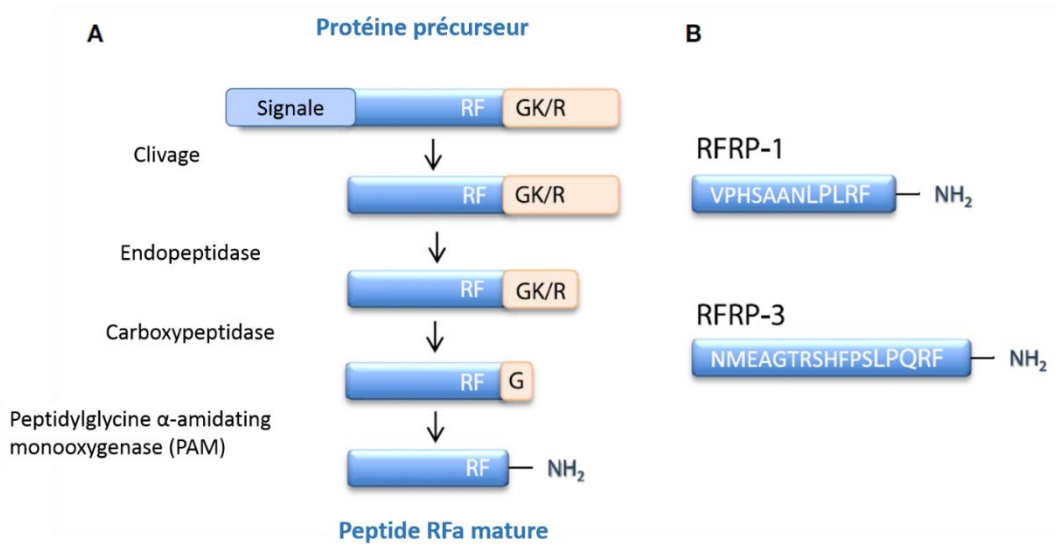


leucine-enképhaline-arginine (Leu-enképhaline-Arg) et potentiellement la leucine-enképhaline (Leu-enképhaline) (Chen et al., 2007) (**Figure 13**). Des études de liaison sur des extraits de cerveaux ont permis de montrer que la Dyn A se lie avec une forte affinité sur les récepteurs  $\kappa$ -opioïdes (KOR) (Chen et al., 2007). Le KOR est un récepteur appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines  $G\alpha_{i/o}$ , inhibant l'activité de l'adénylate cyclase et des canaux calcique voltage-dépendants (Waldhoer et al., 2004).

Chez les mammifères, la distribution des dynorphines est très étendue dans le cerveau et semble être très similaire à celle du KOR (Mansour et al., 1996; Merchenthaler et al., 1997; Shirayama et al., 2004). En périphérie, de nombreux tissus expriment les peptides dérivés de la prodynorphine : c'est le cas de l'estomac, l'intestin, la glande surrénale, l'ovaire, le testicule, le muscle squelettique et le cœur (Spampinato and Goldstein, 1983). Les dynorphines jouent ainsi un rôle important dans diverses fonctions telles que l'activité motrice, la régulation cardiovasculaire, la régulation du stress, la respiration, la dépression, la régulation de la température, le comportement alimentaire et la sécrétion hormonale (Bruchas et al., 2010; Knoll and Carlezon, 2010; Lemos et al., 2012; Schwarzer, 2009).

- **Dialogue entre les neurones de l'AVPV et de l'ARC**

Les neurones KNDy projettent des extensions dans de nombreuses régions de l'hypothalamus et notamment sur les neurones à GnRH du POA (Yip et al., 2015). Ces neurones KNDy permettent une synchronisation entre la pulsativité de Kiss1 avec celle de la GnRH. Des données récentes montrent que la Dyn A des neurones KNDy inhibe aussi la sécrétion de la GnRH au cours du pic préovulatoire de LH chez le rat. L'inactivation pharmacologique (injection dans l'ARC d'un agoniste de NK3R couplé à un neurotoxique, la saponine) des neurones KNDy chez la ratte entraîne une infertilité associée à une perte de cyclicité, une atrophie ovarienne et des niveaux faibles de LH. Si on expose ces rattes (ovariectomisées et dépourvues de neurones KNDy) à de fortes doses de progestérone et d'E2, elles sont de nouveau capables de produire un pic de LH, comme dans des conditions normales (Mittelman-Smith et al., 2018). Une seconde étude montre que la suppression des neurones KNDy, par micro-injection d'un agoniste du NK3R couplé à la saponine, augmente l'amplitude du pic de LH induit par les stéroïdes, et cet effet pourrait être réversé après micro-injection de Dyn A dans l'AVPV (Helena et al., 2015).



**Figure 14 : Cascade de modifications de la protéine précurseur des peptides RF-amides**

- (A)** Représentation schématique de la cascade de clivages protéolytiques de la protéine précurseur pour générer un peptide RF-amide mature. D'une part, la protéine précurseur possède dans sa région N-terminale des résidus hydrophobes qui forment la séquence du peptide signal. D'autre part, cette protéine précurseur contient un motif RFGK/R, dont le clivage forme la signature RF-amide.
- (B)** Représentation schématique des séquences des deux peptides principaux RFRP-1 et RFRP-3, codés par le gène *Npvf*.

Adapté de Leon and Tena-Sempere, 2016

En conclusion, chaque pulse de GnRH est initié par la NKB qui agit de façon autocrine/paracrine sur les neurones KNDy pour stimuler la libération de la Kiss1 (Wakabayashi et al., 2010). En revanche, la fin du pulse de GnRH est induite par la Dyn A sécrétée par les neurones KNDy ou d'autres neurones de l'hypothalamus ; elle agirait selon deux voies potentielles : (1) indirectement *via* les neurones KNDy et/ou (2) directement sur les neurones à GnRH. Par ailleurs, les neurones KNDy de l'ARC pourraient réguler l'activité des neurones à Kiss1 de l'AVPV et ainsi participer au contrôle du pic préovulatoire de GnRH/LH.

## **b. Les peptides liés RFamide-3 (RFRP-3)**

### **• Localisation et site d'action**

En 2000, Tsutsui et ses collègues ont découvert chez les oiseaux un neuropeptide hypothalamique de 12 acides aminés capable d'inhiber la libération des gonadotropines d'hypophyses de caille (Tsutsui et al., 2000). C'était une découverte majeure, car aucun peptide possédant une activité inhibitrice similaire sur la sécrétion des gonadotropines n'avait été précédemment identifiée chez les vertébrés ; par conséquent, ce peptide a été appelé GnIH (GnRH-Inhibitory Hormone). La GnIH aviaire est produite par un gène codant une protéine précurseur de 173 acides aminés donnant naissance à trois peptides après clivage protéolytique (Leon and Tena-Sempere, 2016). Ces peptides ont une séquence commune LPXRF-amide en position C-terminale, où X pourrait être L (Leucine) ou Q (Glutamine). Des analyses par homologie de séquences ont ensuite permis l'identification de peptides orthologues dans un certain nombre d'espèces de mammifères (Ubuka et al., 2016), en particulier de deux peptides RF-amides : RFRP-1 et RFRP-3 (**Figure 14**). Même si le RFRP-1 présente une homologie structurale plus élevée avec la GnIH aviaire que le RFRP-3 (Kriegsfeld et al., 2006), des études pharmacologiques suggèrent fortement que le RFRP-3 est probablement l'orthologue fonctionnel de la GnIH chez les mammifères (Pineda et al., 2010b; Smith and Clarke, 2010).

En effet, chez les mammifères, le gène *Npyf* code deux peptides : RFRP-1 et RFRP-3 (**Figure 14**) (Tsutsui, 2009; Ubuka et al., 2009a, 2009b, 2012a). Un peptide analogue LPXRF-amide a aussi été identifié et nommé RFRP-2 chez l'homme, le macaque et les bovins (Hinuma et al., 2000). Cette forme est absente chez les rongeurs et n'active pas les mêmes récepteurs que le RFRP-1 et le RFRP-3 (Tsutsui et al., 2010). Seul le RFRP-3 a des effets sur l'axe de reproduction (Hinuma et al., 2000). Le RFRP-3 est principalement exprimé dans le



noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH). Ces neurones se projettent dans plusieurs régions hypothalamiques, notamment dans l'ARC et l'AVPV, et dans le POA où se situent les neurones à GnRH (Tanco et al., 2016). Les actions biologiques RFRP-3 s'exercent principalement à travers un récepteur couplé aux protéines G, le GPR147 (également appelé NPPF1R). Dans de nombreuses espèces, l'ARNm du *Gpr147* est présent dans plusieurs régions du système nerveux central, en particulier dans l'hypothalamus où 16% à 25% des neurones à Kiss1 (de l'AVPV et de l'ARC respectivement) et 33% des neurones à GnRH expriment le GPR147 (Tanco et al., 2016). Le GRP147 est aussi présent dans les tissus périphériques tels que l'hypophyse (Dardente et al., 2008; Smith et al., 2011; Ubuka et al., 2009a), les gonades (McGuire and Bentley, 2010) ou l'œil de rat (Hinuma et al., 2000).

- **Rôle de RFRP-3 dans la reproduction**

Le RFRP-3 inhibe l'activité des neurones à GnRH et la libération de LH chez les rongeurs ou le hamster (chez le mâle uniquement) (Ancel et al., 2012, 2017; Henningsen et al., 2017; León et al., 2014; Ubuka et al., 2012b). L'inactivation de son récepteur chez la souris entraîne également une augmentation des niveaux de LH/FSH (León et al., 2014). Néanmoins, le rôle du RFRP-3 dans la reproduction n'est pas encore bien compris. En effet, chez le hamster femelle, l'administration de RFRP-3 lors de journées longues (16 heures de jour/8 heures de nuit) diminue significativement les niveaux de LH, alors que l'administration de RFRP-3 en période de journées courtes (8 heures de jour/16 heures de nuit) stimule la sécrétion de la LH (Ubuka et al., 2012a). La photopériode jouerait donc un rôle prédominant dans la nature de l'effet inhibiteur ou stimulateur de RFRP-3 chez les hamsters. Des études électrophysiologiques sur des neurones à GnRH de souris montrent une action mixte du RFRP-3 sur l'activité de ces neurones ; le nombre relatif de neurones activés vs inactivés dépend de la dose de RFRP-3 (Ducret et al., 2009). De même, chez la brebis, une première étude montrait un effet inhibiteur de RFRP-3 sur la sécrétion de LH (Clarke et al., 2008), alors que plus récemment, l'utilisation de divers protocoles d'administration de RFRP-3 ne montre pas d'effet de ce peptide sur la sécrétion de LH (Decourt et al., 2016).

Le RFRP-3 régulerait plutôt les comportements sexuels (Ubuka et al., 2014). Chez certains mammifères, l'administration intracérébrale de RFRP-3 supprime le comportement sexuel mâle chez le rat (Johnson et al., 2007) et réduit la motivation sexuelle chez les hamsters femelles (Piekarski et al., 2013).





En conclusion, le RFRP-3 est impliqué dans la régulation de la fonction de reproduction, mais avec des effets qui varient en fonction du sexe, de l'espèce et des modèles.

## 2- **Les autres facteurs**

En plus de Kiss1 et de RFRP-3, de très nombreux neurotransmetteurs stimulent ou inhibent l'axe gonadotrope ; il s'agit par exemple du NPY, du GABA, du glutamate, des catécholamines, du « vasoactif intestinal peptide » (VIP), de la vasopressine, de l'oxyde nitrique, de la neurotensine, et de la PRL (Liu and Herbison, 2016). J'ai choisi de vous développer le rôle du NPY et du GABA pour montrer le lien étroit et complexe entre différents systèmes endocriniens et la fonction de reproduction.

### a. **Neuropeptide Y (NPY)**

Le NPY est un neuropeptide de 36 acides aminés hautement conservé chez de nombreuses espèces. Il exerce un rôle important dans l'homéostasie énergétique. Son injection dans l'hypothalamus produit une augmentation de la prise alimentaire associée à une baisse des dépenses énergétiques. Le NPY appartient à la famille des neuropeptides Y, qui comprend également les peptides YY et les polypeptides pancréatiques (Wahlestedt and Reis, 1993). Le NPY est largement exprimé dans le cerveau (Cerdá-Reverter and Larhammar, 2000) mais s'exprime aussi dans les tissus périphériques comme le tissu adipeux blanc et les cellules osseuses (Baldock et al., 2007; Yang et al., 2008). Le NPY se lie à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires de types Y (1 à 6 isotypes) couplés aux protéines  $G\alpha_{i/o}$  (Mashiko et al., 2009). Dans des conditions de privation alimentaire, le nombre des neurones exprimant le NPY augmente fortement (Loh et al., 2015; Sainsbury and Zhang, 2010; Shi et al., 2013). De même, l'injection intracérébrale de NPY chez les rongeurs conduit à une hyperphagie robuste et au développement d'une obésité morbide, confirmant ainsi le rôle orexigène du NPY (Muroi and Ishii, 2016). L'invalidation des gènes codant les récepteurs du NPY a permis de montrer que ses effets passeraient essentiellement par les récepteurs Y1 et Y5 (Lin et al., 2004). Le récepteur Y1 serait également impliqué dans la nociception et l'inflammation neurogène.

La prise alimentaire et la dépense énergétique sont aussi des facteurs qui contrôlent la reproduction. L'homéostasie énergétique est en partie assurée par la ghréline et la leptine qui sont respectivement sécrétées par l'estomac et le tissu adipeux (Fernandes et al., 2013). Ces 2 hormones agissent de façon antagoniste sur l'hypothalamus pour contrôler l'activité de



neurones à NPY et à agouti-related peptide (AgRP). Un apport énergétique excessif favorise l'obésité et augmente les risques d'infertilité (Pasquali et al., 2007; Tortoriello et al., 2004). Un équilibre énergétique négatif peut aussi déclencher un retard pubertaire et une infertilité (Muroi and Ishii, 2015, 2016). Les terminaisons nerveuses des neurones à NPY se projettent dans le POA, réalisant ainsi des connexions avec les corps cellulaires et les dendrites/axones des neurones à GnRH (Li et al., 1999; Sahu et al., 1988). L'utilisation d'agonistes variés des récepteurs Y sur des tranches de cerveaux de souris a permis de montrer que le NPY est capable d'activer ou d'inhiber l'activité des neurones à GnRH en fonction de la localisation de son récepteur (soma ou terminaisons neuronales) (Roa and Herbison, 2012). L'effet de ce neuropeptide varie aussi en fonction de l'environnement stéroïdien (Majdoubi et al., 2000). En effet, l'administration de NPY chez la ratte ovariectomisée n'a aucun effet sur la libération de GnRH, alors que la présence d'E2 ou de progestérone permet au NPY de stimuler la libération de GnRH (Eva et al., 2006; Khorram et al., 1988; Muroi and Ishii, 2015; Sabatino et al., 1990). Des variations entre espèces sont aussi décrites ; à la différence des rongeurs (Xu et al., 2000), le NPY bloque la sécrétion de LH chez le singe (Kaynard et al., 1990), la brebis (Malven et al., 1992) et la vache (Thomas et al., 1999).

En conclusion, le NPY est un facteur de liaison important entre la nutrition et la reproduction (Wójcik-Gładysz and Polkowska, 2006).

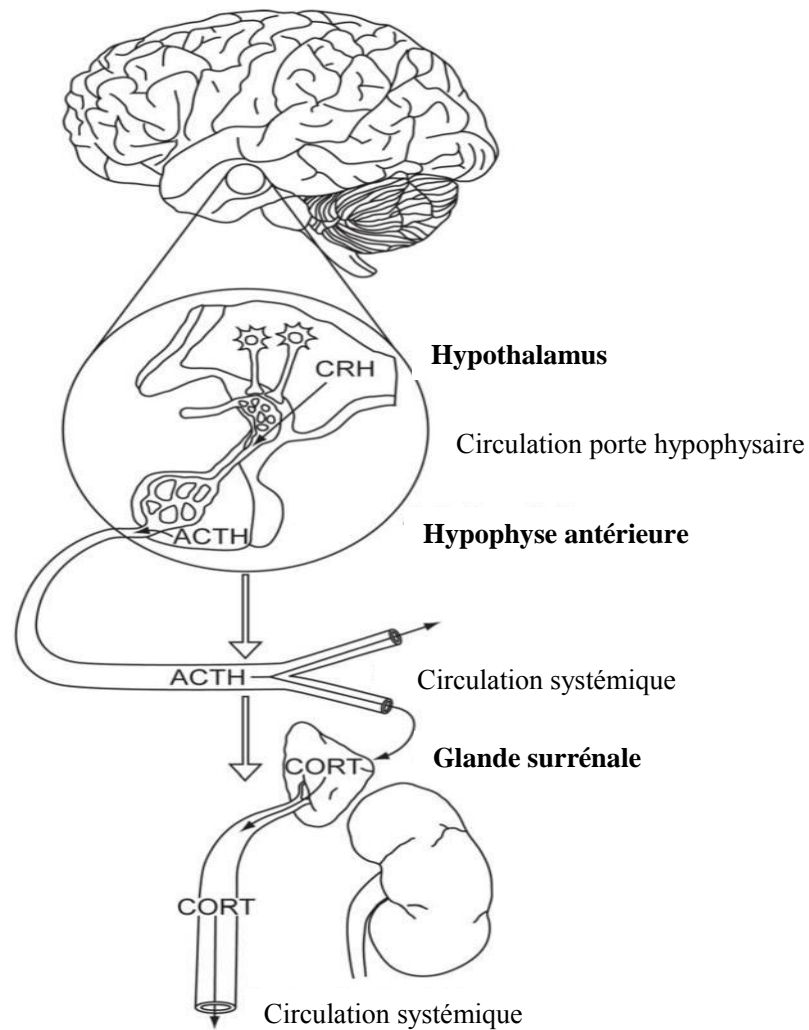
#### **b. L'acide gamma-aminobutyrique (GABA)**

Le GABA est un acide aminé inhibiteur synthétisé à partir du glutamate *via* l'enzyme glutamate décarboxylase spécifiquement exprimée dans les neurones à GABA (Soghomonian and Martin, 1998). Le GABA joue un rôle important dans le contrôle de l'hyperactivité neuronale associée à l'anxiété. Les neurones à GABA qui expriment ER $\alpha$  (Leranth et al., 1985), sont localisés dans l'AVPV et le noyau suprachiasmatique, et projettent des afférences sur les neurones à GnRH (Christian and Moenter, 2007; Ottem et al., 2004). Les neurones à GnRH expriment les deux types de récepteur du GABA couplés aux protéines G, les récepteurs GABA<sub>A</sub> (Temple and Wray, 2005) et GABA<sub>B</sub> (Zhang et al., 2009a). Le développement de modèles de souris reflétant le syndrome des ovaires polykystiques, a permis de montrer que l'augmentation de la fréquence de la pulsativité de GnRH responsable de niveaux élevés de LH observés dans ce syndrome, peut être en partie attribuée à l'activité des afférences GABAergiques (Sullivan and Moenter, 2004).



Bien que l'abolition à 70-90% de la signalisation des récepteurs GABA<sub>A</sub> par l'invalidation de la sous-unité  $\gamma 2$  de ce récepteur dans les neurones à GnRH n'a pas d'effet majeur sur la fertilité (Lee et al., 2010), de nombreuses études suggèrent le rôle du GABA dans la physiologie des neurones à GnRH (Catalano et al., 2005). L'administration de GABA ou d'un agoniste du GABA<sub>A</sub> bloque le pic préovulatoire de LH chez le rat (Adler and Crowley, 1986; Herbison and Dyer, 1991), tandis que l'antagoniste de ce récepteur fait apparaître le pic de LH plus précocement (Kimura and Jinnai, 1994). Des études plus récentes montrent que l'antagoniste du GABA<sub>A</sub> a des effets excitateurs, inhibiteurs ou mixtes sur la libération de GnRH chez la souris. Cette variabilité de réponses semble être dépendante de la voie de signalisation activée par le récepteur GABA<sub>A</sub>, et de la localisation dendritique ou axonale de cette signalisation au sein des neurones à GnRH (Constantin et al., 2012, 2013). Le GABA serait aussi capable de réguler l'activité de l'axe gonadotrope depuis la migration embryonnaire des neurones à GnRH jusqu'à l'apparition de la puberté et aux régulations exercées par l'E2 (Catalano et al., 2005; Grumbach, 2002; Heger et al., 2003; Watanabe et al., 2014). Les signaux métaboliques ont des effets sur la fertilité. Des souris invalidées pour le récepteur de la leptine dans les neurones à GABA montrent un retard pubertaire (Zuure et al., 2013) ou un HH (Martin et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la signalisation de la leptine dans les neurones GABAergiques joue un rôle crucial dans le déclenchement de la puberté et intervient dans la régulation des fonctions de reproduction. Les afférences GABAergiques intègrent donc les signaux métaboliques pour moduler l'activité des neurones à GnRH. Par ailleurs, il existe une coexpression du NPY et du GABA dans l'ARC, où le GABA pourrait réguler l'action stimulatrice du NPY (Muroya et al., 2005).

En conclusion, l'exemple de ces deux neuropeptides reflète une petite partie de la grande complexité des régulations de l'axe gonadotrope exercées par une multitude de signaux.



**Figure 15 : L'axe corticotrope chez le rongeur**

Le noyau paraventriculaire localisé dans l'hypothalamus sécrète le CRH dans la circulation porte hypophysaire. Le CRH exerce son action sur les cellules corticotropes hypophysaires en stimulant la sécrétion d'ACTH dans la circulation systémique. Cette hormone agit à son tour sur les glandes corticosurréaliennes pour produire la corticostérone (CORT). Le CORT est ensuite sécrétée dans la circulation systémique pour agir sur une multitude d'organes cibles.

Adapté de Herman et al., 2016.

CRH : Corticotropin-Releasing Hormone ; ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone ;  
CORT : Corticostérone.

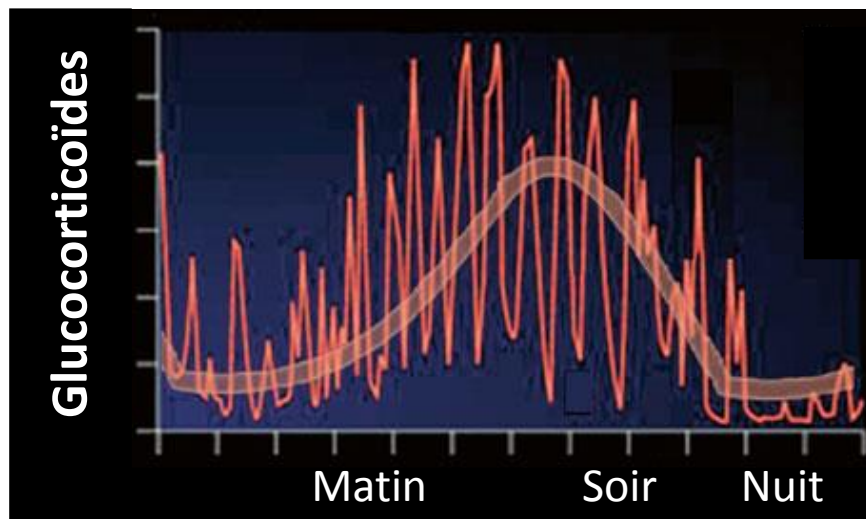
## II- L'axe corticotrope et les glucocorticoïdes

### A- L'axe corticotrope

#### 1- Organisation fonctionnelle

L'axe corticotrope ou axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HPA) est un axe endocrine essentiel au maintien de l'homéostasie. Cet axe comporte 3 structures principales : le noyau paraventriculaire (PVN) localisé dans l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et le cortex de la glande surrénale (**Figure 15**). L'hypothalamus est le centre intégrateur de l'axe corticotrope qui reçoit des très nombreuses afférences en provenance du système limbique regroupant l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal. Ces afférences stimulent les neurones parvocellulaires du PVN pour synthétiser et sécréter le CRH (Corticotropin-Releasing Hormone ; peptide de 41 acides aminés) et l'AVP (Arginine–Vasopressin Peptide : peptide de 9 acides aminés) (Rivier and Vale, 1983). Le CRH est ensuite libéré dans l'éminence médiane et transporté vers les cellules corticotropes de l'antéhypophyse *via* le système porte hypothalamo-hypophysaire. Une fois dans l'antéhypophyse, le CRH se lie à un récepteur spécifique à 7 domaines transmembranaires de type 1 (CRH1R) couplé aux protéines  $G\alpha_s$  qui stimulent la voie de signalisation de l'adénylate cyclase ( $AMP_c$ , PKA) pour *in fine* permettre la synthèse de l'ACTH (peptide 39 acides aminés), résultant de l'hydrolyse partielle du domaine central de la pro-opiomélanocortine (POMC). L'AVP potentialise les effets du CRH sur la stimulation de la sécrétion de l'ACTH (Smith and Vale, 2006). Néanmoins, l'AVP seule a peu d'activité sécrétagogue sur l'ACTH (Lee et al., 2015). Il semble qu'il existe une interaction positive réciproque entre le CRH et l'AVP au niveau de l'hypothalamus ; chaque neuropeptide stimule la sécrétion de l'autre. L'ACTH, libérée par l'antéhypophyse dans la circulation systémique, se lie à un récepteur à 7 domaines transmembranaires de type 2 (MC2R pour melanocortin-2-receptor) couplé aux protéines  $G\alpha_s$ . Une fois activé, ce récepteur localisé dans la zone fasciculée du cortex surrénalien stimule la synthèse des GC (cortisol chez l'homme et corticostérone chez les oiseaux et les rongeurs). Les GC sont ensuite libérés dans la circulation générale pour agir de façon variable sur de très nombreux tissus cibles (cœur, foie, tissu adipeux, os, muscles, cerveau). Les GC régulent ainsi de nombreux processus physiologiques comme les fonctions cardiovasculaire et métabolique, les fonctions immunitaires, l'inflammation et la reproduction (Joseph and Whirlledge, 2017).





**Figure 16 : La rythmicité de la sécrétion des glucocorticoïdes chez les rongeurs**

Le niveau plasmatique des glucocorticoïdes circulants varie durant la journée. La ligne épaisse représente la rythmicité circadienne, alors que la ligne fine représente la rythmicité ultradienne.

Adapté de Lightman and Conway-Campbell, 2010.

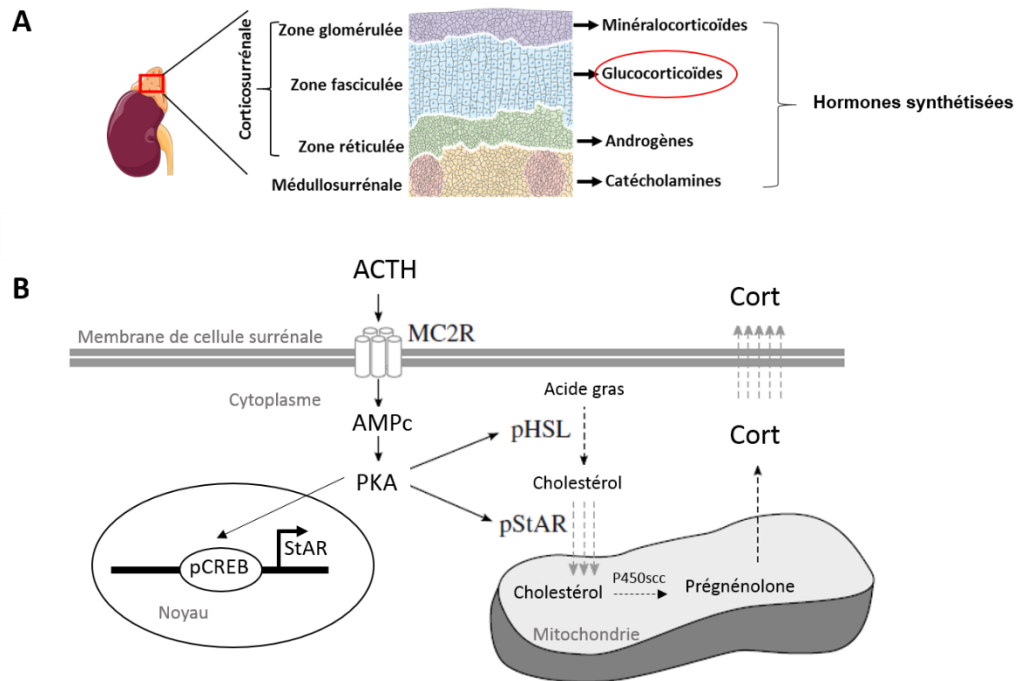
## 2- Régulation de l'axe corticotrope

### a. Rythmicité

L'activité de l'axe corticotrope dans la régulation des systèmes endocrines dépend de l'horloge biologique (circadien/ultradien) et des situations stressantes vécues par l'individu. En condition basale, l'axe corticotrope présente une rythmicité circadienne contrôlée par le SCN (Lightman, 2008) avec des concentrations plus élevées de CRH, d'ACTH et de GC au début de la phase active. Cette phase correspond à la période d'activité majeure de l'organisme où les besoins énergétiques sont élevés et qui se déroule le matin chez l'homme et le soir chez le rongeur. Progressivement, les concentrations hormonales vont diminuer pour atteindre un nadir circadien en période de sommeil, où les besoins énergétiques sont faibles (**Figure 16**) (Biddie et al., 2012). Cette rythmicité circadienne est confirmée dans les études de lésions du SCN qui conduisent à l'abolition du rythme des GC ainsi qu'à la perturbation de la sécrétion de CRH et d'ACTH (Laryea et al., 2015). Cependant, la sécrétion des GC ne dépend pas uniquement de l'axe corticotrope. Des nombreuses études suggèrent que le cortex surrénalien contient son propre système d'horloge endogène qui régule la sécrétion circadienne de GC, indépendamment de l'activité de l'axe corticotrope (Ishida et al., 2005; Oster et al., 2006). En plus du contrôle circadien, la sécrétion des GC présente un rythme ultradien hautement conservé avec des pulses sécrétés à des intervalles réguliers d'environ 60 minutes chez le rongeur (Windle et al., 1998) et 80-110 minutes chez l'homme (**Figure 16**) (Russell et al., 2014; Veldhuis et al., 1989). Ce rythme ultradien semble être essentiel au maintien de la réceptivité de l'axe corticotrope (Lightman and Conway-Campbell, 2010; Young et al., 2004).

### b. Rétrocontrôle

En plus de la régulation circadienne/ultradienne, l'activité de l'axe corticotrope est également contrôlée par des rétrocontrôles négatifs exercés par les GC afin de réduire la biosynthèse et la libération de CRH, d'ACTH et *in fine* de limiter l'exposition prolongée aux actions cataboliques ou immunosuppressives des GC (Dallman, 1993; Keller-Wood, 2015; Oakley and Cidlowski, 2013a). Ces mécanismes sont très importants car une exposition excessive aux GC conduit à des situations pathologiques (détaillées dans la partie III du manuscrit) (Myers et al., 2012). Dans les minutes qui suivent leur libération, les GC inhibent l'expression et la sécrétion du CRH dans le PVN de l'hypothalamus (Bali et al., 2008; Plotsky et al., 1986; Sawchenko, 1987) ainsi que l'activité électrique et la transcription de la protéine



**Figure 17 : La corticosurrénale synthétise les glucocorticoïdes**

- A-** Les deux glandes surrénales se trouvent au-dessus des reins. Les GC sont synthétisés par la zone fasciculée de la corticosurrénale.
- B-** L'ACTH augmente l'activité de la surrénale *via* l'activation de la PKA qui régule l'expression de protéines de la stéroïdogénèse. Par ailleurs, la PKA phosphoryle différentes protéines qui vont permettre l'entrée du cholestérol (précurseur des hormones stéroïdiennes) dans la mitochondrie. Dans la mitochondrie, le cholestérol est transformé en prégnénolone par le cytochrome P450scc. Ce processus est suivi d'un certain nombre de réactions enzymatiques effectuées dans le réticulum endoplasmique. La Cort synthétisée est rapidement libérée dans la circulation générale.

Adapté de Walker et al., 2015.

ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone ; Cort : Corticostérone ; StAR : Steroidogenic acute regulatory protein ; HSL : hormone-sensitive lipase ; CREB : c-AMP Response Element-binding protein ; PKA : protéine kinase A ; p: phosphorylation.

précurseur POMC des cellules corticotropes hypophysaires (Duncan et al., 2016; Eberwine et al., 1987). Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets transcriptionnels des GC sur l'expression du CRH ne sont pas entièrement compris (Aguilera and Liu, 2012), alors que ceux exercés sur l'inhibition de la transcription de la POMC seraient en partie dépendants de l'interaction du récepteur des GC (GR) avec des éléments de réponses négatifs aux GC (nGRE), présents dans la partie proximale du promoteur de la POMC (Aguilera and Liu, 2012). Les GC réguleraient également la stabilité de l'ARNm de la POMC hypophysaire et du CRH hypothalamique et leur traduction (Ma et al., 2001; Tasker and Herman, 2011). A l'image des GC, l'ACTH exerce également un rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamique, inhibant la sécrétion de CRH et ainsi limitant sa propre sécrétion (Watts, 2005).

Bien que l'effet du rétrocontrôle des GC au niveau hypothalamique et hypophysaire ait reçu beaucoup d'attention, les mécanismes intra-surréaliens par lesquels les GC autorégulent leur propre synthèse et sécrétion ne sont pas encore très clairs et semblent être très différents en fonction du modèle cellulaire étudié (Asser et al., 2014; Feltus et al., 2002; Gummow et al., 2006; Louiset et al., 2009; Walker et al., 2015). Néanmoins, l'activation du GR surrénalien, chez le rat (Loose et al., 1980) et l'homme (Briassoulis et al., 2011), induirait l'inhibition de la sécrétion de GC par les cellules corticosurréaliennes *via* des mécanismes non-génomiques (Walker et al., 2015). L'hypersécrétion d'ACTH associée à une tumeur de la surrénale montre également une boucle autocrine très courte de l'ACTH sur la sécrétion de GC (Louiset et al., 2013).

## **B- Les glucocorticoïdes**

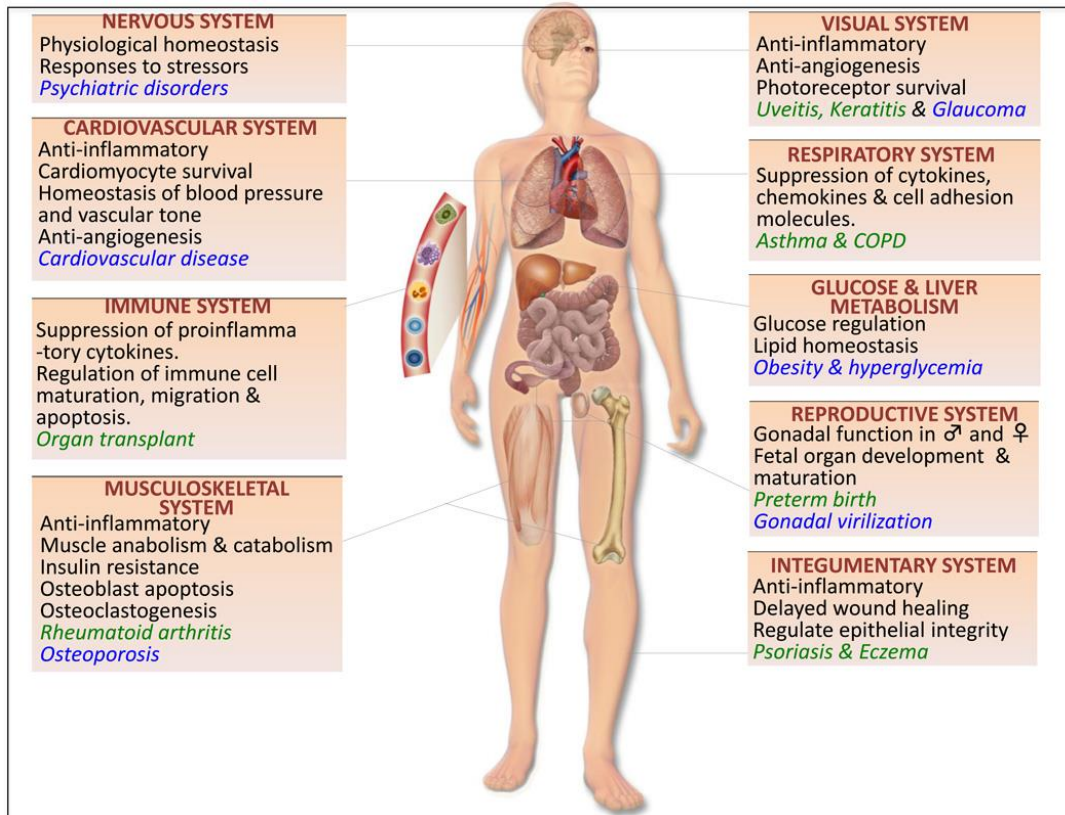
### **1- Biosynthèse, circulation et métabolisme des glucocorticoïdes**

Le terme «glucocorticoïdes» provient de leur rôle dans le métabolisme du glucose, leur synthèse dans le cortex surrénalien et leur structure stéroïdienne (GLUCOse, CORTex et sterOID). Les GC sont synthétisés dans la zone fasciculée/réticulée du cortex surrénalien, glande endocrine paire localisée au pôle supérieur des reins (**Figure 17-A**). Les GC ne peuvent pas être pré-synthétisés et stockés dans les cellules surrénales mais doivent être rapidement (c'est-à-dire en quelques minutes) secrétés après stimulation par l'ACTH (**Figure 17-B**) (Walker et al., 2015). Après la liaison de l'ACTH à son récepteur MC2R, une cascade



de transduction impliquant l'adénylate cyclase/l'AMP<sub>c</sub> et la PKA permet la phosphorylation de certaines protéines comme les protéines de transport du cholestérol à domaine STAR (StAR-related lipid transfer StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) (Arakane et al., 1997) qui accélèrent/facilitent le transport du cholestérol (précurseur des hormones stéroïdes) du cytosol vers la mitochondrie (Lin et al., 1995). Le cholestérol entre dans la matrice mitochondriale et est métabolisé en prégnénolone par l'enzyme cytochrome P450<sub>SSC</sub>. Un dialogue entre la mitochondrie et le RE lisse permet ensuite d'assurer la fin de la stéroïdogenèse. Le catabolisme des GC est principalement réalisé par deux isoenzymes, les 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 $\beta$ HSD)-1 et 11 $\beta$ HSD-2. La 11 $\beta$ HSD-1 est caractérisée par une action réductase majeure favorisant la conversion des GC d'une forme inactive (11-déhydrocorticostérone ou cortisone) en forme active (corticostérone ou cortisol) (Brown et al., 1996; Friedberg et al., 2003). La 11 $\beta$ HSD-2 quant à elle, caractérisée par une activité déshydrogénase, catalyse la réaction inverse en transformant les hormones actives (corticostérone ou cortisol) en métabolites inactifs (11-déhydrocorticostérone ou cortisone) (Chapman et al., 2013). La 11 $\beta$ HSD-1 est exprimée chez l'homme et les rongeurs ; elle est fortement exprimée dans le cerveau, le foie, l'estomac, le tissu adipeux, le cortex surrénalien, le poumon, l'utérus et les testicules (Chapman et al., 2013; Mercer et al., 1993; Paulsen et al., 2007). Au sein de ces tissus, la 11 $\beta$ HSD-1 génère des concentrations élevées de GC, augmentant leur biodisponibilité et amplifiant ainsi leur activité. Inversement, la 11 $\beta$ HSD-2 est spécifiquement exprimée dans les cellules épithéliales minéralocorticoïdes sensibles qui nécessitent une protection contre une suractivité des GC comme le tubule rénale, le côlon et les glandes salivaires (Edwards et al., 1988; Funder et al., 1988; Monder and Lakshmi, 1990; Smith et al., 1996). Par ailleurs, l'ACTH régule aussi l'expression des nombreux gènes tels que *STAR* et *MC2R* (**Figure 17-B**) (Spiga et al., 2011).

Chez l'homme et les rongeurs, environ 90 à 95% des GC sont transportés sous forme inactive dans la circulation sanguine grâce à leur forte liaison avec une  $\alpha$ -globuline de transport synthétisée par le foie, la transcortine ou Corticosteroid Binding Globulin (CBG) (Moisan, 2013; Moisan et al., 2014), et dans une moindre mesure avec l'albumine. Par conséquent, 5 à 10% des GC circulent sous forme libre et constituent la fraction biologiquement active (Baker, 2002; Daughaday, 1956; Hammond, 2016). Les GC libres sont hautement lipophiles, ce qui leur permet de traverser la membrane plasmique par diffusion simple. La demi-vie du cortisol libre dans le plasma est de 66-120 minutes et celle de la



**Figure 18 : Rôle multiple des glucocorticoïdes et pathologies associées**

Ce schéma représente l'impact des glucocorticoïdes sur les principaux organes du corps humain (texte en noir), les rôles bénéfiques en clinique des glucocorticoïdes (texte en vert), et les effets indésirables chez les patients ayant des taux élevés de glucocorticoïdes (texte en bleu).

Adapté de Oakley and Cidlowski, 2013.

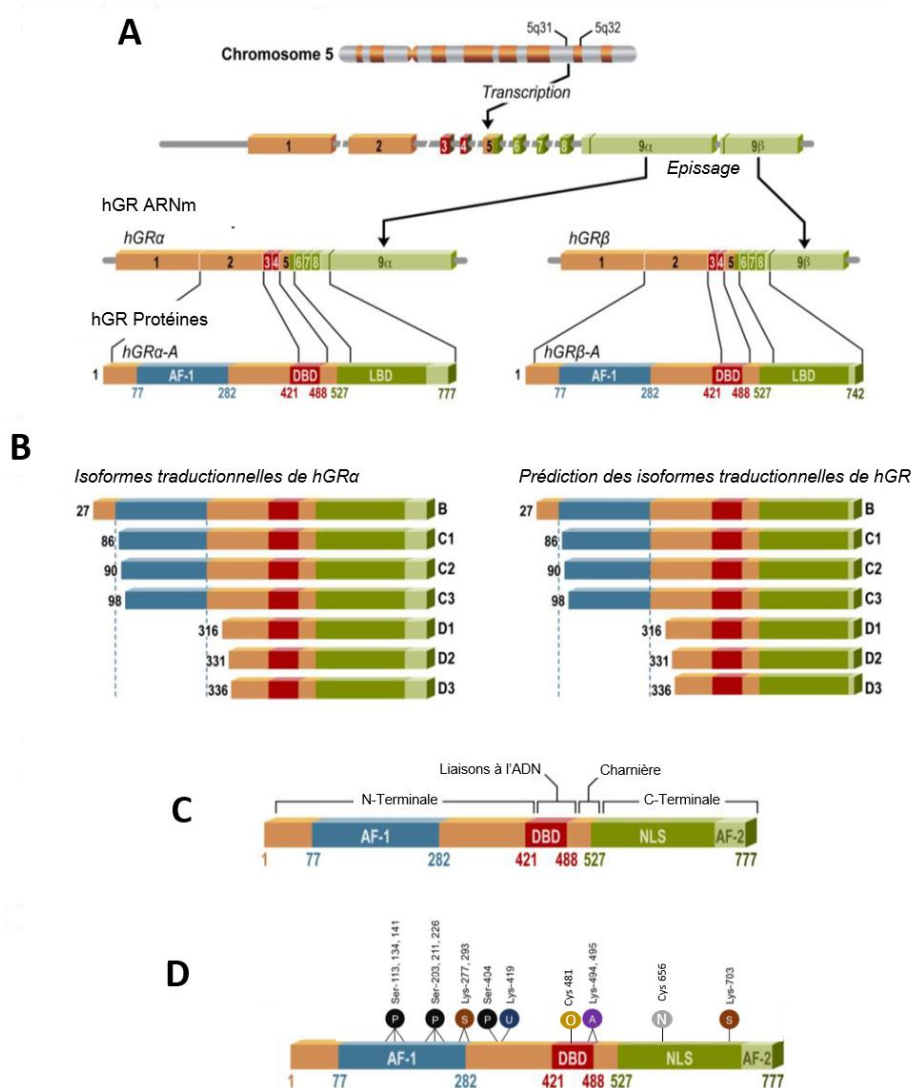
corticostérone est de 45-50 minutes (Weitzman et al., 1971; Wood et al., 1997). Les GC liés à la CBG représentent un « pool de réserve » (Moisan, 2013; Moisan et al., 2014). En réponse au stress, les cytokines libèrent le cortisol de la CBG ce qui augmente la quantité de cortisol disponible (Emptoz-Bonneton et al., 1997; Hammond, 2016).

L'activité biologique des GC dépend donc de nombreux paramètres biologiques (synthèse, sécrétion, diffusion, transport, métabolisme et dégradation).

## 2- Rôle des glucocorticoïdes

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est exprimé dans presque tous les types cellulaires de l'organisme (**Figure 18**) (Oakley and Cidlowski, 2011a), conférant aux GC leur capacité de moduler l'expression d'environ 10% des gènes (Buckingham, 2006; Whirledge and DeFranco, 2018). Ainsi, les GC favorisent la néoglucogenèse et augmentent la glycémie (Reichardt et al., 2012). Ils agissent également sur le métabolisme lipidique en stimulant la lipolyse (Park and Ge, 2017). Ces stéroïdes possèdent aussi des effets anti-inflammatoires en inhibant la production et la sécrétion des cytokines, des chimiokines et de molécules d'adhésion cellulaire (Kaur et al., 2012). Par ailleurs, les GC inhibent la maturation et la prolifération des cellules immunitaires (Cao et al., 2013; Whirledge and DeFranco, 2018) et régulent la pression artérielle parfois à l'origine d'hypertension (Goodwin et al., 2008). Les GC ont relativement peu d'effets sur la balance hydroélectrolytique, fonction physiologique de l'aldostérone. Néanmoins, lors de l'hypersécrétion des GC, ces derniers peuvent occuper le récepteur des minéralocorticoïdes (MR, récepteur de l'aldostérone) pour lequel ils possèdent une très forte affinité. Dans ce cas, les GC peuvent induire les mêmes effets que l'aldostérone : rétention du sodium et de l'eau associée à une fuite de potassium (Thunhorst et al., 2007). Une hypersécrétion de GC peut aussi avoir des effets négatifs sur l'os (ostéoporose) puisque les GC inhibent la formation osseuse, en favorisant la résorption induite par les ostéoclastes et en augmentant l'apoptose des ostéoblastes (cellules qui synthétisent la partie non minérale de l'os) (Bultink et al., 2013; Watson et al., 2012). Enfin, les GC jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de reproduction (abordée dans la partie III) (Busillo and Cidlowski, 2013; Whirledge and Cidlowski, 2017b).





**Figure 19 : Organisation et isoformes du récepteur des glucocorticoïdes (GR)**

Le gène du GR humain (hGR) *NR3C1* est situé sur le locus du chromosome 5 (q31-32).

- (A) L'épissage alternatif de *NR3C1* génère les isoformes hGR $\alpha$  et hGR $\beta$ , qui codent des récepteurs qui diffèrent par leur extrémité C-terminale.
- (B) L'utilisation des différents sites d'initiations de la traduction, l'isoforme GR $\alpha$  génère huit variants protéiques supplémentaires aux extrémités N-terminales tronquées (GR $\alpha$ -A, GR $\alpha$ -B, GR $\alpha$ -C1, GR $\alpha$ -C2, GR $\alpha$ -C3, GR $\alpha$ -D1, GR $\alpha$ -D2 et GR $\alpha$ -D3). GR $\beta$  pourrait également conduire à huit variants GR $\beta$  similaires à ceux de hGR $\alpha$ .
- (C) Le GR est une protéine comportant un domaine N-terminal (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de liaison au ligand (LBD), et une "région charnière" flexible séparant le DBD du LBD.
- (D) Le GR subit de multiples modifications post-traductionnelles : P : phosphorylation ; S : sumoylation ; U : ubiquitination ; A : acétylation ; O : Oxydation ; N : Nitrosylation.

Adapté de Oakley and Cidlowski, 2013.

## C- Les récepteurs des glucocorticoïdes

### 1- Le gène *NR3C1*

Les GC agissent principalement en se liant à un récepteur spécifique (GR) appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le GR est codé par le gène *NR3C1*, localisé chez l'homme sur le chromosome 5 (région q31-32) (**Figure 19-A**). Des études génétiques menées sur des souris invalidées pour le gène *NR3C1* ( $GR^{-/-}$ ) ont permis de montrer l'importance du GR en physiologie (Cole et al., 1995; Tronche et al., 1999). Les nouveau-nés  $GR^{-/-}$  meurent quelques heures après leur naissance, en raison d'une insuffisance respiratoire provenant d'anomalies du développement pulmonaire (Harris and Seckl, 2011; Manwani et al., 2010). Par ailleurs, des anomalies supplémentaires au niveau du foie, de la glande surrénale, du cerveau et de l'axe gonadotrope ont aussi été observées chez ces souris.

Le gène *NR3C1* est composé d'au moins 10 exons (**Figure 19-A**). La région codant la protéine GR est portée par les exons 2 à 9, tandis que l'existence de multiples exons non traduits illustre la complexité de la régulation de l'expression de GR qui pourrait jouer un rôle important dans l'expression tissu-spécifique (Vitellius et al., 2018a). L'exon 2 (1197 pb) contient la séquence codant le domaine N-terminal (NTD) de la protéine GR. L'exon 3 (167 pb) et l'exon 4 (117 pb) contiennent chacun la séquence d'un motif de doigt de zinc et constituent le domaine de liaison à l'ADN (DBD). La région englobant les exons 5 à 9 codent le domaine de liaison du ligand (LBD) et la région non traduite en 3' (Nobukuni et al., 1995).

L'épissage alternatif du transcrit primaire génère les 2 isoformes les plus étudiés,  $GR\alpha$  et  $GR\beta$ , qui diffèrent par leur extrémité C-terminale (15 acides aminés supplémentaires pour  $GR\beta$ ) (**Figure 19-A/B**) (Kino et al., 2009; Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006).  $GR\alpha$  correspond à la forme classique majoritaire qui comprend la fin de l'exon 8 et l'exon  $9\alpha$ , alors que  $GR\beta$  recouvre la fin de l'exon 8 et l'exon  $9\beta$ . Le  $GR\beta$  ne lie pas les GC et ne régule pas directement les gènes sensibles aux GC. Cependant, lorsqu'il est coexprimé avec  $GR\alpha$ ,  $GR\beta$  exerce un effet dominant-négatif sur le  $GR\alpha$  (Patel et al., 2018). Plusieurs isoformes supplémentaires de GR proviennent également de l'épissage alternatif du *NR3C1*. L'isoforme  $GR\gamma$  contient une insertion supplémentaire d'un seul résidu Arginine entre les deux doigts de zinc du DBD et provient d'un épissage alternatif initié dans l'intron séparant l'exon 3 et 4 (Ray et al., 1996). Le  $GR\gamma$  lie les GC et l'ADN avec une capacité similaire à celle de  $GR\alpha$ , mais stimule très faiblement l'expression de gènes sensibles aux GC (Meijsing et al., 2009;



Ray et al., 1996). L'expression de GR $\gamma$  est associée à une résistance aux GC observée dans les carcinomes pulmonaires à petites cellules ou dans les adénomes corticotropes (Rivers et al., 1999). De même, des myélomes résistants aux GC ont permis d'isoler 2 autres variants d'épissage dépourvus de la région liant le ligand, le GR-A et le GR-P (Moalli et al., 1993). Ce GR-P est détecté dans de nombreux tissus et semble être le variant de GR prédominant dans plusieurs cancers résistants aux GC (Krett et al., 1995; de Lange et al., 2001).

De nombreux autres variants protéiques de GR sont produits après initiation alternative de la traduction (**Figure 19-B**) (Lu and Cidlowski, 2005; Yudt and Cidlowski, 2001). L'alignement de séquences dans différentes espèces (humain, primate et rongeur) révèle 8 codons d'initiation (AUG) conservés et dérivés de l'exon 2. En effet, il existe 8 isoformes de GR $\alpha$  avec des régions N-terminales progressivement plus courtes (GR $\alpha$ -A, GR $\alpha$ -B, GR $\alpha$ -C1, GR $\alpha$ -C2, GR $\alpha$ -C3, GR $\alpha$ -D1, GR $\alpha$ -D2 et GR $\alpha$ -D3). Le GR $\alpha$ -A est le récepteur humain classique (777 acides aminés) généré à partir du premier codon d'initiation (Méthionine 1). Ainsi, chacun des variants d'épissage de GR (GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A et GR-P) devrait pouvoir théoriquement conduire aux 8 variants protéiques distincts, dans la mesure où ils possèdent tous le même exon 2. Tous ces variants possèdent une affinité aux GC identique et sont capables d'interagir avec les GRE (Glucocorticoid-Response Element) après leur activation par le ligand (Lu et al., 2007). Néanmoins, elles n'ont pas la même capacité à transactiver les gènes ; l'isoforme GR $\alpha$ -C3 est plus active que la forme GR $\alpha$ -D3. Ces isoformes ont une expression tissu-spécifique ; chez les rongeurs, GR $\alpha$ -C est faiblement exprimé dans le foie alors qu'il est fortement exprimé dans le pancréas, le poumon et le colon. De même, GR $\alpha$ -D est fortement exprimé dans la rate et la vessie, mais faiblement exprimé dans le cœur et le pancréas (Oakley and Cidlowski, 2011a). Ces différents variants se distinguent aussi par leur distribution subcellulaire (cytoplasme *vs* noyau) et par leur profil de régulation de l'expression des gènes (Nicolaidis et al., 2010).

L'expression ubiquiste de GR ainsi que l'existence de très nombreuses isoformes et variants transcriptionnelles et traductionnelles sous-tendent l'existence de régulation fine afin d'assurer une expression spécifique et contrôlée et une action précise dans chacune des cellules cibles.



## **2- La protéine GR, interface entre ligand, ADN, et partenaires transcriptionnels**

Le GR est un récepteur nucléaire classé dans la famille des récepteurs stéroïdiens avec le récepteur des androgènes (AR), le MR, le PR et le ER. Le GR est constitué de 3 domaines fonctionnels et une région charnière (**Figure 19-C**).

### **a. Le domaine N-terminal (NTD)**

En terme de taille et d'homologie de séquence, le NTD représente le domaine le plus variable parmi les récepteurs nucléaires et au sein des différentes espèces de GR (Kumar and Thompson, 1999, 2003). Le NTD contient un domaine de transactivation majeur, appelé fonction d'activation (AF-1 ou Tau 1), situé entre les acides aminés 77 et 262 du GR humain (hGR) (Dieken and Miesfeld, 1992; Godowski et al., 1987). L'AF-1 est riche en acides aminés acides et peut agir de manière constitutive, dite « autonome » en absence du ligand (Hahn, 1993). L'AF-1 joue un rôle important dans l'interaction du récepteur avec les molécules nécessaires à l'initiation de la transcription, comme les co-activateurs, les modulateurs de la chromatine et les acteurs de la machinerie basale de transcription essentiels tels que l'ARN-polymérase II ou la protéine de liaison à TATA (TBP) (Chrousos, 2004; Duma et al., 2006; Nicolaidis et al., 2010).

### **b. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)**

Le DBD, situé au centre de la séquence primaire d'acides aminés du GR $\alpha$  (420-480 de hGR $\alpha$ ), représente la région la plus conservée parmi les récepteurs nucléaires. Ce domaine est caractérisé par la présence de deux doigts de zinc à travers lesquels GR se lie à des séquences d'ADN spécifiques, les GRE situés dans les régions promotrices des gènes cibles (Duma et al., 2006; Zhou and Cidlowski, 2005). Le GRE classique est reconnu spécifiquement grâce à sa séquence palindromique « 5'- G/AGnACAnnnTGTnCT/C -3' » où « n » désigne n'importe quel nucléotide. Chacun des deux doigts de zinc est composé de 4 résidus cystéines coordonnés de manière tétraédrique autour d'un atome de zinc. Les atomes de zinc jouent un rôle structural, chacun portant l'extrémité N-terminale d'une hélice  $\alpha$  amphipathique. Dans le premier doigt de zinc, une séquence peptidique (composée de 3 acides aminés) appelée boîte proximale (Boîte P) permet la reconnaissance spécifique des GRE, alors que dans le deuxième doigt de zinc, une séquence de 5 acide aminés appelée boîte distale (Boîte D) joue un rôle important dans l'homo-dimérisation des GR au niveau des GRE et dans la stabilité du complexe GR-GRE (Luisi et al., 1991).



### **c. La région charnière**

La région charnière ou région D ou « hinge » est la région la moins étudiée du GR. Néanmoins, cette dernière représente une région flexible localisée entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD). Cette région charnière confère une flexibilité structurale aux homo-dimères de GR, permettant ainsi la fixation d'un homo-dimère sur plusieurs GRE (Duma et al., 2006; Zhou and Cidlowski, 2005).

### **d. Le domaine de liaison du ligand (LBD)**

Ce domaine localisé en C-terminal du GR (résidus 527 à 777 du hGR $\alpha$ ), possède plusieurs fonctions : la reconnaissance et l'interaction du ligand, la liaison avec la protéine chaperone Hsp90 (Heat shock protein) et l'interaction avec les co-activateurs et co-répresseurs transcriptionnels. En effet, le LBD contient une fonction d'activation de la transcription ligand-dépendante (AF-2) localisée dans l'extrémité C-terminale (Giguère et al., 1986). L'analyse de la structure cristallographique du LBD montre une structure en sandwich contenant 11 hélices  $\alpha$  (H1, H3-H12) et 4 petits feuillets  $\beta$  anti-parallèles, l'ensemble formant une poche hydrophobe dans laquelle le ligand peut se loger (Bledsoe et al., 2002). Après liaison du ligand, l'hélice H12 change de conformation, passant d'une position « ouverte » à une position « fermée ». Cette nouvelle conformation facilite la fixation des co-activateurs. En revanche, certains antagonistes semblent modifier la position de l'hélice  $\alpha$ -12, créant ainsi une surface défavorable pour la liaison des co-activateurs (Bledsoe et al., 2002).

Enfin, la localisation nucléaire du GR est contrôlée par au moins deux séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) situées dans les régions DBD et LBD du GR.

## **3- Mutations et polymorphismes du GR**

L'hypersensibilité ou la résistance aux GC peuvent être une conséquence de mutations pathologiques du hGR. La résistance aux GC est principalement décrite dans le contexte de mutations perte de fonction de GR. Parmi les 26 mutations « perte de fonction » identifiées à ce jour, 19 sont des mutations faux-sens, 4 correspondent à des décalages du cadre de lecture et les 3 dernières à des mutations non-sens (Vitellius et al., 2018). Toutes ces mutations altèrent la signalisation du GR à différents niveaux. Les signes cliniques des patients porteurs de ces mutations sont également très variables ; ces patients peuvent présenter un hirsutisme, une hypertension artérielle, une hyperplasie surrénalienne et/ou des troubles métaboliques (Vitellius et al., 2018). Une seule mutation gain de fonction du GR a été décrite à ce jour et





conduit à un profil métabolique défavorable chez les patients (adiposité viscérale, diabète de type 2). La caractérisation fonctionnelle de ce mutant GR a montré une augmentation de ses capacités de transactivation (Charmandari et al., 2008).

Certains polymorphismes du GR (ER22/23EK, GR-9 $\beta$ ) sont également associés à une résistance partielle aux GC, résultant d'une réduction de l'activité transcriptionnelle de hGR $\alpha$  (ER22/23EK) ou d'une augmentation de la stabilité des ARNm de hGR $\beta$  (GR-9 $\beta$ ) (Derijk et al., 2001; Oakley and Cidlowski, 2011b). La présence de ces polymorphismes s'accompagne d'un meilleur profil métabolique chez ces patients (van den Akker et al., 2008; Chung et al., 2009; Gross and Cidlowski, 2008). Par contre, d'autres polymorphismes (N363S, BclI) (Cuzzoni et al., 2012) peuvent être associés à une hypersensibilité aux GC (augmentation de l'activité transcriptionnelle de GR) avec un profil métabolique plus défavorable (Gross and Cidlowski, 2008; Vitellius et al., 2018b). Les polymorphismes du GR peuvent ainsi expliquer en partie la variabilité de la réponse aux GC observée chez les individus traités avec des GC de synthèse (Kadmiel and Cidlowski, 2013). Toutefois, les fonctions de reproduction n'ont pas été étudiées chez ces patients.

#### 4- Régulation de l'expression de GR

##### a. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

###### • Régulation transcriptionnelle

La partie 5' non traduite (5'UTR) du gène *NR3C1* présente 3 promoteurs (A, B et C) (Breslin et al., 2001) et peut ainsi produire 5 transcrits différents dont l'expression semble tissu-spécifique (Turner and Muller, 2005). La région promotrice du *NR3C1* contient de très nombreux sites de liaison aux facteurs de transcription comme l'hétérodimère Jun/Fos ou AP-1 (Breslin and Vedeckis, 1996), l'«Activating protein 2» (AP-2) (Nobukuni et al., 1995), le ERR (Wang et al., 2010), l'Egr1 (Weaver et al., 2004), la protéine Nuclear Factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) (Webster et al., 2001), le Yin Yang 1 (YY1) (Breslin and Vedeckis, 1998), la protéine spécifique 1 (Sp1) (Nobukuni et al., 1995), l'« Interferon Regulatory Factor » (IRF) (Nunez et al., 2005) ou le proto-oncogène cMyb (Geng et al., 2008; Vandevyver et al., 2014). Alors que les facteurs de transcription mentionnés ci-dessus sont connus pour augmenter l'expression de GR, les proto-oncogènes c-Ets-1/2 répriment son expression (Vandevyver et al., 2014). La liaison de ces multiples facteurs de transcription associée à l'existence d'un nombre important de variants (par exemple, 11 variants d'épissage décrits à partir de l'exon 1



du hGR $\alpha$ ) (Turner and Muller, 2005) peuvent ainsi contribuer à la réponse tissu-spécifique des GC.

Plusieurs GRE et nGRE (Ramamoorthy and Cidlowski, 2013) ont aussi été identifiés dans la région promotrice du *NR3C1* (Burnstein et al., 1990), suggérant que GR pourrait spécifiquement se lier sur son propre promoteur pour augmenter ou réprimer sa propre expression (Geng et al., 2008). Par conséquent, l'administration chronique de GC pourrait réprimer de manière constitutive l'expression de GR par l'intermédiaire d'une boucle autorégulatrice et ainsi induire une résistance aux GC.

La méthylation sur des îlots CpG du promoteur du GR a également été décrite. La méthylation de la 5'-cytosine d'un dinucléotide CpG est une modification épigénétique associée à une inactivation des gènes par inhibition de la liaison aux facteurs de transcription ou par inactivation de la chromatine (Meaney et al., 2007). Les modifications épigénétiques de la chromatine sont sensibles à l'environnement hôte. Ainsi, la méthylation représente un lien entre l'environnement et l'activité des gènes (Dwi Putra et al., 2017). Chez l'homme et les rongeurs, une absence de soins maternels est associée à de faibles niveaux d'expression de GR dans l'hippocampe et dans le PVN des individus/animaux adultes (Radtke et al., 2015; Witzmann et al., 2012). La faible expression de GR est corrélée à une forte méthylation des sites CpG dans le promoteur de *NR3C1* (CpG 37 chez l'homme et 16 chez le rat), empêchant l'interaction avec le facteur de transcription Egr-1 nécessaire à la transcription du gène (Weaver et al., 2007).

- **Régulation post-transcriptionnelle**

La stabilité de l'ARNm du GR est contrôlée par divers mécanismes. La structure de la région 3' non traduite (3'UTR) régule le positionnement des ribosomes sur l'ARNm et la demi-vie des transcrits de GR (Turner et al., 2014). La présence de nombreux éléments riches en adénylate et uridylylate (ARE) dans la région 3' UTR de l'ARNm du GR pourrait induire une déstabilisation de l'ARNm et réduire l'expression de la protéine GR (Schaaf and Cidlowski, 2002; Vedeckis et al., 1989). Cependant, les mécanismes de dégradation de l'ARNm du GR induite par les ARE ne sont pas entièrement compris.

Plusieurs études ont montré l'importance des micro-ARN (miRNA) dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm du GR. Les miRNA, découverts en 2001, régulent jusqu'à 30% le génome humain (Filipowicz et al., 2008; Lee and Ambros, 2001). Les miRNA sont des



molécules d'ARN monocaténaire non codantes d'environ 21 nucléotides. Ils exercent leurs fonctions par un appariement de base sur les ARNm cibles, préférentiellement en 3'UTR, afin de diminuer la stabilité et la traduction de l'ARNm (Bagga et al., 2005). De nombreux sites de fixation de miRNA ont été retrouvés dans la région 3' UTR du hGR (Vandevyver et al., 2014). Des études réalisées chez la souris ont montré que les miRNA-96, miRNA-101a, miRNA-142-3p et miRNA-433 sont capables de réduire jusqu'à 40% l'expression du GR (Riester et al., 2012; Vandevyver et al., 2014). Les miRNA-18 et miRNA-124a diminuent également l'expression du GR (Wang et al., 2017).

### **b. Régulation post-traductionnelle**

Bien que la spécificité tissulaire soit principalement déterminée au niveau transcriptionnel, chaque isoforme du GR est soumise à diverses modifications post-traductionnelles qui modulent davantage l'activité de ces récepteurs. A ce jour, 15 sites différents de modification post-traductionnelle ont été identifiés : 7 sites de phosphorylation sur des résidus Sérine dans le NTD, 2 sites de sumoylation dans le NTD, 1 site de sumoylation dans le LBD, 1 site d'ubiquitination dans le NTD, 2 sites d'acétylation dans la région charnière, 1 site de nitrosylation dans le LBD et 1 site d'oxydation dans le DBD (**Figure 19-D**) (Duma et al., 2006; Oakley and Cidlowski, 2013b).

#### **• Phosphorylation**

La phosphorylation (P) représente la première modification identifiée de GR $\alpha$ , ce qui l'a rendue au centre de la plupart des études (Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009). Le hGR $\alpha$  est phosphorylé sur les résidus Sérines présents dans la région AF1 du NTD : Ser-113, -134, -141, -203, -211, -226 et -404 (Beck et al., 2009; Kumar and Calhoun, 2008). Ces sites sont conservés chez la souris et le rat. Les principales kinases qui phosphorylent GR $\alpha$  sont les MAPK, les kinases cycline-dépendantes et la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3). Le hGR $\alpha$  présente un niveau basal de phosphorylation (P-Ser-134) et devient hyper-phosphorylé lors de la liaison du ligand (Avenant et al., 2010; Wang et al., 2002). La phosphorylation de GR $\alpha$  module son activité transcriptionnelle (Webster et al., 1997) ; la P-Ser-211 correspond à la forme active de hGR $\alpha$  alors que la P-Ser-226 altère la signalisation du hGR $\alpha$  (Chen et al., 2008; Wang et al., 2002). Ces différentes phosphorylations régulent également l'interaction du GR $\alpha$  avec des co-activateurs différents ; P-Ser-211 avec MED14 (Mediator of RNA polymerase II transcription unit 14) (Chen et al., 2008) et P-Ser-404 avec p300 (Galliher-Beckley et al., 2008). Le profil de phosphorylation de GR conditionne à la fois la nature des



voies de signalisation empruntées (Zhang et al., 2009b) mais aussi sa localisation subcellulaire (P-Ser-203, -226 et -404 favorisent la localisation cytosolique du GR) et sa stabilité (P-Ser-203 et -211 favorisent la dégradation du GR) (Blind and Garabedian, 2008; Ismaili et al., 2005; Wang et al., 2002). D'un autre côté, les protéines phosphatases (PP) telles que la PP1, la PP2A, la PP2B ou la PP5 régulent la déphosphorylation du GR (Vandevyver et al., 2014). Dans le traitement du cancer du sein, l'E2 induit la déphosphorylation de la Ser-211 du hGR $\alpha$  en augmentant l'expression de la PP5 pour diminuer l'activité transcriptionnelle du GR $\alpha$  (Zhang et al., 2009b).

- **Ubiquitination**

L'ubiquitination est une autre modification importante du GR $\alpha$  qui consiste à lier de façon covalente un ou plusieurs groupements ubiquitines sur un résidu Lysine. Cette modification est réalisée en plusieurs étapes (implication des enzymes spécifiques, « activating » E1, « conjugating » E2 et « ligase » E3 enzymes) (Kinyamu et al., 2005) et conduit le récepteur vers une dégradation *via* le protéasome (Wallace and Cidlowski, 2001; Zhou and Cidlowski, 2005).

- **Sumoylation**

La sumoylation des protéines modifie leur fonctionnalité notamment la stabilisation des protéines, leur transport nucléo-cytoplasmique ou la régulation de leur activité transcriptionnelle (recrutement de nouveaux facteurs de transcription, changement de conformation) (Gill, 2005). Cette modification post-transcriptionnelle correspond à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier, SUMO-1 à -4) sur un résidu Lysine (Le Drean et al., 2002). La sumoylation est un processus dynamique qui implique des réactions en plusieurs étapes catalysées par une enzyme spécifique (Ub<sub>c9</sub>) (Schwienhorst et al., 2000). Le motif consensus de sumoylation est défini par la séquence  $\psi$ KXE, dans laquelle  $\psi$  correspond à un acide aminé hydrophobe et K (Lysine) au site de fixation de la protéine SUMO (Lys-277, -293 et -703 pour hGR $\alpha$ ). En fonction du site de sumoylation, l'activité transcriptionnelle de GR $\alpha$  peut être augmentée ou réprimée en fonction du type de co-régulateur recruté (Davies et al., 2008; Druker et al., 2013; Holmstrom et al., 2008; Oakley and Cidlowski, 2013b). Contrairement à l'ubiquitination, la sumoylation est réversible grâce à l'action de protéases spécifiques des SUMO, les Ulp chez la levure ou les SENP chez l'homme (Eckhoff and Dohmen, 2016).





- **Acétylation**

L'activité du GR est aussi modulée par des mécanismes d'acétylation/désacétylation. L'addition d'un groupement acétyl se produit sur les résidus Lysine et implique des protéines qui possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) (Nusinzon and Horvath, 2005). L'acétylation des 2 résidus Lysine localisés dans la région charnière (Lys-494 et -495 du hGR $\alpha$ ) survient en réponse aux GC et permet de moduler l'interaction du GR avec ses co-régulateurs. Ainsi, la désacétylation du GR est nécessaire pour une suppression efficace de l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires (Ito et al., 2006).

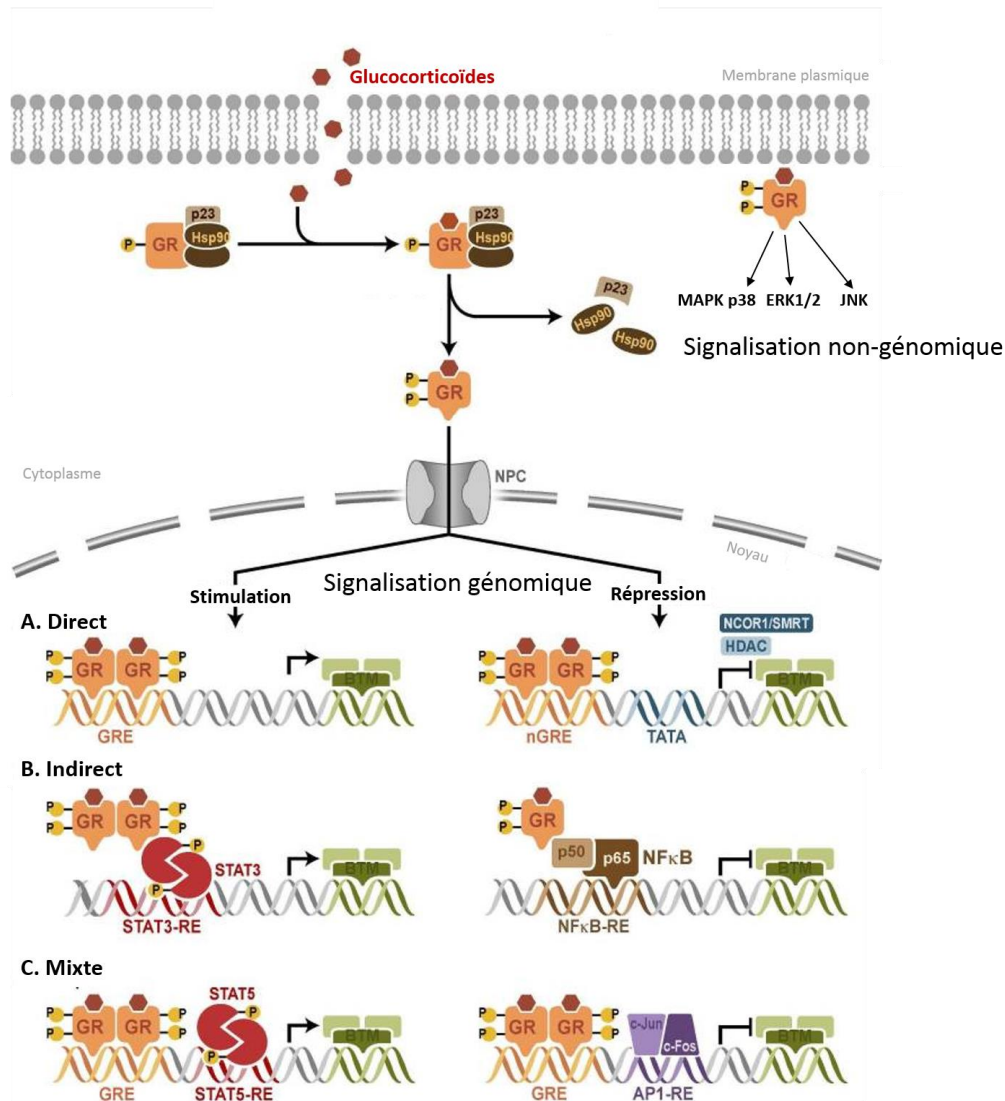
- **Nitrosylation et oxidation**

La nitrosylation affecte également l'activité du GR. Les cystéines contiennent des groupements sulfhydriles qui réagissent avec l'oxyde nitrique (NO) pour former des S-nitrosothiols. La Cys-656 est le site unique de nitrosylation du hGR $\alpha$  (Duma et al., 2004). Néanmoins, l'effet du NO sur l'activité du GR reste controversé (Vandevyver et al., 2014). Des études ont montré que l'activité transcriptionnelle du GR peut être supprimée dans des conditions oxydatives et restaurée en présence d'agents réducteurs (Okamoto et al., 1999). En effet, l'oxydation est étroitement liée à la nitrosylation, avec pour cible commune les groupements sulfhydriles. La Cystéine 481 du hGR semble être une cible pour l'oxydation car sa substitution réduit la sensibilité du GR aux traitements oxydatifs. Il a été démontré que l'oxydation du GR réduit sa capacité à lier le ligand et l'ADN (Vandevyver et al., 2014).

Les modifications post-traductionnelles peuvent donc réguler de multiples aspects des fonctions du GR, fournissant ainsi aux cellules un degré supplémentaire de complexité pour contrôler les réponses variées aux GC.

## 5- Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

Les GC se lient au GR et induisent leurs effets selon 2 mécanismes d'action complémentaires. Le premier est un mécanisme génomique, classique de la signalisation des récepteurs nucléaires, qui permet la régulation de l'expression de gènes cibles alors que le second, induit dans les secondes qui suivent la stimulation, implique une cascade de signalisation initiée à la membrane plasmique (mécanismes non génomiques).



**Figure 20 : Signalisation génomique et non génomique des glucocorticoïdes**

Le GR est initialement cytoplasmique et associé à un complexe multiprotéique (Hsp90, p23...). Après liaison aux GC, le GR subit un changement de conformation (activation) et devient hyper-phosphorylé. Le complexe GC/GR se dissocie du complexe multiprotéique et est transféré dans le compartiment nucléaire où il régule l'expression des gènes *via* des mécanismes génomiques.

Le GR stimule ou réprime la transcription de gènes cibles par (A) liaison directe aux GRE ou (B) en se fixant à d'autres facteurs de transcription sans liaison directe à l'ADN, ou (C) de manière mixte par une liaison directe aux GRE et une interaction avec des facteurs de transcription liés sur des sites voisins.

Les GC sont également connus pour exercer des actions non génomiques rapides *via* l'activation de nombreuses voies de signalisation dont celles des MAPK.

Adapté de Ramamoorthy and Cidlowski, 2016.

NPC : complexe de pores nucléaires ; BTM : machine de transcription basale ; GRE : élément de réponse aux glucocorticoïdes ; nGRE : GRE négatif ; RE : élément de réponse ; STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription ; HDAC : histone désacétylase ; AP-1 : hétérodimère Jun/Fos ; Ncor1/SMRT : Co-régulateurs.

### a. Actions génomiques transcriptionnelles

En l'absence d'hormone, le GR réside principalement dans le cytoplasme associé à un complexe multiprotéique comprenant des protéines chaperonnes (Hsp90, Hsp70 et p23) et des immunophilines (FKBP51 et FKBP52) (Grad and Picard, 2007). Ce complexe multiprotéique maintient le GR dans une conformation qui favorise la liaison du ligand (Ramamoorthy and Cidlowski, 2016). Après liaison des GC, le GR subit un changement de conformation et une phosphorylation par la MAPK p38 sur la Ser-211. Cette phosphorylation produit alors une dissociation du complexe multiprotéique et l'exposition des 2 signaux de localisation nucléaires (NLS1 et NLS2). Le NLS1 interagit avec les importines et les nucléoporines permettant un transfert nucléaire rapide (4 à 6 min). Le GR s'homodimerise ensuite pour se lier aux GRE localisés sur les promoteurs de ses gènes cibles. La séquence consensus du GRE est une séquence palindromique composée de 2 hémi-sites (5'-G/AGnACAnnnTGTnCT/C-3') séparés par un « séquence espaceur » de 3 nucléotides (Oakley and Cidlowski, 2013a; Scheschowitsch et al., 2017). Le GR se lie au GRE en tant que dimère et chaque hémi-site est occupé par un récepteur ; la séquence « espaceur » de 3 nucléotides entre les deux hémi-sites est essentielle à la dimérisation des récepteurs (Freedman, 1992; Meijssing et al., 2009; Watson et al., 2013). La liaison du GR aux GRE induit des changements de conformation du GR permettant un recrutement coordonné de co-régulateurs et de complexes de remodelage de la chromatine pour activer/réprimer la transcription des gènes. Une étude plus récente a identifié un nGRE qui induit une répression des gènes cibles dépendant des GC, en recrutant certains co-répresseurs (NcoR1 (nuclear receptor co-repressor) et SMRT (silencing mediator of retinoic and thyroid receptors)) et certaines histone désacétylases (HDACs) (**Figure 20**) (Surjit et al., 2011). La séquence consensus nGRE est palindromique (5'-CTCC(n)<sub>0-2</sub>GGAGA-3') et possède un nombre variable de nucléotides entre chaque hémi-site (Hudson et al., 2013).

Des études de recrutement par immunoprécipitation de la chromatine ont montré que seule une petite proportion de GRE est occupée par le GR, et que les sites de liaison du GR varient selon les cellules (Burd and Archer, 2013; John et al., 2011). Ces études ont également montré que la majorité des sites de liaison du GR sont situés à distance (>10 Kb) du site d'initiation de la transcription des gènes (Weikum et al., 2017). Pour exemple, les GC stimulent l'expression de la  $\beta$ -arrestine 1 et la répression de la  $\beta$ -arrestine 2 *via* un GRE de l'intron 1 et un nGRE de l'intron 11 des gènes respectifs (Oakley et al., 2012). Une proportion



significative des sites de liaison du GR comprend d'autres sites (intra ou intergénique) que les GRE, et se réalise *via* des interactions avec d'autres facteurs de transcriptions (mécanismes de « tethering ») tels que AP-1 (hétérodimère Jun/Fos), NF-κB ou Stat3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) qui chacun lie une séquence spécifique sur l'ADN (Ronacher et al., 2009; Uhlenhaut et al., 2013) (**Figure 20**). Le GR peut aussi fonctionner de manière mixte, se liant directement à un GRE et s'associant physiquement avec AP-1 ou NF-κB sur un site voisin (**Figure 20**). Ces mécanismes de « tethering » mettant en jeu des interactions avec d'autres facteurs de transcription sont essentiels puisque leur invalidation chez la souris entraîne la léthalité (Tronche et al., 2004).

La concentration des GC influence également la liaison du GR aux GRE ; certains GRE sont occupés à faible concentration en GC (sites hypersensibles) alors que d'autres sites sont occupés à haute concentration en GC. L'accessibilité des sites et le type de co-régulateurs présents dans chacune des cellules gouvernent la sensibilité du GR pour les GRE (Oakley and Cidlowski, 2013b). En effet, il a été démontré que l'activation de l'expression des gènes par les GC est tissu-spécifique et dépend de l'accessibilité du site de liaison aux GR, déterminée par l'état de condensation de la chromatine (John et al., 2011; Reddy et al., 2012). L'état de condensation de la chromatine est finement régulé par un ensemble intriqué d'enzymes, de voies de signalisation et de facteurs de transcription (Rothbart and Strahl, 2014). Des analyses d'hypersensibilité à la DNase I ont montrés que 95% des sites génomiques de liaison du GR sont dans des régions chromatinienne préablement accessibles (John et al., 2011). Le GR interagit avec un grand nombre de co-régulateurs transcriptionnels afin de moduler de façon fine la transcription de ses cibles génomiques. Ces co-régulateurs ont des fonctions diverses : ouverture de la chromatine, recrutement de l'ARN polymérase de type II ou au contraire blocage de l'accès aux sites d'initiation de la transcription. Ainsi, il existe des co-activateurs qui favorisent la transcription d'un gène et des co-répresseurs qui la répriment. Dans les deux cas, l'interaction a lieu majoritairement au niveau du LBD. Plus de 300 co-régulateurs ont été identifiés pour GR. Il existe des protéines, dites structurales/enzymatiques comme la famille des p160 SRC (Steroid Receptor Co-regulator), des protéines modulateurs de la chromatine telles que BRG1 (BRM-associated factor), des Methyltransferases comme CARM1 (co-activator-associated Arg methyltransferase 1), des HDACs ou des protéines « Histone acetyltransferase » (HAT) (ex : CBP (CREB-binding protein) et les PCAF (p300 associated factor)) (Weikum et al., 2017).



## **b. Actions non génomiques**

Un grand nombre d'effets des GC (développés dans la partie II-B-2) ne peut pas être expliqué par le seul mode d'action génomique. Les temps courts (de l'ordre de la seconde ou de la minute) de certaines de leurs activités et l'absence d'effets d'inhibiteurs de la transcription sont en faveur de l'existence d'effets non génomiques (Borski, 2000). Ces effets rapides peuvent aussi être induits par des GC conjugués à la BSA (Bovin Serum Albumine), qui ne peuvent pas accéder au compartiment intracellulaire (Losel et al., 2003; Moenter and Chu, 2012; Stellato, 2004), suggérant donc l'existence d'une signalisation initiée à la membrane plasmique.

Des premières études de microscopie (électronique et à fluorescence) chez les rongeurs ou chez l'homme ont montré la présence d'un GR à la membrane plasmique de neurones d'hippocampe, d'hypothalamus ou d'amygdale (Johnson et al., 2005a; Liposits and Bohn, 1993) ainsi que sur la membrane de lymphomes ou de monocytes (Bartholome et al., 2004; Gametchu et al., 1999). La transfection des monocytes CD14<sup>+</sup> par des ARN interférents dirigés contre le GR entraîne une réduction du niveau d'expression de GR membranaire (réduction de 69%) démontrant que ces deux récepteurs sont bien issus d'un même gène (Strehl et al., 2011). L'adressage membranaire du GR dépend de la présence d'un appareil de Golgi fonctionnel (Bartholome et al., 2004), des radeaux lipidiques (Jain et al., 2005; Wehmeyer et al., 2014) et dans certains cas d'une interaction avec la cavéoline 1 (Matthews et al., 2008; Peffer et al., 2014; Spies et al., 2007). La forme membranaire du GR est faiblement abondante (5 à 10% du GR dans la fraction membranaire de kératinocytes et d'hypothalamus (Deng et al., 2015a; Nahar et al., 2016; Stojadinovic et al., 2013)), et possède une capacité de liaison aux protéines chaperonnes et à l'ADN (Powell et al., 1999) ainsi qu'un profil de phosphorylation, identiques à ceux du GR cytosolique (Vernocchi et al., 2013). Par ailleurs, des études de liaison sur des cellules hypophysaires corticotropes AtT20 ont montré que le GR membranaire (GRm) possède des constantes de liaison plus faibles que le GR intracellulaire (GRi) ( $K_d = 180$  nM pour le GRm vs  $K_d = 5$  nM pour le GRi) (Maier et al., 2005). Néanmoins, l'affinité du GRm varie beaucoup en fonction des cellules :  $K_d = 32$  nM sur des membranes hypothalamiques de rat (Nahar et al., 2016) ;  $K_d = 400$  nM sur des membranes de foie de rat (Quelle et al., 1988) ou  $K_d = 239$  nM sur des lymphocytes humains (Gametchu et al., 1991). Ces données suggèrent donc qu'en fonction des circonstances physiologique ou pathologique, les GC pourraient agir de façon tissu-spécifique grâce aux

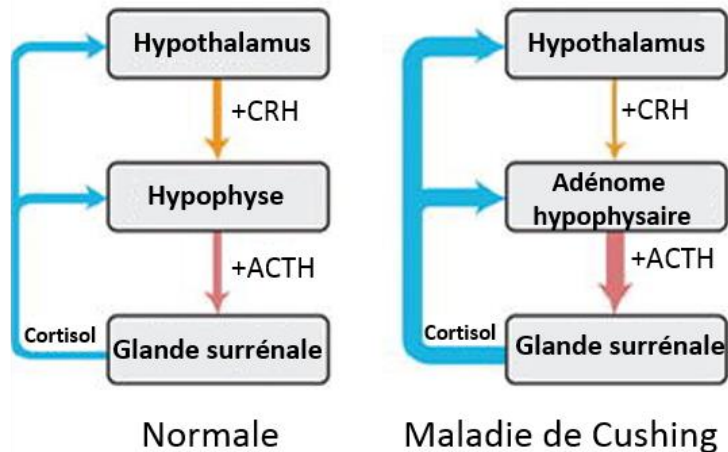




variations des niveaux d'expression membranaire et d'affinité du GR $\alpha$ , présent dans chacune des cellules.

De nombreuses voies de signalisation stimulées par les GC et initiées à la membrane plasmique ont été décrites sur de multiples tissus et semblent cellule-spécifique. Dans les neurones de l'hippocampe, les GC inhibent très rapidement (< 10 secondes) l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type N et L (French-Mullen, 1995) et stimulent (dans les 15 minutes) la voie de signalisation PKC/MAPK p38/JNK (Qi et al., 2005). Les GC sont aussi capables d'activer la dépolymérisation de l'actine dans les cellules endométriales dès 15 minutes de traitement, en diminuant la quantité d'AMP<sub>c</sub> intracellulaire (Koukouritaki et al., 1996). Ces stéroïdes inhibent également la sécrétion de chlore des cellules épithéliales bronchiques en réduisant les concentrations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Urbach et al., 2002). En revanche, dans des cellules endothéliales vasculaires ou des cellules épithéliales de poumon, les GC activent la voie PI3K/Akt, à l'origine de la production du nitric oxyde (NO) (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Matthews et al., 2008). Les GC sont aussi largement décrits pour réguler la voie de signalisation des MAPK (en particulier ERK1/2) (Stahn and Buttgerit, 2008); l'activation de cette voie serait impliquée dans les processus de mémorisation post-stress (Gutiérrez-Mecinas et al., 2011), dans l'inhibition paracrine de la sécrétion d'ACTH (Solito et al., 2003) ou dans la prolifération des précurseurs neuronaux (Samarasinghe et al., 2011), alors que son inhibition participerait aux effets anti-inflammatoires des GC (Ayroldi et al., 2012; Löwenberg et al., 2005). Les GC stimulent également la voie des capsases pour induire l'apoptose des thymocytes (Machetti et al., Blood, 2003). Par ailleurs, les GC peuvent aussi réguler l'activité d'autres récepteurs ou canaux tels que le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Croxtall et al., 2000) ou les récepteurs du GABA<sub>A</sub> (Teng et al., 2013) et du NMDA (acide N-méthyl D-aspartique) (Zhang et al., 2012).

Ainsi, durant les quelques minutes qui suivent le stress, les concentrations en GC peuvent augmenter jusqu'à 100 fois ; il est donc possible que pour maintenir l'homéostasie, un système d'adaptation ayant recours à ces signalisations rapides puisse permettre une réponse cellulaire immédiate et adaptée.



**Figure 21 : L'axe corticotrope chez des individus sains ou chez des patients atteints de la maladie de Cushing**

Gauche: Dans des conditions physiologiques normales, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus libère le CRH (flèches orange) qui agit sur l'hypophyse pour induire la sécrétion d'ACTH. Cette dernière stimule ensuite le cortex surrénalien (flèche rouge) pour synthétiser et libérer les GC, comme le cortisol. Le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif (flèches bleues) sur l'hypothalamus et l'hypophyse en se liant au GR. Il réduit ainsi la production et la sécrétion de CRH et d'ACTH.

CRH : Corticotropin-Releasing Hormone ; ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone.

Droite: Dans des conditions physiopathologiques associées à la maladie de Cushing, un adénome basophile monoclonal bénin de la glande hypophysaire antérieure sécrète continuellement des taux excessifs d'ACTH (grande flèche rouge). L'ACTH circulante stimule la surproduction de cortisol (hypercorticisme) à partir des corticosurrénales (grandes flèches bleues) qui entraîne une réduction de la production et de la libération de CRH par l'hypothalamus sans modifier les taux d'ACTH circulants.

Adapté de Lonser et al., 2017.

### **III- Impact de l'hypercorticisme sur l'activité de l'axe gonadotrope**

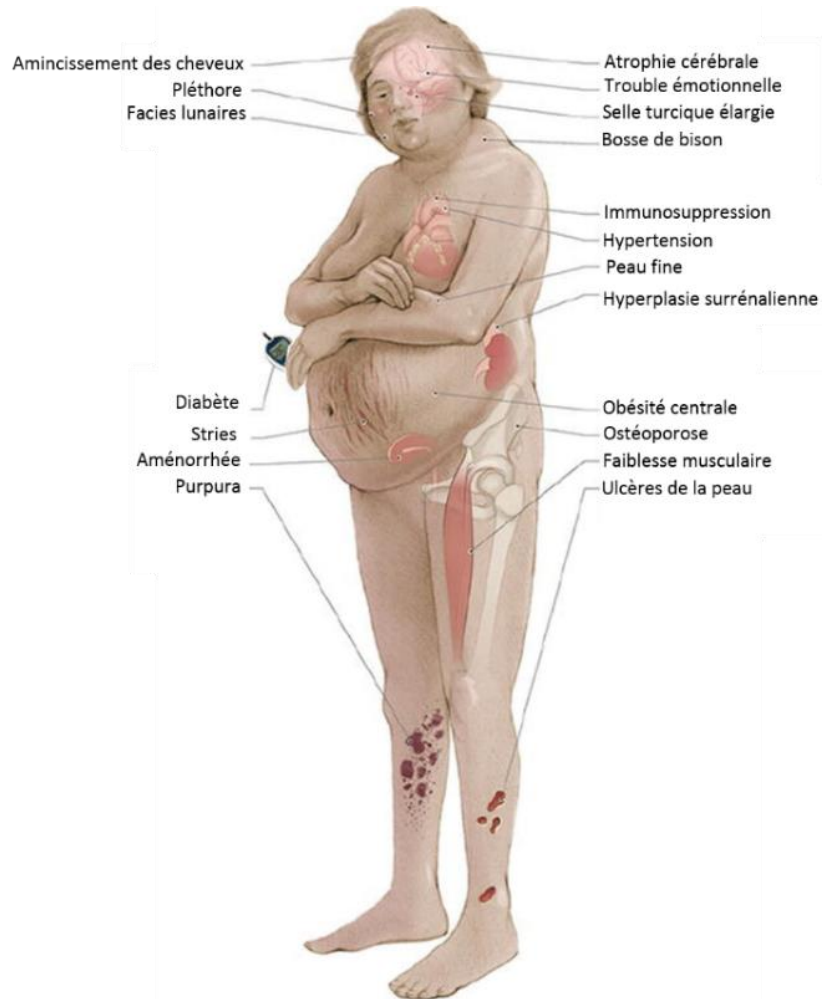
#### **A- Etiologie de l'hypercorticisme**

Il existe des conditions cliniques chez l'homme et des conditions d'élevage chez de nombreux mammifères (rongeurs, brebis) dans lesquelles les concentrations des GC sont pathologiquement élevées, et sont associées à un dysfonctionnement de la reproduction (Allsworth et al., 2007; Berga and Loucks, 2005; Ferin, 1999; Joseph and Whirledge, 2017). Chez l'homme, ces maladies comprennent le syndrome de Cushing (Bertagna et al., 2009; Lonser et al., 2017), la maladie de Cushing (Lonser et al., 2017), l'obésité (Berga et al., 1997), le syndrome métabolique (Berga et al., 1997), l'aménorrhée hypothalamique fonctionnelle (Sapolsky et al., 2011), l'hyperthyroïdie (Breen and Karsch, 2004), le diabète de type II (Di Dalmazi et al., 2012), l'hypertension (Baid and Nieman, 2004) et la dépression sévère (Shishkina and Dygalo, 2017). Chez les animaux mais aussi chez l'homme, le stress chronique est aussi responsable de troubles de la reproduction (Joseph and Whirledge, 2017).

J'ai choisi de détailler les effets du syndrome de Cushing et du stress pour démontrer les effets néfastes de l'hypercorticisme sur la reproduction.

##### **1- Le Syndrome de Cushing**

Le syndrome de Cushing est une pathologie s'accompagnant d'un hypercorticisme non freinable. Dans la majorité des cas, les causes sont iatrogènes et font suite à des traitements par des GC de maladies inflammatoires. Les autres cas de syndrome de Cushing sont beaucoup plus rares et regroupent la maladie de Cushing avec un adénome hypophysaire ou avec une sécrétion d'ACTH ectopique (pulmonaire-digestive). La maladie de Cushing est la cause la plus fréquente du syndrome de Cushing spontané, survenant chez 60 à 70% des patients de Cushing. Il résulte d'une hypersécrétion d'ACTH par un adénome corticotrope hypophysaire, qui entraîne une sécrétion excessive de GC par les glandes surrénales (Gicquel et al., 1992). Les GC qui circulent en excès, perturbent la variation diurne physiologique normale des GC et exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRH hypothalamique. Cependant, l'adénome lui-même est relativement résistant à l'inhibition des GC endogènes circulants (**Figure 21**). Par conséquent, la maladie de Cushing est associée à une sécrétion réduite de CRH et à des niveaux élevés d'ACTH (Lonser et al., 2017). Le syndrome d'ACTH ectopique est quant à lui responsable de 5 à 10% des cas de syndrome de Cushing spontané. Il est causé par une grande variété de tumeurs non hypophysaires sécrétant l'ACTH. Environ 20



**Figure 22 : Les caractéristiques cliniques du Syndrome de Cushing**

Les patients atteints d'un syndrome de Cushing présentent d'importants signes cliniques chez l'adulte. Les signes et les symptômes courants comprennent le gain de poids, l'obésité, le diabète, la pléthore faciale, le faciès lunaire, l'hirsutisme et l'aménorrhée.

Adapté de Lonser et al., 2017.

à 30% des syndromes spontanés de Cushing sont indépendants de l'ACTH et sont causés par des tumeurs corticosurrénales primaires (Orth, 1995).

Une exposition excessive et prolongée aux GC entraîne une symptomatologie multi-systémique. Les caractéristiques cliniques les plus courantes chez les adultes comprennent l'obésité, le diabète, l'hypertension, le faciès lunaire, la pléthore faciale et l'aménorrhée secondaire (**Figure 22**) (Kanter et al., 2005; Lonser et al., 2013, 2017; Unuane et al., 2011; Whirledge and Cidlowski, 2017b). Des troubles psychiatriques (dépression, anxiété, crises de panique, idées suicidaires et paranoïa) et des troubles neurocognitifs (troubles de l'apprentissage et déficits de la mémoire) peuvent également être associés à la maladie de Cushing (Kelly, 1996; Lahera Vargas and da Costa, 2009; Newell-Price et al., 2006).

L'ensemble des effets de l'hypercorticisme chez des patients non traités entraîne un surmortalité (2,5 fois supérieure à la normale) (Graversen et al., 2012; Lindholm et al., 2001; Yaneva et al., 2013). Néanmoins, le taux de mortalité est considérablement réduit avec un traitement efficace, même si ces patients présentent toujours un risque plus élevé de diabète, d'obésité et de dyslipidémie par rapport aux individus témoins (Clayton et al., 2011; Hammer et al., 2004).

## 2- Le stress chronique

Le stress est généralement défini comme un état d'homéostasie perturbée. Les facteurs de stress sont nombreux et variés et peuvent inclure des traumatismes, des réactions immunitaires et inflammatoires, une dérégulation métabolique et des pressions psychologiques ou même simplement faire face aux épreuves de la vie quotidienne. Lors d'un stress aigu, l'organisme mobilise deux systèmes distincts : d'une part, le système nerveux sympathique et la médullosurrénale, et d'autre part l'axe corticotrope qui augmente la sécrétion de GC. La réponse au stress par les GC combine de nombreux effets métaboliques (augmentation de la néoglucogenèse, de la lipolyse, inhibition de la synthèse protéique, etc...) dans le but de préserver l'existence de l'individu plutôt que le maintien de l'espèce. Si le stress devient chronique, les conséquences délétères des GC apparaissent (diabète, hypertension (Ayada et al., 2015; Goodwin and Geller, 2012)) avec également un impact au niveau du système nerveux central (catatonie, diminution de la concentration, insomnie) (Ciriaco et al., 2013) et au niveau de l'axe de reproduction.



## **B- Effets de l'hypercorticisme sur l'axe gonadotrope**

Chez la femme, des facteurs de stress physiques et émotionnels sont associés à des perturbations des cycles menstruels (Allsworth et al., 2007; Berga and Loucks, 2005; Ferin, 1999) et du déclenchement pubertaire (Unuane et al., 2011). Ils sont aussi associés à des délais plus longs de chance de grossesse et augmentent le risque d'infertilité (Lynch et al., 2014). Récemment, une étude clinique sur 400 femmes a montré que le stress pendant la période ovulatoire (concentrations élevées d'E2) entraîne une réduction jusqu'à 46% de la probabilité de concevoir (Akhter et al., 2016). De même, 80% des patientes atteintes de syndrome de Cushing sont susceptibles de présenter une aménorrhée secondaire due à l'hypercorticisme et non à une hyperandrogénie potentielle (Kaltsas et al., 2000; Lado-Abeal et al., 1998; Unuane et al., 2011; Whirledge and Cidlowski, 2017b). Dans de nombreuses espèces animales sensibles au stress (brebis, rongeurs), différentes études ont montré que le stress entraînait une suppression de la sécrétion des gonadotropines hypophysaires. Le stress par immobilisation ou isolement chez la brebis supprime le comportement sexuel et réduit leur fertilité (Dobson et al., 2012). Chez les rongeurs, l'administration de fortes concentrations de GC, mimant les concentrations atteintes au cours du stress, perturbe les cycles œstriens et bloque l'apparition du pic préovulatoire de GnRH/LH (Luo et al., 2016). L'hypercorticisme, induit par le stress (isolement, transport, contention) chez la souris ou la brebis, entraîne des dysfonctionnements de la fonction de reproduction (perturbation de la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH et de l'ovulation) (Wagenmaker and Moenter, 2017) et du comportement sexuel (disparition de la phase d'œstrus, comportement d'évitement) (Ralph et al., 2016) en agissant sur l'ensemble de l'axe gonadotrope. Néanmoins, d'après la littérature, la cible privilégiée des GC serait l'hypophyse (Joseph and Whirledge, 2017).

Dans cette partie nous détaillerons les effets de l'hypercorticisme sur la sécrétion du couple GnRH/LH indispensable à l'ovulation. Il apparaît clair que les GC peuvent cibler à la fois l'hypothalamus, l'hypophyse et les ovaires pour exercer leurs effets sur la reproduction.

### **1- Effets sur l'hypothalamus**

L'inhibition de la synthèse et de la sécrétion de la GnRH hypothalamique induite par un hypercorticisme a été démontrée dans plusieurs espèces (Ciechanowska et al., 2016; Lopes et al., 2012; Ralph et al., 2016; Shahjahan et al., 2017; Wagenmaker et al., 2009a). Malgré une





expression très large de GR, son expression dans les neurones à GnRH reste très controversée (Cintra et al., 1991; Dufourny and Skinner, 2002). A l'heure actuelle, la cible privilégiée des GC serait en amont des neurones à GnRH et concernerait une population restreinte de neurones produisant des neuropeptides régulateurs de la GnRH, tels que la Kiss1 et le RFRP-3. Ces neurones expriment le GR, ainsi que les récepteurs des stéroïdes sexuels (ER $\alpha$  et PRA/B) et peuvent ainsi répondre aux rétrocontrôles des stéroïdes gonadiques (Lehman et al., 1993).

Plusieurs expériences réalisées chez la brebis ovariectomisée ont montré que l'isolement, le confinement, ou l'exposition à des cris de prédateurs (aboiements) inhibent l'amplitude des pulses de GnRH mesurée dans le sang porte hypophysaire (Wagenmaker et al., 2009b). De même, la perfusion de fortes concentrations de cortisol (0,375 mg/kg/h dosé à 150 ng/ml dans le sang) à des brebis ovariectomisées entraîne une chute de l'amplitude et/ou de la fréquence des pulses du couple GnRH/LH (Breen and Karsch, 2004; Oakley et al., 2009). Le stress agirait durant la phase folliculaire pour bloquer ou décaler l'apparition du pic préovulatoire de LH chez la brebis (Breen et al., 2005; Oakley et al., 2009; Wagenmaker et al., 2009c). Des études réalisées chez la souris ont aussi démontré que l'implantation de pompes délivrant de façon continue de la corticostérone (pendant 15 jours) perturbe le cycle œstrien, qui reste alors bloqué au stade diœstrus (Luo et al., 2016). Chez ces souris, l'exposition aux GC inhibe l'expression de *Kiss1* et de son récepteur (Kinsey-Jones et al., 2009) ainsi que l'activité des neurones à Kiss1 (mesurée par *c-fos*) de l'AVPV (Luo et al., 2016). Les GC peuvent donc bloquer l'ovulation en agissant sur les neurones à Kiss1 de l'AVPV durant la période préovulatoire (Breen and Karsch, 2006).

Chez les rongeurs, un stress d'immobilisation entraîne également une augmentation de l'expression du RFRP-3 hypothalamique, parallèlement à une diminution de la sécrétion de LH (Geraghty et al., 2015; Kirby et al., 2009). Cet effet inhibiteur est aboli lorsque les animaux sont surrénalectomisés ou que l'expression de RFRP-3 dans le DRM est réprimée (utilisation des vecteurs viraux conditionnels) (Geraghty et al., 2015; Kirby et al., 2009). Des brebis ovariectomisées exposées à différents types de stress présentent également une augmentation de l'expression de RFRP-3 dans le DRM et du nombre de contacts synaptiques avec les neurones à GnRH du POA (Clarke et al., 2016).



## 2- Effets sur l'hypophyse

Au niveau hypophysaire, le GR est exprimé dans les cellules gonadotropes, rendant possible une action directe des GC (Kononen et al., 1993; Teitsma et al., 1999). Dans des cultures primaires hypophysaires bovines ou porcines, les GC inhibent la sécrétion de la LH induite par la GnRH (Li, 1994; Padmanabhan et al., 1983). Des études réalisées chez la brebis ont démontré une action directe des GC sur la cellule gonadotrope (Wagenmaker et al., 2009a; Wagenmaker et al., 2009b) en diminuant leur réceptivité à la GnRH, sans modifier le nombre de R-GnRH (Breen et al., 2004, 2007, 2008). Certains mécanismes d'action des GC sur l'expression et la sécrétion de la LH ont été élucidés sur la lignée gonadotrope hypophysaire L $\beta$ T2 ; les GC interfèreraient avec 1/ les effets génomiques Egr1-dépendants induits par la GnRH sur l'expression de *Lh $\beta$*  (Breen et al., 2012), et 2/ avec les signalisations dépendantes de la PKC et de l'AMP<sub>c</sub> induites par la GnRH (Breen and Mellon, 2014). Néanmoins, en ce qui concerne *Fsh $\beta$*  et *Gnrhr*, les GC augmenteraient leur expression (Ringstrom and Schwartz, 1987; Thackray et al., 2006) *via* une interaction de GR avec SRC-1 (Steroid receptor co-activator 1) et leur liaison sur des séquences cibles AP-1, présentes sur leurs promoteurs (Breen and Mellon, 2014). L'expression de *Cga* est, quant à elle, régulée positivement ou négativement en fonction de la durée d'exposition aux GC (Breen and Mellon, 2014).

Les GC pourraient également avoir des effets paracrines sur les cellules gonadotropes en agissant sur les cellules adjacentes. Les cellules corticotropes ainsi que les cellules folliculo-stellaires possèdent du GR (Solito et al., 2003) et pourraient sécréter certains facteurs régulant l'activité de la cellule gonadotrope.

## 3- Effets sur les fonctions ovariennes

En plus des effets sur la cyclicité ovarienne contrôlée par l'hypothalamus et l'hypophyse, les GC agissent directement sur l'ovaire. Le GR est exprimé dans les cellules de la granulosa (Schreiber et al., 1982) et les cellules lutéales du corps jaune (Whirledge and Cidlowski, 2013). Ces cellules expriment également les 2 enzymes qui métabolisent les GC (11 $\beta$ HSD)-1 et 11 $\beta$ HSD-2) ; ces enzymes peuvent donc moduler l'activité des GC dans les follicules (Michael et al., 1993). L'exposition à de fortes concentrations de GC exogènes induit l'activation du système Fas-FasL qui entraîne l'apoptose des cellules de granulosa chez la ratte (Whirledge and Cidlowski, 2013a; Yuan et al., 2016). L'hypercorticisme perturbe



également la stéroïdogenèse ovarienne (Whirledge and Cidlowski, 2010) et altère la qualité des ovocytes (Whirledge and Cidlowski, 2013a). Le degré d'atteinte de l'ovocyte dépend de la sévérité du stress, avec des effets plus marqués après un stress de longue durée (Gao et al., 2016). L'effet des GC sur les ovocytes humains a également été évalué (Jimena et al., 1992) et montre un impact négatif des GC sur le succès de la fécondation *in vitro* (Jimena et al., 1992; Michael et al., 1999), suggérant que l'hypercorticisme influence négativement la capacité d'un ovocyte à être fécondé. Enfin, les GC diminuent la réceptivité des cellules de la granulosa aux hormones gonadotropes affectant la production d'E2 indispensable au rétrocontrôle positif nécessaire à l'ovulation (Hsueh and Erickson, 1978; Huang and Shirley Li, 2001; Michael et al., 1993).

L'ensemble de ces données montrent que l'hypercorticisme régule négativement l'activité de l'axe gonadotrope à plusieurs niveaux, perturbant le cycle œstrien responsable des troubles de la fertilité. Néanmoins, le stress fait aussi intervenir les catécholamines ou des opioïdes endogènes qui peuvent également jouer un rôle régulateur important sur l'activité de l'axe gonadotrope (Tilbrook et al., 2002). La nature du stress ainsi que la durée d'exposition au stress sont autant d'éléments qui vont réguler de façon différentielle la réponse au stress.









## **OBJECTIFS**



Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, l'activité de l'axe gonadotrope est finement régulée afin de maintenir l'équilibre du système de reproduction. Néanmoins, différents facteurs dont l'hypercorticisme pathologique (Syndrome de Cushing) ou celui lié au stress peuvent conduire à des troubles de fertilité. L'action des GC sur l'axe de gonadotrope est complexe et reste partiellement comprise. Au sein de l'organisme, les GC exercent à la fois des effets génomiques et non génomiques dont la nature et les mécanismes varient en fonction des cellules cibles. Au niveau de l'axe gonadotrope, de nombreuses données montrent que l'excès de GC agit indirectement sur les neurones à GnRH hypothalamiques, principalement *via* les neurones à Kiss1, et directement sur l'hypophyse pour réduire la sécrétion des gonadotropines. Les GC agissent tout au long du cycle œstrien/menstruel pour freiner la production d'E2 par les follicules ovariens nécessaire au rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ainsi, les GC bloquent ou décalent l'apparition du pic préovulatoire de GnRH/LH essentiel l'ovulation. Les mécanismes moléculaires d'action des GC au niveau hypothalamo-hypophysaire restent encore fragmentaires. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, j'ai voulu préciser et approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'action des GC sur ces 2 structures. Pour cela, mon projet de thèse s'est orienté selon deux axes :

- 1) Etudier les effets des GC sur l'expression de neurorégulateurs hypothalamiques de la GnRH tels que la Dyn A ou le RFRP-3. Nous avons cherché à mieux comprendre comment les GC pouvaient réguler la sécrétion de la GnRH, en particulier celle de Kiss1 dont le rôle est essentiel à la genèse du pic préovulatoire.
- 2) Etudier les effets rapides peu connus des GC sur la sécrétion de LH au niveau des cellules gonadotropes hypophysaires. Nous avons recherché l'existence d'un GR membranaire responsable d'une signalisation non génomique en lien avec la sécrétion de LH.







## **RESULTATS**





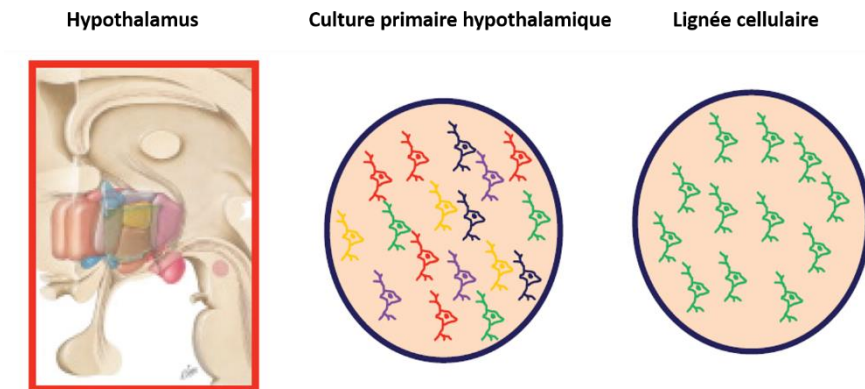
**1<sup>ère</sup> partie :**

**Etude des effets des glucocorticoïdes sur l'expression  
de différents neurorégulateurs de la GnRH au cours  
du cycle œstrien**



## I-Contexte et objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'hypercorticisme est souvent associé à des troubles de la fertilité. Les GC peuvent agir à tous les niveaux de l'axe gonadotrope (hypothalamus-hypophyse-ovaire) et, en particulier, réduire la sécrétion d'un acteur capital, la GnRH. L'expression du GR dans les neurones à GnRH étant controversée (Cintra et al., 1991; Dufourny and Skinner, 2002), les GC exerceraient leurs effets par l'intermédiaire d'une population restreinte de neurones hypothalamiques produisant des molécules régulatrices de la GnRH ; la Kiss1 et la NKB pour leurs effets activateurs, ou la Dyn A et le RFRP-3 pour leurs effets inhibiteurs. Les neurones à Kiss1 sont situés dans deux régions distinctes mais probablement interconnectées de l'hypothalamus chez les rongeurs : l'AVPV et l'ARC (Brock and Bakker, 2013; Yeo et al., 2016). L'ARC, contenant les neurones KNDy, est une structure où s'exercent les rétrocontrôles négatifs des stéroïdes sexuels sur la libération de la GnRH, alors que l'AVPV possède des neurones à Kiss1 réceptifs aux rétrocontrôles positifs observés à la fin de la phase folliculaire (Pinilla et al., 2012b; Skorupskaite et al., 2014b). La Dyn A sert d'intermédiaire à la progestérone pour exercer son rétrocontrôle négatif sur la libération de la GnRH (Goodman et al., 2004; Mostari et al., 2013). La Dyn A agit directement sur les neurones à GnRH et/ou indirectement *via* les neurones KNDy qui expriment le récepteur de la Dyn A (KOR) (Weems et al., 2016). Il a été montré qu'un excès de corticostérone bloque le cycle œstrien de souris au stade diœstrus en réduisant 1) l'activité des neurones à Kiss1 de l'AVPV (Luo et al., 2016), 2) l'expression de son récepteur (Kinsey-Jones et al., 2009), empêchant ainsi l'induction préovulatoire de GnRH et de LH. Chez la brebis, l'injection de cortisol réduit la fréquence des pulses de LH pendant toute la phase folliculaire conduisant à un blocage ou un décalage de l'apparition du pic préovulatoire de LH (Breen et al., 2005). L'importance de l'E2 dans la réceptivité hypothalamique aux GC a également été montré chez la brebis ovariectomisée dont la pulsativité de la GnRH reste inchangée en présence de cortisol (Breen and Karsch, 2004; Oakley et al., 2009). L'ensemble de ces données suggèrent que la présence d'E2 est essentielle à l'action des GC au niveau de l'hypothalamus et que les GC peuvent bloquer l'ovulation en agissant sur les neurones à Kiss1. Toutefois, l'inactivation spécifique du GR dans les neurones à Kiss1 empêche la diminution de l'expression de Kiss1 induite lors d'un stress aigu, mais ne bloque pas complètement l'axe gonadotrope, suggérant qu'il existe d'autres neuropeptides qui puissent aussi être des intermédiaires aux effets des GC (Whirledge and Cidlowski, 2013b).



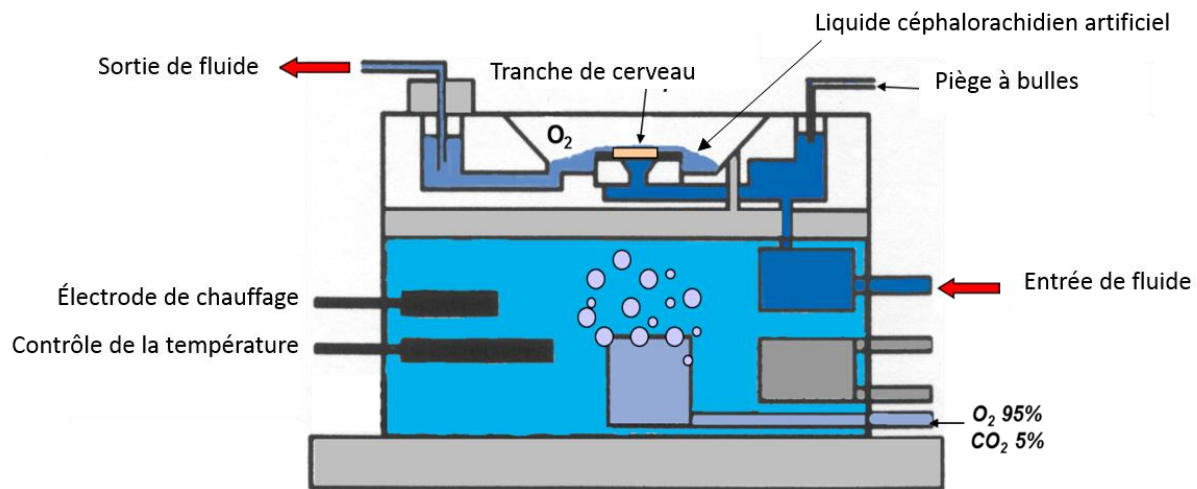
### **Figure 23 : Les avantages des modèles cellulaires hypothalamiques**

La complexité des circuits neuronaux au sein de l'hypothalamus crée un environnement défavorable pour l'étude des régulations directes des neuropeptides et des événements cellulaires par les neuromodulateurs. La lignée cellulaire immortalisée bien qu'imparfaite a l'avantage d'être homogène.

De façon intéressante, l'administration exogène de cortisol à des brebis ovariectomisées augmente le nombre des neurones à Dyn A dans l'ARC (Oakley et al., 2009). De même, l'induction d'un stress par immobilisation chez le rongeur entraîne une augmentation des concentrations de Dyn A dans l'hypothalamus (Nabeshima et al., 1992) ou de son immunoréactivité dans l'hippocampe (Shirayama et al., 2004). Par conséquent, la Dyn A pourrait être un bon candidat pour servir de relais direct ou indirect (*via* les neurones KNDy) aux effets des GC sur la sécrétion de la GnRH.

La première partie de mon travail de thèse a donc eu pour objectif, **d'étudier les effets et les mécanismes d'action des GC sur l'expression de la Dyn A en fonction du statut œstrogénique**. Pour répondre à ces questions, nous avons, d'une part, utilisé un modèle cellulaire hypothalamique classique, et, d'autre part, mis en place un protocole expérimental sur un modèle animal, en collaboration avec l'équipe du Dr S. Mhaouty-Kodja (UMR 8246 UPMC, Paris).

Modèle *in vitro* : La complexité des circuits neuronaux de l'hypothalamus rend particulièrement difficile l'étude de la régulation directe des neuropeptides et les événements cellulaires induits par des neuromodulateurs (Everitt and Hökfelt, 1990). Les cultures primaires hypothalamiques non transformées sont difficiles à maintenir et à utiliser, d'autant qu'elles sont constituées d'une population cellulaire très hétérogène. C'est pourquoi, les lignées cellulaires fournissent une population homogène de cellules qui permettent l'étude de la régulation directe des voies de signalisation et des événements moléculaires (**Figure 23**) (Mayer et al., 2009). Dans le cas de notre étude, il n'existe pas de modèle cellulaire bien établie pour étudier les neurones à Kiss1. Le modèle cellulaire hypothalamique le plus caractérisé qui exprime *Kiss1* (Li et al., 2007; Terasaka et al., 2013; Wen et al., 2012) sont les cellules GT1-7, développées par P. Mellon (Mellon et al., 1990). Ces cellules expriment les ER (Roy et al., 1999) et nous avons vérifié qu'elles expriment également le GR, le gène précurseur de la Dyn A (*Pdyn*), la NKB et le RFRP. Ce modèle cellulaire, bien qu'imparfait, est donc un bon outil pour étudier le rôle des GC sur l'expression des neuromodulateurs dont la Dyn A. Pour mimer le statut œstrogénique du cycle ovarien et les variations associées de concentrations œstrogéniques et les rétrocontrôles (négatifs (faibles concentrations d'E2) et positifs (fortes concentrations d'E2)) qui prévalent pendant les phases folliculaire et lutéale, nous avons prétraité les cellules GT1-7 avec de l'E2 à 2 concentrations différentes :  $10^{-10}$  M



**Figure 24 : Schéma représentatif du système d'incubation des tranches de cerveaux de souris**

Des souris femelles adultes ovariectomisées ont été utilisées. Des coupes coronales de cerveaux (400  $\mu\text{m}$ ) sélectionnées pour comprendre les régions de l'AVPV et de l'ARC sont transférées dans un système d'incubation oxygénée et thermorégulée. Après une heure d'équilibration dans un liquide céphalorachidien artificiel, les coupes sont exposées à des traitements par des GC (dexaméthasone).

(phase lutéale et début de la phase folliculaire) ou  $10^{-7}$  M (fin de la phase folliculaire) (Chu et al., 2009).

Modèle *in vivo* : Pour se rapprocher de la physiologie animale et confirmer les résultats que nous avons obtenus *in vitro*, nous avons établi un protocole expérimental sur des souris femelles adultes cyclées. Ainsi, nous avons placé un implant diffusant de façon continue de fortes doses d'E2 (durant 3 semaines) à des souris ovariectomisées puis prélevé leurs cerveaux afin de réaliser des tranches tissulaires traitées ou non par les GC (6 heures) à l'aide d'un système d'incubation thermorégulée et oxygénée (**Figure 24**).

Les principaux résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans l'Article 1 (Ayrout et al., 2018).



**Article 1:**

**Glucocorticoids stimulate hypothalamic dynorphin expression accounting for stress-induced impairment of GnRH secretion during preovulatory period**

**Mohsen Ayrou<sup>1</sup>, Florian Le Billan<sup>1</sup>, Valérie Grange-Messent<sup>2</sup>, Sakina Mhaouty-Kodja<sup>2</sup>, Marc Lombès<sup>1</sup> and Stéphanie Chauvin<sup>1,\*</sup>**

**GLUCOCORTICOIDS STIMULATE HYPOTHALAMIC DYNORPHIN EXPRESSION  
ACCOUNTING FOR STRESS-INDUCED IMPAIRMENT OF GnRH SECRETION DURING  
PREOVULATORY PERIOD**

**Mohsen Ayrout<sup>1</sup>, Florian Le Billan<sup>1</sup>, Valérie Grange-Messent<sup>2</sup>, Sakina Mhaouty-Kodja<sup>2</sup>, Marc Lombès<sup>1</sup> and Stéphanie Chauvin<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>INSERM UMR\_S1185, Fac Med Paris Sud, Université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin Bicêtre, France

<sup>2</sup>Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Neuroscience Paris Seine – Institut de Biologie Paris Seine, 75005 Paris, France.

\*Corresponding author: Stéphanie CHAUVIN

INSERM U1185 - Faculté de Médecine Paris Sud

63, rue Gabriel Péri

94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

*E-mail:* [stephanie.chauvin@inserm.fr](mailto:stephanie.chauvin@inserm.fr)

Tel: 00 33 (1) 49 59 67 13

Fax: 00 33 (1) 49 59 67 3

**DECLARATIONS OF INTEREST:** The authors hereby affirm that they have no competing or conflicts of interests

**RUNNING HEAD:** Glucocorticoids up-regulate dynorphin expression

**HIGHLIGHTS:**

- Preovulatory-like concentrations of estrogens favor glucocorticoid gene regulation
- Stress-like glucocorticoid concentrations regulate hypothalamic prodynorphin expression
- The glucocorticoid receptor binds to and transactivates prodynorphin promoter

**ABSTRACT**

Stress-induced reproductive dysfunction is frequently associated with increased glucocorticoid (GC) levels responsible for suppressed GnRH/LH secretion and impaired ovulation. Besides the major role of the hypothalamic kisspeptin system, other key regulators may be involved in such regulatory mechanisms. Herein, we identify dynorphin as a novel transcriptional target of GC. We demonstrate that only priming with high estrogen (E2) concentrations prevailing during the late prooestrus phase enables stress-like GC concentrations to specifically stimulate *Pdyn* (prodynorphin) expression both *in vitro* (GT1-7 mouse hypothalamic cell line) and *ex vivo* (ovariectomized E2-supplemented mouse brains). Our results indicate that stress-induced GC levels up-regulate dynorphin expression within a specific kisspeptin neuron-containing hypothalamic region (antero-ventral periventricular nucleus), thus lowering kisspeptin secretion and preventing preovulatory GnRH/LH surge at the end of the prooestrus phase. To further characterize the molecular mechanisms of E2 and GC crosstalk, chromatin immunoprecipitation experiments and luciferase reporter gene assays driven by the proximal promoter of *Pdyn* show that glucocorticoid receptors bind specific response elements located within the *Pdyn* promoter, exclusively in presence of E2. Altogether, our work provides novel understanding on how stress affects hypothalamic-pituitary-gonadal axis and underscores the role of dynorphin in mediating GC inhibitory actions on the preovulatory GnRH/LH surge to block ovulation.

**KEY WORDS:** Stress, Glucocorticoids, hypothalamus, dynorphin, estrogen, GT1-7

## 1. INTRODUCTION

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons form the final common pathway for the central regulation of fertility. Pulsatile hypothalamic GnRH release regulates pituitary secretion of gonadotropins (LH, Luteinizing Hormone and FSH, Follicle-Stimulating Hormone) that, in turn control ovarian function during the oestral cycle. The gonadal steroids are critical feedback regulators of the hypothalamus-pituitary activity. Much of the ovulatory cycle is dominated by negative feedback effects of the gonadal estradiol (E2) and progesterone. As the cycle progresses, rising E2 produced by maturing ovarian follicles (at the end of the prooestrus phase) evokes a positive feedback action that triggers generation of the pituitary signal of ovulation (Clarkson and Herbison, 2009). Because GnRH neurons do not possess the required sex steroid receptors (Lehman et al., 1993; Skinner et al., 2001), feedback signals to these neurons rely on transmission through other steroid-sensitive cells within the brain. Kisspeptin neuropeptide secreting neurons within the antero-ventral periventricular (AVPV) nucleus are considered as critical hypothalamic neurons for processing the positive feedback E2 signal during the generation of the GnRH/LH surge in rodents. Another subgroup of kisspeptin neurons, located in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus, co-synthesize the endogenous opioid inhibitor dynorphin and the excitatory neuropeptide neurokinin B that autopsynaptically coordinate the pulsatile release of kisspeptin to maintain episodic GnRH secretion (Burke et al., 2006; Goodman et al., 2007). These latter kisspeptin neurons are considered key effectors mediating the negative feedback of E2 while dynorphin is reported to mediate the negative feedback of progesterone (Goodman et al., 2004) which slows down GnRH/LH pulsatility frequency (Schulz et al., 1981). Intravenous administration of the opioid receptor antagonist naloxone blocks the suppressive effect of dynorphin on LH release (Kinoshita et al., 1982). Dynorphin specific receptors ( $\kappa$ -opioid opioid receptors or KOR) are expressed in ARC kisspeptin neurons as well as in GnRH neurons in ovine and rats (Weems et al., 2016), indicating that dynorphin could act on both kisspeptin and GnRH secretion levels. Interestingly, prodynorphin gene *Pdyn* (dynorphin precursor gene) is a direct target of sex steroids in rodents. E2 exerts a

positive or a negative effect on *Pdyn* expression depending on E2 concentrations and/or brain regions (Kanaya et al., 2017; Simerly et al., 1996). For instance, in the ARC, low E2 concentrations increase *Pdyn* immunoreactive cell number whereas higher concentrations decrease *Pdyn* expression (Kanaya et al., 2017). Besides, testosterone also regulates hypothalamic *Pdyn* expression suggesting that dynorphin could play a major role in female as well as in male reproduction (Iwasa et al., 2017).

In mammals, physical or emotional stresses are pivotal triggers of reproductive dysfunctions (Whirledge and Cidlowski, 2013). Chronic stress induces activation of the corticotrope axis which directly controls the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) activity. Stress-induced increases in plasma glucocorticoids (GC) plays a major role in mediating suppression of GnRH and LH secretion. Reproductive stress responses depend on the reproductive state of female individuals, highlighting the crucial role of ovarian steroids (Kajantie and Phillips, 2006). Contrary to the well described direct effects of GC on GnRH responsiveness and pituitary gonadotropin expression (Breen and Karsch, 2006), their effects at the level of hypothalamus remain unclear. The lack of glucocorticoid receptors (GR) expression in GnRH neurons (Dufourny and Skinner, 2002) suggests that GC act indirectly, possibly *via* an inter-neuronal system to lower GnRH pulse frequency, involving for instance corticotrophin-releasing factor (Kinsey-Jones et al., 2006), Rfamide related peptide-3 (Leon et al., 2014) or kisspeptin (Gottsch et al., 2004; Navarro et al., 2005a; Navarro et al., 2005b). Studies on rodents as well as in domestic animals demonstrate that exogenous administration of stress-like GC levels disrupts the preovulatory LH surge and oestrous cyclicity (Breen et al., 2005; Luo et al., 2016; Saketos et al., 1993). Other studies report that GC down-regulate kisspeptin gene (*Kiss1*) expression (Kinsey-Jones et al., 2009) and inhibit AVPV kisspeptin neurons activity at the time of the LH surge (Luo et al., 2016), preventing them to elicit the E2-induced surge release of GnRH and LH (Luo et al., 2016). GC may therefore block ovulation by acting directly on kisspeptin neurons. Hypothalamic deletion of GR (*Nr3c1*) in kisspeptin-expressing neurons prevents GC induced *Kiss1* suppression but does not impair the acute suppression of the HPG axis following stress, suggesting that kisspeptin neurons are not the sole effectors of stress-induced GC actions (Whirledge and Cidlowski, 2013). Interestingly, stress-like immobilization or elevation of GC levels significantly increases dynorphin concentrations in various

brain areas, particularly in hypothalamus (Nabeshima et al., 1992; Shirayama et al., 2004), associated with increased number of dynorphin expressing neurons within the ARC (Oakley et al., 2009a; Oakley et al., 2009b; Ralph et al., 2016). Hence, dynorphin could be a good candidate to trigger GC inhibitory effects on HPG activity.

In the present study, we investigate the potential role of dynorphin in mediating stress response during a specific period of the ovulatory cycle. We use the GC-sensitive and dynorphin expressing hypothalamic cell line GT1-7 and provide evidence that only high levels of E2 enable GC to up-regulate *Pdyn* expression. We further confirm these results *ex vivo* in E2-supplemented ovariectomized mouse brains that exhibit an up-regulation of *Pdyn* in the AVPV upon GC treatment. We also explore E2 and GC crosstalk at a molecular level and show that E2 allows GR to access to glucocorticoid response elements located within the proximal region of mouse *Pdyn* promoter, thereby demonstrating that dynorphin relays and participates to GC activities in controlling female reproduction.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals and treatment**

RjOrl:SWISS female mice at 8 weeks of age (Janvier Breeding Centre, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed in nest-enriched cages under a 12:12h light-dark cycle, maintained at 22°C, and fed a standard diet with free access to food and water. Experiments were conducted in accordance with the French and European legal requirements (Decree 2010/63/UE) and were approved by the “Charles Darwin” Ethical committee (project number 01490-01).

Mice were ovariectomized under general anaesthesia (xylazine 10 mg/kg - ketamine 100 mg/kg, i.p.) and implanted with Silastic (Dow Corning) implants filled with 50 µg of estradiol-benzoate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MA, USA) in 30 µL of sesame oil as previously described (Naule et al., 2015; Raskin et al., 2009).

Three weeks after ovariectomy and E2 supplementation, female mice were euthanized (in the morning, at 10.00 am) and the brain and uterine horns were collected. Uterus is an estrogen-responsive tissue usually used to indirectly monitor circulating oestradiol levels. Therefore, uterine horns collected for each female were weighed in order to ensure that all studied females were comparably impregnated with E2 implants. Ovariectomized and E2-supplemented females showed an average percentage of relative uterine weight of  $0.73 \pm 0.04\%$  of body weight, about 2.4-fold increase when compared with eight weeks old RjOrl:SWISS female mice at dioestrus (Lemini et al., 2015).

### **2.2 Slice preparation, drug application and RNA preparation**

The brain was immersed in cooled artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing: 117 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O; 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O; 10 glucose. Anatomically matched slices (400µm) containing the AVPV (plate 30 of the Mouse Brain Atlas of Paxinos et Franklin) or ARC (plate 46) were selected and transferred to a thermostated (32-34°C) and oxygenated

(95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) brain slice chamber system allowing a continuous flow of fluid throughout the incubation period (2 mL/min). Slices were allowed to equilibrate for 1 h in aCSF before being exposed to 100 nM Dex (dissolved in aCSF with 0.01% ascorbic acid) or ethanol (vehicle, 1:1000 dilution in aCSF with 0.01% ascorbic acid) treatment for 6 h. After incubation, punches were recovered through the AVPV and ARC with a 1 mm diameter canula. Total RNA was extracted using the PicoPure RNA isolation kit from Arcturus (Excilone, Élancourt, France). Total RNAs were reverse transcribed using the Promega kit (Charbonnières-les-Bains, France).

### **2.3 Cell line culture and hormonal treatment**

GT1-7 cells (kindly provided by Dr. Pamela L. Mellon, UCSD, USA) were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium)-glutamax without red-phenol and with 4.5 g/L glucose (Life Technologies, Saint-Aubin, France), containing 10% Fetal calf serum (FCS) (Biowest, Nuaille, France), and supplemented with 100 U/mL penicillin (Life Technologies), 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies), at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For gene expression experiments, cells at  $0.4 \times 10^6$  cells/well were seeded in 6-well plates, whereas for gene recruitment study, cells were seeded at  $3 \times 10^5$  cells in T-175 flasks. Twenty-four h later, cells were washed with PBS and fed with DMEM containing 10% hormone-depleted, charcoal-stripped FCS. After overnight steroid starvation, cells were pretreated for 24 h with either ethanol, or either 0.1 nM or 100 nM 17-β estradiol (E2) (Sigma-Aldrich). Twenty-four h after E2 priming, cells were treated with ethanol (Vehicle, V), Dexamethasone (Dex) or different drugs (RU486, 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) or Actinomycin D (Sigma-Aldrich)) at different concentrations for various periods of time, as indicated in the corresponding figure legends.

### **2.4 Primer design for genomic amplification and RT-qPCR assays**

Primer pairs were designed by using NCBI's software Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/tools/primer-blast/>). Primers were synthesized from Eurogentec (Ougrée, Belgium),



purified by the selective precipitation optimized process (SePOP), desalted, and delivered at 100  $\mu$ M concentration in water. To determine the expression of endogenous *Esr1*, *Esr2*, *Nr3c1*, *Pdyn*, *Gnrh* and *Hsd11b2* in GT1-7 cells, one  $\mu$ g of total RNA samples was first treated with DNase I (New England Biolabs, Évry, France) and then reverse-transcribed into cDNA with the High Capacity cDNA reverse transcription kit RT-qPCR. cDNA was amplified for 35 cycles (95 °C for 45 s, 56–65 °C for 1 min, and 72 °C for 45 s) in 1X buffer with 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.06  $\mu$ M (initial concentration) concentrations of each primer (sequences provided in Supplemental Tables), 100 ng of DNA, and 1.25 U of Dream Taq (ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) in a total volume of 50  $\mu$ L. The amplified samples were subjected to agarose gel electrophoresis to follow gene expression within GT1-7 cells.

## 2.5 Construction of recombinant plasmid

The pGL4.16 vector (Promega) containing the gene for *Firefly* luciferase was used in this study. To create the pGL4.16-*Pdyn* promoter-F-Luc construct containing the 1.7-kb promoter in the upstream of the *Firefly* luciferase gene, the *Pdyn* promoter region was amplified by PCR from mouse genomic DNA by using the primers forward and reverse including a *Xho*I and *Hind*III restriction sites at their 5' ends

(Forward: 5'-CGCCCTCGAGTACTACACCACACTCCACAG-3');

Reverse: 5'-CGCTAAGCTTGATCCAAGATTCAGAAGGTA-3'.

PCR product was subcloned into pGL4.16 vector at the *Xho*I and *Hind*III sites. The construct was verified by DNA sequencing (Eurofins, Ivry-sur-Seine, France).

## 2.6 Transient transfection of GT1-7 cells and Dual® Luciferase reporter assays

The reporter plasmids used in these studies, *Pdyn* promoter, contains the *Pdyn* promoter region which drives the expression of the *Firefly* luciferase gene. The control plasmid pRL-TK, carrying the *Renilla* luciferase gene under the control of the TK promoter (Promega) was co-transfected to correct for variations in transfection efficiency. For transient transfection assays, GT1-7 cells were plated in 96-well plates at 20  $\times$

$10^3$  cells/well in DMEM-glutamax containing 10% FCS for 24 h. The reporter (*Pdyn*-promoter or pGL-vector at 125 ng/well) and the control (Renilla at 20 ng/well) plasmids were transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) in OptiMEM (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol for 6 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Then, the media was replaced with DMEM containing 10% hormone-depleted, charcoal-stripped FCS. Following 24 h starvation, cells were treated with either ethanol (V, 1/1000 dilution) or different drug combinations (100 nM E2, 100 nM Dex, 10 µM RU486) for another 24 h. At the end of the experiment, cultures were harvested and lysates prepared in passive lysis buffer (Promega). Luciferase activities were determined using the Dual<sup>®</sup> Luciferase reporter assays system (Promega). Potency of the *Pdyn* promoter to drive the reporter gene expression was determined by the activity of the *Firefly* luciferase normalized to that of the *Renilla* luciferase in each sample.

## 2.7 RT-qPCR

To evaluate GC-induced expression of endogenous prodynorphin (*Pdyn*), kisspeptin (*Kiss1*) and actin beta (*Actb*), GT1-7 cells were pretreated or not with E2 (0.1 nM or 100 nM) for 24 h, and then treated or not (V) with 100 nM Dex for 1.5 h, 6 h or 24 h. Co-treatment with DRB (10 µg/mL), ActD (1 µM) or RU486 (10 µM) was also performed. cDNA samples obtained from cells and tissues RNA extracts were prepared as described above. These samples were analyzed with TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix Reagent (Life Technologies), with specific TaqMan Gene expression Assays (*Kiss1*: Mm03058560\_m1; *Pdyn*: Mm00457573\_m1; *Actb*: Mm02619580\_g1) and the QuantStudio<sup>™</sup> 6 Flex Real-Time PCR System. A standard curve consisted of four 1:10 serial dilutions of hypothalamus cDNA was performed for each set of primers. All samples were tested in triplicate within a single run. Quantification of the amount of *Pdyn* or *Kiss1* mRNA was calculated relative to that of the *Actb* normalizer gene and expressed as relative units. Experiences were performed at least three times, and the median ± interquartile range was calculated using the Prism curve-fitting program.

## 2.8 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were performed with the iDeal ChIP-Seq kit for Transcription Factors (Diagenode, Seraing, Belgium), according to the manufacturer's recommendations. Rabbit monoclonal anti-GR D6H2L (5 µg, Cell Signaling Technology) or polyclonal anti-Jun (7 µg, sc-44, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) antibodies were used for immunoprecipitation of endogenous GR or Jun proteins, respectively. Rabbit control IgG, provided in the kit, was used as negative immunoprecipitation control. ChIP-resulting DNA samples were amplified by qPCR, by using the primer sets (Supplemental Tables) targeted to different regions of mouse *Pdyn*, *Ucp1* or *Trh* genes.

## 2.9 qPCR

ChIP-resulting DNA samples were amplified by qPCR, by using the QuantStudio™ 6 Flex System (Life Technologies), with a 5 µL DNA sample, 6 µL Fast SYBR Green Master Mix, and 0.5 µL forward and reverse primers (300 nM final concentrations) (primer sequences are provided in Supplemental Tables). Each DNA sample was analyzed in triplicate. All results are expressed as fold recruitment normalized to input samples (Percent Input Method, ChIP analysis; Life Technologies) and expressed as medians ± interquartile range of 3 independent experiments.

## 2.10 Protein extraction and Western Blot analysis

To follow GR expression, E2 pretreated GT1-7 cells were scraped in RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton, 10% Glycerol, protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich)). After centrifugation (14,000×g, 4°C, 15 min), protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay (ThermoFisher Scientific). Equal protein amounts (50 µg) were resolved on 7.5% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membrane

(Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Blots were incubated for 1 h at room temperature (RT) in a blocking buffer (5% BSA in 0.2% Tween 20 Tris-buffered saline (TBS-T)), before an overnight incubation at 4°C with primary monoclonal anti-GR (D6H2L, Cell Signaling Technology) or monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich) antibodies as indicated. After extensive washes with TBS-T, blots were incubated with an IRDye 800-conjugated affinity purified anti-rabbit IgG secondary antibody (Perbio Science, Villebon-sur-Yvette, France) and an IRDye 680-conjugated affinity purified anti-mouse IgG secondary antibody (Perbio Science) for 1 h at RT. After washes, proteins were visualized with an Odyssey-Fc apparatus (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Specific signals for different proteins were normalized by the infrared fluorescence of  $\alpha$ -tubulin as determined by densitometry using the Image Studio software (Li-Cor). All Western blots shown are representative of what was observed in at least three independent experiments.

## 2.11 Statistical Analyses

Data are median  $\pm$  interquartile range (IQR) of  $n$  experiments. Non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis tests followed by post-test of Dunn or Mann–Whitney  $U$ -tests were used when appropriate to determine significant differences (GraphPad Prism software).  $P$  value of 0.05 was considered as statistically significant (\* $P$ <0.05; \*\*  $P$ <0.01; \*\*\*  $P$ < 0.001).

### 3. RESULTS

#### 3.1 Priming with high levels of E2 allows *Pdyn* up-regulation by dexamethasone in GT1-7 cells

Stress induces suppression of LH release through down-regulation of kisspeptin expression and release (Kinsey-Jones et al., 2009). To investigate the potential role of the inhibitory neuropeptide dynorphin in these processes, we examined the effects of GC on *Pdyn* (dynorphin precursor gene) mRNA levels in the hypothalamus.

Because of the absence of a characterized kisspeptin cell model, we used a hypothalamic cell line (GT1-7 cells) that expresses dynorphin (*Pdyn*) as well as GR (*Nr3c1*), estrogen receptors ER alpha and beta (*Esr1* and *Esr2*), and the metabolizing enzyme 11 $\beta$  hydroxysteroid-dehydrogenase type 2 (*Hsd11b2*) (Supplemental Figure 1) that inactivates corticosterone into 11-dehydrocorticosterone. To ensure optimal effects of GC on gene regulation, we treated cells with a synthetic and non-metabolizing GR agonist, dexamethasone (Dex), at a stress-like concentration (100 nM, (Dominguez et al., 2014; Kainuma et al., 2009; Tronche et al., 2010)) that has the same potency to induce GR transactivation than corticosterone (Hellal-Levy et al., 1999). Moreover, to mimic the variation of E2 levels during ovulatory cycle, we pretreated GT1-7 cells for 24 h with two different E2 concentrations, one mimicking high E2 levels (100 nM) prevailing at the end of the prooestrus phase, and the second one corresponding to low E2 concentrations (0.1 nM) observed during the dioestrus phase (Chu et al., 2009). Cells were then treated with ethanol (V) or 100 nM Dex for 1.5 h, 6 h or 24 h in order to follow *Pdyn* expression by RT-qPCR. Figure 1 shows that, in the presence of 100 nM E2, Dex significantly increases by 1.4-fold *Pdyn* expression (non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.05$ ) after 1.5 h treatment (Figure 1). Dex-induced effect is even stronger after 6 h treatment and shows an up-regulation by 2.7-fold of *Pdyn* mRNA levels, only in the presence of high levels of E2 (non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 1). However, *Pdyn* mRNA return to basal levels after 24 h Dex treatment (Figure 1). Dex alone or in the presence of 0.1 nM E2 does not modify the *Pdyn* mRNA expression, demonstrating that only priming with high E2 concentrations enables Dex to stimulate *Pdyn* expression.

To examine the importance of GC concentrations and to assess the specificity of this regulation, we pretreated GT1-7 cells with high levels of E2 before Dex treatment at 10 nM or 100 nM for 6 h. As shown in Figure 2A, in the presence of 100 nM E2, only 100 nM Dex significantly induces *Pdyn* expression by 2.7-fold (non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.001$ ). Remarkably, 10 nM Dex treatment, even with 100 nM E2 pretreatment, is unable to modify *Pdyn* mRNA levels, suggesting that threshold GC concentrations are necessary for controlling *Pdyn* expression. Dex induced-*Pdyn* mRNA up-regulation is prevented by a GR antagonist (RU486) co-treatment (Figure 2B), demonstrating that Dex effects are mediated by GR. To examine whether E2 effects are mediated by its specific receptor, we co-treated GT1-7 cells previously exposed to 100 nM E2 with Dex and ER antagonists (tamoxifen or fulvestrant) but unfortunately these two antagonists alone increase the basal levels of *Pdyn* mRNA preventing any definite conclusion to be drawn (data not shown).

Lastly, we evaluated whether Dex-induced *Pdyn* up-regulation could be the result of transcriptional activation by using two transcription inhibitors, DRB or ActD. Figure 2C shows that 6 h treatment with 100 nM Dex induces up-regulation of *Pdyn* mRNA of GT1-7 pretreated with 100 nM E2 (about 2.4-fold, non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.001$ ). Remarkably, this up-regulation is prevented by co-incubation with either DRB or ActD, without affecting basal levels of *Pdyn* mRNA (Figure 2C).

Altogether, these data provide evidence that only priming with high concentrations of E2 allows Dex to up-regulate *Pdyn* mRNA transcription, suggesting that GC solely act during a specific window of the ovulatory cycle. Besides, Dex stimulates *Pdyn* transcription exclusively at stress-like concentrations, indicating that these regulations only occur during very specific conditions.

### **3.2 GC regulate *Pdyn* expression in ovariectomized and E2-supplemented mice**

We wondered whether GC could also control *Pdyn* expression *ex vivo* with an estrogenic exposure alike the one observed at the end of the proestrus phase. To this aim, adult female mice were ovariectomized and E2-supplemented to mimic the ovulatory surge of LH and induce female receptivity (Naule et al., 2015; Raskin et al., 2009). Three weeks after surgery, mice presented comparable hormonal impregnation as

shown in Material and Methods. They were euthanized and brain slices containing either AVPV or ARC were incubated with the vehicle or 100 nM Dex for 6 h (Figure 3A). As depicted in Figure 3B, *Pdyn* levels are more than 3-fold higher in ARC than in the AVPV under basal conditions reflecting the differential E2 regulation on *Pdyn* expression previously described within these two hypothalamic areas (Kanaya et al., 2017; Simerly et al., 1996). Interestingly, Dex induces a significant 1.55-fold increase in *Pdyn* expression (Mann-Whitney *U*-tests,  $P \leq 0.05$ ) in the AVPV as compared to the vehicle. No significant difference was observed in *Pdyn* expression in the ARC between Dex and vehicle treatment (Figure 3B). In agreement with previous studies (Dubois et al., 2015; Gonzalez-Martinez et al., 2008), *Kiss1* expression in vehicle samples is more than 20-fold higher in AVPV than in ARC of OVX+E2 mice (Figure 3C). As expected, Dex treatment significantly decreases *Kiss1* mRNA both in the AVPV and in the ARC (by about 9.2- and 3.2-times less than the control respectively, Mann-Whitney *U*-tests,  $P \leq 0.05$ ) (Figure 3C). These results reveal that in the presence of high E2 levels, Dex is able to induce *Pdyn* expression in the mouse AVPV. Up-regulation of *Pdyn* would be an important inhibitory signal to kisspeptin neurons present within the AVPV, as well as an important negative input on GnRH neurons to reduce GnRH release.

### 3.3 E2 does not modify GR expression in GT1-7 cells

To further explore the molecular crosstalk between E2 and GC signaling pathways, we examined whether E2 priming could increase GR mRNA expression and/or protein stability and activity (through GR phosphorylation) to promote GC actions. As shown in Supplemental Figure 2, 100 nM E2 treatment does not modify *Nr3c1* mRNA (Supplemental Figure 2A) nor GR protein expression (Supplemental Figure 2B) levels when compared to *36b4* mRNA or  $\alpha$ -tubulin protein levels, respectively.

### 3.4 The 1.7-kb *Pdyn* promoter is activated by GR in GT1-7 cells

Given that GC modulate transcriptional activation by binding to glucocorticoid response elements (GREs) in DNA regulatory regions or interacting with other transcription factors (e.g. NF $\kappa$ B and AP-1) to regulate gene expression (Uht et al., 1997; Vandevyver et al., 2014), we analyzed *in silico* 1.7-kb 5'-flanking region

of Exon I of mouse *Pdyn* (Supplemental Figure 3) using Jaspar database (URL: [http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar\\_db.pl](http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl)). Within the proximal *Pdyn* promoter, we identify three putative GREs (5'-AGAACAAnnTGTTCT-3') (positions: -638, -1490 and -1535 bp) and one potential AP-1 binding site (5'-TGACTCA-3', positions -1248 bp) (Supplemental Figure 3). Nine potential hemi-sites for GR (5'-AGAACA-3') are also detected.

To assess whether GR may specifically transactivate *Pdyn* gene, the 1.7-kb mouse *Pdyn* promoter was subcloned into the promoter-less pGL4.16 vector, generating the pGL4.16-*Pdyn* promoter-F-Luc plasmid (Figure 4), in which *firefly* luciferase (F-Luc) gene expression was driven by the cloned promoter. Twenty-four h after transfection, cells were exposed to hormonal treatment for another 24 h. Data demonstrate that the promoter-less pGL4.16 vector (pGL-vector) is not activated by Dex (Figure 4). Interestingly, the *Pdyn* promoter containing all three GREs significantly responds to Dex, with a 5.2-fold higher *Firefly* luciferase activity compared to the vehicle treatment (non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.01$ ). Co-treatment with RU486 completely abolishes Dex-induced increase in *Pdyn* promoter activity, indicating that Dex controls *Pdyn* promoter activity through GR activation. Since we observed a permissive effect of E2 on Dex-induced *Pdyn* expression, we examined whether Dex and E2 co-treatment would exert a stronger effect on 1.7-kb *Pdyn* promoter activity. *In silico* analysis of the 1.7-kb *Pdyn* promoter does not disclose any potential estrogen response element (ERE). Alternatively, E2 may act indirectly through AP-1 site (Uht et al., 1997) that was identified on the 1.7-kb *Pdyn* promoter (Supplemental Figure 3). Surprisingly, Figure 4 shows that E2 treatment alone or together with Dex does neither stimulate nor potentiate Dex-induced *Pdyn* promoter activity (about 5.57 vs 5.2-fold induction of *Firefly* luciferase activity for Dex or Dex + E2 respectively).

### 3.5 E2 enables GR recruitment upon *Pdyn* promoter

We next examine whether GR stimulates *Pdyn* expression through either direct GR recruitment on GREs or indirect interaction with AP-1 complex (heterodimer Jun/Fos) by tethering mechanisms. For that, GT1-7 cells (pre-exposed or not with 100 nM E2) were treated with ethanol (V) or 100 nM Dex for 1 h before



performing chromatin immunoprecipitation (ChIP). The endogenous GT1-7 promoter region *Pdyn* was immunoprecipitated with anti-GR antibody, anti-Jun or control IgG antibody, and the isolated DNA was quantified by qPCR, with primers encompassing putative GREs (from - 1.555 kb to - 1.475 kb) (Figure 5) or the AP-1 site (Supplemental Figure 4).

Remarkably, GR recruitment on DNA regions only occurs in the presence of both Dex and E2 (Figure 5). E2 pretreatment enables Dex to induce a significant 12.6-fold (non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.01$ ) GR recruitment on *Pdyn* promoter region. Uncoupling protein 1 *Ucp1* promoter region was used as a negative control sequence (Supplemental Figure 4A). As expected, no significant GR recruitment was observed on the target region of *Ucp1* promoter, independently of the presence of E2 and Dex (Supplemental Figure 4A), clearly demonstrating that GR recruitment is gene-specific.

Concerning the AP-1 site, ChIP analysis with anti-Jun antibodies does not show any recruitment of Jun on the DNA region encompassing the potential AP-1 site (Supplemental Figure 4B). As a positive control, we measured the recruitment of Jun to a GR target Thyrotropin Releasing Hormone gene *Trh* (Diaz-Gallardo et al., 2010) that contains two AP-1 sites within its promoter. As shown in Supplemental Figure 4B, Dex is able to induce a significant Jun recruitment on this *Trh* specific DNA region (by about 3-fold, non-parametric ANOVA,  $P \leq 0.05$ ).

Altogether, our data demonstrate that Dex stimulates 1.7-kb mouse *Pdyn* promoter activity very likely through GR interaction with GREs cis-elements. Though, at genome-wide level, only 100 nM E2 priming enables Dex to promote *Pdyn* transcription.

#### 4. DISCUSSION

In the present study, we identify dynorphin as a novel important transcriptional target for GC that would strengthen GC inhibitory impacts on HPG axis during stress. In a mouse hypothalamic cell line (GT1-7 cells), we demonstrate that only priming with high concentrations of E2 enables stress-like GC levels to specifically up-regulate *Pdyn* expression through ligand- and GR-dependent transcriptional mechanisms. Accordingly, ovariectomized mice with a strong and sustained estrogenic exposure give convergent data on *Pdyn* mRNA levels that were significantly increased in the AVPV upon GC treatment. These data are of high interest since AVPV contains kisspeptin neurons which are the major sensors of E2 positive feedback signals that trigger the preovulatory GnRH/LH surge. During stress, *Pdyn* up-regulation could play a direct or an indirect role in blunting GnRH release. Since specific dynorphin receptors (KOR) are expressed in ARC kisspeptin neurons as well as in GnRH neurons (Weems et al., 2016), one could speculate that during stress, dynorphin would down-regulate kisspeptin as well as GnRH secretion. In accordance with this hypothesis, recent data show that microinjection of a selective KOR antagonist directly into the AVPV area of OVX+E2 rats increases the magnitude of the LH surge (Helena et al., 2015). This effect is similar as the one observed on the same rats with partial ablation of ARC kisspeptin neurons (Helena et al., 2015). Helena and colleagues demonstrate the existence of E2-dependent mechanisms that promote ARC dynorphin producing neurons to act indirectly on AVPV kisspeptin to reduce LH surge (Helena et al., 2015). Fibers from ARC kisspeptin neurons are described to come into direct contact with kisspeptin neurons of the AVPV (Yeo et al., 2016; Yip et al., 2015). Although ARC kisspeptin neurons express KOR (Weems et al., 2016), it is yet to be determined whether AVPV kisspeptin neurons do so. Answering to this question will help to determine whether dynorphin could act directly on AVPV kisspeptin neurons.

KOR is a membrane receptor coupled to inhibitory G-proteins that inhibits cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production. This receptor also activates mitogen-activated protein kinases which in turn activates transcription factors and alters gene expression (Bruchas et al., 2010). KOR activation decreases cell firing and neurotransmitter release (Bruchas et al., 2010). We analyzed *in silico* the -1.4 kb 5'-flanking region of mouse *Kiss1* promoter using Jaspar database and detected three potential cAMP response elements

(5'TGACGTCA3') at -687, -717 and -1138 bp from exon I. Since KOR activation decreases cAMP production, one may speculate that dynorphin could decrease cAMP-induced, CRE-mediated *Kiss1* promoter activity and therefore induces down-regulation of *Kiss1* expression. Our results suggest then that at the end of the prooestrus phase, stress-related GC levels would stimulate *Pdyn* expression leading to lower *Kiss1* secretion and prevent the preovulatory GnRH/LH surge.

E2 and GC crosstalk has already been reported with one receptor-mediated signaling pathway impeding the other one (Cvoro et al., 2011; Karmakar et al., 2013). For instance, GR interacts with ER to destabilize the ER-Steroid Receptor Coactivator-3 complex leading to ER activity repression in breast cancer cells (Karmakar et al., 2013). Conversely, an inhibitory effect of ER was also described on GR repressing proinflammatory genes expression in human osteosarcoma cells (Cvoro et al., 2011). In our study, we observe a positive effect of E2 on GR signaling in GT1-7 cells that occurs under specific conditions, notably the requirement of high E2 concentrations. Indeed, 0.1 nM E2 pretreatment (corresponding to the low E2 concentration prevailing during the luteal phase (Chu et al., 2009)) is inefficient in enabling GC-induced *Pdyn* expression, indicating that GC may stimulate *Pdyn* expression at a specific period of the ovulatory cycle. Besides, upon priming with high doses of E2, up-regulation of *Pdyn* expression was solely observed at a threshold GC concentration only found under specific situations e.g. stress or pathological hypercorticism.

E2 exposure does not affect GR mRNA or protein levels in GT1-7 cells. Unliganded GR activation has been already described (Galliher-Beckley et al., 2011), therefore one could speculate that E2 could induce GR phosphorylation and then promotes GR activation. Nonetheless, as shown in Figure 1, basal GR activity observed on basal *Pdyn* levels remains unchanged independently of the presence of E2. The lack of effect of E2 on GR expression and activity was also described in female rat hippocampus during stress (Green et al., 2018). We went further to understand the molecular mechanism of ER and GR crosstalk by generating a 1.7-kb mouse *Pdyn* promoter construct. This proximal promoter contains three GREs and one AP-1 site on which GR could functionally interact with. Similarly, ER binds to consensus ERE or indirectly binds to chromatin through tethering to other transcription factors like AP-1. By using Jaspar database, we identify

an ERE site far away from the transcription start site at -5.2-kb upstream of the first exon of mouse *Pdyn*. However, ER could potentially bind to the AP-1 site present within the proximal *Pdyn* promoter. We demonstrate that, in contrast to E2, GC are able to transactivate the proximal *Pdyn* promoter (luciferase assays), suggesting that GR may bind to *Pdyn* promoter on either GRE or/and AP-1 sites. ChIP experiments validate that GR is indeed recruited on *Pdyn* proximal promoter and especially on GRE containing regions. ChIP data also confirm that GR recruitment on *Pdyn* promoter solely occurs in presence of 100 nM E2, suggesting that E2 may facilitate GR DNA accessibility, probably after chromatin remodeling as already proposed for GR transcriptional regulations (Miranda et al., 2013; Voss et al., 2011). In these studies, GR was described to interact with ATP-dependent chromatin remodelers (SWI/SNF complexes) to trigger chromatin remodeling at specific sites, priming the chromatin landscape, facilitating accessibility of a second binding factor (Voss et al., 2011). Hence, the relative discrepancy between the significant positive effect of Dex alone on *Pdyn* promoter-driven luciferase activity and the E2 requirement for Dex-induced GR recruitment on *Pdyn* promoter (ChIP experiments) reveals that E2 may promote chromatin remodeling to increase the odds of GR to bind GRE. ER has been shown to recruit more than one remodeling complex to response elements upon activation (Miranda et al., 2013) and therefore could also dictate GR binding. In addition, genome wide sequencing and analysis of global changes in chromatin structure have shown that GR binding may be determined by an “assisted loading” mechanisms (Miranda et al., 2013) which lead to rapid reprogramming of the chromatin structure during a transient window by which GR could access to GRE previously unavailable (Miranda et al., 2013). Understanding how E2 modulates cellular responses of GC should give general insights into functional steroid receptor crosstalk.

## 5. CONCLUSIONS

We identify dynorphin as an important inhibitory neuropeptide induced by hypercorticism. Using an *ex vivo* mouse brain model and a hypothalamic cell line, we demonstrate that GC induce *Pdyn* up-regulation, exclusively after E2 priming. Our work converges with others to propose that HPG axis is specifically receptive to stress at the end of the proestrus phase when positive E2 feedback signals induce GnRH/LH

surge. During this critical period, elevated GC levels would stimulate *Pdyn* expression which in turn leads to *Kiss1* down-regulation and GnRH/LH release suppression. At the molecular level, we describe a novel crosstalk between E2 and GC signaling pathways where E2 exposure may unmask GRE binding sites within *Pdyn* promoter to enable GR DNA accessibility. Future challenges should clarify the exact role of dynorphin on preovulatory GnRH/LH surge and investigate its potential implication in other reproductive dysfunctions (sexual behavior, pregnancy rate and litter size) occurring during stress. A better understanding of molecular mechanisms by which GC modulate HPG axis will facilitate management of stress-related infertility.

## **6. ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr Nadine Binart for her help in setting up brain RNA extraction, and Caroline Parmentier for her advices concerning brain RNA extraction and qPCR protocols. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the University Paris Sud. M.A. is supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

## **7. AUTHOR CONTRIBUTIONS**

S. Mhaouty-Kodja, M. Lombès and S. Chauvin designed research; M. Ayrout, F. Le Billan, M. Lombès and S. Chauvin analyzed data; M. Ayrout, F. Le Billan, V. Grange-Messent, S. Mhaouty-Kodja and S. Chauvin performed research; M. Ayrout, M. Lombès and S. Chauvin wrote the paper; all authors corrected and approved the final version of the manuscript.

## 8. REFERENCES

- Breen, K.M., Billings, H.J., Wagenmaker, E.R., Wessinger, E.W., Karsch, F.J., 2005. Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology* 146, 2107-2115.
- Breen, K.M., Karsch, F.J., 2006. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Front Neuroendocrinol* 27, 233-245.
- Bruchas, M.R., Land, B.B., Chavkin, C., 2010. The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Res* 1314, 44-55.
- Burke, M.C., Letts, P.A., Krajewski, S.J., Rance, N.E., 2006. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 498, 712-726.
- Chu, Z., Andrade, J., Shupnik, M.A., Moenter, S.M., 2009. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J Neurosci* 29, 5616-5627.
- Clarkson, J., Herbison, A.E., 2009. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol* 21, 305-311.
- Cvoro, A., Yuan, C., Paruthiyil, S., Miller, O.H., Yamamoto, K.R., Leitman, D.C., 2011. Cross talk between glucocorticoid and estrogen receptors occurs at a subset of proinflammatory genes. *J Immunol* 186, 4354-4360.
- Diaz-Gallardo, M.Y., Cote-Velez, A., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2010. A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signalling in hypothalamic neurones prevents binding of phosphorylated cAMP response element binding protein and glucocorticoid receptor at the CRE-Like and composite GRE sites of thyrotrophin-releasing hormone gene promoter. *J Neuroendocrinol* 22, 282-293.
- Dominguez, G., Faucher, P., Henkous, N., Krazem, A., Pierard, C., Beracochea, D., 2014. Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone. *Front Behav Neurosci* 8, 166.
- Dubois, S.L., Acosta-Martinez, M., DeJoseph, M.R., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., Urban, J.H., Levine, J.E., 2015. Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor alpha in kisspeptin neurons. *Endocrinology* 156, 1111-1120.
- Dufourny, L., Skinner, D.C., 2002. Type II glucocorticoid receptors in the ovine hypothalamus: distribution, influence of estrogen and absence of co-localization with GnRH. *Brain Res* 946, 79-86.

- Gallier-Beckley, A.J., Williams, J.G., Cidlowski, J.A., 2011. Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling. *Mol Cell Biol* 31, 4663-4675.
- Gonzalez-Martinez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpirer, C., Bakker, J., 2008. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 149, 2333-2340.
- Goodman, R.L., Coolen, L.M., Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Connors, J.M., Fitzgerald, M.E., Lehman, M.N., 2004. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* 145, 2959-2967.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148, 5752-5760.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073-4077.
- Green, M.R., Marcolin, M.L., McCormick, C.M., 2018. The effects of ovarian hormones on stressor-induced hormonal responses, glucocorticoid receptor expression and translocation, and genes related to receptor signaling in adult female rats. *Stress* 21, 90-100.
- Helena, C.V., Toporikova, N., Kalil, B., Stathopoulos, A.M., Pogrebna, V.V., Carolino, R.O., Anselmo-Franci, J.A., Bertram, R., 2015. KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 156, 4200-4213.
- Hellal-Levy, C., Couette, B., Fagart, J., Souque, A., Gomez-Sanchez, C., Rafestin-Oblin, M., 1999. Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Lett* 464, 9-13.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., Yanagihara, R., Mayila, Y., Irahara, M., 2017. The effects of chronic testosterone administration on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone regulatory factors (Kiss1, NKB, pDyn and RFRP) and their receptors in female rats. *Gynecol Endocrinol*, 1-5.
- Kainuma, E., Watanabe, M., Tomiyama-Miyaji, C., Inoue, M., Kuwano, Y., Ren, H., Abo, T., 2009. Association of glucocorticoid with stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1459-1468.
- Kajantie, E., Phillips, D.I., 2006. The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 31, 151-178.



- Kanaya, M., Iwata, K., Ozawa, H., 2017. Distinct dynorphin expression patterns with low- and high-dose estrogen treatment in the arcuate nucleus of female rats. *Biol Reprod* 97, 709-718.
- Karmakar, S., Jin, Y., Nagaich, A.K., 2013. Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) alpha and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ERalpha activity. *J Biol Chem* 288, 24020-24034.
- Kinoshita, F., Nakai, Y., Katakami, H., Imura, H., 1982. Suppressive effect of dynorphin-(1-13) on luteinizing hormone release in conscious castrated rats. *Life Sci* 30, 1915-1919.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Bowe, J.E., Lightman, S.L., O'Byrne, K.T., 2006. Corticotrophin-releasing factor type 2 receptor-mediated suppression of gonadotrophin-releasing hormone mRNA expression in GT1-7 cells. *Stress* 9, 215-222.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Knox, A.M., Wilkinson, E.S., Zhu, X.L., Chaudhary, A.A., Milligan, S.R., Lightman, S.L., O'Byrne, K.T., 2009. Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 21, 20-29.
- Lehman, M.N., Ebling, F.J., Moenter, S.M., Karsch, F.J., 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinology* 133, 876-886.
- Lemini, C., Jaimez, R., Figueroa, A., Martinez-Mota, L., Avila, M.E., Medina, M., 2015. Ovariectomy differential influence on some hemostatic markers of mice and rats. *Exp Anim* 64, 81-89.
- Leon, S., Garcia-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Roa, J., Vazquez, M.J., Gaytan, F., Blumenrohr, M., van Duin, M., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2014. Physiological roles of gonadotropin-inhibitory hormone signaling in the control of mammalian reproductive axis: studies in the NPF1 receptor null mouse. *Endocrinology* 155, 2953-2965.
- Luo, E., Stephens, S.B., Chaing, S., Munaganuru, N., Kauffman, A.S., Breen, K.M., 2016. Corticosterone Blocks Ovarian Cyclicity and the LH Surge via Decreased Kisspeptin Neuron Activation in Female Mice. *Endocrinology* 157, 1187-1199.
- Miranda, T.B., Morris, S.A., Hager, G.L., 2013. Complex genomic interactions in the dynamic regulation of transcription by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 380, 16-24.
- Nabeshima, T., Katoh, A., Wada, M., Kameyama, T., 1992. Stress-induced changes in brain Met-enkephalin, Leu-enkephalin and dynorphin concentrations. *Life Sci* 51, 211-217.
- Naule, L., Robert, V., Parmentier, C., Martini, M., Keller, M., Cohen-Solal, M., Hardin-Pouzet, H., Grange-Messent, V., Franceschini, I., Mhaouty-Kodja, S., 2015. Delayed pubertal onset and prepubertal Kiss1 expression in female mice lacking central oestrogen receptor beta. *Hum Mol Genet* 24, 7326-7338.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2005a. Effects of KiSS-1

- peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146, 1689-1697.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2005b. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146, 156-163.
- Oakley, A.E., Breen, K.M., Clarke, I.J., Karsch, F.J., Wagenmaker, E.R., Tilbrook, A.J., 2009a. Cortisol reduces gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. *Endocrinology* 150, 341-349.
- Oakley, A.E., Breen, K.M., Tilbrook, A.J., Wagenmaker, E.R., Karsch, F.J., 2009b. Role of estradiol in cortisol-induced reduction of luteinizing hormone pulse frequency. *Endocrinology* 150, 2775-2782.
- Ralph, C.R., Lehman, M.N., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., 2016. Impact of psychosocial stress on gonadotrophins and sexual behaviour in females: role for cortisol? *Reproduction* 152, R1-R14.
- Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., Mhaouty-Kodja, S., 2009. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci* 29, 4461-4470.
- Saketos, M., Sharma, N., Santoro, N.F., 1993. Suppression of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in normal women by glucocorticoids. *Biol Reprod* 49, 1270-1276.
- Schulz, R., Wilhelm, A., Pirke, K.M., Gramsch, C., Herz, A., 1981. Beta-endorphin and dynorphin control serum luteinizing hormone level in immature female rats. *Nature* 294, 757-759.
- Shirayama, Y., Ishida, H., Iwata, M., Hazama, G.I., Kawahara, R., Duman, R.S., 2004. Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. *J Neurochem* 90, 1258-1268.
- Simerly, R.B., Young, B.J., Carr, A.M., 1996. Co-expression of steroid hormone receptors in opioid peptide-containing neurons correlates with patterns of gene expression during the estrous cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 40, 275-284.
- Skinner, D.C., Caraty, A., Allingham, R., 2001. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology* 142, 573-579.
- Tronche, C., Pierard, C., Coutan, M., Chauveau, F., Liscia, P., Beracochea, D., 2010. Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93, 343-351.

- Uht, R.M., Anderson, C.M., Webb, P., Kushner, P.J., 1997. Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology* 138, 2900-2908.
- Vandevyver, S., Dejager, L., Libert, C., 2014. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev* 35, 671-693.
- Voss, T.C., Schiltz, R.L., Sung, M.H., Yen, P.M., Stamatoyannopoulos, J.A., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Miranda, T.B., John, S., Hager, G.L., 2011. Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. *Cell* 146, 544-554.
- Weems, P.W., Witty, C.F., Amstalden, M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2016. kappa-Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology* 157, 2367-2379.
- Whirledge, S., Cidlowski, J.A., 2013. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 154, 4450-4468.
- Yeo, S.H., Kyle, V., Morris, P.G., Jackman, S., Sinnott-Smith, L.C., Schacker, M., Chen, C., Colledge, W.H., 2016. Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J Neuroendocrinol* 28.
- Yip, S.H., Boehm, U., Herbison, A.E., Campbell, R.E., 2015. Conditional Viral Tract Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. *Endocrinology* 156, 2582-2594.

**FIGURE CAPTIONS****Figure 1: Dex up-regulates *Pdyn* expression in GT1-7 cells upon pretreatment with high E2 concentrations**

GT1-7 cells were pretreated or not with 0.1 nM or 100 nM E2 for 24 h. Cells were then exposed to vehicle (V) or 100 nM Dex for 1.5, 6 h or 24 h. Relative transcript expression of *Pdyn* was normalized to *Actb* expression, arbitrarily set at 1 for vehicle condition. Data are expressed as medians  $\pm$  IQR from four independent experiments performed in triplicates. Non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis tests followed by post-test of Dunn, \* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$  compared to vehicle.

**Figure 2: *Pdyn* transcription is activated via GR in GT1-7 cells upon high Dex concentrations**

A, GT1-7 cells were pretreated with 100 nM E2 for 24 h before exposure to vehicle (V), 10 or 100 nM Dex for 6 h. B and C, After 100 nM E2 pretreatment, GT1-7 cells were treated with 100 nM Dex in the absence or in the presence of RU486, a GR antagonist (B), DRB or Actinomycin D (ActD), two transcription inhibitors (C) for 6 h. Relative *Pdyn* transcript expression was normalized to the one of *Actb*, and arbitrarily set at 1 for vehicle condition. Data are expressed as medians  $\pm$  IQR from three independent experiments performed in triplicates. Non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis tests followed by post-test of Dunn, \*\*\* $P \leq 0.001$  compared to vehicle condition.

**Figure 3: Dex induces up-regulation of *Pdyn* expression within AVPV of ovariectomized + E2 mice**

A, Ovariectomized mice were implanted with E2. Mice were sacrificed after 3 weeks and brain slices were incubated for 6 h with either the vehicle (V) or 100 nM Dex. Total RNAs extracted from punches of the AVPV or ARC were isolated as described in Material and Methods. B and C, Relative expression levels of mRNA for *Pdyn* (B) or *Kiss1* (C) were determined by RT-qPCR analysis of AVPV or ARC samples from individual mouse. Transcript levels were normalized to *Actb* transcripts abundance. Medians  $\pm$  IQR (n = 5 to 7 mice per group) mRNA expression levels are presented. Results are from one experiment performed in

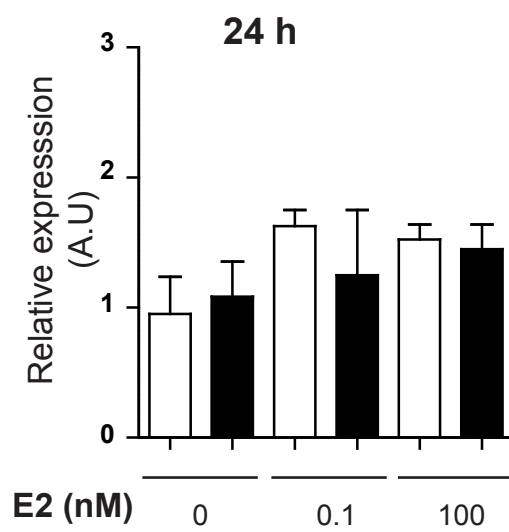
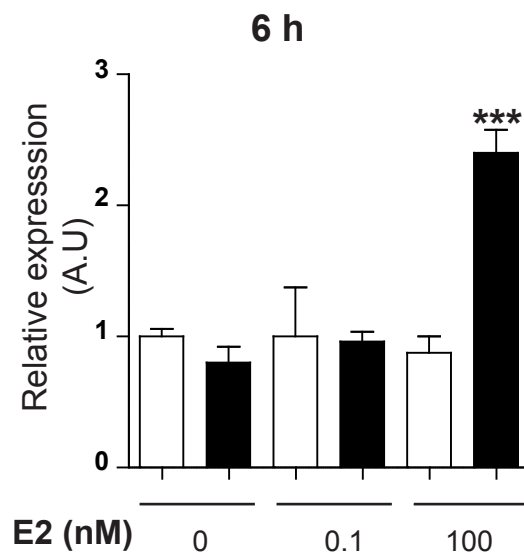
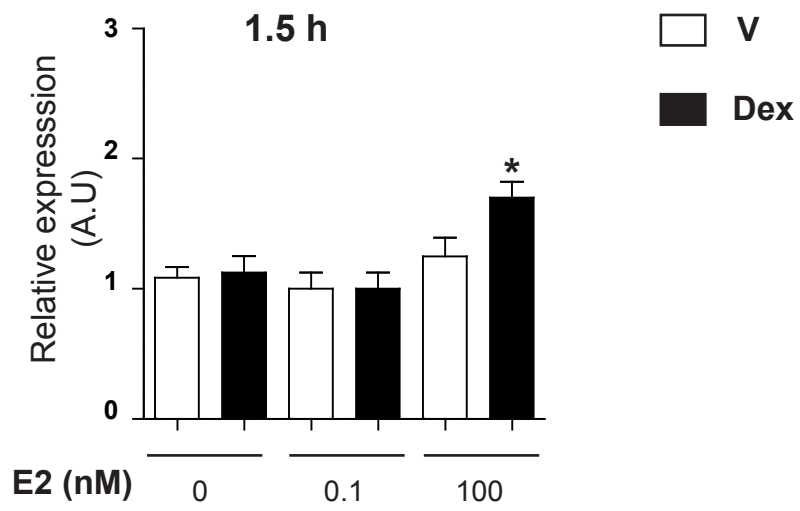
triplicates. Statistical significance of difference between Dex and vehicle for ARC or AVPV was analyzed by using the Mann-Whitney *U*-tests. \*  $P < 0.05$ .

**Figure 4: Dex transactivates *Pdyn* proximal promoter**

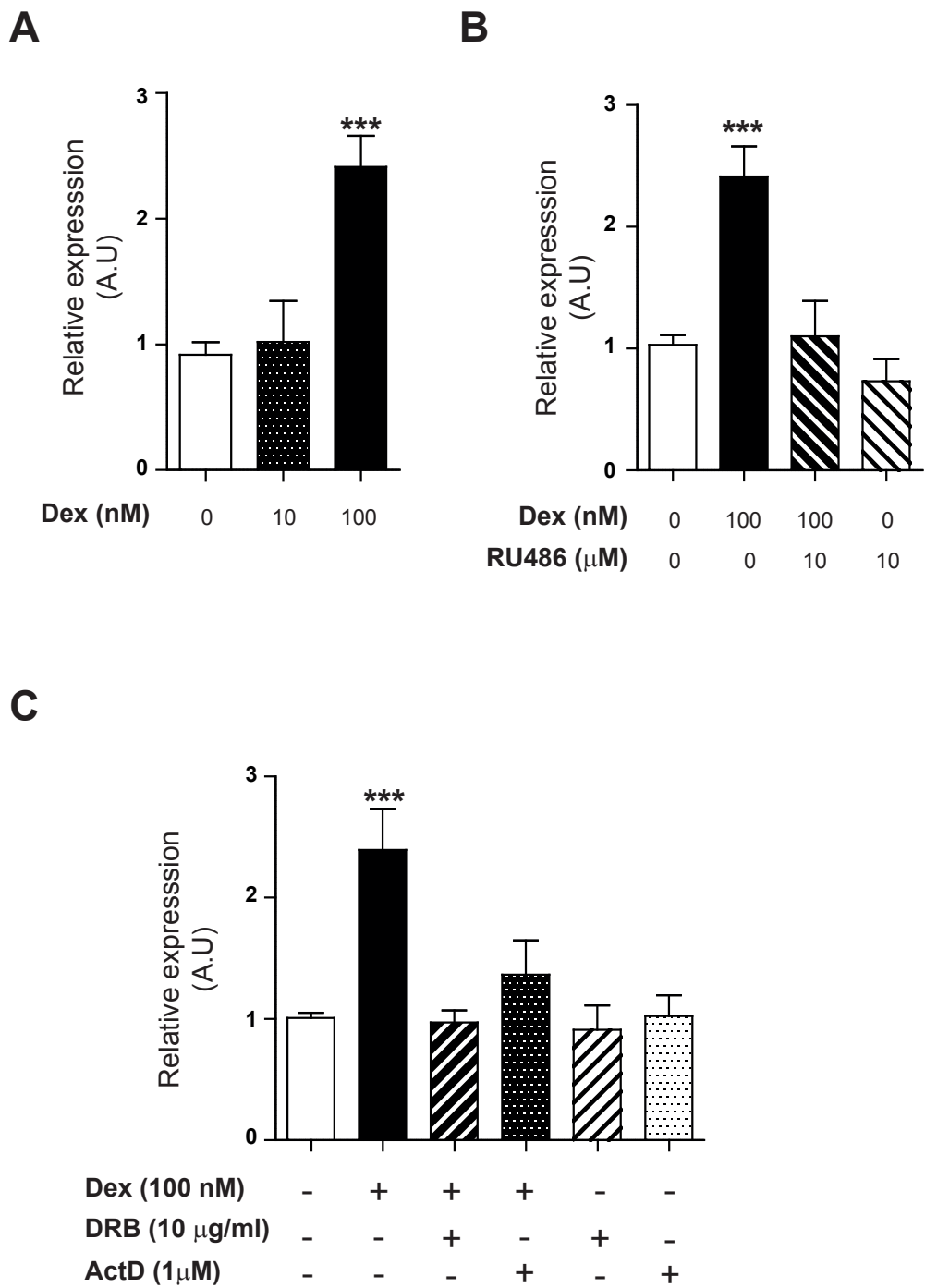
1.7 kb mouse *Pdyn* promoter was inserted upstream of the *Firefly* luciferase gene in pGL4.16 vector. *Pdyn* promoter or pGL4.16 vector (pGL-vector) was transfected in GT1-7 cells together with an internal control vector containing *Renilla* luciferase. Twenty-four h post-transfection, cells were treated either with ethanol, 100 nM Dex or 100 nM E2 in the presence or absence of 10  $\mu$ M RU486, a GR antagonist. Firefly luciferase activity was assessed 24 h after treatment and normalized relative to *Renilla* luciferase activity, arbitrarily set at 1 for vehicle condition. Results are medians  $\pm$  IQR of 3 independent experiments performed in six replicates (non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis tests followed by post-test of Dunn, \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 5: E2 priming is required for Dex-induced GR recruitment on *Pdyn* promoter**

GT1-7 cells, pretreated or not with 100 nM E2, were treated for 1 h with 100 nM Dex or ethanol (V), fixed and lysed. ChIP assays were performed on sheared chromatin extracts using GR antibody, or unrelated rabbit IgG antibody as a negative control. Immunoprecipitated and eluted DNA fragments were analyzed by qPCR using primer pair encompassing genomic sequence containing GREs within the proximal *Pdyn* gene (see sequences in Supplemental Tables). Histograms represent the fold induction of GR enrichment compared to vehicle condition, arbitrarily set at 1, and are medians  $\pm$  IQR of three independent experiments performed in triplicates. Statistical difference is indicated as compared to vehicle condition for Dex-induced cells treated (non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis tests followed by post-test of Dunn, \*\* $P < 0.01$ ).



**Figure 1**



**Figure 2**

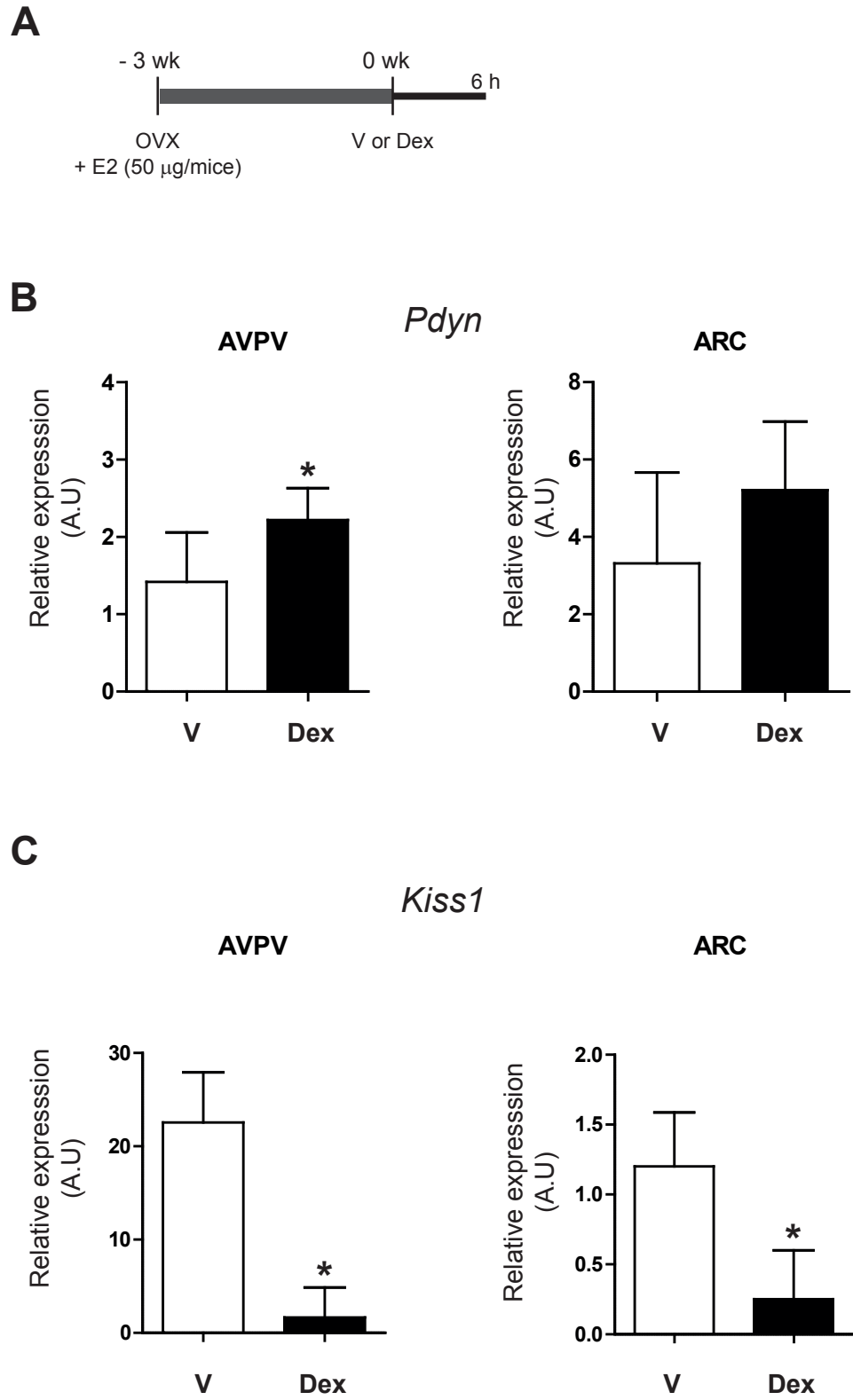


Figure 3



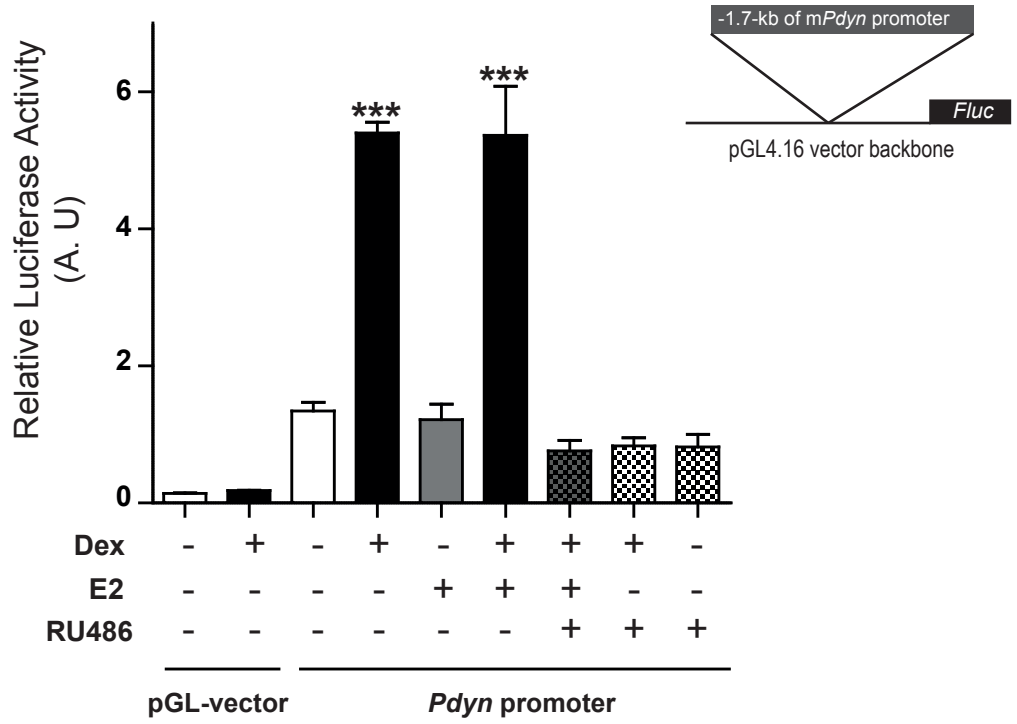


Figure 4

*Pdyn*

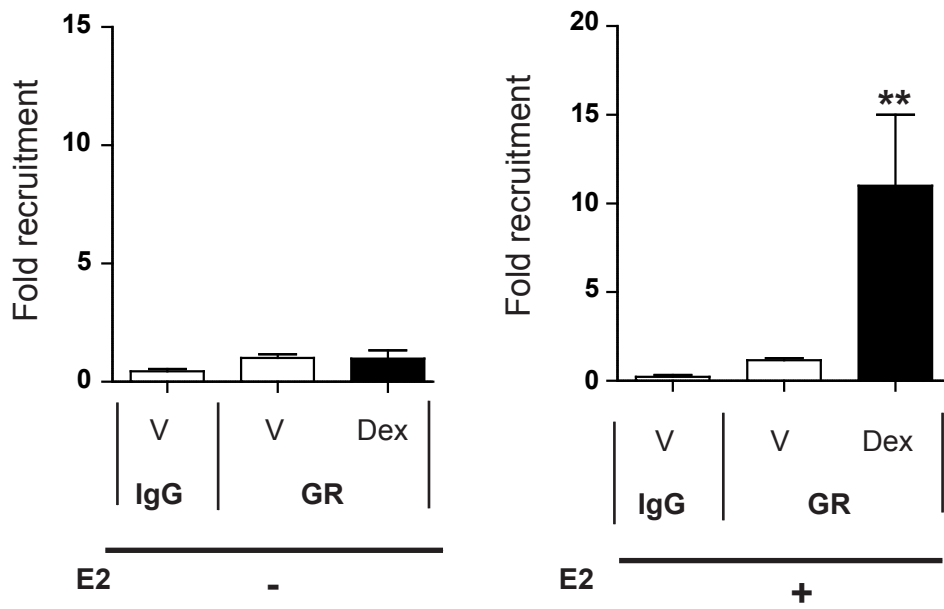
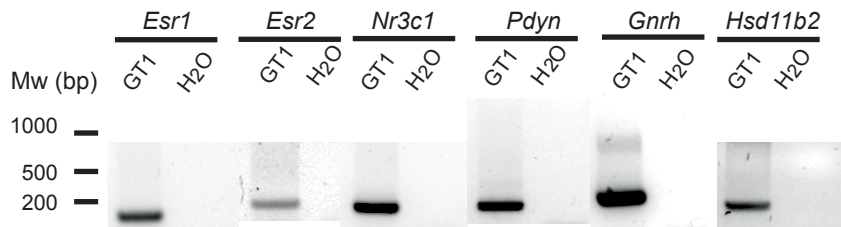


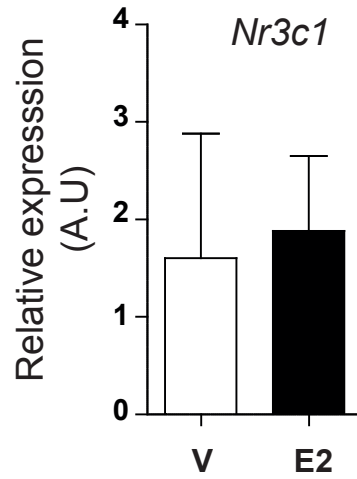
Figure 5



### Supplemental Figure S1: Expression of different genes in GT1-7 cells

Total RNAs were extracted from GT1-7 cells. Expression of *Esr1*, *Esr2*, *Nr3c1*, *Pdyn*, *Gnrh* and *Hsd11b2* in GT1-7 cells was examined by RT-PCR. Primers sequences and amplicon sizes are summarized in **Supplemental Tables**. Aliquots of PCR products were electrophoresed on 2 % agarose gel and visualized by SYBER safe staining. H<sub>2</sub>O corresponds to negative control condition with no added cDNA. Mw indicates molecular weight marker.

**A**



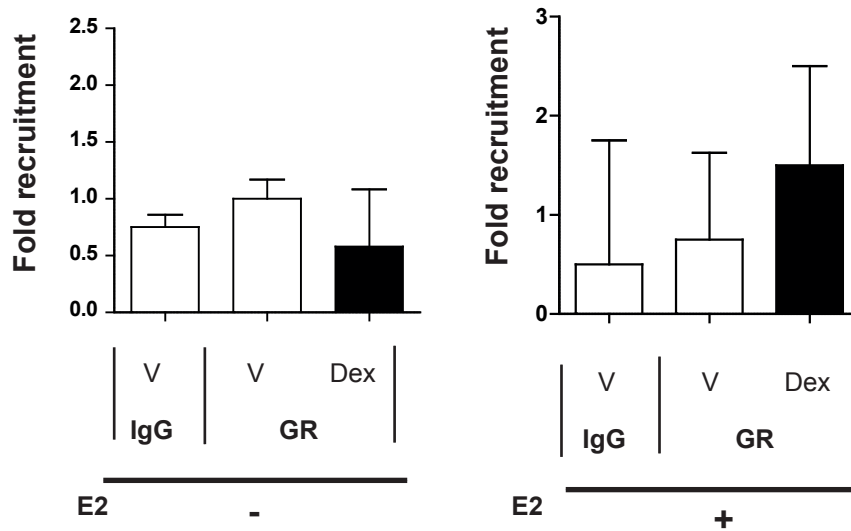
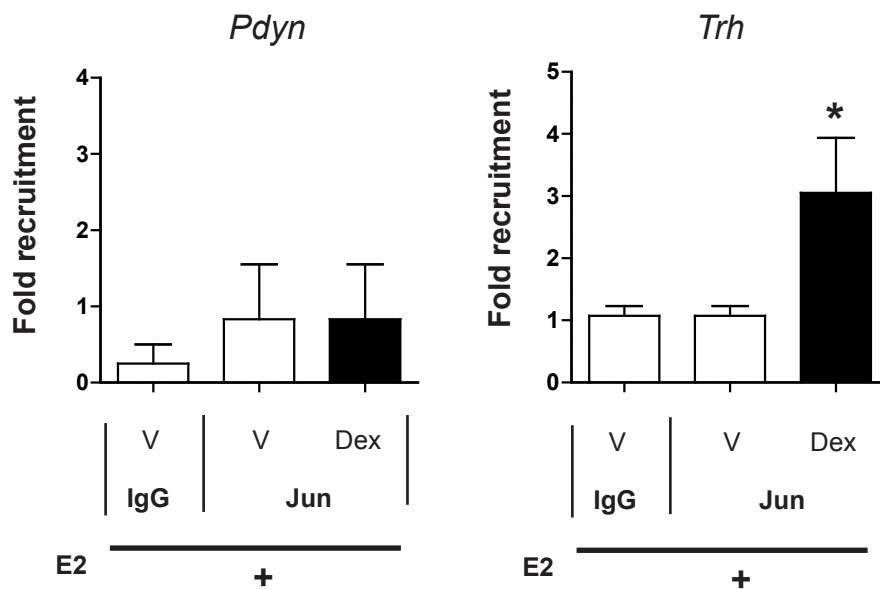
**B**



**Supplemental Figure S2: E2 treatment does not modify *Nr3c1* mRNA and GR protein levels**

GT1-7 cells were treated or not (V) with 100 nM E2 for 24 h. A, Relative expression of *Nr3c1* was analyzed. Transcripts were quantified by RT-qPCR and normalized to *36B4* mRNA expression. Error bars indicate the median $\pm$ IQR from three biological replicates. B, GR expression was analyzed by immunoblotting (monoclonal anti-GR D6H2L at 1/1000 dilution) and normalized to  $\alpha$ -tubulin expression.



**A***Ucp1***B**

**Supplemental Figure S4: GR is not recruited on the proximal region of *Pdyn* promoter encompassing AP-1 site**

GT1-7 cells, pretreated or not with 100 nM E2, were treated for 1 h with 100 nM Dex or ethanol (V). After cell fixation and lysis, ChIP assays were performed on the chromatin extracts using GR antibody (A), Jun antibody (B) or unrelated rabbit IgG antibody used as negative control (A and B). Immunoprecipitated and eluted DNA fragments were analyzed by qPCR using primer pair encompassing genomic sequence (see sequences in **Supplemental Tables**) of the *Ucp1* gene used as negative locus control (A), the *Pdyn* and the *Trh* genes (B). Histograms represent the fold induction of GR (A) or Jun (B) enrichment compared to vehicle condition, arbitrary set at 1, and are medians±IQR of three independent experiments performed in triplicates. Statistical difference, assessed by non-parametric Anova Kruskal-Wallis tests followed by post-test of Dunn, is indicated as compared to vehicle condition. \*\*  $P < 0.01$ .

## Supplemental Tables

### Primer sequences used in PCR and RTqPCR

Name	Acc.Number	Amplicon (bp)	Forward primer (5' > 3')	Reverse primer (5' > 3')
<i>Esr1</i>	NM_007956	128	ACAAGATCACAGACACTTTG	CATGCCTTTGTTACTCATGT
<i>Esr2</i>	NM_010157	183	TATGCATCTCTGGGTATCATT	GACCATTCCTACTTCGTAAC
<i>Gnrh</i>	NM_008145	193	AGCACTGGTCCTATGGGTTG	CCTGGCTTCCTCTTCAATCA
<i>Hsd11b2</i>	NM_008289	153	AACCTCTGGGAGAAACGCAAG	GGCATCTACAACCTGGGCTAAGG
<i>Nr3c1</i>	NM_008173	151	TTCTGTTTCATGGCGTGAGTAC	CCCTTGGCACCTATTCCAGTT
<i>Pdyn</i>	NM_018863	144	TACTACACCACACTCCACAG	GATCCAAGATTCAGAAGGTA
<i>36b4</i>	NM_007475	129	AGCGCGTCCTGGCATTGTCTGT	GGGCAGCAGTGGTGGCAGCAGC

### Primer sequences used in ChIP qPCR

Name	Acc.Number	Amplicon (bp)	Forward primer (5' > 3')	Reverse primer (5' > 3')
<i>Ucp1</i>	NM_009463	148	GGTGCCCTGTAAATGGTGTCT	CTGGCAGGAAGAGTGGAAAGG
<i>Pdyn</i> (GRE)	NM_018863	80	TGTCACCCTAGTTGTATGAG	CACACTTTGTA CTCTCTGG
<i>Trh</i>	NM_009426	81	ATTCATTGTAGCCTTAGAGC	AATTCCCCTCTTCTAGTTTC
<i>Pdyn</i> (AP-1)	NM_018863	72	ACTCCACCTTGTCTCTTACA	TTAAGTTCTACCTCCATAAGC







## **II-Conclusion-Discussion-Données complémentaires**

Dans cette première partie, nous montrons que le prétraitement des cellules GT1-7 par de fortes concentrations d'E2 ( $10^{-7}$  M) est indispensable pour permettre aux GC de stimuler l'expression du précurseur de la Dyn A (*Pdyn*). Ces effets transcriptionnels, relayés par GR, sont uniquement observés en présence de fortes concentrations de GC ( $10^{-7}$  M), mimant celles atteintes au cours d'un stress. Ces résultats *in vitro* sont confirmés par les résultats *in vivo* obtenus sur des souris ovariectomisées, en présence de fortes concentrations d'E2, où les GC augmentent significativement l'expression de *Pdyn* et diminuent celle de *Kiss1* dans l'AVPV. Les neurones à *Kiss1* présents dans ce noyau sont responsables du pic préovulatoire de GnRH/LH induit par l'E2. Nos résultats suggèrent que les GC agiraient pendant une fenêtre étroite du cycle œstrien, à la fin de la phase folliculaire, au moment où les concentrations en E2 atteignent un seuil critique.

### **A- La Dyn A, un nouveau relais pour les GC au cours du stress**

Nos résultats sont en accord avec ceux de Luo et ses collaborateurs qui montrent que les GC empêchent l'apparition de l'œstrus en inhibant l'expression de *Kiss1* dans l'AVPV (Luo et al., 2016), et complètent les données obtenues par Helena et ses collaborateurs montrant l'implication d'une baisse d'expression de Dyn A dans l'apparition du pic préovulatoire (Helena et al., 2015). En perspectives de ce travail, il serait intéressant de comparer les effets d'un excès de GC sur l'expression de *Pdyn* chez des souris en fin de phase folliculaire à celle de souris en phase lutéale. Deux groupes de souris femelles à différents stades du cycle pourraient être étudiés : 1) un groupe en proœstrus/œstrus (concentrations élevées d'E2) et 2) un groupe en diœstrus 1/diœstrus 2 (concentrations plus faibles d'E2). Par l'utilisation des mêmes techniques employées dans l'Article 1, il serait possible de comparer, en fonction du cycle œstrien, l'effet des GC sur l'expression de *Pdyn* et de *Kiss1* dans l'AVPV et l'ARC. Un co-traitement des GC avec un antagoniste du KOR, la naloxone, permettrait aussi d'évaluer le rôle de la signalisation de Dyn A sur l'expression de *Kiss1* dans l'AVPV. Il paraît aussi essentiel de déterminer si la Dyn A agit directement sur les neurones à *Kiss1* de l'AVPV et s'il existe des KOR sur ces neurones. Des techniques d'immunofluorescence, recherchant la co-expression de *Kiss1* et KOR sur des tranches d'AVPV, pourront répondre en partie à cette question. L'étude de la région promotrice de *Kiss1* sera également importante et permettra de



vérifier si les séquences CRE (cAMP response elements) putatives présentes sur ce promoteur pourraient être la cible de la signalisation induite par le couple Dyn (1-17) et KOR.

La Dyn A est exprimée dans les neurones KNDy chez les rongeurs, les moutons et les chèvres, mais est peu présente chez l'homme (Skrapits et al., 2015). L'importance de la Dyn A dans la régulation de la reproduction chez les rongeurs et les moutons doit être confirmée chez l'homme. La régulation des fonctions de reproduction pourrait y être assurée par d'autres opioïdes endogènes comme la met-enképhaline ou la pro-enképhaline qui sont détectées chez l'homme dans les neurones à Kiss1 (Skrapits et al., 2015).

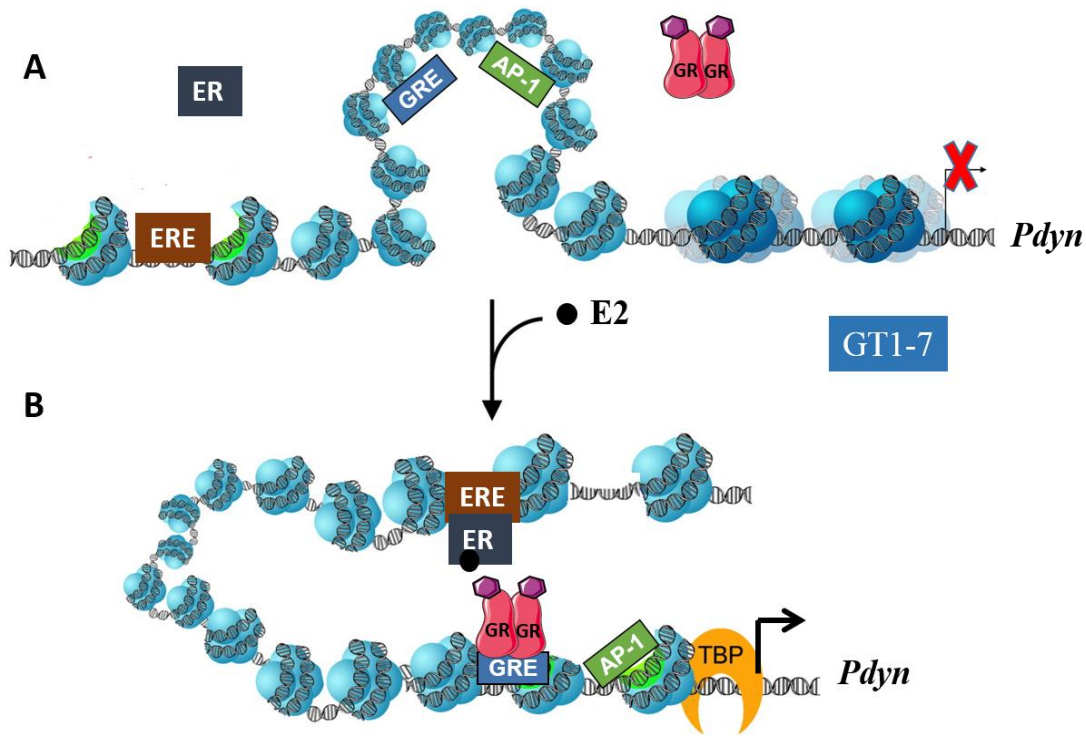
En dehors de l'hypothalamus, la Dyn A peut agir directement sur l'hypophyse. La Dyn A est exprimée dans l'antéhypophyse (Spampinato et al., 1995) de souris et son récepteur KOR est détecté dans les cellules gonadotropes L $\beta$ T2 (Ayrou et al., 2017; Mijiddorj et al., 2012). Ces données suggèrent donc un rôle potentiel direct de la Dyn A dans la régulation de l'axe gonadotrope (hypothalamus et hypophyse) au cours du stress.

## **B- L'E2 régule l'activité des GC en période de stress**

Nos résultats mettent aussi en évidence l'importance de l'E2 dans la régulation de l'activité des GC. Pour mieux comprendre le « dialogue croisé » entre la signalisation des GC et celle de l'E2, nous avons cherché à déterminer le niveau de régulation de l'E2 sur l'activité du GR. Nous n'avons pas observé d'effets de l'E2 sur l'expression (ARNm et protéique) du GR, suggérant que l'E2 agirait au niveau génomique. Le clonage de la région proximale du promoteur de *Pdyn* (1,7 Kb) en amont du gène de la luciférase et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont donné des résultats très intéressants.

Ainsi, nous avons montré :

- 1) l'implication de motifs GRE proximaux dans l'induction de l'expression de *Pdyn* par les GC dans les cellules GT1-7,
- 2) l'importance du contexte cellulaire et des co-facteurs spécifiques hypothalamiques (Bolt et al., 2013) dans la régulation transcriptionnelle de *Pdyn* ; A l'inverse des cellules GT1-7, aucune transactivation du gène de la luciférase n'a été observée dans les cellules



**Figure 25 : Hypothèse d'interaction entre les GC et l'E2 dans les cellules GT1-7**

L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer le modèle suivant :

- A-** En absence d'E2, les GC complexés à leurs récepteurs GR ne peuvent pas accéder aux GRE présents dans la région promotrice de *Pdyn*, empêchant ainsi la transcription de la *Pdyn*.
- B-** En présence de fortes concentrations d'E2, physiologiquement rencontrées en fin de phase folliculaire, l'E2 couplé à son récepteur ER se lierait à un ERE pour induire le remodelage de la chromatine, favorisant l'accessibilité du complexe GC/GR aux GRE de la région promotrice de la *Pdyn*, stimulant ainsi la transcription de la *Pdyn*.

GR : Récepteur des glucocorticoïdes ; GRE : Élément de réponse aux glucocorticoïdes ; ER : Récepteur des œstrogènes ; TBP : TATA binding protein ; ERE : Élément de réponse aux œstrogènes ; AP-1 : Activator protein binding site.

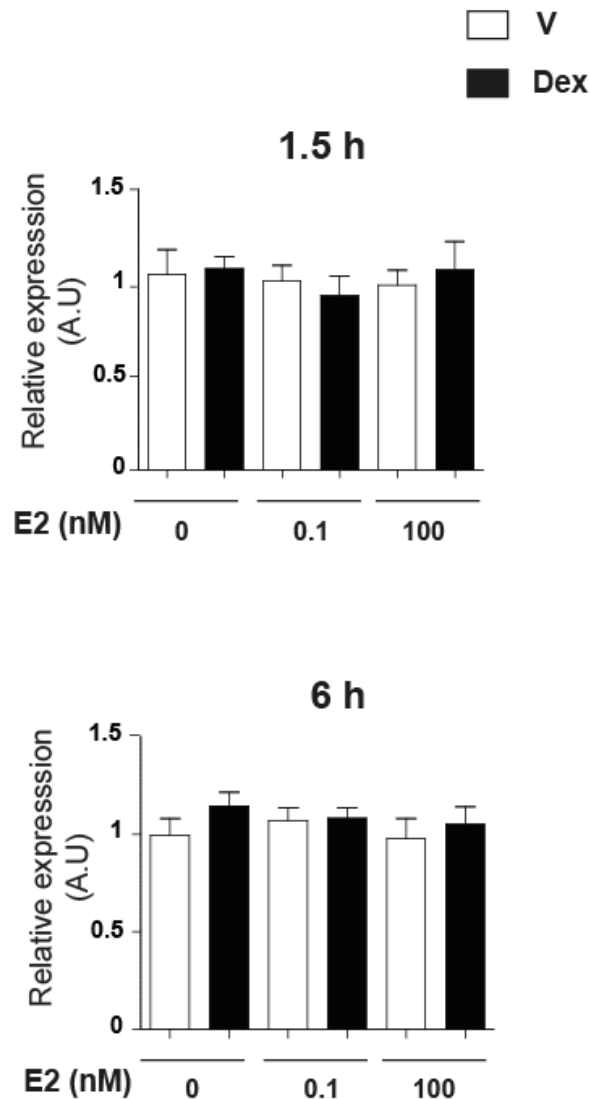
HEK293T (Human Embryonic Kidney) ou dans les cellules COS-7 (Monkey kidney fibroblast-like cell),

3) l'absence d'effets directs de l'E2 sur la région proximale de la *Pdyn*.

Des expériences complémentaires de CHIP réalisées sur les cellules GT1-7 ont montré que les fortes concentrations d'E2 sont nécessaires au recrutement spécifique du GR sur les GRE localisés au niveau du promoteur de la *Pdyn*.

L'ensemble de ces données nous permet de proposer un mécanisme de régulation illustré dans la **Figure 25** à travers lequel l'E2 *via* ER permettrait l'ouverture de la chromatine et l'accessibilité du GR aux GRE pour induire la transcription de la *Pdyn*, selon des mécanismes « d'assistance » (Miranda et al., 2013, 2013; Voss et al., 2011). En effet, la structure de la chromatine s'est avérée être un facteur important dans la détermination de la liaison du GR aux éléments de réponse et dans la transcription régulée par les hormones. Pour que le GR se lie aux GRE, il est indispensable que la chromatine devienne accessible (John et al., 2011). L'accessibilité de la chromatine est spécifique à chaque cellule, qui possède un panel de protéines régulatrices spécifiques (Miranda et al., 2013; Narlikar et al., 2013). Ainsi, la régulation de l'accessibilité du GR aux motifs GRE est un mécanisme essentiel, qui pourrait en partie expliquer les réponses variées aux GC selon le type cellulaire (John et al., 2011). Le GR est donc capable de lier des GRE dans la partie proximale du promoteur de la *Pdyn*, néanmoins, nous ne pouvons pas exclure une liaison du GR sur d'autres sites en amont des 1,7 Kb étudiés. En effet, des études de ChiP-Seq ont permis de montrer sur plusieurs types cellulaires que le GR régule ses gènes cibles à de longues distances (plus de 10 Kb voire 100 Kb), et que sa liaison à l'ADN ne dépendait de la présence de motif GRE que dans 50% des cas (Miranda et al., 2013; Pan et al., 2011; Polman et al., 2012). Le GR peut aussi moduler l'expression des gènes *via* des mécanismes de « tethering » en s'associant avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1, SP1 ou NFκB (Rani et al., 2009).

En perspectives de ce travail, il serait essentiel d'identifier la localisation des sites spécifiques sur lesquels GR et ER coopèrent à l'échelle cellulaire pour augmenter l'expression de la *Pdyn*. Nous proposons d'utiliser la technique de DNase-Seq qui consiste à mesurer et à identifier la distribution des produits de clivage de la DNase I. Cette enzyme n'agit que dans les régions où l'ADN est décondensé ou ouverte. Ainsi, nous pourrions



**Figure 26 : La dexaméthasone n'augmente pas l'expression de RFRP-3 (*Npvf*) dans les cellules GT1-7**

Les cellules GT1-7 ont été prétraitées ou non avec 0,1 ou 100 nM E2 pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été traitées avec le véhicule (V) ou 100 nM de Dex pendant 1,5 ou 6 heures. L'expression du transcrite *Npvf* a été normalisée avec celle de la  $\beta$ -actine.

Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  S.E.M. à partir de quatre expériences indépendantes effectuées en tripliquat.

Tests non paramétriques Kruskal-Wallis.

vérifier si l'E2 modifie le profil de digestion à la DNase I, et si et comment elle favorise l'accessibilité du GR à la chromatine.

### **C- L'expression de RFRP-3 (*Npvf*) n'est pas modulée par les GC dans les cellules GT1-7**

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés aux effets de GC sur l'expression de RFRP-3, un autre neurorégulateur de la GnRH. Comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, le RFRP-3 joue un rôle important dans la régulation des fonctions de reproduction qui dépend de l'espèce et du sexe (Ancel et al., 2017; Decourt et al., 2016; Ubuka et al., 2016). Les neurones à RFRP-3 sont principalement localisés dans le DMH et possèdent une activité réduite pendant le pic préovulatoire de LH (Gibson et al., 2008; Poling et al., 2012; Tanco et al., 2016). Les neurones à RFRP expriment le ER $\alpha$  et les PR (Lehman et al., 1993) et se projettent vers l'AVPV, l'ARC et le POA (Kriegsfeld et al., 2010; Poling et al., 2012). Les récepteurs du RFRP-3 sont présents sur les neurones à Kiss1, suggérant ainsi des interactions potentielles entre le système RFRP-3 et Kiss1 dans la genèse du pic préovulatoire de GnRH/LH chez la souris (Rizwan et al., 2012). Un stress d'immobilisation chez le rat entraîne une augmentation du nombre de neurones exprimant le RFRP-3 dans le DMH, alors que la surrénalectomie prévient l'effet du stress sur l'expression de ce neuropeptide (Kirby et al., 2009). Les neurones à RFRP-3 pourraient jouer un rôle important dans les actions des GC puisque 53% d'entre-eux expriment le GR (Iwasa et al., 2017; Kirby et al., 2009). Ainsi, comme décrit dans l'Article 1 pour *Pdyn*, nous avons prétraité les cellules GT1-7 pendant 24 heures avec une faible ( $10^{-10}$  M) ou une forte ( $10^{-7}$  M) concentration d'E2. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 1,5 ou 6 heures avec un agoniste des GC, la dexaméthasone ou Dex ( $10^{-7}$  M) avant d'en extraire leurs ARN totaux pour réaliser des RT-qPCR. Comme la montre la **Figure 26**, quel que soit le temps d'incubation, la Dex n'a aucun effet sur l'expression du RFRP-3 (*Npvf*), quelle que soit la concentration d'E2 utilisée, dans les cellules GT1-7. L'expression de RFRP-3 ne semble donc pas être modifiée par les GC dans nos conditions expérimentales et sur ces cellules. Ces résultats sont à comparer aux nombreuses autres études décrivant ou non des effets du stress sur l'expression de RFRP-3 ; ces effets dépendent du type de stress, du sexe et de l'espèce. Pour exemple, l'induction d'un stress inflammatoire par injection de fortes doses de lipopolysaccharide (LPS) (5 mg/kg) chez la ratte, entraîne une augmentation de l'expression





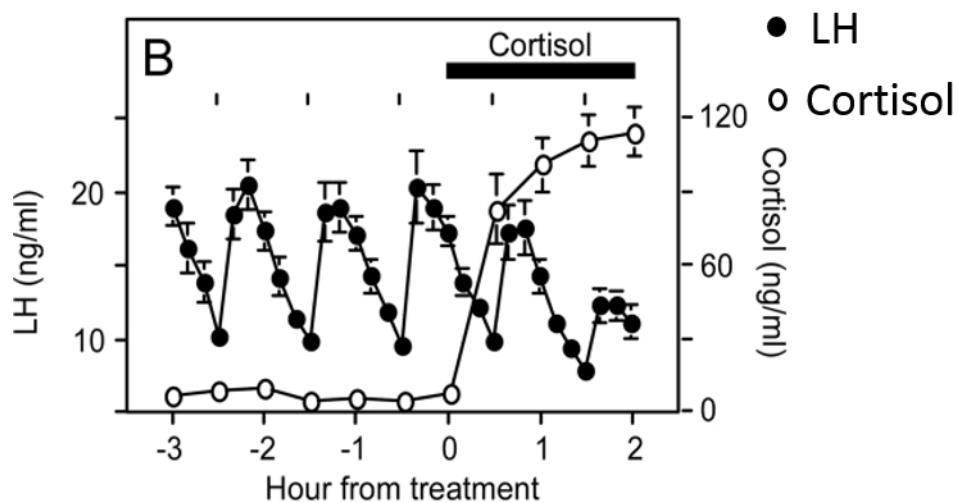
de RFRP-3 et une chute de la sécrétion de GnRH/LH (Iwasa et al., 2017). En revanche, l'injection de doses 10 fois inférieures de LPS (500 µg/kg) ne modifie pas l'expression de RFRP-3 alors que la chute de la sécrétion de LH est conservée (Lopes et al., 2012). De même, un stress d'isolement chez la brebis ovariectomisée ne modifie pas l'expression de RFRP-3 ou de son ARNm dans les régions du PVN et du DMH (Papargiris et al., 2011) alors qu'elle est augmentée chez le rat mâle (Kirby et al., 2009). Le RFRP-3 aurait plutôt un rôle potentiel dans le dysfonctionnement des comportements sexuels et alimentaires au cours du stress (Iwasa et al., 2017; Kriegsfeld et al., 2015; Ubuka et al., 2014).

**En résumé**, notre travail décrit un nouveau dialogue entre l'E2 et les GC qui a lieu dans des conditions très particulières, en présence de fortes concentrations d'E2 et de GC. Au niveau hypothalamique, les GC stimuleraient l'expression de la Dyn A, responsable d'une diminution directe et/ou indirecte (*via* les neurones à Kiss1 de l'AVPV) de la sécrétion de GnRH et ainsi bloquerait/décalerait l'apparition du pic préovulatoire de GnRH/LH survenant en fin de la phase folliculaire (concentrations élevées en E2). Toutefois, pour favoriser les effets des GC lors du stress, l'E2 pourrait parallèlement diminuer la synthèse hépatique et la production de CBG (lie les GC circulants (Bronstein et al., 2015)) et ainsi augmenter la quantité de GC biodisponibles ; il a été notamment montré dans une lignée hépatique HepG2 que de fortes concentrations d'E2 diminuent la biosynthèse de CBG (Mihirshahi et al., 2006). D'autre part, l'E2 est aussi décrit pour diminuer l'expression de la 11βHSD-2 dans plusieurs régions de l'hypothalamus (Haque et al., 2015; Robson et al., 1998), et pourrait également favoriser la production d'une forme biologiquement active de GC au cours du stress.



**2<sup>ème</sup> partie :**

**Identification d'une nouvelle signalisation rapide des  
glucocorticoïdes dans les cellules gonadotropes**



**Figure 27 : Le cortisol inhibe la sécrétion pulsatile de LH chez la brebis**

Des brebis ovariectomisées reçoivent toutes les heures une décharge de GnRH (représentée par les barres en haut de la figure). Durant les deux dernières heures de l'expérience, les brebis reçoivent en continue une perfusion de cortisol (0,40 mg/kg/h). Un prélèvement sanguin est collecté chez ces brebis, toutes les 10 minutes pendant 5 heures ; les concentrations de LH (rond noir) et le cortisol (rond blanc) sont ensuite mesurées.

Breen et al., 2008.

## I-Contexte et objectifs de l'étude

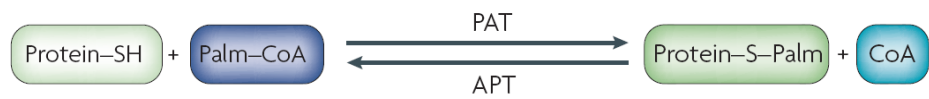
Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale de ce manuscrit, les GC sont les médiateurs essentiels du stress et leur sécrétion excessive conduit à un grand nombre de pathologies (Akhter et al., 2016; Allsworth et al., 2007; Luo et al., 2016; Lynch et al., 2014; Suh et al., 1988). De nombreuses études ont montré l'effet direct des GC sur l'hypophyse. Les GC régulent, en particulier, l'expression de la sous-unité  $\beta$  de la LH (Breen and Mellon, 2014). Néanmoins, depuis plusieurs années, les GC sont aussi décrits pour avoir des effets rapides non génomiques dans un grand nombre de modèles cellulaires (Rainville et al., 2015). Un GR membranaire a été déjà identifié dans de nombreuses cellules, en revanche, il n'y a que très peu de données sur l'existence et le rôle d'un GR membranaire dans les cellules hypophysaires (Deng et al., 2015b; Wehmeyer et al., 2014). Dans la cellule gonadotrope, de nombreux arguments plaident en faveur d'effets directs et rapides des GC sur la libération de LH (Breen et al., 2008). En effet, l'injection de cortisol à des brebis ovariectomisées réduit très fortement l'action de la GnRH sur la sécrétion (fréquence et amplitude) de LH dès 30 minutes de traitement (cortisol plasmatique  $\sim 80$  ng/ml) (Breen et al., 2008) (**Figure 27**). Cet effet s'amplifie avec l'augmentation des concentrations plasmatiques de cortisol.

L'ensemble de ces données suggèrent qu'il existe un **GR membranaire à l'origine d'une signalisation non génomique rapide qui permettrait de réguler la libération de LH**. Pour répondre à cette question importante, la deuxième partie de mon travail de thèse a donc eu plusieurs objectifs :

- 1- Identifier la voie de signalisation non génomique des GC dans les cellules gonadotropes hypophysaires.

La nature lipophile des GC rend difficile la dissociation des effets génomiques des effets rapides non génomiques de ce stéroïde. Pour tenter d'étudier la contribution relative des effets non génomiques rapides et des effets génomiques classiques, nous avons eu recours à la corticostérone couplée à la BSA (Cort-BSA), un composé qui ne pénètre pas la membrane plasmique et reste donc en extra-cellulaire. Ce dérivé a déjà été utilisé dans plusieurs études (Rainville et al., 2015; Zheng et al., 1996).

Au même titre que pour les cellules hypothalamiques, l'obstacle majeur des études sur les mécanismes de régulation des fonctions gonadotropes est l'absence d'un modèle cellulaire idéal ; les cultures primaires hypophysaires de rat ne comptent que 5% de cellules



### **Figure 28 : La palmitoylation présente un caractère réversible**

Les palmitoyl-transférases (PAT) catalysent l'addition d'un palmitoyl-CoA sur les protéines substrats tandis que les palmitoyl-thioestérases, comme l'APT, libèrent le palmitate qui se lie ensuite au Coenzyme A (CoA) pour former le palmitoyl-CoA.

Linder et Deschenes, 2007.

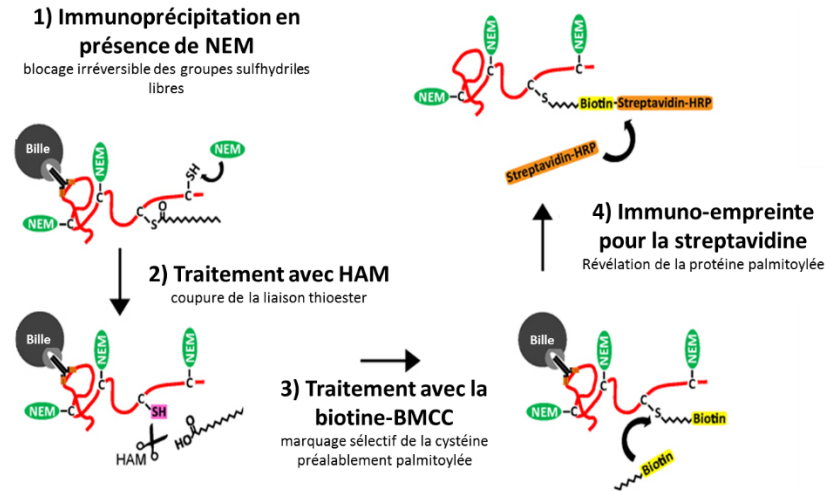
gonadotropes bi-hormonales (Pals et al., 2008). Plusieurs lignées cellulaires hypophysaires immortalisées ont déjà été proposées comme modèles d'étude de la signalisation gonadotrope (Kaiser et al., 2011). Parmi elles, nous avons choisi d'utiliser une lignée cellulaire murine gonadotrope, les cellules L $\beta$ T2, établie par l'équipe de P. Mellon, Californie, USA, qui exprime le GR. Ces cellules constituent une lignée gonadotrope pure générée par une stratégie d'oncogenèse ciblée (Turgeon et al., 1996) dans laquelle l'expression de l'oncogène immortalisant, l'antigène grand T de SV40 est placé sous la contrôle de la région promotrice (1,8 Kb) de *Lh $\beta$*  de rat. Ce modèle cellulaire présente l'avantage de sécréter la LH en réponse au GnRH, à l'opposé des cellules gonadotropes  $\alpha$ T3 immatures non sécrétantes (Windle et al., 1998).

## 2- Préciser l'existence d'une forme membranaire de GR dans les cellules gonadotropes et déterminer le mécanisme moléculaire d'adressage membranaire du GR

Pour préciser la présence d'un GR à la membrane plasmique des cellules L $\beta$ T2, nous avons utilisé des techniques biochimiques classiques de fractionnement subcellulaire. Cette technique permet d'isoler différentes fractions cellulaires après centrifugation différentielle et d'en évaluer la pureté par analyse en western-blot avec des protéines d'intérêt spécifiques de chaque fraction.

L'adressage membranaire est déjà décrit pour d'autres récepteurs stéroïdiens tels que ER et PR (Pedram et al., 2007) ; il met en jeu une interaction avec la cavéoline 1 et une modification post-traductionnelle, la palmitoylation. Cette modification a lieu majoritairement au niveau de l'appareil de Golgi et est réalisée par des enzymes spécifiques, les palmitoyl-transférases (PATs) qui sont au nombre de 23 chez les mammifères (Ohno et al., 2006). Les PATs transfèrent un palmitate (acide gras saturé à 16 carbones) sur une cystéine *via* une liaison thioester, alors que les palmitoyl-thioesterases (PTE) dépalmitoylent les protéines (**Figure 28**) (Greaves and Chamberlain, 2006; Linder and Deschenes, 2007). Il n'existe pas de séquence consensus pour la palmitoylation, seule une cystéine encadrée par un environnement hydrophobe est nécessaire (Greaves and Chamberlain, 2006). Cette modification joue un rôle essentiel dans l'adressage membranaire de protéines variées telles le récepteur de type AMPA (Hayashi et al., 2005) ou la post-synaptique density protein 95 (PSD-95), et conditionne leur localisation subcellulaire (Huang and El-Husseini, 2005). De façon intéressante, le GR est retrouvé dans les radeaux lipidiques associés à la cavéoline-1 (Matthews et al., 2008; Peffer et

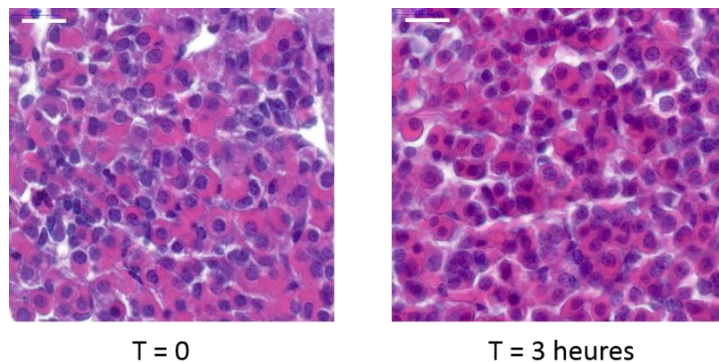




**Figure 29 : Mise en évidence de la palmitoylation**

Cette technique consiste en plusieurs étapes : 1) La protéine cible (en rouge) est purifiée (immunoprécipitation) grâce à un anticorps spécifique (IgG) couplé à des billes d'agarose par l'intermédiaire de la protéine G. La protéine cible purifiée est ensuite traitée par du N-ethylmaléimide (NEM) qui bloque irréversiblement les groupes sulfhydriles libres (-SH) des cystéines (C) non modifiées. 2) Un traitement à l'hydroxylamine (HAM) permet le clivage spécifique et le démasquage du groupe thiol (-SH) de la cystéine préalablement palmitoylée, qui sera marquée ultérieurement (3) par un réactif biotine-BMCC (1-Biotinamido-4-[4'-(maleimidométhyl) cyclohexanecarboxamido] butane, agent biotinylé composé d'un groupe maléimide se fixant aux groupes sulfhydriles libres. 4) Enfin, la protéine cible biotinylée est éluee et révélée par la streptavidine couplée à un fluorophore après western-blot.

Adapté de Brigidi and Bamji, 2013.



**Figure 30 : La coloration à l'hématoxyline-éosine d'hypophyses antérieures des souris ne montre pas de changements morphologiques ayant pu survenir durant la durée du protocole expérimental (3 heures).**

Les hypophyses de souris sont rapidement prélevées puis incubées dans un milieu tel que décrit dans la partie méthode de Ayrout *et al*, 2017. Après fixation par 4% formaldéhyde et incubation dans de la paraffine, les sections d'hypophyses d'une épaisseur de 5  $\mu$ m sont réalisées avant une analyse histologique. Les coupes ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine.

al., 2014; Samarasinghe et al., 2011), et l'utilisation de bréfeldine A, qui inhibe le transfert protéique du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, empêche tout adressage de GR à la membrane plasmique (Groeneweg et al., 2012), suggérant l'existence d'un GR membranaire palmitoylé, possiblement impliqué dans une signalisation non génomique rapide. Pour évaluer si GR est palmitoylé, nous avons, d'une part, utilisé un inhibiteur compétitif de la palmitoylation, le 2-Bromopalmitate (2-Br) (Fukata et al., 2004; Webb et al., 2000) et, d'autre part, optimisé un test de palmitoylation afin de mettre en évidence le « pool » de protéines palmitoylées au sein des cellules (**Figure 29**). Ce test consiste à 1) immunoprécipiter la protéine d'intérêt, puis de masquer les groupements thiols SH libres par du N-ethylmaléimide (NEM), 2) libérer le site de palmitoylation en coupant la liaison thioester par de l'hydroxylamine (HAM), 3) marquer le site de palmitoylation avec un composé biotinylé, 4) la protéine palmitoylée est ensuite révélée après western-blot grâce à de la streptavidine couplée à un fluorophore (**Figure 29**).

### 3- Evaluer un lien potentiel entre la signalisation rapide non génomique des GC et la sécrétion de la LH

Pour étudier la relation potentielle entre la signalisation rapide induite par les GC et la sécrétion de la LH, nous avons été contraints d'abandonner le modèle des cellules LβT2, dans la mesure où le dosage radio-immunologique de la LH n'est pas suffisamment sensible (1 ng/ml) pour mesurer précisément la sécrétion de LH dans le surnageant des cellules après seulement 1 heure de traitement par la GnRH. Des modifications de capacités sécrétoires de LH de ces cellules ne sont mesurables qu'après 4 heures de traitement par ce décapeptide (Garrel et al., 2011). Ainsi, nous avons développé un modèle de culture *ex-vivo* d'hypophyses de souris déjà décrit (Lozach et al., 1998; Matsuda et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2000), pour lequel nous avons contrôlé l'intégrité morphologique et possiblement fonctionnelle avant et après les 3 heures du protocole expérimental. Comme illustre la **Figure 30**, la coloration hématoxyline-éosine des sections hypophysaires n'a pas montré de marques évocatrices de nécrose, ni agrégation significative de la chromatine (< 5% des cellules) ni grandes zones nécrotiques. Dans les deux cas, la majorité des cellules présentent des nucléoles visibles et de la chromatine intacte, ce qui semble indiquer une intégrité des explants hypophysaires utilisés dans notre étude.



L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans l'Article 2 (Ayrout et al., 2017).



Article : 2

**A novel non genomic glucocorticoid signaling  
mediated by a membrane palmitoylated  
glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in  
gonadotrope cells**

**Mohsen Ayrou, Violaine Simon, Valérie Bernard, Nadine Binart, Joëlle Cohen  
Tannoudji, Marc Lombès & Stéphanie Chauvin**

Scientific **Reports** 8;7(1):1537

Published online 2017 May 8

doi: 10.1038/s41598-017-01777-2

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells

Mohsen Ayrou<sup>1</sup>, Violaine Simon<sup>2</sup>, Valérie Bernard<sup>1</sup>, Nadine Binart<sup>1</sup>, Joëlle Cohen-Tannoudji<sup>2</sup>, Marc Lombès<sup>1</sup> & Stéphanie Chauvin<sup>1</sup>

Glucocorticoid hormones (GC) are the main stress mediators associated with reproductive disorders. GC exert their effects through activation of the glucocorticoid receptor (GR) principally acting as a transcription factor. Beside well-established GR-mediated genomic actions, several lines of evidence suggest a role for rapid membrane-initiated GC signaling in gonadotrope cells triggered by a membrane-associated GR. Herein, we demonstrate the existence of a specific membrane-initiated GC signaling in L $\beta$ T2 gonadotrope cells involving two related phosphoproteins: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and synapsin-I. Within 5 min, L $\beta$ T2 cells treated with stress range of 10<sup>-7</sup> M Corticosterone or a membrane impermeable-GC, BSA-conjugated corticosterone, exhibited a 2-fold increase in levels of phospho-CaMKII and phospho-synapsin-I. Biochemical approaches revealed that this rapid signaling is promoted by a palmitoylated GR. Importantly, GC significantly alter GnRH-induced CaMKII phosphorylation, consistent with a novel cross-talk between the GnRH receptor and GC. This negative effect of GC on GnRH signaling was further observed on LH release by mouse pituitary explants. Altogether, our work provides new findings in GC field by bringing novel understanding on how GR integrates plasma membrane, allowing GC membrane-initiated signaling that differs in presence of GnRH to disrupt GnRH-dependent signaling and LH secretion.

Glucocorticoid hormones (GC) are the main mediators of stress and their increased secretion leads to a large variety of acute and long-term responses. Physical and emotional stressors have been reported to perturb female menstrual cycles<sup>1,2</sup>, to alter the onset of puberty<sup>3</sup>, to be associated with a longer time-to-pregnancy and to increase the risk of infertility<sup>4</sup>. Psychosocial stress has been extensively studied in ewes<sup>5</sup>. It is now established that GC act at different levels of the reproductive axis: at the hypothalamus by reducing Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) pulse frequency<sup>6</sup> and at the pituitary by rapidly decreasing responsiveness to GnRH to suppress pulsatile gonadotropins expression and secretion, notably LH<sup>7</sup>. GC responses are mediated by the glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily, through two separate but inter-related mechanisms of actions<sup>8</sup>. After ligand binding, GC/GR complexes translocate into the nucleus to regulate target genes expression<sup>9</sup>. Several studies described a direct action of GC in pituitary gonadotrope cells to regulate gonadotropins and GnRH receptor (GnRH-R) expression<sup>10</sup>. In addition, signaling pathways mediating rapid non-genomic GC actions have been demonstrated in a number of studies; they involve various cytosolic proteins<sup>11</sup> e.g. Phospholipase C<sup>12</sup>, Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)<sup>13,14</sup>, Phosphatidylinositol 3-kinase<sup>15</sup>, Src kinase<sup>16,17</sup> or intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling<sup>18</sup>.

GC-induced rapid signaling has never been directly studied in gonadotrope cells yet, different arguments suggest their involvement in the rapid blunting of GnRH responsiveness during stress<sup>7</sup>. We speculate that GC could

<sup>1</sup>INSERM UMR\_S1185, Fac Med Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-94276, Le Kremlin Bicêtre, France. <sup>2</sup>Sorbonne Paris Cité, Université Paris-Diderot, CNRS, INSERM, Biologie Fonctionnelle et Adaptative UMR 8251, Physiologie de l'axe gonadotrope, U1133, Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C. (email: [stephanie.chauvin@inserm.fr](mailto:stephanie.chauvin@inserm.fr))

modulate signaling mechanisms downstream of the GnRH-R leading to a reduction of gonadotropin release. Such GC-induced rapid signaling should involve the activation of a putative membrane associated GR (MbGR). The existence of such a MbGR has been convincingly demonstrated in monocytes and B lymphocytes<sup>19</sup>, keratinocytes<sup>20</sup>, hippocampal neurons<sup>21</sup> or in several cell lines<sup>16, 22, 23</sup>. Studies using classical GR antibodies<sup>24, 25</sup> or using RNA interference-mediated GR reduction<sup>26</sup> revealed that intracellular GR and MbGR may originate from the same gene. Membrane targeting of a steroid receptor has been already described for the estrogen receptor (ER) which undergoes membrane translocation after caveolin-1 association<sup>27</sup> and protein palmitoylation<sup>28</sup>. Palmitoylation is a posttranslational process by which palmitate, a C16 fatty acid, is covalently linked to an internal cysteine *via* a thioester bond. As for ER, GR has been found associated with lipid rafts<sup>29</sup> and caveolin-1<sup>14, 30, 31</sup>. However, contrary to ER, Vernocchi *et al.*, proposed that the membrane localization of GR is not totally dependent on caveolin-1<sup>32</sup>. Posttranslational modifications that influence GR membrane localization<sup>33</sup> have not been described yet.

In the present study, we used a murine gonadotrope cell line (L $\beta$ T2) expressing GR and prone to release LH upon GnRH treatment, as well as mouse pituitary explants to better understand whether and how GC might rapidly interfere with GnRH signaling to prevent LH release during stress. Our data provide evidence, using a membrane-impermeable corticosterone conjugate, Cort-BSA (bovine serum albumin), and an inhibitor of protein palmitoylation (2-Br) that GC induce a novel rapid signaling in L $\beta$ T2 cells through the activation of a palmitoylated membrane GR. We also demonstrate that GC interfere with GnRH induced Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent kinase 2 (CaMKII) phosphorylation in L $\beta$ T2 cells, ultimately decreasing LH release by pituitary explants.

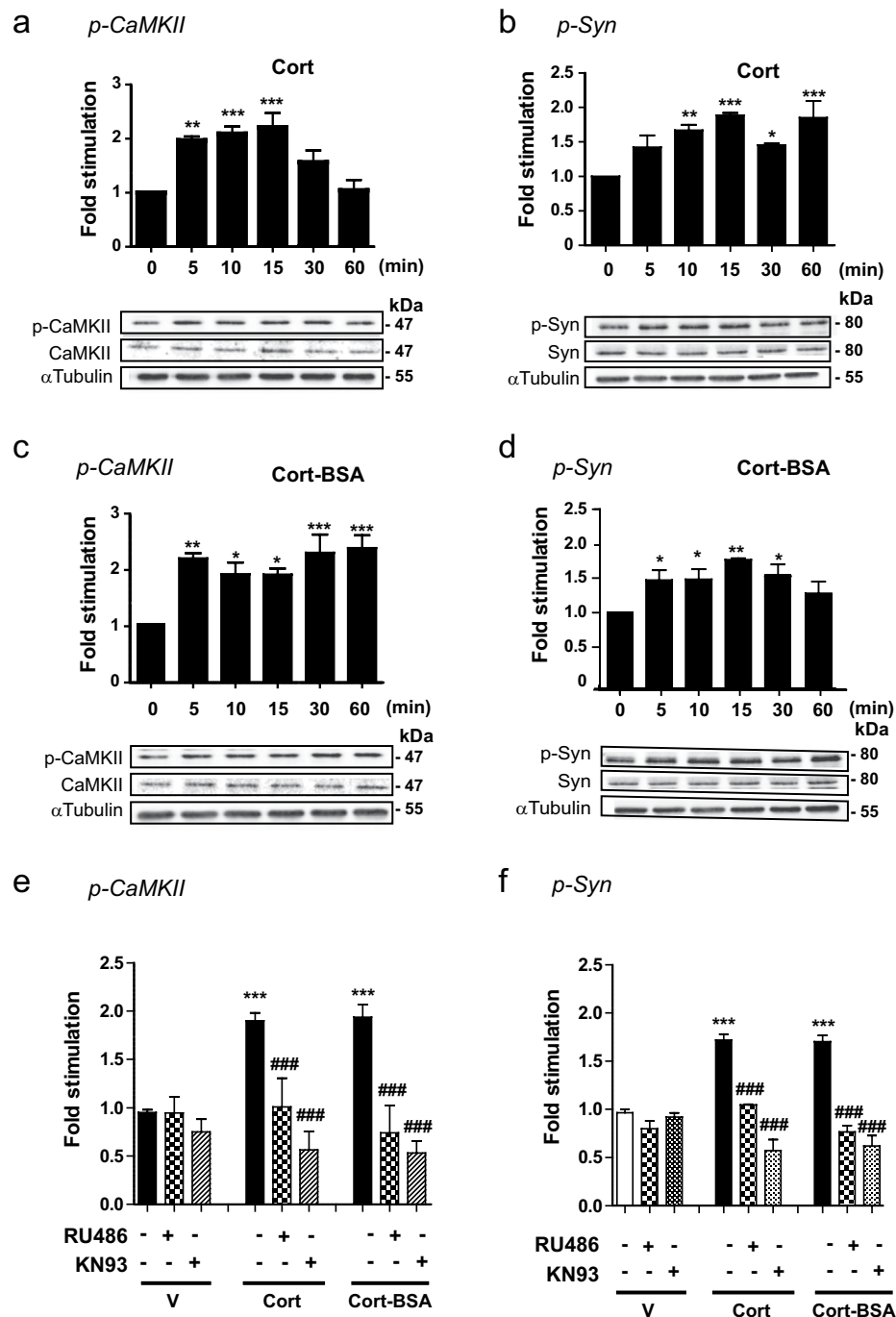
## Results

**Specific membrane-initiated GC signaling in gonadotrope cells: role of CaMKII and synapsin-I.** In ewes, GC have been described to reduce the LH response of pulse-like delivery of GnRH by 50% within 30 min, indicating rapid action of GC on pituitary<sup>7</sup>. To examine a potential relationship between rapid GC-induced signaling and LH release reduction, we investigated whether specific rapid GC signaling pathways were activated in gonadotrope cells. L $\beta$ T2 cells were treated with a stress range of 10<sup>-7</sup> M corticosterone (Cort) for up to 60 min and the level of phosphorylation of CaMKII (p-CaMKII) as well as one of its target, synapsin-I (Syn) were evaluated by Western blotting; signals were normalized to the level of total proteins and  $\alpha$ -tubulin (Fig. 1a,b). Figure 1a shows that Cort induced a rapid and transient phosphorylation of CaMKII in L $\beta$ T2 cells with a maximum (about 2.3-fold) observed after 15 min of treatment which then returned to basal value. Cort also stimulated the level of phospho-Syn (p-Syn) within 10 min (Fig. 1b) and such an effect was maintained up to 60 min of treatment. Cort treatment did not modify total levels of CaMKII and Syn. To bring support for a membrane GR-initiated effect, we used BSA-conjugated corticosterone (Cort-BSA), a membrane impermeable GC that allows discriminating specific activities of the MbGR from those of the intracellular GR. The ability of Cort-BSA to promote genomic effects was tested on the expression of a GC-induced gene Serum and Glucocorticoid regulated Kinase 1 (*Sgk-1*). As shown in Supplementary Fig. S1, Cort-BSA did not induce expression of *Sgk-1* after 1 or 4 h of treatment, when compared to vehicle, in contrast to the expected effects of dexamethasone (Dex, a GR agonist) or Cort. These data confirm that Cort-BSA effects could only be attributed to non-genomic mechanisms in L $\beta$ T2 cells. Exposure of L $\beta$ T2 cells to Cort-BSA (10<sup>-7</sup> M) for 5 min induced the same level (about 2-fold) of CaMKII phosphorylation as the one induced by Cort, but phosphorylation remained stable up to 60 min of treatment (Fig. 1c). A similar phosphorylation pattern was observed for p-Syn following Cort-BSA and Cort exposure, except an earlier return to basal level after Cort-BSA treatment (Fig. 1d). Total levels of CaMKII and Syn were unchanged after Cort-BSA treatment. Interestingly, Dex did not stimulate MAPK (Supplementary Fig. S2a) nor Src signaling pathways (Supplementary Fig. S2b) in contrast to their reported effect in most cellular models<sup>11</sup> studied so far. The specificity of Cort/Cort-BSA rapid signaling was assessed using a GR antagonist (RU486) or a CaMKII inhibitor (KN93) (Fig. 1e). Co-incubation of Cort or Cort-BSA with these inhibitors prevented CaMKII phosphorylation measured after 5 min of treatment in L $\beta$ T2 cells, without significantly affecting basal p-CaMKII. Interestingly, both inhibitors also affected the level of GC-induced p-Syn observed after 5 min of treatment without disturbing basal level of p-Syn (Fig. 1f). These data provide evidence that Cort or Cort-BSA rapidly promotes the phosphorylation of CaMKII and Syn in gonadotrope cells. This phosphorylation sequence therefore constitutes a new GC membrane-initiated signaling dependent on GR.

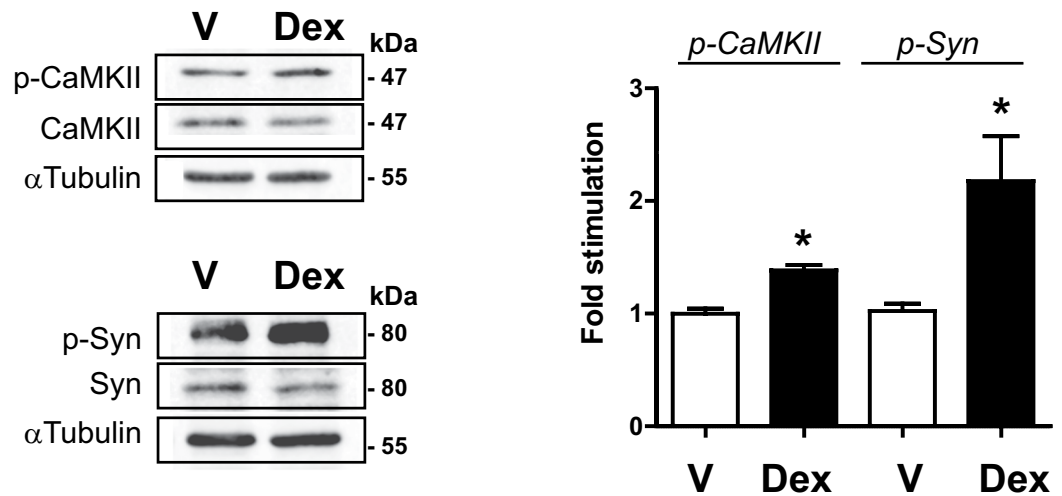
We next examined GC effects in a more physiological context. To this aim, mouse pituitary explants were treated for 30 min with the GR agonist Dex. We found a significant GC-induced increase in levels of p-CaMKII (about 1.4-fold) as well as in p-Syn (about 2.2-fold) (Fig. 2). Dex treatment did not alter total CaMKII or total Syn contents. This effect was prevented by co-treatment with RU486 (not shown). CaMKII and Syn therefore constitute new key elements of GC membrane-initiated signaling in pituitary.

**A palmitoylated membrane GR promotes CaMKII phosphorylation in L $\beta$ T2 cells.** This observed rapid membrane-initiated signaling strongly suggests the existence of a membrane form of GR (MbGR) in L $\beta$ T2 gonadotrope cells. Therefore, we investigated the subcellular localization of endogenous GR in L $\beta$ T2 cells by cell fractionation, each fraction being analyzed by Western blotting. As illustrated in Fig. 3a using classical GR antibodies (M20), a single band at approximately 100 kDa corresponding to GR was detected in total L $\beta$ T2 cell lysates in the absence (Vehicle, V) or presence of Dex, as well as in all three subcellular compartments (Nuclei/Debris (N), Cytoplasmic (Cyto) and Membranous (Mb) fractions). Quantification of GR signal in each subcellular compartment in the vehicle condition further confirmed that GR was mainly located in the cytoplasm (ratio Cyto/Total = 2  $\pm$  0.32). Noteworthy, our results demonstrate that a significant amount of GR was also recovered in the membranous fraction of L $\beta$ T2 cells (ratio Mb/Total = 0.9  $\pm$  0.2) (Fig. 3b). A membrane form of GR is therefore present in gonadotrope cells. Such a form could also be detected in various GC-sensitive cell lines originating from various tissues (Supplementary Fig. S3), clearly demonstrating that although the bulk of GR is in the





**Figure 1.** GC rapidly stimulate CaMKII and synapsin-I phosphorylation in L $\beta$ T2 cells. **(a,b)** L $\beta$ T2 cells were treated with Cort ( $10^{-7}$  M) for 0 to 60 min. Cell lysates were subjected to western blotting (WB) with anti-CaMKII **(a)**, anti-p-CaMKII **(a)**, anti-synapsin **(b)**, anti-p-synapsin **(b)** and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies **(a,b)**. Cropped blots are shown in the figure and are representative of 4 independent experiments. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to time 0. One-way ANOVA with Dunnett's posttest, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . **(c,d)** L $\beta$ T2 were treated for 0 to 60 min with Cort-BSA ( $10^{-7}$  M). Cropped immunoblots are shown in the figure and are representative of 4 independent experiments. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to time 0, one-way ANOVA with Dunnett's posttest, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . **(e,f)** Phosphorylated CaMKII **(e)** and Syn **(f)** were significantly increased after 5 min treatment with either Cort or Cort-BSA. These events were abolished by co-incubation with RU486 ( $10^{-5}$  M) or KN93 ( $10^{-5}$  M). V: Vehicle. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison Test,  $n \geq 3$ , \*\*\* $p < 0.001$  when compared to Vehicle, ### $p < 0.001$  within the same steroid treatment (Cort or Cort-BSA). Full length WBs are presented in Supplementary Fig. S4a-c. p-CaMKII: phospho-CaMKII; p-Syn: phospho-synapsin I.

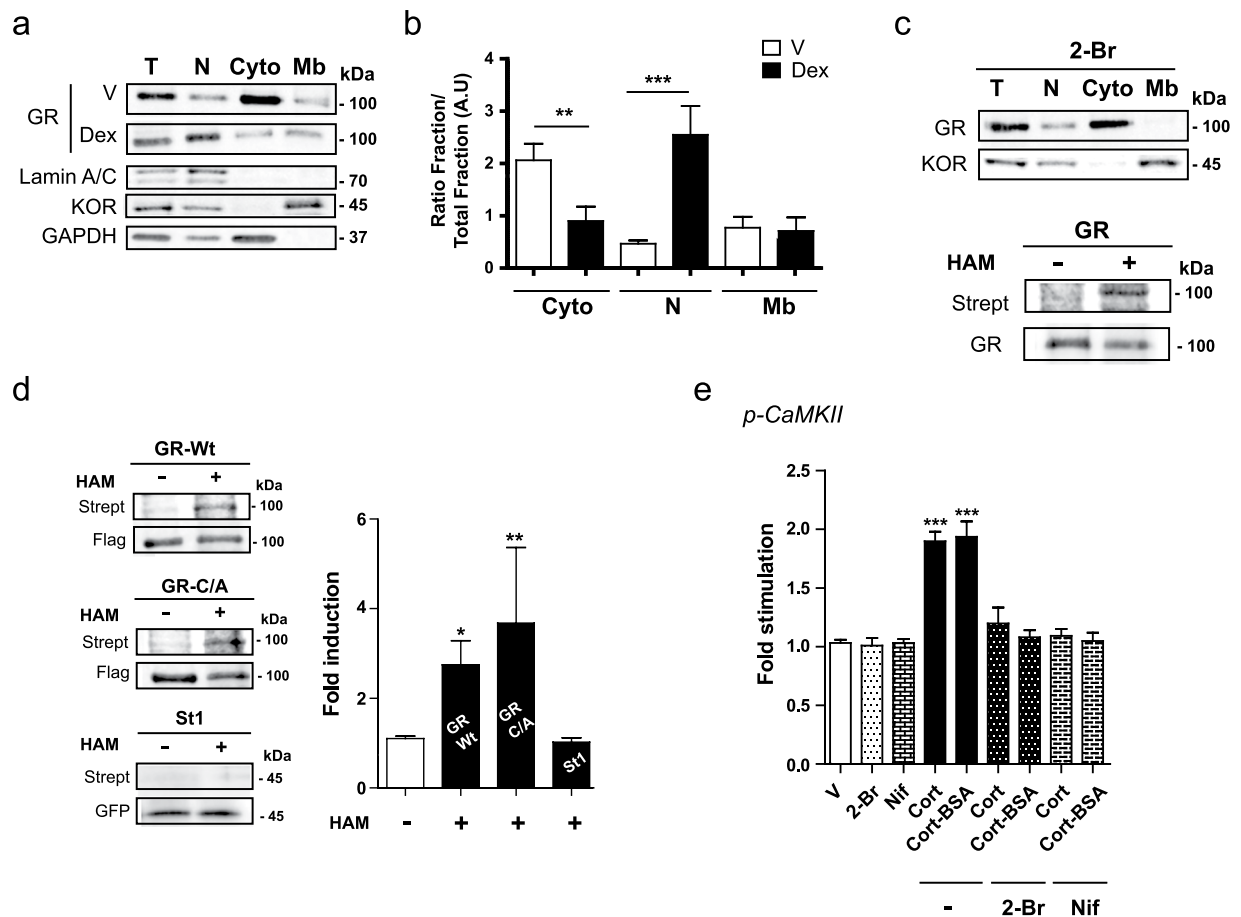


**Figure 2.** Dexamethasone stimulates phosphorylation of CaMKII and Syn in mouse pituitary explants. Explanted pituitaries were treated with Dex ( $10^{-7}$  M) or not (Vehicle, V) for 30 min. Lysates were subjected to immunoblotting with anti-p-CaMKII, anti-CaMKII, anti-Syn, anti-p-Syn and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. Dex induced significant increase in the phosphorylation state of CaMKII and Synapsin-I. Cropped blots (full length WBs are presented in Supplementary Fig. S4d) are shown in the figure and are representative image of 3 independent experiments. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to vehicle. Statistical significance was assessed by One way ANOVA, Dunnett's posttest,  $n = 3$ ,  $*p \leq 0.05$ . p-CaMKII: phospho-CaMKII; p-Syn: phospho-synapsin-I.

cytoplasm and nucleus, a significant proportion of GR is tethered or anchored to cell membranes of GC-sensitive cells. To test whether subcellular GR localization could be modified in the presence of ligand, L $\beta$ T2 cells were incubated with  $10^{-7}$  M Dex for 30 min before cell fractionation. As expected, nuclear GR was significantly increased upon Dex treatment, while cytoplasmic signal was concomitantly reduced (Fig. 3b), in agreement with the hormone-dependent GR translocation from cytoplasm to the nucleus. Importantly, the presence of ligand did not modify the intensity of MbGR signal suggesting that acute Dex exposure does not affect MbGR level (Fig. 3b).

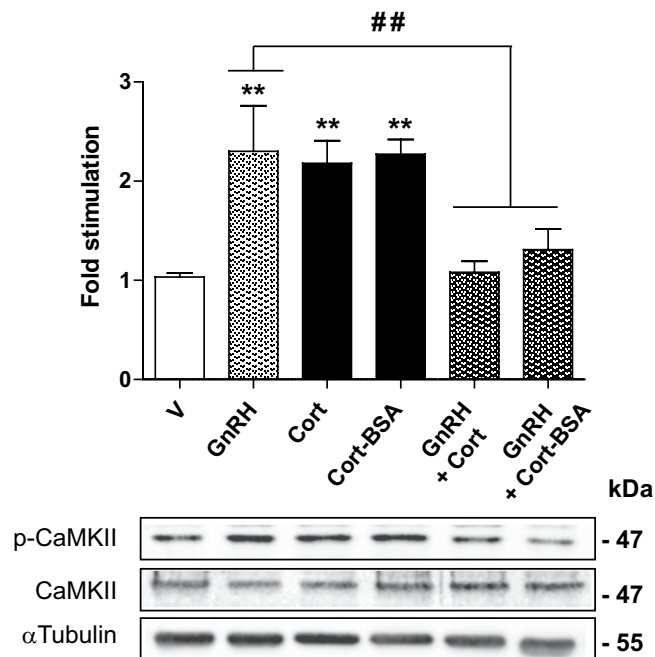
Since palmitoylation of ER was previously shown to be the major determinant for ER residence at the plasma membrane<sup>34</sup>, we evaluated the effect of the palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate (2-Br) on MbGR localization. As illustrated in Fig. 3c (upper panel), overnight incubation of L $\beta$ T2 cells with 100  $\mu$ M 2-Br totally abolished MbGR localization without modifying the presence of the membrane marker, the  $\kappa$ -opioid receptor (KOR), in the membranous fraction (ratio Mb/Total =  $1.32 \pm 0.2$  vs  $1.43 \pm 0.3$ ), strongly suggesting that endogenous GR is palmitoylated. To further confirm GR palmitoylation, we performed an ABE assay<sup>35</sup> on L $\beta$ T2 cells. During the ABE assay, unmodified free cysteines of immunoprecipitated GR were alkylated with NEM. Next, hydroxylamide (HAM) specifically cleaved palmitates from cysteines and then exposed these sites for biotinylation. Once the sites were labeled, palmitoylation was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using fluorophore-conjugated streptavidin (Strept); Strept signals correspond to protein biotinylation of palmitoylation sites. The same membrane was also used for Western blotting with an anti-GR antibody (Fig. 3c, lower panel). As shown in Fig. 3c (lower panel), Strept signals were only revealed after HAM treatment condition (+), despite an equivalent immunoprecipitation efficiency between the two conditions. This result confirms that GR is clearly palmitoylated in L $\beta$ T2 cells and demonstrates that GR is addressed to the plasma membrane through palmitoylation. Next, we assessed whether the palmitoylation site of GR was conserved with the one described for ER, AR and PR<sup>28</sup>. We mutated the ER corresponding cysteine residue of GR (Cys671) into Alanine (C/A) on a Flag-form of GR and performed an ABE assay after overexpressing GR<sub>wt</sub> or GR<sub>C/A</sub> in HEK293 cells. A GFP-form of stathmin 1 (St1) known as a soluble non-palmitoylable protein<sup>36</sup> was used as a negative control. Strept signal was normalized to the amount of tagged protein detected on the same blot (Fig. 3d). As shown in Fig. 3d, GR<sub>wt</sub> treated with HAM was significantly biotinylated and specifically labeled by Strept (about 2.7-fold induction compared to the absence of HAM), indicating that overexpressed GR is also palmitoylated in HEK293 cells. Importantly, mutation of Cys671 into Ala (GR<sub>C/A</sub>) led to a GR mutant that remained palmitoylated at an equivalent level as the GR<sub>wt</sub> (Strept/Flag signals between “-HAM” and “+HAM” increased by  $3.6 \pm 1.5$ -fold vs  $2.7 \pm 1.2$ -fold, respectively). Immunoprecipitated stathmin 1 (St1) was not labeled by Strept providing additional support for GR palmitoylation. Thus, in sharp contrast with ER, the putative palmitoylation consensus site Cys671 is not involved in the GR membrane targeting.

We also tested whether palmitoylated GR was responsible for rapid GC-induced signaling. As shown in Fig. 3e, overnight pretreatment of L $\beta$ T2 cells with 100  $\mu$ M 2-Br totally abolished both Cort- and Cort-BSA-induced CaMKII phosphorylation when compared to vehicle. Total CaMKII levels were not modified by 2-Br treatment (not shown). These data unambiguously demonstrate that the palmitoylated form of GR triggers GC rapid signaling on CaMKII phosphorylation.



**Figure 3.** A palmitoylated membrane GR is involved in GC-induced rapid CaMKII phosphorylation in L $\beta$ T2 cells. **(a)** L $\beta$ T2 cells were treated or not (V) with Dex before subcellular fractionation to detect GR and specific markers by WB; lamin A/C,  $\kappa$ -opioid receptor (KOR) and GAPDH for nuclear/debris (N), membranous (Mb) and cytosolic (Cyto) fractions, respectively. T: total extract. **(b)** Quantification of GR in each fraction of L $\beta$ T2 cells treated or not (V) with Dex, in comparison with T. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to T, one-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison Test,  $n = 4$  experiments,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ . **(c)** Upper panel, L $\beta$ T2 cells were pre-incubated with 2-Br prior to cell fractionation. Equal amounts of proteins were analyzed by WB.  $n = 3$  experiments. 2-Br: 2-bromopalmitate. Lower panel, L $\beta$ T2 cell lysates were subjected to ABE assay after GR immunoprecipitation, followed by SDS-PAGE with the minus (-) and plus (+) HAM samples. Palmitoylation was detected by WB comparing streptavidin (Strept) signal to GR one.  $n = 3$  experiments. **(d)** HEK293 cells were transfected with GR<sub>Wt</sub>, GR<sub>C/A</sub> or stathmin 1-GFP (St1). Cell lysates were subjected to the ABE protocol followed by SDS-PAGE as described in (c). Strept signals detecting palmitoylation were normalized to the level of immunoprecipitated Flag-GR or GFP-St1 detected on the same membrane. Graph shows the average normalized densitometry data (Strept signal divided by anti-Flag or anti-GFP signals) displayed as fold induction of (+) HAM/(-) HAM control samples. One-way ANOVA with Dunnett's posttest ( $n = 4$  experiments,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ). **(e)** L $\beta$ T2 cells were pretreated with 2-Br or Nifedipine (Nif) respectively, and then treated with either Cort or Cort-BSA for 5 min. Cell lysates were subjected to WB with anti-CaMKII, anti-p-CaMKII, and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to vehicle (V). One-way ANOVA with Dunnett's post-test,  $n = 3$  experiments,  $***p < 0.001$  when compared to V. Cropped blots are shown. Full length WBs are presented in Supplementary Fig. S4d,e.

Calmodulin-associated calcium promotes CaMKII autophosphorylation and subsequently CaMKII activation<sup>37</sup>. Therefore, we examined the mechanism by which GC would increase intracellular calcium concentration by following the effects of an L-type calcium channel blocker (Nifedipine) on GC induced CaMKII phosphorylation. As show in Fig. 3e, 1h pretreatment with 10  $\mu$ M Nifedipine (Nif) prevented CaMKII phosphorylation measured after 5 min of Cort or Cort-BSA treatment. Nif did not modify total levels of CaMKII (not shown). Overall, GC rapidly promote membrane-initiated signaling involving a palmitoylated GR that elicits calcium entry through L-type calcium channel that participates to CaMKII phosphorylation and leads to synapsin phosphorylation.



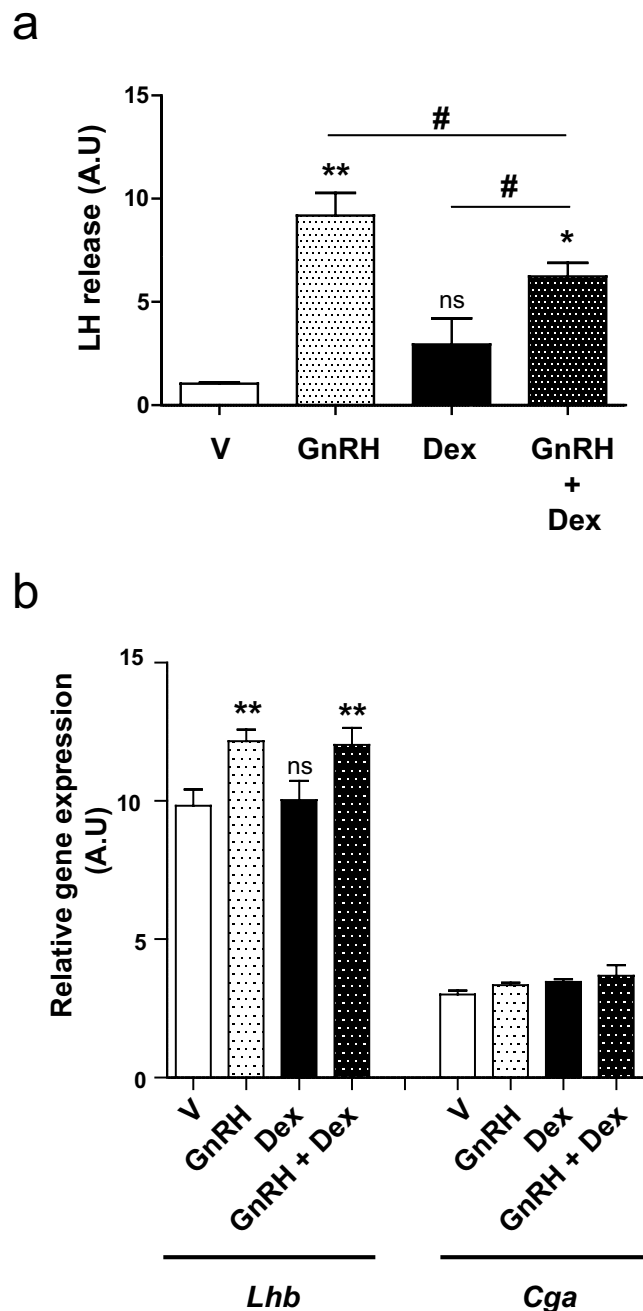
**Figure 4.** GC prevent GnRH-induced CaMKII phosphorylation. L $\beta$ T2 cells were treated or not (V) with GnRH ( $10^{-8}$  M), Cort ( $10^{-7}$  M), Cort-BSA ( $10^{-7}$  M) or co-treated with either GnRH and Cort or GnRH and Cort-BSA for 5 min. Cell lysates were subjected to WB with anti-CaMKII, anti-p-CaMKII, and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. Cropped blots (full length WBs are presented in Supplementary Fig. S4e) are shown in the figure and are representative of 3 independent experiments. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to vehicle. One-way ANOVA with Dunnett's post-test, \*\* $p < 0.01$ . ## $p < 0.01$  comparing GnRH with both co-treatments.

**GC affect GnRH signaling to reduce LH secretion.** GnRH has been described to rapidly stimulate CaMKII phosphorylation (by about 2.5-fold) in rodent pituitary cells<sup>37</sup>, thus regulating gonadotropin subunit transcription. Therefore, we investigated whether GC could influence GnRH-induced CaMKII phosphorylation in L $\beta$ T2 cells. Figure 4 shows that treatment with GnRH ( $10^{-9}$  M) for 5 min increased by about 2.3-fold p-CaMKII levels compared with vehicle. These phosphorylation levels were in the same range than those measured after Cort or Cort-BSA exposure alone (Fig. 4). Interestingly, co-treatment with GnRH and Cort or Cort-BSA for 5 min prevented GnRH-induced CaMKII phosphorylation. Total CaMKII levels remained unchanged after any of these hormonal stimulations. These data strongly indicate that GC affect GnRH signaling by preventing GnRH-dependent CaMKII phosphorylation in L $\beta$ T2 cells.

Since CaMKII was also described to be involved in insulin secretion<sup>38</sup>, we wondered whether this kinase could also modulate LH secretion. Because detection of LH release in L $\beta$ T2 culture media was not possible at early time points due to the low secretory activity of this cell line, we tested the effect of GC treatment on LH release from pituitary explants. The integrity of the pituitary explants was controlled at the end of the procedure by histological approaches (not shown). Mouse pituitary explants were pre-incubated for 30 min in DMEM at 37 °C before stimulation to measure basal level of LH content present in culture supernatants of each explant. Culture media was then replaced by fresh media containing either GnRH ( $10^{-8}$  M), Dex ( $10^{-7}$  M) or both hormones for 1 h. LH contents were subsequently assayed from culture supernatants. As anticipated, Fig. 5a shows that GnRH strongly increased (by about 9-fold) LH secretion. In contrast, Dex did not induce any significant LH release. Noteworthy, co-incubation of pituitary explants with both GnRH and Dex significantly reduced LH release by 1.5-fold when compared to GnRH alone (Fig. 5a).

Since Dex binds both membrane and non-membrane GR, one could expect Dex to exert genomic activities that could contribute to Dex inhibitory effect on GnRH-induced LH release. Therefore, to investigate a possible impact of Dex on the expression of genes encoding the common  $\alpha$ -glycoprotein subunit (*Cga*) and the  $\beta$ -subunit of LH (*Lhb*), we performed RT-qPCR on total RNA extracted from L $\beta$ T2 cells treated with GnRH ( $10^{-8}$  M), Dex ( $10^{-7}$  M) or both hormones for 1 h (Fig. 5b). GnRH treatment significantly increased *Lhb* expression (by about 1.24-fold) whereas Dex alone or associated with GnRH was ineffective on *Lhb* or *Cga* expression at this very early time point when compared to vehicle or GnRH respectively (Fig. 5b). In contrast and as shown in Supplementary Fig. S1, under the same experimental conditions, Dex was able to regulate *Sgk1* expression; after 1 h treatment, Dex induced a 1.7-fold induction of *Sgk-1* mRNA levels. These results confirm that Dex blockade of GnRH-induced LH secretion involves rapid non-genomic mechanisms.

Altogether, these results demonstrate that GC rapidly regulate GnRH-induced CaMKII phosphorylation as well as impact on GnRH-dependent LH secretion.



**Figure 5.** GC prevent GnRH-induced LH secretion in mice pituitary explants. **(a)** Pituitary explants were either treated with GnRH ( $10^{-8}$  M), Dex ( $10^{-7}$  M) or co-incubated with these two hormones for 1 h at 37 °C. LH concentrations were assayed in the culture supernatants as described in Methods. LH release after hormonal treatment was quantified (ng/ml) in comparison with LH amount measured in basal condition (pre-stimulation). GnRH significantly induced LH release when compared to vehicle. This effect significantly decreased after co-incubation of GnRH with Dex. One-way ANOVA with Dunnett's post-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . # $p < 0.05$  comparing GnRH and Dex co-treatment with each individual treatment. **(b)** L $\beta$ T2 were treated with GnRH ( $10^{-8}$  M), Dex ( $10^{-7}$  M) or co-incubated with these two hormones for 1 h at 37 °C before RT-qPCR to follow the expression of genes encoding the common  $\alpha$ -glycoprotein subunit (*Cga*) and the  $\beta$ -subunit of LH (*Lhb*). Data show relative expression (arbitrary units) normalized with the reference gene *36b4*. Within 1 h, GnRH significantly stimulated *Lhb* expression (by approximately 1.24-fold above basal), whereas Dex did not have any effects either alone or associated with GnRH. One-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison posttest,  $n = 3$ , \*\* $p < 0.01$ .

## Discussion

Stress-induced disturbance of reproductive function is well described in many species including humans<sup>3,5,39</sup>, and is typically associated with an activation of the hypothalamic-pituitary adrenal axis, resulting in an increased secretion of GC. GC act directly *via* GR in the pituitary gland<sup>40</sup> to elicit a rapid decrease ( $\leq 30$  min) in responsiveness to GnRH, independent of changes in GnRH-R expression<sup>7</sup>, leading to a strong reduction of gonadotropin release<sup>41</sup>. Non-genomic mechanisms activated by a membrane anchored GR (MbGR) have been proposed to explain such rapid GC events.

In the present study, we provide evidence that GC rapidly trigger CaMKII and Syn phosphorylation in gonadotrope L $\beta$ T2 cells. We demonstrated that Cort elicited a rapid (significant up to 15 min) and transient effect on CaMKII phosphorylation whereas a significant induction of p-Syn was detected up to 60 min after GC exposure. *Ex vivo*, by using pituitary explants, we demonstrated that Dex also induces phosphorylation of CaMKII and Syn after 30 min treatment, likewise what observed *in vitro*, in gonadotrope L $\beta$ T2 cells exposed to Cort. Interestingly, L $\beta$ T2 cells treated with a membrane impermeable GC (Cort-BSA) induced similar phosphorylation patterns of p-CaMKII and p-Syn than those obtained with Cort. However, p-CaMKII rapidly returned to basal levels indicating dephosphorylation processes after Cort treatment, as opposed to Cort-BSA. These data suggest a negative regulatory feedback whereby GC, acting genomically through unknown genomic events, might desensitize its activated-signaling pathway more rapidly and efficiently than Cort-BSA. In addition and contrary to Dex or Cort, no induction of *Sgk-1* expression was observed after 1 h or 4 h of treatment with Cort-BSA, providing additional support that Cort-BSA effects are clearly only mediated by membrane-initiated non-genomic processes in L $\beta$ T2 cells. Our results clearly differ from those reported in another study that showed genomic activities with Cort-BSA at a much higher concentrations (3  $\mu$ g/ml vs 6.6 ng/ml in the present study) on human lymphoma cells<sup>42</sup>. In addition, contrary to other cell types<sup>14,16,17,43</sup>, Dex was unable to induce phosphorylation of ERK1/2 or Src indicating that, depending on the cellular context and the nature of the associated signalosome, a wide variety of signal transduction pathways may be initiated. From plasma membrane of L $\beta$ T2 cells, GC may promote L-type Calcium channel activation that triggers the calcium increase necessary for CaMKII phosphorylation and the resulting downstream signaling cascade.

To further understand this rapid signaling in gonadotrope L $\beta$ T2 cells, we identified a MbGR and provided evidence that palmitoylation, a reversible posttranslational modification, promotes GR membrane targeting. We also demonstrated a direct involvement of palmitoylated form of GR in triggering CaMKII phosphorylation and activation, after Cort or Cort-BSA treatment in L $\beta$ T2 cells. Contrary to others who used an hypothalamic cell line 4B<sup>33</sup> and performed metabolic labeling presenting low sensitivity detection, we demonstrated that endogenous as well as overexpressed GR are truly palmitoylated. These data further support previous data performed in lymphocytes which showed that GR membrane targeting was prevented by a Golgi-disrupting agent (brefeldin A) treatment<sup>19</sup>, indicating that GR membrane attachment might take place in the Golgi where most of protein palmitoylation occurs<sup>44</sup>. Interestingly yet surprisingly, we demonstrated by site directed mutagenesis that ER and GR do not share the equivalent palmitoylation site, arguing against a consensus palmitoylation site among steroid receptors. Further studies are required to identify GR palmitoylation sites. Contrary to ER whose membrane transport relies on caveolin-1, two studies demonstrated that caveolin-1 is not the limiting factor for membrane transport of GR, without ruling out the possibility that it is a component of the transport machinery<sup>22,42</sup>. A recent study using several protein structure algorithms predicted that some steroid receptor ligand binding domains contain one or more transmembrane helices and/or pore lining regions that may be essential for their translocation to the plasma membrane<sup>45</sup>. Herein, we also show as already described by others<sup>23</sup> that Dex does not modify the level of MbGR in gonadotrope L $\beta$ T2 cells. This finding contrasts though with the observation that Cort promoted MbGR level increase in hypothalamic cell line 4B<sup>16</sup>, and suggests that the regulation of MbGR might be dependent on the cell type.

In pituitary, GnRH-R is primary expressed in gonadotrope cells. Upon GnRH binding to GnRH-R, a wide range of intracellular signaling pathways including CaMKII phosphorylation is activated that ultimately regulates the synthesis and release of gonadotropins<sup>46</sup>. In the present study, we show that Cort or Cort-BSA rapidly induced phosphorylation of CaMKII and synapsin-I. However, in the presence of GnRH, GC rapidly prevented GnRH-induced CaMKII phosphorylation, by preventing calcium mobilization probably in localized sub-cellular regions, and efficiently reduced LH release by gonadotrope cells. Contrary to GnRH, Dex alone or associated with GnRH does not rapidly affect *Lhb* or *Cga* expression demonstrating that Dex inhibition of GnRH-induced LH secretion involves rapid non-genomic regulatory mechanisms.

These data suggest that during anestrus or in between GnRH pulses that could be widely spaced depending on the species, GC exert rapid non genomic signaling involving both CaMKII and synapsin-I, whereas during GnRH stimulation GC prevent GnRH-induced CaMKII phosphorylation that may account for the inhibitory effects of GC on LH secretion. Such paradoxical actions of GCs have already been described to depend on the timing, duration, and magnitude of GC exposure<sup>47</sup>. In the present situation, one could speculate that MbGR might interact with GnRH-R to regulate its associated signaling upon GnRH binding. GR and GnRH-R have been reported to co-localize with the lipid raft protein flotillin-1 at the plasma membrane, independently of the presence of ligands<sup>23</sup>. GnRH and GC were reported to synergistically inhibit cell proliferation *via* PKC activation and *Sgk-1* up-regulation in L $\beta$ T2 cells<sup>23</sup>. Rapid non-genomic as well as genomic cross-talk mechanisms between the GnRH-R and GR signaling pathways have already been described in L $\beta$ T2 cells<sup>48</sup>. GnRH may rapidly activate the unliganded GR *via* GnRH-R dependent phosphorylation involving MAPKs, leading to nuclear translocation and GR transactivation *via* a glucocorticoid response element. GC and GnRH may also modulate GnRH-R mRNA levels *via* a genomic mechanism involving GR binding to an AP-1 motif of the murine GnRH-R promoter<sup>48</sup>. In the present study, we propose another level of cross-talk mechanisms in L $\beta$ T2 cells in which GC may regulate the level of GnRH-induced phosphorylation of CaMKII and synapsin-I that ultimately regulate LH release. We showed that Dex inhibited GnRH-induced LH release by pituitary explants. It remains to determine whether this

inhibition is triggered by MbGR. GC have already been described to rapidly inhibit ACTH release in pituitary AtT-20 cells<sup>49,50</sup> or  $\text{Cl}^-$  secretion in human bronchial epithelial cells<sup>18</sup>. CaMKII is a multifunctional kinase that has been depicted to mediate insulin secretion<sup>51</sup> by phosphorylating synapsin-I<sup>38</sup>, already known to control neurotransmitters release<sup>52</sup>. Synapsin-I has been described as an important molecular effector of the GR signaling pathway induced in hippocampus involved in increased stress-related memory<sup>53</sup>. We demonstrated in L $\beta$ T2 cells that GC signaling pathways encompass both CaMKII and synapsin-I. However, in the presence of GnRH, GC do not trigger this signaling pathways any longer to ultimately prevent LH release. It remains to precisely decipher the molecular mechanisms by which GC and GnRH signaling cross-talk, even though such a task might be very difficult to explore *in vivo* given that both GC and GnRH signaling share several downstream effectors. In addition, owing to the fact that GR is expressed in almost all pituitary cells, GC action is not restricted to gonadotrope cells but also affect other cell lineage populations within pituitary.

Finally, our work brings new findings in GC field, unraveling novel understanding on how GR integrates plasma membrane allowing GC membrane-initiated signaling through L-type calcium channel activation, CaMKII and synapsin-I phosphorylation in gonadotrope cells. A novel conceptual advance in the cross-talk between GnRH and GC signaling pathways has been discovered that could ultimately regulate pituitary LH release. Future challenge should clarify the existence of other pathways between GnRH and GC signaling that could account for desensitization of gonadotrope cells to GnRH during stress.

## Methods

The antibodies and products used in the present study were purchased from the following sources:

Monoclonal anti- $\alpha$  tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Polyclonal anti-p-CaMKII (T286) (sc-12886-R, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Polyclonal anti-CaMKII (H300) (sc-13082, Santa Cruz Biotechnology), Polyclonal anti-p-synapsin Ia/b (S603) (sc-135708, Santa Cruz Biotechnology), Polyclonal anti-synapsin Ia/b (H170) (sc-20780, Santa Cruz Biotechnology), Polyclonal anti-p-Src and anti-Src (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Monoclonal anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich), Polyclonal anti-GR M20 (Santa Cruz Biotechnology), Polyclonal anti-Lamin A/C (Cell Signaling Technology), Monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich), monoclonal anti-GFP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), Polyclonal anti- $\kappa$ -Opioid Receptor (Abcam, Cambridge, UK), RU486 (mifepristone) (Sigma-Aldrich), 2-bromohexadecanoic acid (Sigma-Aldrich), Dexamethasone (Dex) (Sigma-Aldrich), Corticosterone (Sigma-Aldrich), Corticosterone-BSA conjugate (Cusabio Biotech Co., CliniSciences, Nanterre, France), KN93 (Sigma-Aldrich), DMEM-glutamax (Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium)-glucose 4.5 g/l (Life Technologies, Saint-Aubin, France), Fetal calf serum (FCS) (Biowest, Nuaillé, France), Lipofectamine 2000 (Life Technologies), OptiMEM (Life Technologies), Hydroxylamine (Sigma-Aldrich), EZ-link biotin-BMCC ((1-biotinamido-4-[4'-maleimidomethyl] cyclohexanecarboxamido] butane) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), *N*-ethylmaleimide (NEM) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and *N*-methylmaleimide (NMM) (Sigma-Aldrich).

**Pituitary Culture.** Adult male mice SV129 were decapitated and the whole pituitaries were rapidly collected and incubated in DMEM-glutamax medium at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 2 h (equilibration) before hormonal treatment. This procedure was carried out in accordance with relevant guidelines and regulations following a protocol approved by the Animal Care Committee, Ministère de l'Agriculture, France (N°C94-043-12). All procedures were approved by the local ethics committee Consortium des Animaleries Paris Sud (CAPSud) (N°2012-021).

**Cell line culture and transfection.** Cell lines, L $\beta$ T2<sup>54</sup>, GT1-7<sup>55</sup> and HEK293 cells (obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)) were cultured in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS) supplemented with 100 U/ml penicillin (Life technologies), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Life technologies), at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. KC3AC1 cells<sup>56</sup> were seeded on collagen I-coated dishes and routinely cultured at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> as previously described<sup>56</sup>. mhATF3F cells<sup>57</sup> were cultured in DMEM/F12 (1:1) medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 10 nM insulin, 2 mM glutamine, 1  $\mu$ M Dex, 30 nM sodium selenite, 1  $\mu$ M 3,4,5-tri-iodo D-thyronine and 5% FCS. All cells were serum-starved for 24 h prior to drug treatment. HEK293 cells were transfected with Flag-GR using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Twenty four hours after transfection, cells were used for ABE assays.

**Construction of Flag-GR Wt or C/A mutant.** Mouse GR cDNA was amplified by PCR using pSV2-GR plasmid, a generous gift of E. D. Sanchez (Dept Pharmacology, University of Toledo College of Medicine, Toledo OH 43614, US)<sup>58</sup>, and specific primers (Forward: 5'-GATCTATGGACTCCAAAGAATCC-3', Reverse: 5'-CTAGATCATTTCTGATGAAACAGAAGC-3') containing *Bgl*III and *Xba*I restriction sites to facilitate cloning into the pFLAG-CMV2 vector (Sigma-Aldrich) leading to a N-terminal Flag form of GR. For Flag-GR C/A mutant, specific cysteine residue was mutated into alanine (Forward primer: 5'-GAAGAGTATCTCGCTATGAAAACCTTAC-3'; Reverse primer: 5'-CTGATTATTAATGAGCAGAGA-3', mutated codons are underlined) by Quick change Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). All plasmid sequences were verified by DNA sequencing.

**Cell fractionation.** Subcellular compartments of each cell line were separated according to specific protocols as previously described<sup>59</sup>. Cells were homogenized in a Dounce B homogenizer in buffer composed of 10 mM Hepes, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.4, with an anti-protease cocktail (Sigma-Aldrich) at 4 °C and fractionated by differential centrifugation. The initial homogenate was first centrifuged at 850  $\times$  g for 5 minutes at 4 °C to obtain a pellet corresponding to nuclear (N) fraction that could also contain cell debris. Then, the post-nuclear supernatant was centrifuged at 10 000  $\times$  g for 10 minutes at 4 °C to remove mitochondria. The resulting supernatant was finally centrifuged at 400 000  $\times$  g for 6 minutes at 4 °C to obtain the soluble (supernatant, Cyto) and membrane (pellet, Mb) fractions. Each pellet was washed 3 times before resuspension in RIPA (50 mM

Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton, protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich).

Equal amounts (50 µg) of each fraction were analyzed by SDS-PAGE. The purity of each fraction was assessed by immunoblotting for specific protein markers: lamin A/C at approximately 70 kDa in the nuclear fraction, a 37 kDa band for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, cytosol), and a band 45 kDa  $\kappa$ -opioid receptor (KOR, membranes). These analyses showed little contamination between compartment fractions indicating that the purity of the different fractions. Quantification of the membrane and the soluble pools of GR was analyzed and compared to the total extract (T) and expressed as a percentage of the total.

**Protein extraction.** After drug treatment, cells were scraped in RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton, 10% Glycerol, protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Pituitaries were homogenized in RIPA with TissueLyser LT homogenizer (Qiagen, Les Ulis, France). After centrifugation (14,000 × g, 4 °C for 15 min) protein content was determined by bicinchoninic acid assay (Thermo Fisher Scientific).

**Western Blot analysis.** Equal protein amounts (50 µg) were resolved by either 7.5% or 10% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membrane (Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Blots were incubated for 1 h at room temperature (RT) in a blocking buffer (5% fat-free milk or 5% BSA in 0.2% Tween 20 phosphate-buffered saline (PBS-T) or in 0.2% Tween 20 Tris-buffered saline (TBS-T) depending on the nature of the first antibody, before an overnight incubation at 4 °C with primary monoclonal or polyclonal antibodies as indicated. After extensive washes with PBS-T or TBS-T, blots were incubated with an IRDye 800-conjugated affinity purified anti-rabbit IgG second antibody (Perbio Science, Brebières, France) and an IRDye 680-conjugated affinity purified anti-mouse IgG second antibody (Perbio Science) for 1 h at RT. After washes, proteins were visualized with an Odyssey-Fc apparatus (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Specific signals for different proteins were normalized by the infrared fluorescence of  $\alpha$ -tubulin followed by total CaMKII or total Syn or total ERK or total Src signals as determined by densitometry using the Image Studio software (Li-Cor). All Western blots shown are representative of what was observed in at least three independent experiments, excepted in Supplementary Fig. S2 (2 independent experiments).

**RT-qPCR.** RT-qPCR analysis was undertaken using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) with primers (*Sgk-1* Forward: 5'-TCACCTTCTCATTCCAGACCGC-3', Reverse: 5'-ATAGCCCAAGGCACTGGCTA-3'; *Lhb* Forward: 5'-ATCACCTTACCACCAGCAT-3', Reverse: 5'-GACCCACAGTCAGAGCTA-3'; *Cga* Forward: 5'-GCTGTCATTCTGGTCATGCT-3', Reverse: 5'-GAAGCAACAGCCATACACT-3'; *36b4* Forward: 5'-AGCGCGTCTGGCATTGTCTGT-3', Reverse: 5'-GGGACAGTGGTGGCAGCAGC-3') and a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies). Expression levels of *Sgk-1*, *Lhb* and *Cga* analyzed by qPCR were normalized relative to levels of *36b4* mRNA, *Cga* coding for the alpha subunit of LH and FSH.

**ABE assay.** L $\beta$ T2 as well as HEK293 cells transfected with Flag-GR (GR) or Stathmin 1-GFP (St1) were lysed in presence of N-Ethylmaleimide (NEM). GR palmitoylation was assessed using the acyl biotin exchange (ABE) protocol as previously described<sup>35</sup>. The principle of this assay was to biotinylate palmitoylation sites after specific cleavage by hydroxylamide (HAM) on immunoprecipitated GR using either EZview Red anti-FLAG M2 agarose (Sigma-Aldrich) or anti-GR (M20) or GFP with anti-GFP associated with 50% slurry of protein G-coated sepharose beads (Roche Diagnostics). Once labeling sites was achieved, palmitoylation was analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using Streptavidin-IRDye800CW conjugated (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) as well as an anti-GR or anti-Flag or anti-GFP antibody. Streptavidin signals were normalized to the amount of Flag-GR protein present on the blot.

**LH assay.** Whole pituitaries were cultured in DMEM for 2 h at 37 °C for equilibration. The medium (200 µl) was replaced by fresh medium for 30 min at 37 °C and collected for LH assay (pre-stimulation). Medium containing ethanol (vehicle), GnRH (10<sup>-8</sup> M), Dex (10<sup>-7</sup> M) or both hormones were used to treat pituitaries for 1 h at 37 °C. Culture supernatants were then collected to measure LH content. LH concentration in culture media was determined using an ELISA method as previously described<sup>60</sup> with reagents supplied by Dr Parlow (NHPP, Harbor-UCLA, CA, USA). Briefly, micro-titration plates (High binding, Greiner Bio-one) were coated overnight at 4 °C with 10 ng of purified rat LH-I-10 diluted in carbonate buffer. Rat LH-RP3, used as standard, and media were incubated with anti-rat LH-S11 (dilution 1:4,000 overnight at 4 °C). Plates were then rinsed with PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween20 for 1 h at RT and washed with PBS-0.1% Tween20 before addition of standards and samples for competition binding (2 h at 4 °C). After removal of unbound material, phosphatase alkaline-labeled secondary antibody (dilution 1: 2,000, Thermo Scientific, France) was added for 1 h at 4 °C and phosphatase alkaline activity was revealed with SigmaFast pNPP reagent. The minimum detectable LH concentration was 0.2 ng/ml and the inter-assay coefficient of variation were <10%. LH release after hormonal treatment was quantified in comparison with LH amount measured in basal condition (pre-stimulation).

**Statistical Analysis.** Means  $\pm$  SEM of n experiments of measurements were analyzed for significant differences by one-way ANOVA using Prism 6 (GraphPad) software followed by appropriated posttests. Means are assumed to be significantly different if  $p < 0.05$ .



## References

- Allsworth, J. E. *et al.* The influence of stress on the menstrual cycle among newly incarcerated women. *Women's health issues: official publication of the Jacobs Institute of Women's Health* **17**, 202–209, doi:10.1016/j.whi.2007.02.002 (2007).
- Luo, E. *et al.* Corticosterone Blocks Ovarian Cyclicity and the LH Surge via Decreased Kisspeptin Neuron Activation in Female Mice. *Endocrinology* **157**, 1187–1199, doi:10.1210/en.2015-1711 (2016).
- Whirledge, S. & Cidlowski, J. A. A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* **154**, 4450–4468, doi:10.1210/en.2013-1652 (2013).
- Lynch, C. D., Sundaram, R., Maisog, J. M., Sweeney, A. M. & Buck Louis, G. M. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study—the LIFE study. *Human reproduction* **29**, 1067–1075, doi:10.1093/humrep/deu032 (2014).
- Dobson, H., Fergani, C., Routly, J. E. & Smith, R. F. Effects of stress on reproduction in ewes. *Anim Reprod Sci* **130**, 135–140, doi:10.1016/j.anireprosci.2012.01.006 (2012).
- Oakley, A. E. *et al.* Cortisol reduces gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. *Endocrinology* **150**, 341–349, doi:10.1210/en.2008-0587 (2009).
- Breen, K. M. *et al.* Insight into the neuroendocrine site and cellular mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **149**, 767–773, doi:10.1210/en.2007-0773 (2008).
- Kadmiel, M. & Cidlowski, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* **34**, 518–530, doi:10.1016/j.tips.2013.07.003 (2013).
- Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* **132**, 1033–1044, doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007 (2013).
- Breen, K. M. & Mellon, P. L. Influence of stress-induced intermediates on gonadotropin gene expression in gonadotrope cells. *Molecular and cellular endocrinology* **385**, 71–77, doi:10.1016/j.mce.2013.08.014 (2014).
- Haller, J., Mikics, E. & Makara, G. B. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Frontiers in neuroendocrinology* **29**, 273–291, doi:10.1016/j.yfrne.2007.10.004 (2008).
- Teng, Z., Zhang, M., Zhao, M. & Zhang, W. Glucocorticoid exerts its non-genomic effect on IPSC by activation of a phospholipase C-dependent pathway in prefrontal cortex of rats. *The Journal of physiology* **591**, 3341–3353, doi:10.1113/jphysiol.2013.254961 (2013).
- Ayrolidi, E. *et al.* Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 4805–4820, doi:10.1096/fj.12-216382 (2012).
- Samarasinghe, R. A. *et al.* Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 16657–16662, doi:10.1073/pnas.1102821108 (2011).
- Solito, E. *et al.* Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **144**, 1164–1174, doi:10.1210/en.2002-220592 (2003).
- Deng, Q. *et al.* Rapid Glucocorticoid Feedback Inhibition of ACTH Secretion Involves Ligand-Dependent Membrane Association of Glucocorticoid Receptors. *Endocrinology* **156**, 3215–3227, doi:10.1210/EN.2015-1265 (2015).
- Marchetti, M. C., Di Marco, B., Cifone, G., Migliorati, G. & Riccardi, C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* **101**, 585–593, doi:10.1182/blood-2002-06-1779 (2003).
- Urbach, V., Walsh, D. E., Mainprice, B., Bousquet, J. & Harvey, B. J. Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl<sup>-</sup> secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium. *The Journal of physiology* **545**, 869–878 (2002).
- Bartholome, B. *et al.* Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 70–80, doi:10.1096/fj.03-0328com (2004).
- Stojadinovic, O., Sawaya, A., Pastar, I. & Tomic-Canic, M. Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes. *PLoS one* **8**, e63453, doi:10.1371/journal.pone.0063453 (2013).
- Komatsuzaki, Y. *et al.* Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications* **335**, 1002–1007, doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.173 (2005).
- Spies, C. M. *et al.* Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Annals of the rheumatic diseases* **65**, 1139–1146, doi:10.1136/ard.2005.048272 (2006).
- Wehmeyer, L., Du Toit, A., Lang, D. M. & Hapgood, J. P. Lipid raft- and protein kinase C-mediated synergism between glucocorticoid- and gonadotropin-releasing hormone signaling results in decreased cell proliferation. *J Biol Chem* **289**, 10235–10251, doi:10.1074/jbc.M113.544742 (2014).
- Maier, C. *et al.* G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *J Cell Sci* **118**, 3353–3361, doi:10.1242/jcs.02462 (2005).
- Nahar, J., Rainville, J. R., Dohanich, G. P. & Tasker, J. G. Further evidence for a membrane receptor that binds glucocorticoids in the rodent hypothalamus. *Steroids*. doi:10.1016/j.steroids.2016.05.013 (2016).
- Strehl, C. *et al.* Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis and rheumatism* **63**, 3779–3788, doi:10.1002/art.30637 (2011).
- Acconcia, F. *et al.* Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* **16**, 231–237, doi:10.1091/mbc.E04-07-0547 (2005).
- Pedram, A. *et al.* A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* **282**, 22278–22288, doi:10.1074/jbc.M611877200 (2007).
- Jain, S., Li, Y., Kumar, A. & Sehgal, P. B. Transcriptional signaling from membrane raft-associated glucocorticoid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **336**, 3–8, doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.057 (2005).
- Matthews, L. *et al.* Caveolin mediates rapid glucocorticoid effects and couples glucocorticoid action to the antiproliferative program. *Molecular endocrinology* **22**, 1320–1330, doi:10.1210/me.2007-0154 (2008).
- Peffer, M. E. *et al.* Caveolin-1 regulates genomic action of the glucocorticoid receptor in neural stem cells. *Mol Cell Biol* **34**, 2611–2623, doi:10.1128/MCB.01121-13 (2014).
- Vernocchi, S. *et al.* Membrane glucocorticoid receptor activation induces proteomic changes aligning with classical glucocorticoid effects. *Molecular & cellular proteomics: MCP* **12**, 1764–1779, doi:10.1074/mcp.M112.022947 (2013).
- Deng, Q., Waxse, B., Riquelme, D., Zhang, J. & Aguilera, G. Helix 8 of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor (GR) is essential for ligand binding. *Molecular and cellular endocrinology* **408**, 23–32, doi:10.1016/j.mce.2015.01.044 (2015).
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P. & Marino, M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochemical and biophysical research communications* **316**, 878–883, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.129 (2004).
- Brigidi, G. S. & Bamji, S. X. Detection of protein palmitoylation in cultured hippocampal neurons by immunoprecipitation and acyl-biotin exchange (ABE). *Journal of visualized experiments: JoVE*, doi:10.3791/50031 (2013).

36. Chauvin, S. & Sobel, A. Neuronal stathmins: a family of phosphoproteins cooperating for neuronal development, plasticity and regeneration. *Progress in neurobiology* **126**, 1–18, doi:10.1016/j.pneurobio.2014.09.002 (2015).
37. Haisenleder, D. J., Burger, L. L., Aylor, K. W., Dalkin, A. C. & Marshall, J. C. Gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription: evidence for the involvement of calcium/calmodulin-dependent kinase II (Ca/CAMK II) activation in rat pituitaries. *Endocrinology* **144**, 2768–2774, doi:10.1210/en.2002-0168 (2003).
38. Yamamoto, H., Matsumoto, K., Araki, E. & Miyamoto, E. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation of synapsin I in insulin exocytosis. *Journal of pharmacological sciences* **93**, 30–34 (2003).
39. Breen, K. M. *et al.* Stress levels of glucocorticoids inhibit LHbeta-subunit gene expression in gonadotrope cells. *Molecular endocrinology* **26**, 1716–1731, doi:10.1210/me.2011-1327 (2012).
40. Breen, K. M. *et al.* Does cortisol acting via the type II glucocorticoid receptor mediate suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in response to psychosocial stress? *Endocrinology* **148**, 1882–1890, doi:10.1210/en.2006-0973 (2007).
41. Collu, R., Tache, Y. & Ducharme, J. R. Hormonal modifications induced by chronic stress in rats. *Journal of steroid biochemistry* **11**, 989–1000 (1979).
42. Vernocchi, S. *et al.* Membrane Glucocorticoid Receptor activation induces proteomic changes aligning with classical glucocorticoid effects. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. doi:10.1074/mcp.M112.022947 (2013).
43. Gutierrez-Mecinas, M. *et al.* Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13806–13811, doi:10.1073/pnas.1104383108 (2011).
44. Greaves, J. & Chamberlain, L. H. DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho)physiology. *Trends in biochemical sciences* **36**, 245–253, doi:10.1016/j.tibs.2011.01.003 (2011).
45. Morrill, G. A., Kostellow, A. B. & Gupta, R. K. Transmembrane helices in “classical” nuclear reproductive steroid receptors: a perspective. *Nuclear receptor signaling* **13**, e003, doi:10.1621/nrs.13003 (2015).
46. Duran-Pasten, M. L. & Fiordeliso, T. GnRH-Induced Ca Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. *Frontiers in endocrinology* **4**, 127, doi:10.3389/fendo.2013.00127 (2013).
47. Bellavance, M. A. & Rivest, S. The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front Immunol* **5**, 136, doi:10.3389/fimmu.2014.00136 (2014).
48. Kotitschke, A., Sadie-Van Gijzen, H., Avenant, C., Fernandes, S. & Hapgood, J. P. Genomic and nongenomic cross talk between the gonadotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor signaling pathways. *Molecular endocrinology* **23**, 1726–1745, doi:10.1210/me.2008-0462 (2009).
49. Loechner, K. J., Knox, R. J., McLaughlin, J. T. & Dunlap, K. Dexamethasone-mediated inhibition of calcium transients and ACTH release in a pituitary cell line (AtT-20). *Steroids* **64**, 404–412 (1999).
50. Castellino, F., Heuser, J., Marchetti, S., Bruno, B. & Luini, A. Glucocorticoid stabilization of actin filaments: a possible mechanism for inhibition of corticotropin release. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3775–3779 (1992).
51. Easom, R. A. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* **48**, 675–684 (1999).
52. Ferreira, A. & Rapoport, M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **59**, 589–595 (2002).
53. Revest, J. M. *et al.* The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-Ia/Ib. *Molecular psychiatry* **15**(1125), 1140–1151, doi:10.1038/mp.2010.40 (2010).
54. Turgeon, J. L., Kimura, Y., Waring, D. W. & Mellon, P. L. Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Molecular endocrinology* **10**, 439–450, doi:10.1210/mend.10.4.8721988 (1996).
55. Mellon, P. L. *et al.* Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* **5**, 1–10 (1990).
56. Viengchareun, S. *et al.* Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Molecular endocrinology* **23**, 1948–1962, doi:10.1210/me.2009-0095 (2009).
57. Romieu, R. *et al.* Critical stages of tumor growth regulation in transgenic mice harboring a hepatocellular carcinoma revealed by distinct patterns of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNA production. *International immunology* **9**, 1405–1413 (1997).
58. Danielsen, M., Northrop, J. P. & Ringold, G. M. The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J* **5**, 2513–2522 (1986).
59. Levy, A. D. *et al.* Subcellular Golgi localization of stathmin family proteins is promoted by a specific set of DHHC palmitoyl transferases. *Mol Biol Cell* **22**, 1930–1942, doi:10.1091/mbc.E10-10-0824 (2011).
60. Garrel, G. *et al.* Unsaturated fatty acids stimulate LH secretion via novel PKCepsilon and -theta in gonadotrope cells and inhibit GnRH-induced LH release. *Endocrinology* **152**, 3905–3916, doi:10.1210/en.2011-1167 (2011).

## Acknowledgements

We thank Drs S. Viengchareun for his help in performing luciferase assays and J. Fagart for discussion on GR structure. We thank N. Ba from Plateau de morphologie at Institut Biomedical de Bicêtre for preparing mouse pituitary slices and Dr C. Adam for the histological interpretations. We thank C. Denoyelle and F. Petit for their technical help as well as J.A. Girault who allowed us to use his ultracentrifuge (Beckman) at Institut du Fer à Moulin (Paris). This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the University Paris Sud (Attractivity 2015 grant). M.A. is supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

## Author Contributions

M.A. designed and performed the experiments, analyzed primary data, aggregated data and contribute to the writing of the manuscript; V.S. performed L.H. assays and analyzed primary data; V.B. contributed to biochemical experiments; N.B. contributed to *ex vivo* experiments and to the conception of the project; J.C.-T. contributed to experimental design and analyzed the data; M.L. contributed to experimental design and analyzed the data; S.C. conceived and supervised the project, designed experiments, analyzed aggregated data and wrote the manuscript. All authors reviewed this manuscript and approved the submission.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-01777-2

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

# **A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells**

**Mohsen Ayrou<sup>1</sup>, Violaine Simon<sup>2</sup>, Valérie Bernard<sup>1</sup>, Nadine Binart<sup>1</sup>, Joëlle Cohen-Tannoudji<sup>2</sup>, Marc Lombès<sup>1</sup> and Stéphanie Chauvin<sup>1,\*</sup>**

## **Supplementary information**

### **Supplementary Figure S1: Cort-BSA does not trigger genomic activities.**

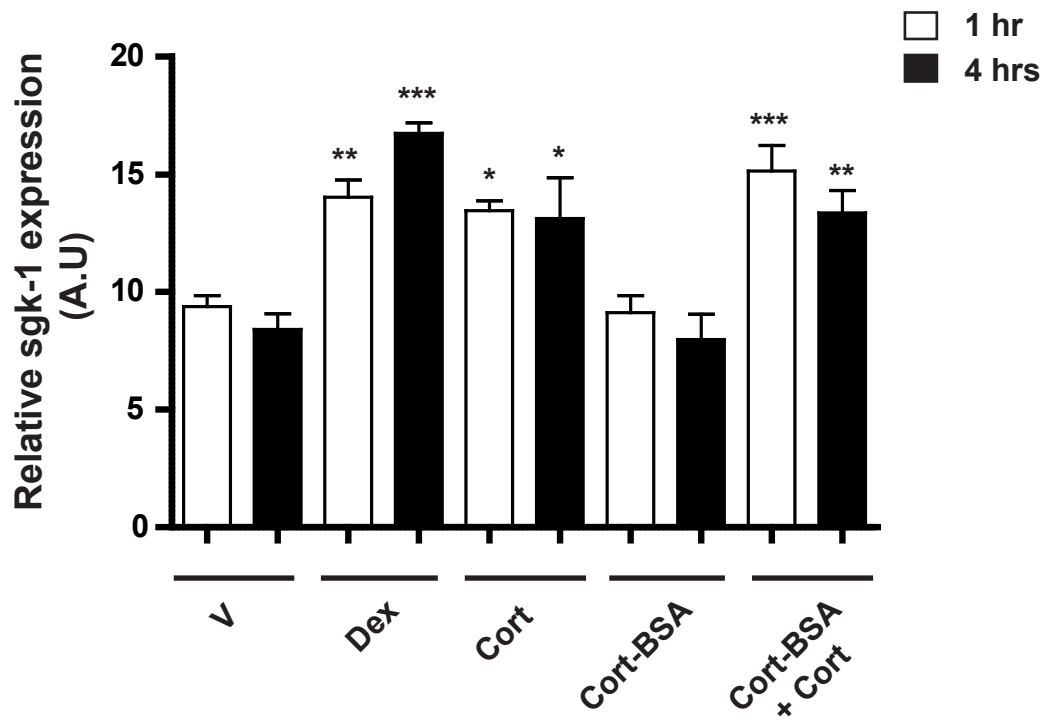
Total mRNAs were recovered from LβT2 cells treated for 1 to 4 h with Dex ( $10^{-7}$  M), Cort ( $10^{-7}$  M) or Cort-BSA ( $10^{-7}$  M). A well-known GC target gene, Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 (*Sgk1*) gene expression was evaluated by RTqPCR. Data show relative expression (arbitrary units) corrected for reference gene *36b4*. As anticipated, Dex as well as Cort significantly stimulated *Sgk1* expression within 1 h by approximately 1.7 and 1.4-fold above basal, respectively. In sharp contrast, Cort-BSA was unable to induce *Sgk1* expression after 1 or 4 h of treatment, demonstrating that Cort-BSA was devoid of any uncoupled, free Cort and thus exclusively acted through membrane-mediated mechanism. Pretreatment with Cort-BSA for 20 min did not potentiate the transcriptional activity of Cort. One-way ANOVA with Tuckey's posttest, n=3, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

**Supplementary Figure S2. GC do not stimulate either MAPK or Src signaling pathways in LβT2 cells.**

(a) LβT2 cells were treated with GnRH ( $10^{-8}$  M) (g), Dex ( $10^{-7}$  M) (d) or co-treated with GnRH and Dex (gd) for 0 to 60 min. Cells lysates were subjected to western blotting with anti-ERK (in red) and p-ERK (in green). GnRH stimulated ERK phosphorylation within 5 min and maintained its effect after 60 min of treatment, whereas Dex alone or associated with GnRH did not have any effect on the level of ERK phosphorylation. Level of total ERK was unchanged during treatments. Results are representative of 2 separate experiments that gave similar results. (b) LβT2 cells were treated with Dex ( $10^{-7}$  M) for 0 to 60 min. Cells lysates were subjected to immunoblotting with anti-Src, p-Src and  $\alpha$ -tubulin antibodies. Dex did not significantly induce Src phosphorylation. Total Src level were unchanged during treatment. The immunoblot images are representative of 3 independent experiments. Results are expressed as means  $\pm$  SEM fold stimulation when compared to vehicle. Statistical significance was assessed by One way ANOVA, Dunnett's post-test, n = 2; NS, no significant difference.

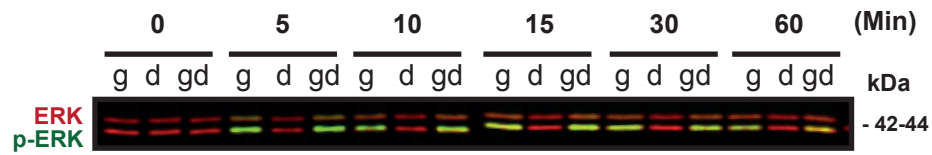
**Supplementary Figure S3. GR is broadly detected in the membrane fraction of various murine cell lines.**

LβT2 (gonadotrope cells), GT1-7 (hypothalamic cells), mhATF3F (hepatic cells) and KC3AC1 (kidney cells) were subjected to cell fractionation. Equal amounts (50  $\mu$ g) of proteins from each fraction (Total (T), Nuclei/debris (N), Cytosolic (Cyto), Membranous (Mb)) were loaded on SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with the anti-GR antibody. Results are representative of two separate experiments that gave similar results.



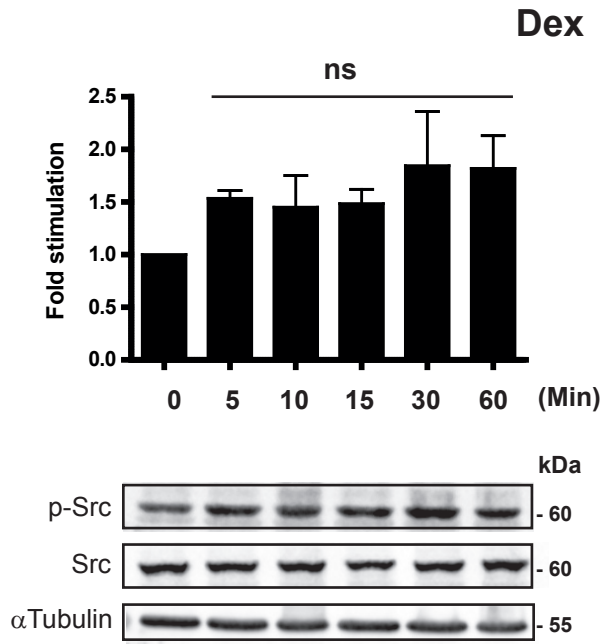
Supplementary Figure S1

a

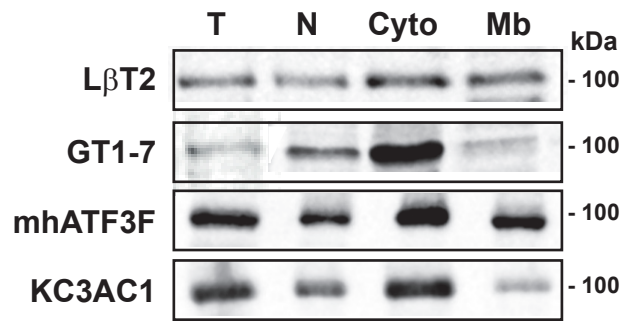


Treatments:  
g: GnRH  
d: Dex  
gd: GnRH + Dex

b



Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S3



Figure 1 a

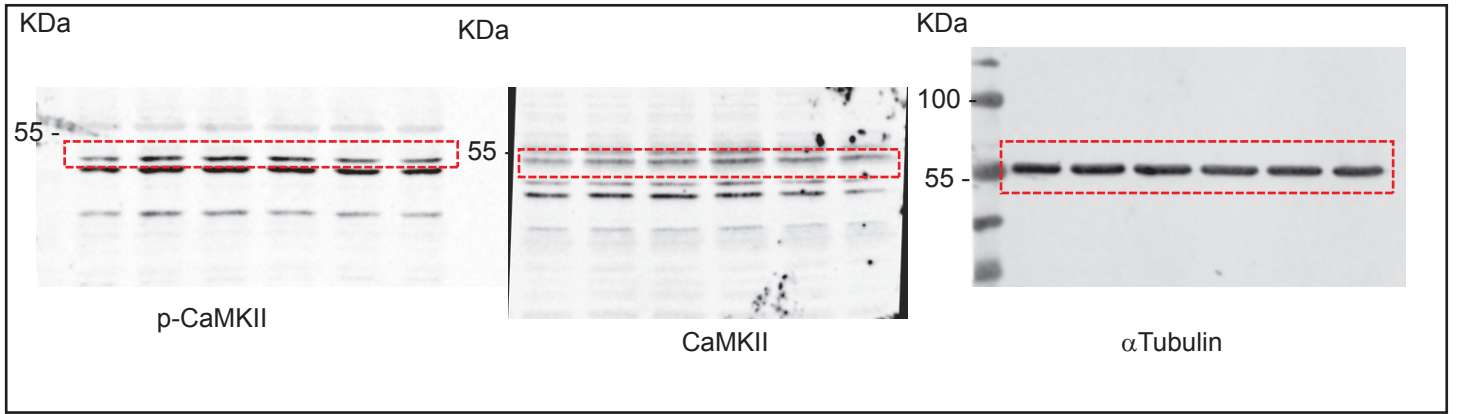


Figure 1 b

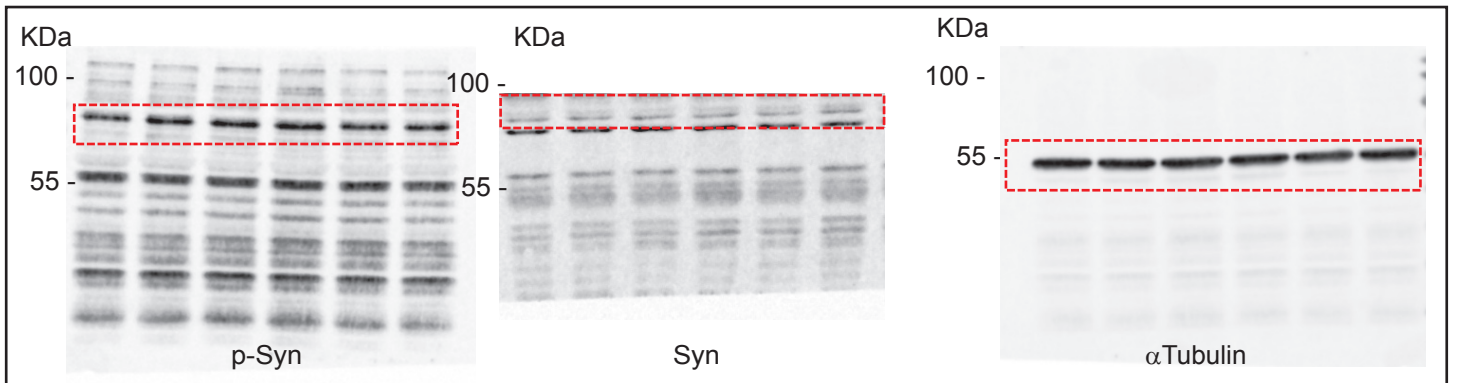


Figure 1c

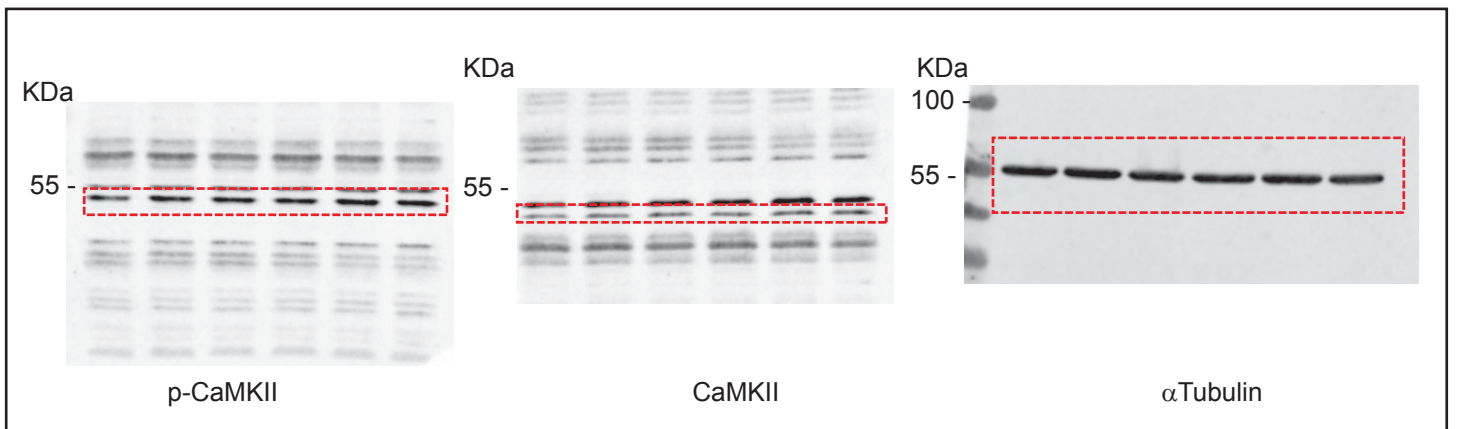


Figure 1d

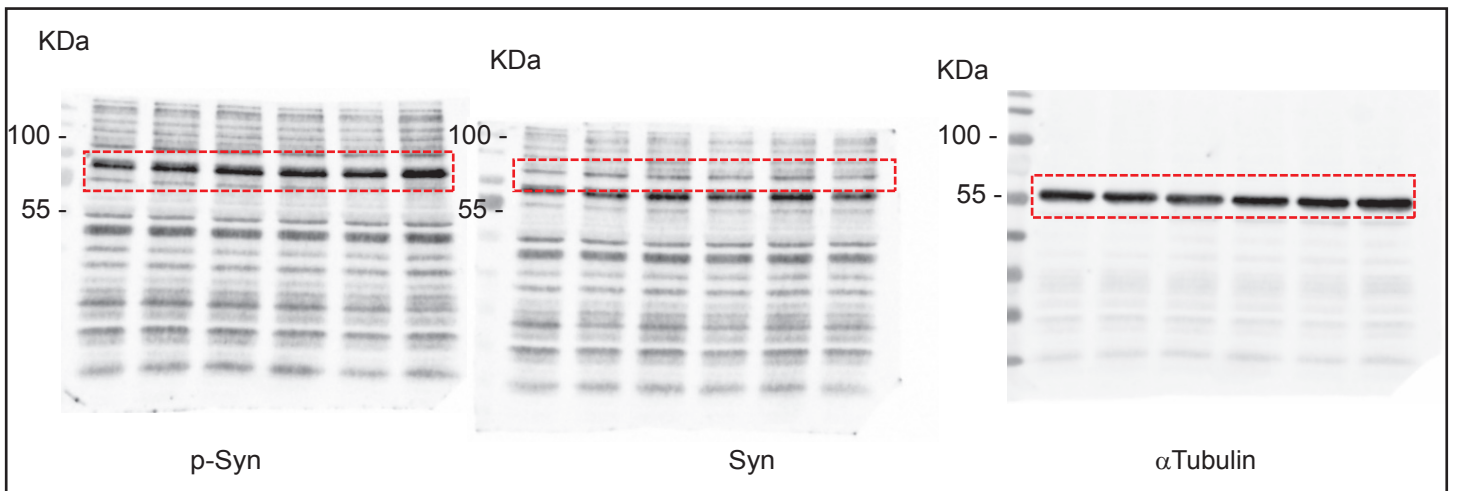


Figure 1e

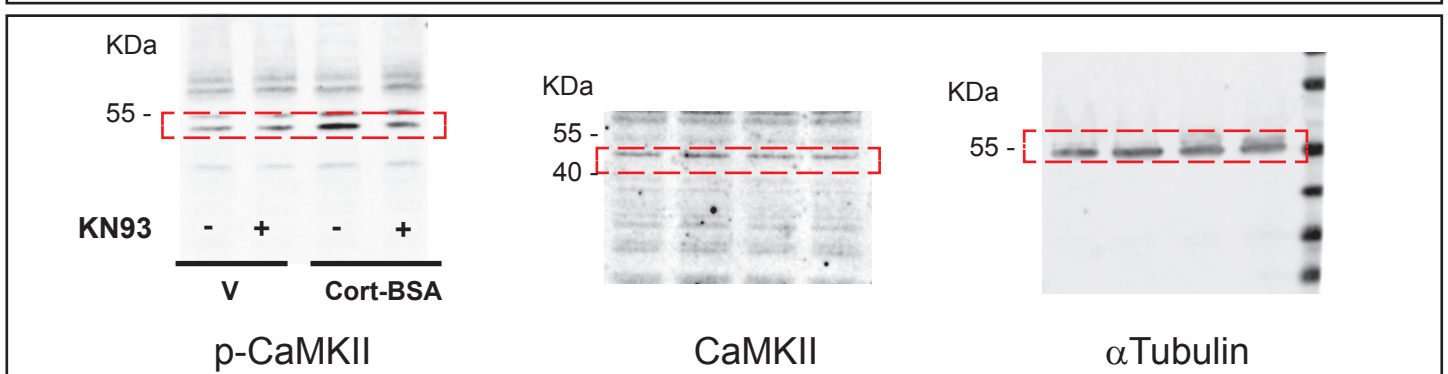
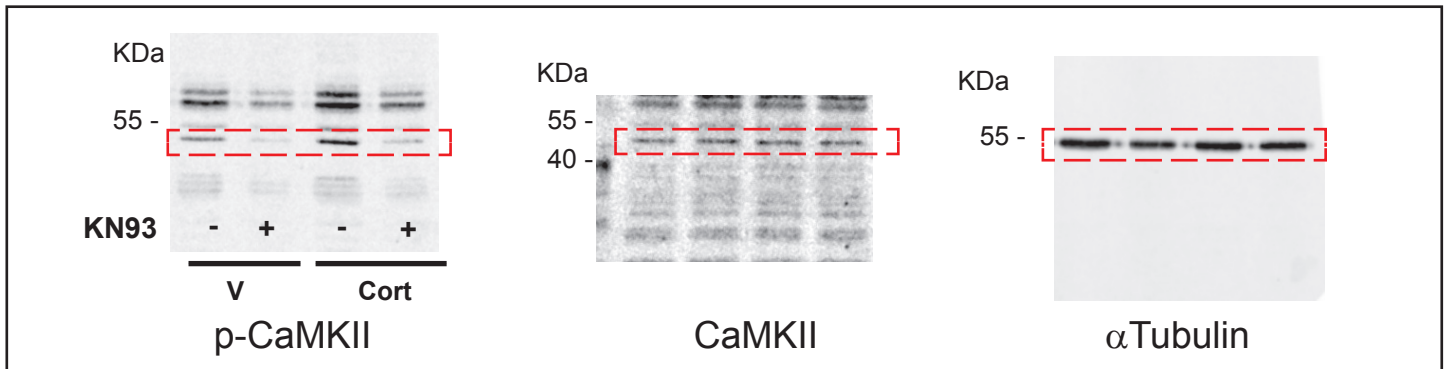
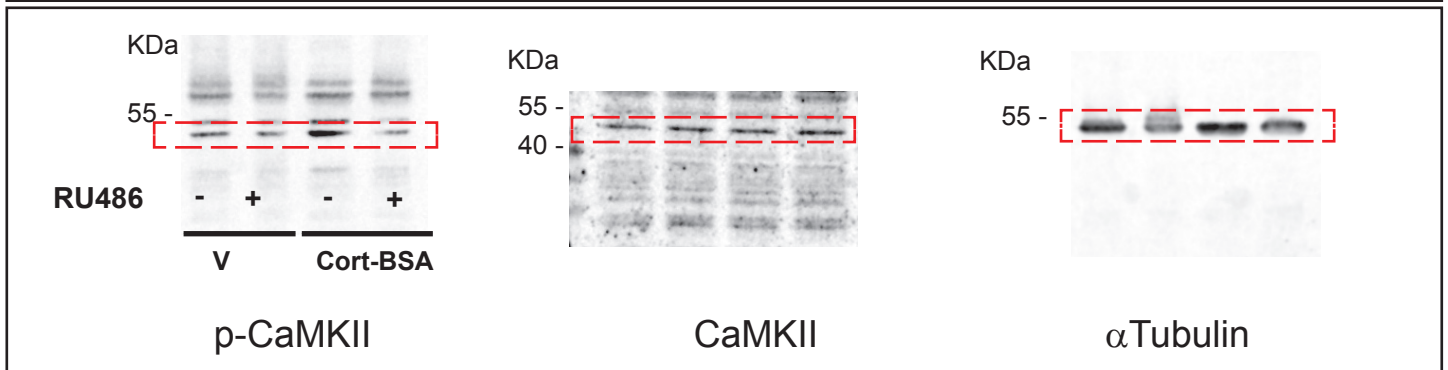
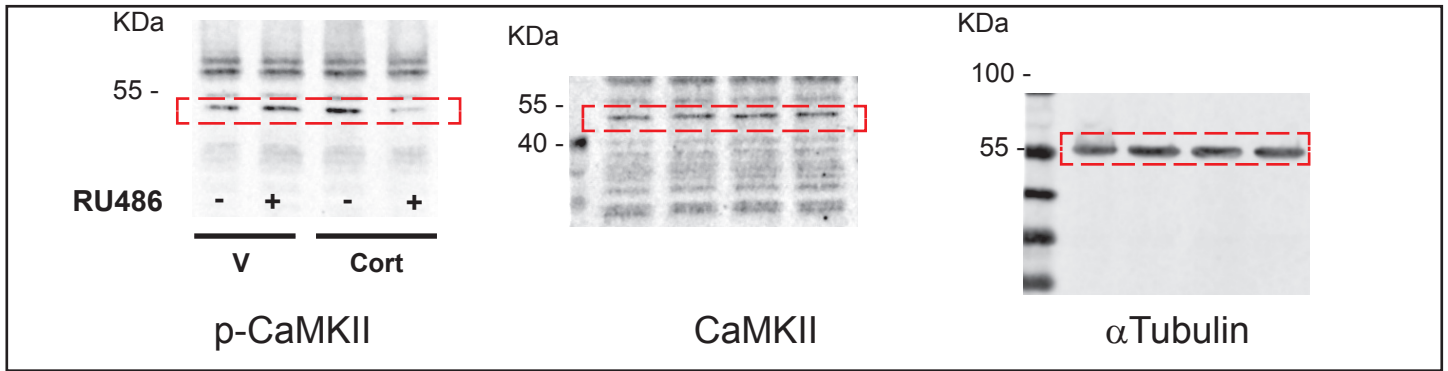


Figure 1f

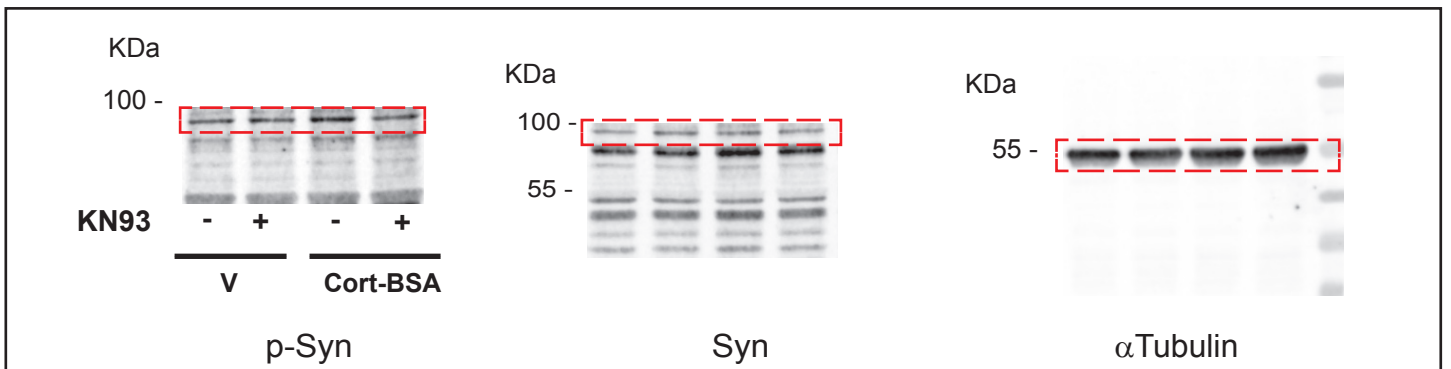
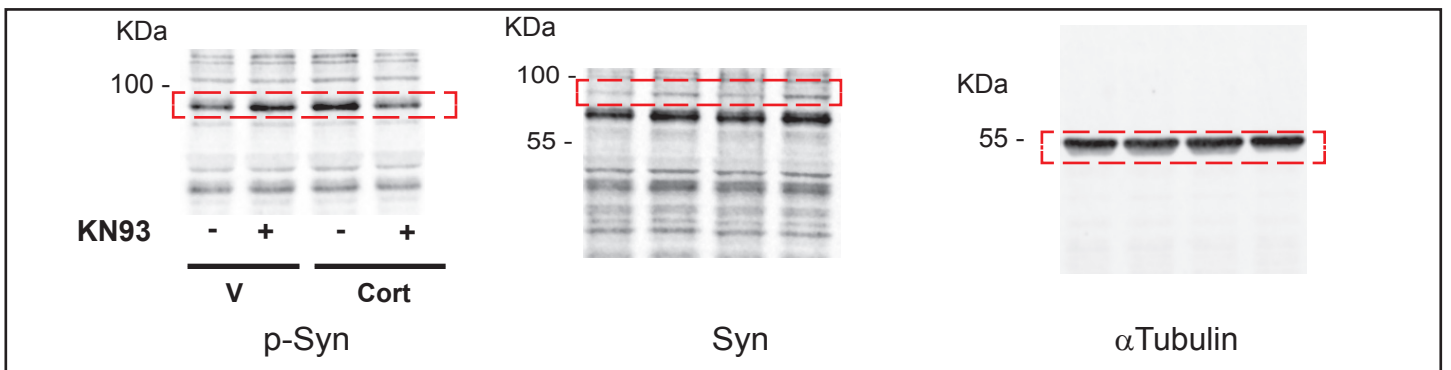
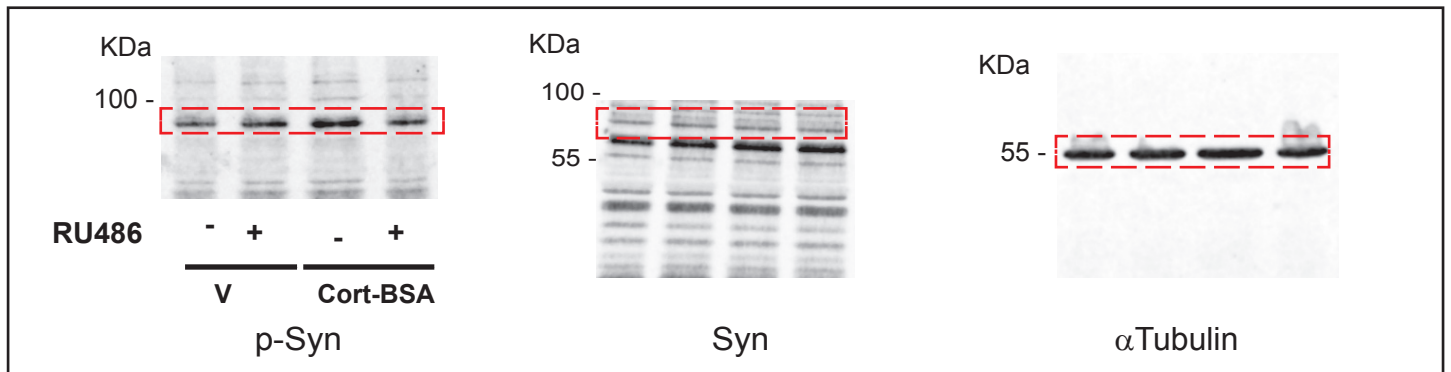


Figure 2 (upper panels)

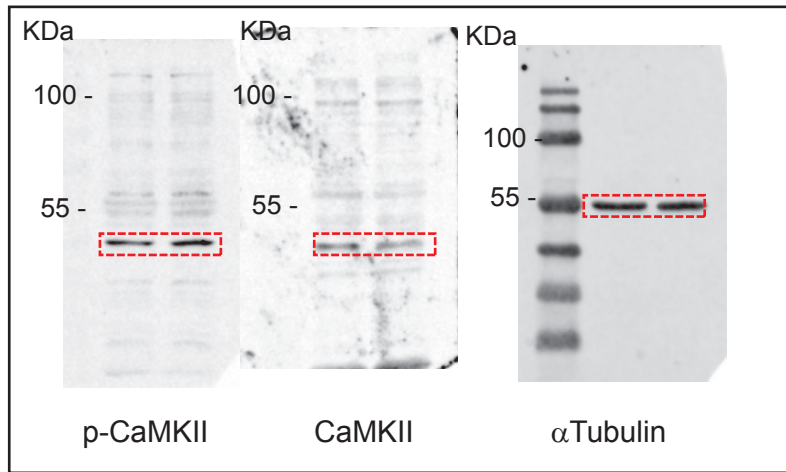


Figure 2 (lower panels)

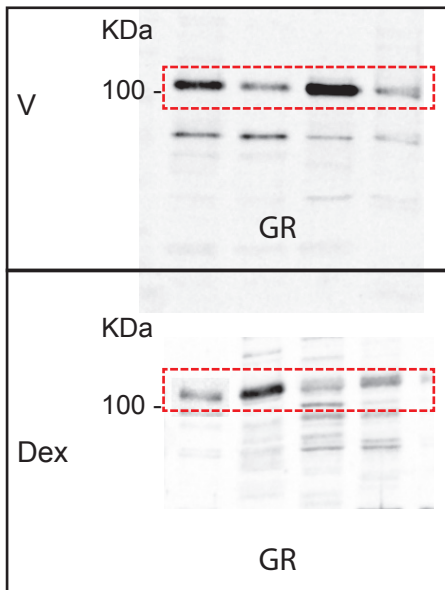
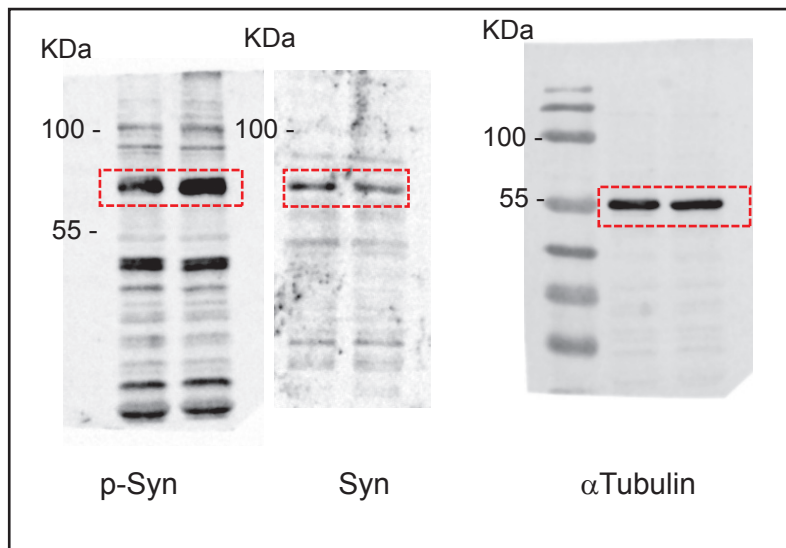


Figure 3a

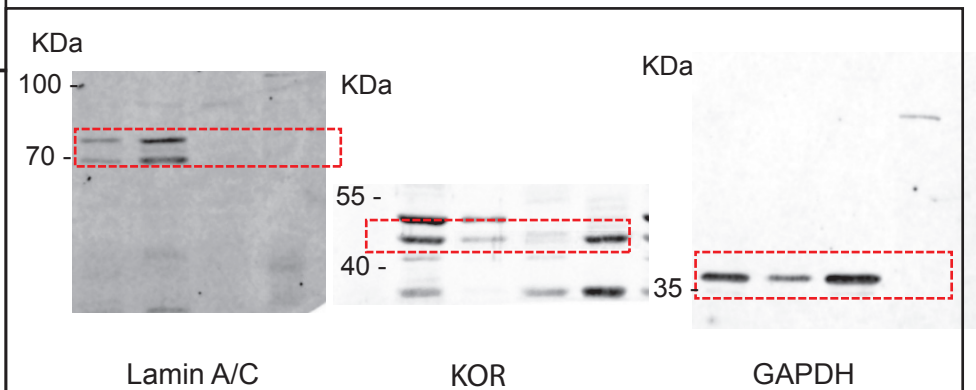


Figure 3c (upper panel)

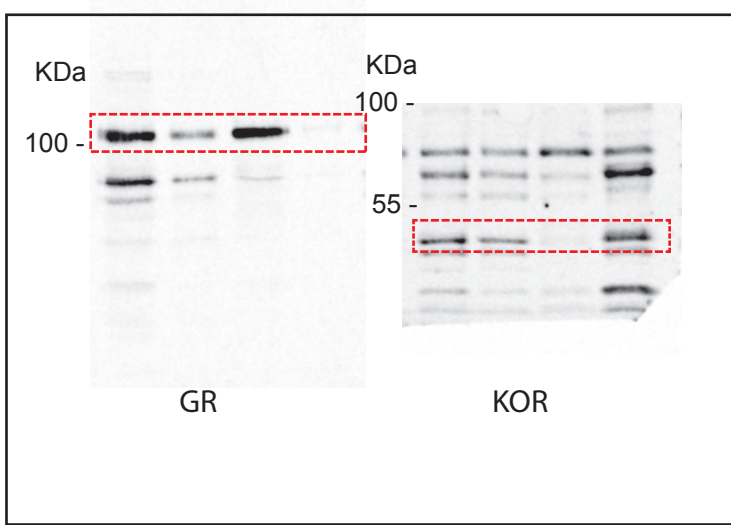


Figure 3c (lower panel)

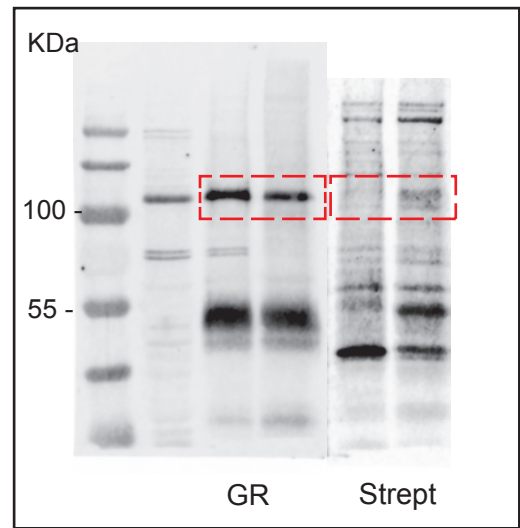


Figure 3d

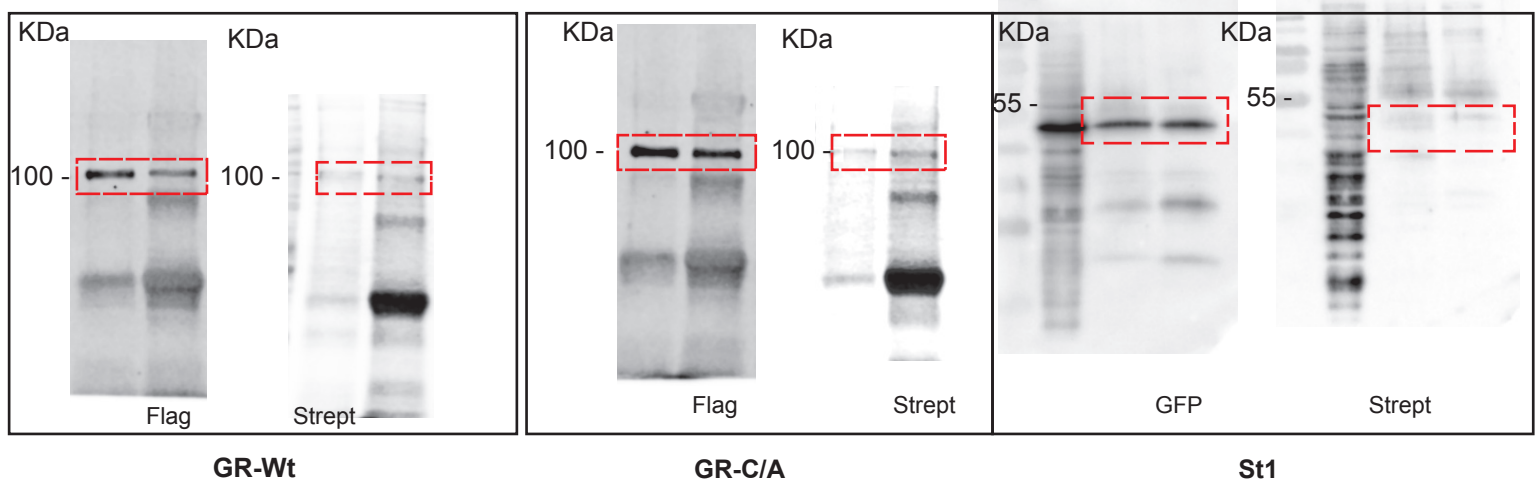
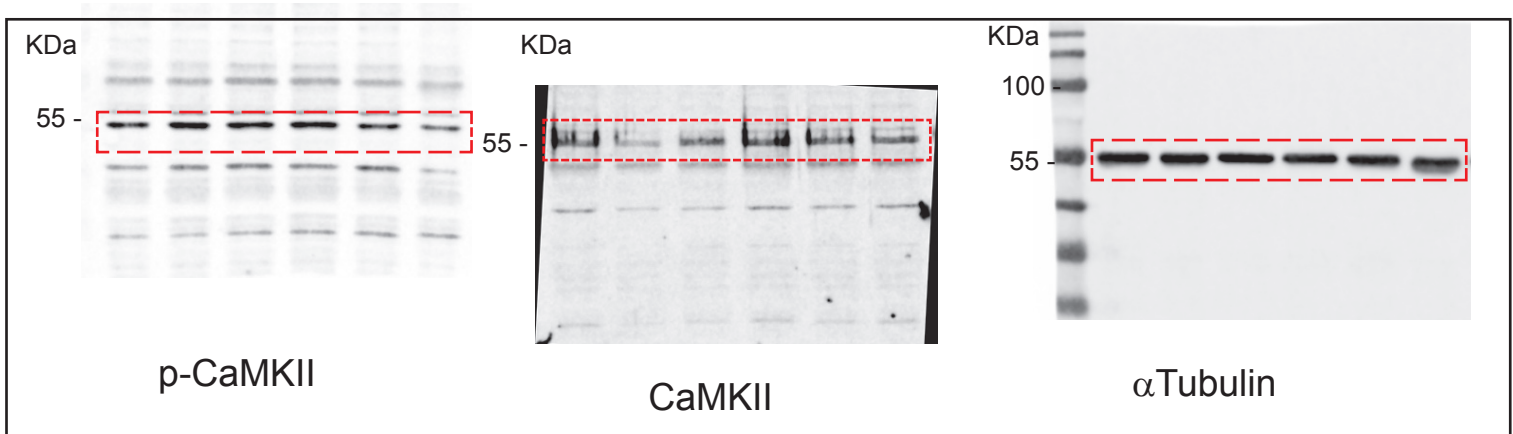


Figure 4



## **II-Conclusion-Discussion-Données complémentaires**

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons pu identifier une nouvelle voie de signalisation rapide, encore jamais décrite dans les cellules gonadotropes L $\beta$ T2. A la différence d'autres modèles cellulaires, l'utilisation de fortes concentrations de corticostérone (Cort) (mimant le stress) ou de Cort-BSA n'a pas entraîné l'activation des voies MAPK et AKT dans les cellules L $\beta$ T2. Néanmoins, nous avons identifié de nouveaux effecteurs potentiels, la CaMKII ainsi qu'une de ses cibles, la synapsine-Ia ; dès 5 minutes de traitement, la Cort ou la Cort-BSA induisent rapidement et de façon transitoire, la phosphorylation de ces 2 protéines dans les cellules L $\beta$ T2. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a aussi révélé le lien direct entre ces 2 protéines ; sans la CaMKII, la synapsine-Ia ne peut être phosphorylée après induction par la Cort-BSA. Cette cascade de signalisation a également été observée *ex vivo* sur des explants d'hypophyses de souris traitées pendant 30 minutes par la dexaméthasone.

### **A- La CaMKII, la synapsine-Ia et le Ca<sup>2+</sup>, de nouveaux acteurs dans la signalisation rapide des GC**

La CaMKII est une kinase serine-thréonine régulée par le complexe Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline. L'activation de la CaMKII conduit à son auto-phosphorylation sur le résidu Thréonine 286. La CaMKII phosphoryle aussi de très nombreuses protéines impliquées dans des fonctions très variées telles que l'apprentissage et la mémoire, la libération des neurotransmetteurs et la synthèse des gonadotropines (Fowkes et al., 2002; Haisenleder et al., 2003b). Dans le cerveau, la CaMKII stimule l'expression de *c-fos* et la sécrétion de noradrénaline et de glutamate (Miller and Kennedy, 1986). Dans l'hypophyse, cette kinase stimule la sécrétion de PRL et modestement celle des gonadotropines (Haisenleder et al., 2003b; Nowakowski et al., 1997). Dans la cellule gonadotrope, la CaMKI phosphoryle les histones désacétylases de classe 2 qui vont s'exporter dans le noyau pour lever la répression exercée sur l'expression de *Lh $\beta$*  (Melamed, 2008; Melamed et al., 2012).

Parmi les très nombreuses cibles de la CaMKII, nous trouvons la synapsine-Ia. Cette dernière est une protéine cytoplasmique associée aux vésicules de sécrétion ayant un rôle important dans le trafic vésiculaire. La synapsine-Ia, *via* son interaction avec les monomères et les filaments d'actine, permet de stocker ou de libérer les vésicules d'exocytose (Benfenati et al., 1992; Greengard et al., 1993; Hilfiker et al., 1999). En effet, la phosphorylation de la synapsine-Ia par de nombreuses kinases (CaMKII, MAPK et PKA) (Hosaka et al., 1999;



Jovanovic et al., 2000, 2001; Yamagata, 2003) conduit à sa dissociation des vésicules de sécrétion qui peuvent alors fusionner avec les membranes. La synapsine-Ia phosphorylée devient également disponible pour réguler l'efficacité de la sécrétion à travers son interaction avec des protéines de signalisation telles que Src (Onofri et al., 2007) ou Rab3 (Giovedi et al., 2004). De façon intéressante, la synapsine-Ia est décrite pour être un des effecteurs importants mis en jeu dans les processus de mémorisation induits par le stress ou par une forte exposition aux GC (Revest et al., 2010, 2014).

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est enfin un élément clé pour la sécrétion et un composant majeur de la signalisation de la GnRH (Haisenleder et al., 2003b). Dans notre étude, l'utilisation d'un inhibiteur des canaux calciques (la nifédipine) nous a permis de montrer que la signalisation rapide induite par les GC régule l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  *via* des canaux calciques de type L dans les cellules L $\beta$ T2. Il a été rapporté que les GC régulent l'expression et/ou l'activité des canaux calciques de type L (Chameau et al., 2007; Gemert et al., 2009; Qiu et al., 1998, 2003), ainsi que l'expression des canaux calciques de type TRPC (Transient Receptor Potential Channel) dans des neurones d'hippocampe, des cellules de phéochromocytomes surrénaliens (PC12) ou des cellules  $\beta$  pancréatiques (Wie et al., 2015). Nos résultats sont à rapprocher d'autres études qui définissent le  $\text{Ca}^{2+}$  comme un médiateur important du stress ; le stress entraîne une augmentation de l'expression de nombreux types de canaux calciques tels que les récepteurs de type L, P/Q ou N qui sont responsables d'une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire observée dans différentes régions du cerveau, notamment dans l'hippocampe et l'amygdale (Bali et al., 2013).

## **B- Un GR membranaire palmitoylé à l'origine d'une signalisation rapide**

L'utilisation d'approches biochimiques (traitement au 2-Br et test de palmitoylation) nous a permis de démontrer l'existence d'un GR membranaire palmitoylé dans les cellules L $\beta$ T2. Ce GR membranaire est associé à une signalisation rapide induite par la Cort ou la Cort-BSA dans ces cellules. D'une façon intéressante, des études ont montré une corrélation entre la phosphorylation et la palmitoylation de protéines dans la régulation de l'adressage membranaire (Gauthier-Kemper et al., 2014). Par exemple, la phosphorylation de la protéine Growth Associated Protein 43 (GAP-43) sur la sérine 41 favorise sa palmitoylation et son adressage au cône de croissance de cellules de type neuronale PC-12 (Gauthier-Kemper et al.,



	443				447					453		456		
hER $\alpha$	E	E	F	V	<b>C</b>	L	K	S	I	I	L	L	N	S
	661				665				669			674		
hGR $\alpha$	E	E	Y	L	<b>C</b>	M	K	T	L	L	L	L	S	S
	661				665				669			692		
hGR $\beta$	E	E	Y	L	<b>C</b>	M	K	T	L	L	L	L	S	S
	667				671				675			680		
mGR $\alpha$	E	E	Y	L	<b>C</b>	M	K	T	L	L	L	L	S	S

### Figure 31 : La cystéine palmitoylée de ER $\alpha$ est un résidu conservé au sein du LBD du GR

Alignement d'une partie du LBD du ER $\alpha$  humain (hER $\alpha$ ) contenant le site de palmitoylation (C447), avec celle du GR humain (hGR) et murin (mGR). La cystéine conservée est en rouge.

Adapté de Marino and Ascenzi, 2006.

2014). En revanche, la phosphorylation de la protéine AKAP-79 (A-kinase anchoring protein 79) par la CaMKII réduit sa palmitoylation, en agissant soit sur l'activité des PAT ou celle des PTE, soit en perturbant les liaisons électrostatiques avec les membranes (Woolfrey and Dell'Acqua, 2015). Le GR est également la cible de l'action de nombreuses kinases (Gallagher-Beckley and Cidlowski, 2009) et nous avons démontré que ce récepteur est aussi la cible des PAT. En perspectives de ce travail, il serait intéressant d'évaluer le dialogue entre la phosphorylation et la palmitoylation du GR et le rôle potentiel de la CaMKII induite par les GC dans une boucle d'auto-régulation. Un co-traitement des GC avec un inhibiteur spécifique de la CaMKII (KN-93) pourrait permettre de suivre l'effet de l'inhibition de cette enzyme sur le niveau d'expression membranaire de GR mesuré après fractionnement subcellulaire de cellules L $\beta$ T2.

La recherche du site de palmitoylation du GR semble complexe. Dans notre étude, nous avons exclu la Cystéine 671 comme site majeur de palmitoylation du GR. Ce site correspond au site homologue (**Figure 31**) palmitoylé décrit pour ER $\alpha$  (la Cystéine 447 du hER $\alpha$  (Marino and Ascenzi, 2006)). Nous avons ensuite voulu rechercher le site de palmitoylation du GR en analysant la totalité de sa séquence nucléotidique qui comprend 20 cystéines (**Figure 32-A**). En dehors des 8 cystéines des deux doigts de zinc (Cys431, Cys428, Cys445, Cys448 pour le premier et Cys464, Cys470, Cys480, Cys483 pour le deuxième) nécessaires à la liaison à l'ADN, il existe 12 cystéines susceptibles d'être palmitoylées. Pour déterminer le site de palmitoylation du GR, nous avons dans un premier temps utilisé une approche de purification d'affinité couplée à la spectrométrie de masse en tandem (APMS) sur des extraits totaux de cellules L $\beta$ T2 (F. Guillonéau, Plate-forme 3P5 protéomique de l'Université Paris-Descartes), technique déjà utilisée avec succès pour identifier les sites de palmitoylation de la protéine superoxyde dismutase 1 (SOD1) (Antinone et al., 2013). Cette technique d'identification est basée sur le test de palmitoylation décrit précédemment mais avec marquage des cystéines préalablement palmitoylées avec un composé maléimide (le N-Methyl Maleimide ou NMM) non biotinylé. Malheureusement, les peptides générés et analysés n'ont permis de couvrir qu'une partie restreinte de la séquence primaire du GR (couverture à 40-60%, soit 6 cystéines). Les cystéines détectées (Cys157, Cys295, Cys310, Cys375, Cys488 et Cys742) sur ces peptides ne se sont pas révélées palmitoylées (absence de détection de NMM). Nous avons donc exclu ces cystéines pour être le site de palmitoylation du GR. Nous avons alors entrepris de muter (Cystéine en Alanine) individuellement ou conjointement les 5 autres Cystéines

**A**

```

MDSKESLAPPGRDEVPSLLGRGRGSVMDLYKTLRGGATVKVSAASSPSVAAASQADSK 58
QQRILLDLDFSKGSASNAQQQQQQQQPDLKAVLSMGLYMGETETKVMGNLDLGYPQQ 116
GQLGLSSGETDFRLLLEESIANLNRSTSRPENPKSSTPAAGCATPTEKEFPQTHSDPSS 174
EQQNRKSPGTNGGSKVLYTTDQSTFDILQDLEFSAGSPGKETNESPWRSDLLIDENL 232
LSPFLAGEDDFLLEGGVNEDEKPLILPDTKPKIQDTGDTILSSPSSVALPQVKTEKDD 253 290
FIELCTPGVIKQEKLGVPVYCAQSFSGTNIIGNKMSAISVHGVTSGGQMYHYDMNTAS 348
LSQQQDQKPVFNVIPPIVPGSENWNRCCQSGEDNLTSLGAMNFAGRSVFSNGYSSPGM 406
RPDVSSPPSSSSTA TGP PPKLCLVCSDEASVCHYGVLTCSGCKVFFKRAVEGQHNYLC DBD | 464
AGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRKCLQAGMNL EARKTKKKIKGIQQATAGVSDTSENA 522
NKTIVFAALPQLTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSVPDSAWRIMTTLNMLGGRQVIAA 580
VKWAKAIPGFRNLHDDQMTLLQYSWMLMAFALGWRYSYRQASGNLLCFAPDLIINEQ LBD 638
RMTLP C MYDQCKHMLFI STELQRLQVSYEEYLC MKTLLLLSSVPKEGLKSQELFDEIR 644 649 671 696
MTYIKELGKAIVKREGNSSQNWRQFYQLTKLLDSMHDVVENLLSYCFQTFLDKMSMSE 754
FPEMLAEIITNQIFKYSNGNIKKLLFHQK 783

```

**B**

Constructions de GR	Présence du GR dans la fraction membranaire	GR palmitoylé révélé par la streptavidine
	WB : T N Cyto Mb kDa GR [bandes] -100	WB : HAM - + kDa Strept - + -100 GR [bandes] -100
GR WT	+	+
GR 253	+	+
GR 438	+	+
GR 644	+	+
GR 649	+	+
GR 671	+	+
GR 445-448	+	+
GR 644-649	+	+

**Figure 32 : Evaluation de la localisation membranaire et du niveau de palmitoylation des différents mutants du récepteur des glucocorticoïdes**

- (A) Séquence nucléotidique du GR $\alpha$  murin. Le GR $\alpha$  comporte 20 cystéines, marquées en **jaune**. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est encadré en rouge. Le domaine de liaison au ligand (LBD) est encadré en vert.
- (B) Tableau représentant les résultats du fractionnement subcellulaire et du test de palmitoylation des constructions de GR mutés sur diverses cystéines, comparés au GR sauvage (WT).

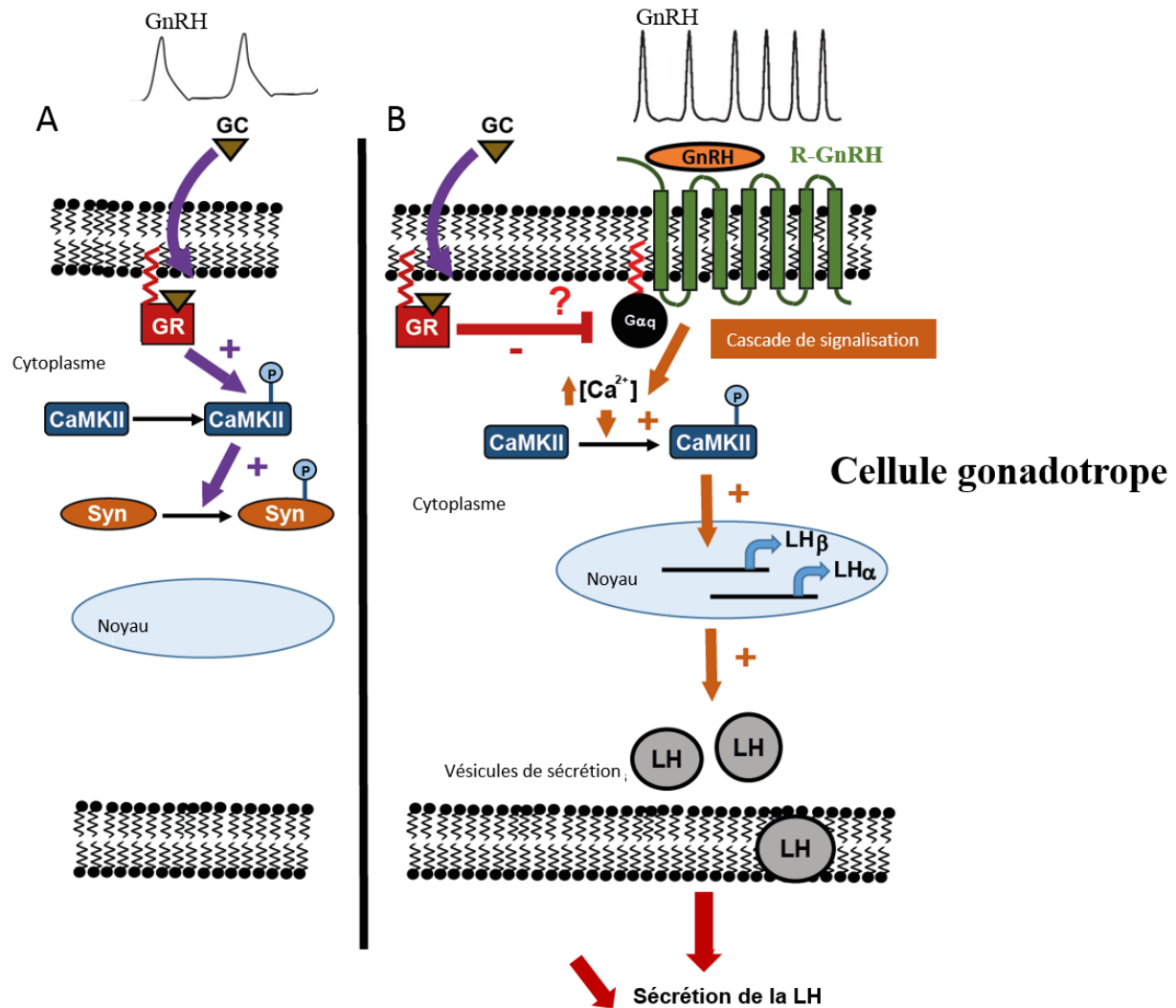
N : Fraction nucléaire/débris ; Cyto : Fraction cytosolique ; Mb : Fraction membranaire ; WB : Western-Blot ; HAM : Hydroxylamine ; Strept : Streptavidine ; GR : récepteur des glucocorticoïdes.

(Cys253, Cys438, Cys644, Cys649 et Cys671) sur une construction de GR étiquetée Flag. La transfection de ces constructions dans les cellules HEK293T nous a permis d'évaluer leur localisation membranaire (par fractionnement subcellulaire) et leurs niveaux de palmitoylation (par le test de palmitoylation). Malheureusement, tous les mutants étudiés conservent une localisation membranaire et un niveau de palmitoylation identiques à ceux du récepteur sauvage (**Figure 32-B**). Ces résultats suggèrent donc l'existence de plusieurs sites de palmitoylation du GR comme pour les protéines PSD-95 ou GAP-43 qui possèdent 2 sites de palmitoylation (Huang and El-Husseini, 2005) ou encore la protéine Cystein-String Protein (CSP) avec ses 14 sites de palmitoylation (Greaves and chamberlain, MBC, 2006). De nouvelles études sont donc indispensables pour identifier les sites de palmitoylation du GR, notamment par AP-MS (Affinity-purification mass spectrometry) mais cette fois-ci réalisée à partir de fractions membranaires de cellules L $\beta$ T2, enrichies en GR palmitoylés, en présence de plusieurs contrôle positifs comme les formes humaines de ER $\alpha$  ou SOD1 dont le site de palmitoylation est connu, la Cys447 ou la Cys6 respectivement (Acconcia et al., 2004; Antinone et al., 2013).

L'identification des sites de palmitoylation est essentielle car elle permettrait d'envisager l'établissement de souris « knock-in » pour ces sites. Ce modèle de souris invalidées pour la signalisation non génomique du GR faciliterait l'analyse des contributions respectives des effets génomiques et non génomiques des GC, sur le stress mais aussi sur les autres effets des GC. Ce type d'approche a déjà permis de grandes avancées dans la compréhension des modes d'action tissu-spécifiques de ER $\alpha$  (Adlanmerini et al., 2014; Arnal et al., 2017).

### **C- Les GC inhibent les actions de la GnRH sur la CaMKII et sur la sécrétion de la LH**

Nos résultats ont révélé que les GC altèrent significativement l'activation de la CaMKII induite dès 5 minutes par la GnRH dans les cellules L $\beta$ T2, démontrant une interaction potentielle entre la signalisation GnRH et celle des GC. Cet effet négatif des GC sur la signalisation GnRH s'est aussi illustré sur la sécrétion de la LH d'explants hypophysaires où nous montrons que les GC inhibent de façon significative la sécrétion de LH après 1 heure de traitement par la GnRH.



**Figure 33 : Représentation schématique des modes d'action des GC, en présence ou en absence de GnRH dans les cellules gonadotropes**

- (A) Dans les cellules gonadotropes, les GC se lient à un GR membranaire palmitoylé ( $\xi$ ) pour induire rapidement et spécifiquement les phosphorylations successives de la Calcium/Calmoduline-kinase dépendante II (CaMKII) et de la synapsine-la (Syn).
- (B) La GnRH se lie à son récepteur R-GnRH, membre de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Après liaison au récepteur, le R-GnRH active la protéine  $G\alpha_q$  qui stimule diverses protéines de signalisation permettant notamment une augmentation du calcium intracellulaire. Le calcium et la calmoduline se lient à la CaMKII pour favoriser son auto-phosphorylation et son activation. La CaMKII stimule la transcription des sous-unités des gonadotropines (par exemple les sous-unités  $\alpha$  commune et la sous-unité  $\beta$  de LH) et participe à leurs sécrétions. La GC prévient la phosphorylation rapide de la CaMKII dépendante de la GnRH, conduisant à l'inhibition de la libération de la LH.

GnRH : Gonadotrophin-releasing hormone; R-GnRH : récepteur de la GnRH; GC : glucocorticoïdes; GR : récepteur des glucocorticoïdes; CaMKII : Calcium/Calmodulin-dependent kinase II, Syn : Synapsin-la;  $G\alpha_q$  : protéine G alpha q; LH : Hormone Lutéinisante; P : phosphorylation.

D'une façon intéressante, la signalisation rapide induite par les GC semble être modifiée en fonction du contexte cellulaire, conférant aux GC une action paradoxale dans la cellule gonadotrope (**Figure 33**). Nous avons démontré dans les cellules L $\beta$ T2 que la voie de signalisation des GC comprend l'activation d'un GR membranaire palmitoylé suivie de la phosphorylation de la CaMKII puis de la synapsine-Ia. Cependant, en présence de la GnRH, les GC réduisent la phosphorylation de la CaMKII, qui pourrait potentiellement altérer la sécrétion de la LH (**Figure 33**). Nous pouvons faire l'hypothèse qu'en période d'anestrus, période d'infertilité ou bien pendant la période où la fréquence des pics de GnRH est faible, les GC stimulent la phosphorylation de la CaMKII, la synapsine-Ia et probablement la sécrétion de LH. En revanche, pendant la période fertile où la fréquence des pulses de GnRH est plus importante, les GC exerceraient un effet négatif sur la sécrétion de LH, en inhibant la phosphorylation de la CaMKII induite par la GnRH, et ainsi la sécrétion de la LH. En perspectives de ce travail, il paraît nécessaire d'évaluer l'effet des GC sur la sécrétion de LH en utilisant des protocoles de périfusion, où la GnRH serait délivrée de façon pulsatile (haute fréquence, toutes les 30 minutes ; basse fréquence : toutes les 120 minutes) sur des explants hypophysaires (Thompson et al., 2016).

Il serait par ailleurs essentiel de mieux comprendre comment les GC inhibent la voie de signalisation induite par la GnRH. Ces régulations pourraient s'effectuer à différents niveaux. Tout d'abord, les GC pourraient augmenter l'activité des PP, comme déjà montrée dans les lymphocytes T (Paliogianni et al., 1995). Les GC pourraient également agir sur différents éléments essentiels à la sécrétion des gonadotropines comme la synapsine-Ia ou les filaments d'actine. Pour être active, la synapsine-Ia doit être fucosylée (addition d'un fucose) et sa défucosylation entraîne sa dégradation par la calpaïne (Murrey et al., 2006). L'évaluation du niveau de fucosylation (western-blot utilisant un anticorps spécifique anti-Fuca (1-2) GAL, A46-B/B10) de la synapsine-Ia dans les cellules L $\beta$ T2 après co-traitement de la GnRH avec les GC serait vraisemblablement pertinente dans ce contexte. Les GC possèdent la propriété de stabiliser le cytosquelette d'actine et d'empêcher la sécrétion des vésicules d'exocytose (Castellino et al., 1995). Cette effet a permis d'expliquer comment les GC inhibent la libération de l'ACTH dans un modèle de cellules corticotropes (AtT-20) (Castellino et al., 1992). Il serait donc important d'examiner les modifications de structure du cytosquelette d'actine après un co-traitement GnRH/GC dans les cellules L $\beta$ T2, notamment par des techniques de microscopie à fluorescence.



D'autres exemples d'effets paradoxaux des GC sont décrits ; les GC peuvent avoir des effets opposés en fonction du type tissulaire et cellulaire (Frank et al., 2010; Johnson et al., 2003). Pour exemple au niveau du cerveau, le cortex préfrontal et l'hippocampe se sont révélés plus sensibles aux effets neurotoxiques des GC que l'hypothalamus (Munhoz et al., 2006; Popoli et al., 2012). Ces différences pourraient être attribuées aux types et aux niveaux d'expression de co-régulateurs présents dans chaque type cellulaire et donc conduire à des signalisations variées. Le type de GC synthétique utilisé, la durée d'exposition, la dose et la voie d'administration sont également des facteurs qui pourraient moduler les effets des GC (Bellavance and Rivest, 2014; Sorrells et al., 2009).









## **DISCUSSION GENERALE**



De nombreux facteurs de stress peuvent déclencher une réponse aigue en activant l'axe corticotrope, qui stimule de façon excessive la sécrétion de GC d'origine surrénalienne. La réponse au stress aigue est essentielle à la survie et entraîne la mobilisation des réserves d'énergie (McNay et al., 2000). Cependant, une exposition répétée ou chronique à des facteurs de stress peut aussi induire des pathologies graves. Le stress chronique chez les rongeurs est associé à l'altération de l'apprentissage, de la mémoire et de la reproduction, à l'augmentation de l'anxiété et à l'apparition des comportements dépressifs (Conrad et al., 1996; Gray et al., 2017; Watanabe et al., 1992). Chez l'homme, le stress chronique est un facteur de risque majeur pour accélérer l'apparition de troubles de l'axe gonadotrope et de santé mentale (Whirledge and Cidlowski, 2013b, 2017a; Zorn et al., 2017).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle du stress chronique, étudié par l'administration de fortes doses de GC, à 2 niveaux différents de l'axe gonadotrope, l'hypothalamus et l'hypophyse. Bien que nos études aient considéré chaque structure indépendamment, nous devons replacer nos résultats dans le contexte d'un organisme entier où ces structures sont interconnectées. Cette interconnexion a particulièrement été explorée chez la brebis où la déconnection chirurgicale entre l'hypothalamus et l'hypophyse empêche les GC d'inhiber la réceptivité des cellules gonadotopes à la GnRH (Stackpole et al., 2006).

Un autre point important à noter est que l'administration de GC exogènes ne récapitule pas la totalité de l'expérience du stress *in vivo*, en particulier en ce qui concerne les changements d'expression des gènes. Le stress induit la libération de nombreuses hormones et neurotransmetteurs, pas seulement les GC, et uniquement certains des effets du stress chronique peuvent être mimés par la seule administration de fortes doses de GC. Plusieurs études *in vivo* réalisées sur l'hippocampe de rongeurs ont comparé les changements d'expression des gènes en fonction de la durée et de la fréquence des périodes de stress chronique (contention/nage forcée) ou de l'administration de GC. Chez la souris, les résultats de transcriptome montrent que le profil d'expression des gènes de l'hippocampe diffère entre la première et la deuxième exposition au stress ; la voie TNF- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B est activée après une première période de stress, alors qu'elle est inhibée après la seconde (Gray et al., 2014). Par ailleurs, le nombre de gènes induits après une injection de GC (3 mg/kg) est significativement moins important que lors d'un stress de contrainte (6 heures pendant 21 jours) chez le rat (267 gènes pour l'injection de GC comparés à 318 gènes régulés lors d'un stress de contrainte, avec 258 gènes en commun) (Datson et al., 2013). L'injection de GC stimule en particulier



l'expression des gènes de la signalisation de mTOR (mammalian target of rapamycin) (Datson et al., 2013). Néanmoins, les rats qui ont connu un stress de contrainte avant cette injection montrent au contraire une inhibition de cette voie de signalisation, démontrant l'importance probable de l'épigénétique ainsi que le rôle d'autres hormones sécrétées (noradrénaline, dopamine ou sérotonine) durant le stress (Datson et al., 2013).

Les mâles comme les femelles réagissent tous deux face au stress, mais le mécanisme adaptatif et les circuits neuronaux sous-jacents peuvent différer entre les sexes (Derntl et al., 2010). Un dimorphisme sexuel face au stress est maintenant établi et en lien avec les stéroïdes sexuels (testostérone, E2 et progestérone) (Iwasaki-Sekino et al., 2009; Rubinow et al., 2005). La plus forte sensibilité au stress des individus durant la période pubertaire est un argument en faveur de l'importance des hormones sexuelles dans la réponse au stress (Romeo, 2010), comme l'indique aussi le risque accru de dépression pendant l'adolescence (Angold and Costello, 2006). Contrairement à l'E2 et à la progestérone, la testostérone exerce un effet inhibiteur sur l'axe corticotrope (Goel and Bale, 2010). Les hormones sexuelles régulent également l'expression, le transfert nucléaire et l'activité transcriptionnelle du GR dans le cerveau et dans certains cancers hormono-dépendants (Bourke et al., 2012; Hubler and Scammell, 2004; Jääskeläinen et al., 2011; Olazábal et al., 1992; Zhang et al., 2009b). Les hormones gonadiques influenceraient la réponse au stress par des effets directs et indirects sur GR et les voies de signalisation des GC. Ainsi, la plus forte vulnérabilité des femmes face au stress pour être expliquée par le rôle important de l'E2 dans la réceptivité au stress. Les femmes sont plus sensibles à l'anxiété, la dépression ou aux troubles du sommeil induit par le stress, tandis que les hommes sont plus sujets à développer des troubles de comportement et des dysfonctionnements métaboliques (diabète, dyslipidémie, hypertension artérielle, hyperglycémie, hyperinsulinisme) (Bourke et al., 2012). D'une façon générale, les rats femelles présentent un dérèglement plus profond de l'axe corticotrope que les mâles ; le stress chronique induit un hypercorticisme plus sévère chez les rats femelles que chez les mâles (Iwasaki-Sekino et al., 2009). Un stress de choc pendant 90 minutes chez le rat provoque une augmentation significative de l'expression du CRH dans le PVN de l'hypothalamus 1,3 fois plus intense chez la femelle (en période de proestrus) que chez le mâle (Iwasaki-Sekino et al., 2009). A noter que les rats femelles ont un niveau basal physiologiquement plus élevé en GC que les mâles (Dalla et al., 2005).





Dans notre étude, nous avons exploré les voies génomique et non génomique des GC sur la fonction de reproduction, selon 2 mécanismes régulateurs distincts. Néanmoins, il existe d'autres mécanismes, notamment épigénétiques, qui pourraient rendre compte de l'influence des GC sur les fonctions de reproduction. L'épigénétique correspond à une régulation continue et réversible de l'expression des gènes *via* un ensemble de processus moléculaires incluant des modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation des bases cytosine de l'ADN ou le remodelage de l'ADN (McEwen et al., 2015; Mehler, 2008). Les modifications épigénétiques sont induites par l'environnement et sont une marque à long terme (Suri et al., 2014). De nombreuses études suggèrent que ces éléments auraient un rôle régulateur dans la réponse au stress (Hunter et al., 2015). Un stress dans la période périnatale influence la réponse au stress à l'âge adulte par son effet sur la méthylation de l'ADN (Lee et al., 2011). Le couple GC/GR est décrit pour induire, *via* le recrutement d'autres facteurs de transcription comme HNF-3, une dé-méthylation locale de l'ADN et ainsi entraîner une augmentation de la réponse transcriptionnelle aux GC dans les cellules d'hépatome de rat (Thomassin et al., 2001).

Au-delà de la reproduction, d'un point de vue clinique, les GC sont largement utilisés comme anti-inflammatoires et immunosuppresseurs chez l'homme (Coutinho and Chapman, 2011). Cependant, leur utilisation clinique est limitée par les nombreux effets secondaires, imprévisibles et potentiellement graves, en particulier lors d'une posologie élevée et d'une utilisation prolongée de GC ; les mécanismes génomiques, en particulier la transactivation du GR sont responsables de nombreux effets secondaires indésirables (Cooper et al., 2016; Stahn and Buttgereit, 2008). Pour cette raison, de nombreux efforts ont été réalisés pour améliorer les molécules synthétiques de GC avec moins d'effets secondaires. Comme mentionné dans l'introduction, le GR membranaire est exprimé dans de nombreux types cellulaires et pourrait donc être la cible potentielle d'un traitement par les GC (Löwenberg et al., 2008). L'activation spécifique des voies non génomiques plus rapides pourrait limiter les effets indésirables associés à une exposition prolongée aux GC (Buttgereit et al., 1998; De Bosscher et al., 2010; Gong et al., 2017; Jiang et al., 2015; Lipworth, 2000; Song and Buttgereit, 2006). En effet, en ce qui concerne les effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des GC, il a été montré dans les macrophages que ces stéroïdes induisent à la fois des effets génomiques et des effets non génomiques rapides (Murata et al., 2013). Parmi les nombreux rôles des macrophages, la phagocytose d'agents pathogènes est un de ses rôles majeurs. La phagocytose s'accompagne



de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que l'anion superoxyde (Grasso et al., 1981). Les GC inhibent la phagocytose par les macrophages après un traitement long (de quelques heures à quelques jours) (Grasso et al., 1981). De façon intéressante, les GC ou les GC couplés à la BSA diminuent dans le 30 premières minutes la production d'anions superoxydes par les macrophages de souris, suggérant que les GC pourraient inhiber rapidement la phagocytose par des mécanismes rapides non génomiques (Long et al., 2005). Les GC sont les agents anti-inflammatoires les plus puissants disponibles notamment pour les maladies allergiques (rhinite allergique ou asthme) dont l'action peut prendre plusieurs heures (intervention d'effets génomiques). Des études réalisées chez 18 hommes ont montré que l'administration par voie nasale (aérosol) de GC de synthèse (bétaméthasone (60 mg), méthylprednisolone (400 mg)) réduit rapidement (< 10 minutes) et significativement (réduction de 38% à 18% respectivement) les premières sensations d'allergie (démangeaisons et troubles de la respiration nasale), soulignant ainsi l'importance des voies non génomiques dans ces processus (Tillmann et al., 2004). De même, l'inhalation de budésonide (3 mg/ml) chez le cochon d'inde inhibe rapidement (< 10 minutes) la gêne respiratoire (mesure de la compliance et de la résistance pulmonaire) induite par un allergène (ovalbumine) (Zhou et al., 2003). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes non génomiques des GC pourrait ouvrir sur de nouvelles stratégies thérapeutiques dans diverses pathologies (Haller et al., 2008).







## **CONCLUSION GENERALE**

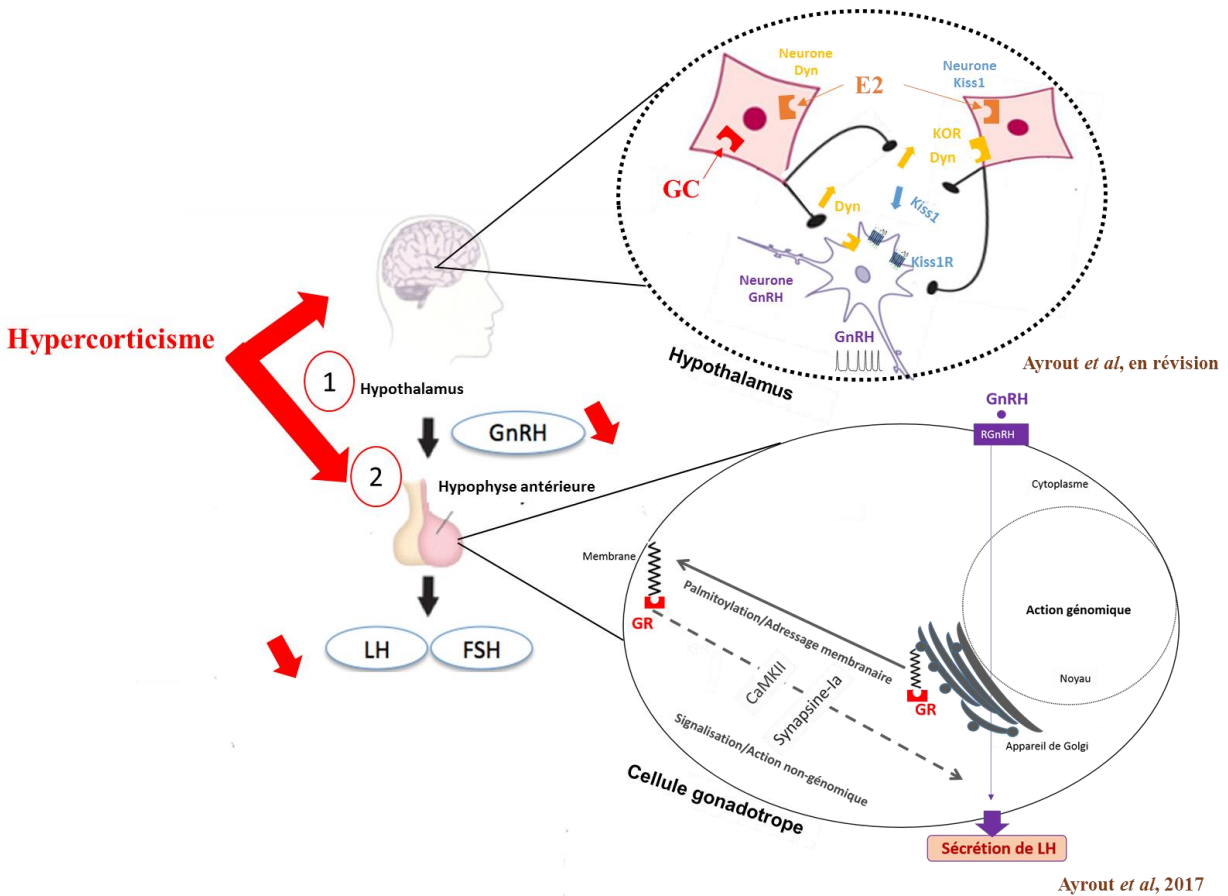




Les GC sont essentiels au développement de l'organisme et présentent un très grand intérêt pharmacologique, dans la mesure où ils sont prescrits dans de très nombreuses indications thérapeutiques. Ainsi, l'administration de GC aux femmes avec un risque d'accouchement prématuré a permis de réduire considérablement la mortalité infantile en accélérant la maturation pulmonaire des nouveau-nés. Néanmoins, l'excès de GC à long terme a des effets néfastes clairs. En dehors des conséquences métaboliques et cognitives, l'hypercorticisme perturbe également les fonctions de reproduction. Les axes gonadotrope et corticotrope partagent une architecture commune avec des composants centraux (hypothalamus et hypophyse) et périphériques (respectivement, les gonades et surrénales). Le stress, à travers l'hypersécrétion de GC, inhibe l'axe gonadotrope à tous ses niveaux. Néanmoins, la compréhension du mode d'action des GC au niveau central et périphérique reste encore partielle.

Dans la première partie de mon travail de thèse, l'utilisation combinée d'une lignée cellulaire hypothalamique différenciée, les cellules GT1-7, et l'étude de l'expression génique sur des régions hypothalamiques de cerveau de souris, nous ont permis de démontrer qu'en présence d'une imprégnation œstrogénique forte, les GC augmentent l'expression du précurseur de la Dyn A par activation de la transcription du gène correspondant *via* l'activation du GR, mais aussi celui de la Kiss1, sans modifier celle du RFRP-3. L'ensemble de nos données suggèrent que l'hypercorticisme aurait un impact à la fin de la phase folliculaire (fenêtre critique du cycle œstrien). Ainsi, les GC augmentent l'expression de la Dyn A qui pourrait agir directement ou indirectement (*via* Kiss1) sur la sécrétion de la GnRH et *in fine* empêcher l'ovulation.

Dans la deuxième partie de ma thèse, en utilisant une lignée hypophysaire sécrétante, les cellules LβT2, et des explants hypophysaires de souris, nous avons démontré que les GC induisent une signalisation rapide non génomique originale dans les cellules gonadotropes, et que le GR est adressé à la membrane plasmique grâce à une nouvelle modification post-traductionnelle jamais décrite pour ce récepteur, la palmitoylation. Néanmoins, en présence de GnRH, les GC bloquent la signalisation induite par ce décapeptide, en empêchant l'activation de la CaMKII, pouvant être à l'origine de l'inhibition de la sécrétion de la LH rapidement observée.



**Figure 34 : Les glucocorticoïdes agissent au niveau hypothalamique et hypophysaire pour freiner l'ovulation**

Notre étude a montré que l'hypercorticisme potentiellement rencontré chez des femmes stressées ou des patientes atteintes du syndrome de Cushing, entraîne des troubles de la fertilité. Les glucocorticoïdes (GC) agissent à deux niveaux :

- 1) Au niveau hypothalamique : pendant une période riche en œstrogène (E2), les GC augmentent l'expression du précurseur de la Dyn A (*Pdyn*) qui peut alors agir directement ou indirectement (*via* Kiss1) sur la sécrétion de la GnRH.
- 2) Au niveau hypophysaire : les GC interfèrent avec la signalisation GnRH par une voie rapide non génomique, initiée par un GR membranaire palmitoylé, pour diminuer la sécrétion de LH des cellules gonadotropes.

GC : Glucocorticoïdes ; GR : Récepteur des GC ; GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone ; RGnRH : Récepteur de la GnRH ; LH: Luteinizing Hormone ; FSH: Follicle Stimulating Hormone ; E2 : œstradiol ; CaMKII : Calcium/Calmodulin-dependent kinase II ; Kiss1 : Kisspeptine 1 ; Dyn A : Dynorphine A ;

📌 : Palmitate ; 🧬 : Récepteur de Kiss1 ; 🟡 : Récepteur de la Dyn A (κ-opioid receptor ; KOR) ;

🔴 : Récepteur des GC (GR) ; 🟠 : Récepteur de l'E2 (ER)

En conclusion, au cours de mon travail de thèse, j'ai contribué de façon significative à une meilleure compréhension de l'implication de la signalisation des GC sur les fonctions reproductives. J'ai ainsi montré que **les GC agissent à deux niveaux de l'axe gonadotrope pour inhiber l'ovulation : 1/ sur l'hypothalamus pour stimuler, pendant la période de forte imprégnation oestrogénique, l'expression d'un neuropeptide inhibiteur de la GnRH, la Dyn A, et 2/ sur l'hypophyse pour rapidement altérer la signalisation de la GnRH et ainsi réduire la sécrétion de LH (Figure 34).**

Il est toutefois indispensable de poursuivre et d'approfondir nos connaissances dans ce domaine pour mieux répondre aux problèmes d'infertilité auxquels un nombre grandissant de couples font face. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'altération de la fertilité, en particulier chez la femme, est essentielle pour envisager l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes.







## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## A

- A. Adler, B., and R. Crowley, W. (1986). Evidence for  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Modulation of Ovarian Hormonal Effects on Luteinizing Hormone Secretion and Hypothalamic Catecholamine Activity in the Female Rat. *Endocrinology* *118*, 91–97.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P., and Marino, M. (2004). S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- $\alpha$  functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 878–883.
- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., et al. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J. Reprod. Dev.* *53*, 367–378.
- Adlanmerini, M., Solinhac, R., Abot, A., Fabre, A., Raymond-Letron, I., Guihot, A.-L., Boudou, F., Sautier, L., Vessières, E., Kim, S.H., et al. (2014). Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor  $\alpha$  in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E283.
- Aguilera, G., and Liu, Y. (2012). The molecular physiology of CRH neurons. *Front. Neuroendocrinol.* *33*, 67–84.
- Akhter, S., Marcus, M., Kerber, R.A., Kong, M., and Taylor, K.C. (2016). The impact of periconceptual maternal stress on fecundability. *Ann. Epidemiol.* *26*, 710–716.e7.
- van den Akker, E.L.T., Koper, J.W., van Rossum, E.F.C., Dekker, M.J.H., Russcher, H., de Jong, F.H., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., Pols, H.A., Witteman, J.C.M., et al. (2008). Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch. Intern. Med.* *168*, 33–39.
- Allsworth, J.E., Clarke, J., Peipert, J.F., Hebert, M.R., Cooper, A., and Boardman, L.A. (2007). The Influence of Stress on the Menstrual Cycle among Newly Incarcerated Women. *Womens Health Issues* *17*, 202–209.
- Almeida, T.A., Rojo, J., Nieto, P.M., Pinto, F.M., Hernandez, M., Martín, J.D., and Candenas, M.L. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2045–2081.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., and Guillemin, R. (1971). Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *44*, 205–210.
- Ancel, C., Bentsen, A.H., Sébert, M.-E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2012). Stimulatory Effect of RFRP-3 on the Gonadotrophic Axis in the Male Syrian Hamster: The Exception Proves the Rule. *Endocrinology* *153*, 1352–1363.
- Ancel, C., Inglis, M.A., and Anderson, G.M. (2017). Central RFRP-3 Stimulates LH Secretion in Male Mice and Has Cycle Stage–Dependent Inhibitory Effects in Females. *Endocrinology* *158*, 2873–2883.

- Andersen, O., and Klungland, H. (1993). The salmon GnRH encoding gene in teleost fish. *Int. Rev. Cytol.* *147*, 165–191.
- Ando, H., Shahjahan, M., and Kitahashi, T. (2018). Periodic regulation of expression of genes for kisspeptin, gonadotropin-inhibitory hormone and their receptors in the grass puffer: Implications in seasonal, daily and lunar rhythms of reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Andreyko, J.L., Marshall, L.A., Dumesic, D.A., and Jaffe, R.B. (1987). Therapeutic uses of gonadotropin-releasing hormone analogs. *Obstet. Gynecol. Surv.* *42*, 1–21.
- Angold, A., and Costello, E.J. (2006). Puberty and depression. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* *15*, 919–937, ix.
- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A.H., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2010). Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J. Biol. Rhythms* *25*, 81–91.
- Antinone, S.E., Ghadge, G.D., Lam, T.T., Wang, L., Roos, R.P., and Green, W.N. (2013). Palmitoylation of superoxide dismutase 1 (SOD1) is increased for familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *J. Biol. Chem.* *288*, 21606–21617.
- Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M., and Strauss, J.F. (1997). Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.* *272*, 32656–32662.
- Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., et al. (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* *97*, 1045–1087.
- Asser, L., Hescot, S., Viengchareun, S., Delemer, B., Trabado, S., and Lombès, M. (2014). Autocrine positive regulatory feedback of glucocorticoid secretion: Glucocorticoid receptor directly impacts H295R human adrenocortical cell function. *Mol. Cell. Endocrinol.* *395*, 1–9.
- Avenant, C., Ronacher, K., Stubrud, E., Louw, A., and Hapgood, J.P. (2010). Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* *327*, 72–88.
- Avet, C., Garrel, G., Denoyelle, C., Laverrière, J.-N., Counis, R., Cohen-Tannoudji, J., and Simon, V. (2013). SET protein interacts with intracellular domains of the gonadotropin-releasing hormone receptor and differentially regulates receptor signaling to cAMP and calcium in gonadotrope cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 2641–2654.
- Ayachi, S., and Simonin, F. (2014). Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Front. Endocrinol.* *5*.
- Ayada, C., Toru, Ü., and Korkut, Y. (2015). The relationship of stress and blood pressure effectors. *Hippokratia* *19*, 99–108.

Ayroldi, E., Cannarile, L., Migliorati, G., Nocentini, G., Delfino, D.V., and Riccardi, C. (2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 4805–4820.

## B

Baenziger, J.U., and Green, E.D. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 287–306.

Baenziger, J.U., Kumar, S., Brodbeck, R.M., Smith, P.L., and Beranek, M.C. (1992). Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 334–338.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553–563.

Baid, S., and Nieman, L.K. (2004). Glucocorticoid excess and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 6, 493–499.

Baker, M.E. (2002). Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *J. Endocrinol.* 175, 121–127.

Baldock, P.A., Allison, S.J., Lundberg, P., Lee, N.J., Slack, K., Lin, E.-J.D., Enriquez, R.F., McDonald, M.M., Zhang, L., Daring, M.J., et al. (2007). Novel Role of Y1 Receptors in the Coordinated Regulation of Bone and Energy Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 282, 19092–19102.

Bali, A., Gupta, S., Singh, N., and Jaggi, A.S. (2013). Implicating the role of plasma membrane localized calcium channels and exchangers in stress-induced deleterious effects. *Eur. J. Pharmacol.* 714, 229–238.

Bali, B., Ferenczi, S., and Kovács, K.J. (2008). Direct inhibitory effect of glucocorticoids on corticotrophin-releasing hormone gene expression in neurones of the paraventricular nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1045–1051.

Ballabio, A., and Camerino, G. (1992). The gene for X-linked Kallmann syndrome: a human neuronal migration defect. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 417–421.

Bartholome, B., Spies, C.M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G.-R., Lauster, R., et al. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 70–80.

- Beck, I.M.E., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Yamamoto, K.R., Haegeman, G., and De Bosscher, K. (2009). Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr. Rev.* *30*, 830–882.
- Belaisch-Allart, J. (2011). Épidémiologie de la fertilité féminine. In *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*, (Springer, Paris), pp. 115–122.
- Bellance, C., Khan, J.A., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Lombès, M., and Loosfelt, H. (2013). Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1363–1374.
- Bellavance, M.-A., and Rivest, S. (2014). The HPA – Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front. Immunol.* *5*.
- Belsham, D.D., and Lovejoy, D.A. (2005). Gonadotropin-Releasing Hormone: Gene Evolution, Expression, and Regulation. In *Vitamins & Hormones*, (Academic Press), pp. 59–94.
- Benfenati, F., Valtorta, F., Chiergatti, E., and Greengard, P. (1992). Interaction of free and synaptic vesicle-bound synapsin I with F-actin. *Neuron* *8*, 377–386.
- Berga, S.L., and Loucks, T.L. (2005). The diagnosis and treatment of stress-induced anovulation. *Minerva Ginecol.* *57*, 45–54.
- Berga, S.L., Daniels, T.L., and Giles, D.E. (1997). Women with functional hypothalamic amenorrhea but not other forms of anovulation display amplified cortisol concentrations. *Fertil. Steril.* *67*, 1024–1030.
- Bernard, D.J., Fortin, J., Wang, Y., and Lamba, P. (2010). Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil. Steril.* *93*, 2465–2485.
- Bertagna, X., Guignat, L., Groussin, L., and Bertherat, J. (2009). Cushing's disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *23*, 607–623.
- Biddie, S.C., Conway-Campbell, B.L., and Lightman, S.L. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *51*, 403–412.
- Bilezikjian, L.M., Blount, A.L., Donaldson, C.J., and Vale, W.W. (2006). Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. *Reprod. Camb. Engl.* *132*, 207–215.
- Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., et al. (2002). Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition. *Cell* *110*, 93–105.
- Blind, R.D., and Garabedian, M.J. (2008). Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *109*, 150–157.

- Bliss, S.P., Miller, A., Navratil, A.M., Xie, J., McDonough, S.P., Fisher, P.J., Landreth, G.E., and Roberson, M.S. (2009). ERK signaling in the pituitary is required for female but not male fertility. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *23*, 1092–1101.
- Bliss, S.P., Navratil, A.M., Xie, J., and Roberson, M.S. (2010). GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 322–340.
- Boehm, U., Bouloux, P.-M., Dattani, M.T., Roux, N. de, Dodé, C., Dunkel, L., Dwyer, A.A., Giacobini, P., Hardelin, J.-P., Juul, A., et al. (2015). Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* *11*, 547–564.
- Bolt, M.J., Stossi, F., Newberg, J.Y., Orjalo, A., Johansson, H.E., and Mancini, M.A. (2013). Coactivators enable glucocorticoid receptor recruitment to fine-tune estrogen receptor transcriptional responses. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4036–4048.
- Bonfil, D., Chuderland, D., Kraus, S., Shahbazian, D., Friedberg, I., Seger, R., and Naor, Z. (2004). Extracellular signal-regulated kinase, Jun N-terminal kinase, p38, and c-Src are involved in gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Endocrinology* *145*, 2228–2244.
- Borgeat, P., Garneau, P., and Labrie, F. (1975). Calcium requirement for stimulation of cyclic AMP accumulation in anterior pituitary gland by LH-RH. *Mol. Cell. Endocrinol.* *2*, 117–124.
- Borski, R.J. (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *11*, 427–436.
- Borum, K. (1961). Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp. Cell Res.* *24*, 495–507.
- Bouligand, J., Ghervan, C., Tello, J.A., Brailly-Tabard, S., Salenave, S., Chanson, P., Lombès, M., Millar, R.P., Guiochon-Mantel, A., and Young, J. (2009). Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2742–2748.
- Bourke, C.H., Harrell, C.S., and Neigh, G.N. (2012). Stress-induced sex differences: adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. *Horm. Behav.* *62*, 210–218.
- Breen, K.M., and Karsch, F.J. (2004). Does Cortisol Inhibit Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion at the Hypothalamic or Pituitary Level? *Endocrinology* *145*, 692–698.
- Breen, K.M., and Karsch, F.J. (2006). New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Front. Neuroendocrinol.* *27*, 233–245.
- Breen, K.M., and Mellon, P.L. (2014). Influence of Stress-Induced Intermediates on Gonadotropin Gene Expression in Gonadotrope Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *385*, 71–77.

- Breen, K.M., Stackpole, C.A., Clarke, I.J., Pytiak, A.V., Tilbrook, A.J., Wagenmaker, E.R., Young, E.A., and Karsch, F.J. (2004). Does the type II glucocorticoid receptor mediate cortisol-induced suppression in pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone? *Endocrinology* *145*, 2739–2746.
- Breen, K.M., Billings, H.J., Wagenmaker, E.R., Wessinger, E.W., and Karsch, F.J. (2005). Endocrine Basis for Disruptive Effects of Cortisol on Preovulatory Events. *Endocrinology* *146*, 2107–2115.
- Breen, K.M., Oakley, A.E., Pytiak, A.V., Tilbrook, A.J., Wagenmaker, E.R., and Karsch, F.J. (2007). Does cortisol acting via the type II glucocorticoid receptor mediate suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in response to psychosocial stress? *Endocrinology* *148*, 1882–1890.
- Breen, K.M., Davis, T.L., Doro, L.C., Nett, T.M., Oakley, A.E., Padmanabhan, V., Rispoli, L.A., Wagenmaker, E.R., and Karsch, F.J. (2008). Insight into the neuroendocrine site and cellular mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* *149*, 767–773.
- Breen, K.M., Thackray, V.G., Hsu, T., Mak-McCully, R.A., Coss, D., and Mellon, P.L. (2012). Stress levels of glucocorticoids inhibit LH $\beta$ -subunit gene expression in gonadotrope cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *26*, 1716–1731.
- Breslin, M.B., and Vedeckis, W.V. (1996). The glucocorticoid receptor and c-jun promoters contain AP-1 sites that bind different AP-1 transcription factors. *Endocrine* *5*, 15–22.
- Breslin, M.B., and Vedeckis, W.V. (1998). The human glucocorticoid receptor promoter upstream sequences contain binding sites for the ubiquitous transcription factor, Yin Yang 1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *67*, 369–381.
- Breslin, M.B., Geng, C.-D., and Vedeckis, W.V. (2001). Multiple Promoters Exist in the Human GR Gene, One of Which Is Activated by Glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* *15*, 1381–1395.
- Briassoulis, G., Damjanovic, S., Xekouki, P., Lefebvre, H., and Stratakis, C.A. (2011). The glucocorticoid receptor and its expression in the anterior pituitary and the adrenal cortex: a source of variation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function; implications for pituitary and adrenal tumors. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* *17*, 941–948.
- Brock, O., and Bakker, J. (2013). The Two Kisspeptin Neuronal Populations Are Differentially Organized and Activated by Estradiol in Mice. *Endocrinology* *154*, 2739–2749.
- Broekmans, F.J., Soules, M.R., and Fauser, B.C. (2009). Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr. Rev.* *30*, 465–493.
- Brown, R.W., Chapman, K.E., Murad, P., Edwards, C.R., and Seckl, J.R. (1996). Purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 from human placenta utilizing a novel affinity labelling technique. *Biochem. J.* *313*, 997–1005.
- Bruchas, M.R., Land, B.B., and Chavkin, C. (2010). The Dynorphin-Kappa Opioid System as a Modulator of Stress-induced and Pro-addictive Behaviors. *Brain Res.* *1314C*, 44.

Brzakowski, M., Lourdel, E., Cabry, R., Oliéric, M.-F., Claeys, C., Devaux, A., Copin, H., and Merviel, P. (2009). Épidémiologie du couple infertile. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *38*, F3–F7.

Buckingham, J.C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br. J. Pharmacol.* *147*, S258–S268.

Bultink, I.E.M., Baden, M., and Lems, W.F. (2013). Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on current pharmacotherapy and future directions. *Expert Opin. Pharmacother.* *14*, 185–197.

Burd, C.J., and Archer, T.K. (2013). Chromatin architecture defines the glucocorticoid response. *Mol. Cell. Endocrinol.* *380*, 25–31.

Burger, L.L., Haisenleder, D.J., Aylor, K.W., and Marshall, J.C. (2008). Regulation of Intracellular Signaling Cascades by GNRH Pulse Frequency in the Rat Pituitary: Roles for CaMK II, ERK, and JNK Activation. *Biol. Reprod.* *79*, 947–953.

Burger, L.L., Haisenleder, D.J., Aylor, K.W., and Marshall, J.C. (2009). Regulation of Lhb and Egr1 Gene Expression by GNRH Pulses in Rat Pituitaries Is Both c-Jun N-Terminal Kinase (JNK)- and Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)-Dependent. *Biol. Reprod.* *81*, 1206–1215.

Burke, M.C., Letts, P.A., Krajewski, S.J., and Rance, N.E. (2006). Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J. Comp. Neurol.* *498*, 712–726.

Burnstein, K.L., Jewell, C.M., and Cidlowski, J.A. (1990). Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* *265*, 7284–7291.

Busillo, J.M., and Cidlowski, J.A. (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM 24*, 109–119.

Buttgereit, F., Wehling, M., and Burmester, G.R. (1998). A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum.* *41*, 761–767.

## C

Cahoreau, C., Klett, D., and Combarous, Y. (2015). Structure–Function Relationships of Glycoprotein Hormones and Their Subunits’ Ancestors. *Front. Endocrinol.* *6*.

Caldani, M., Batailler, M., Thiéry, J.C., and Dubois, M.P. (1988). LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry* *89*, 129–139.

Campbell, R.E., and Suter, K.J. (2010). Redefining the gonadotrophin-releasing hormone neurone dendrite. *J. Neuroendocrinol.* *22*, 650–658.

Campbell, R.E., Gaidamaka, G., Han, S.-K., and Herbison, A.E. (2009). Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 10835–10840.

- Cao, Y., Bender, I.K., Konstantinidis, A.K., Shin, S.C., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., Schleimer, R.P., and Lu, N.Z. (2013). Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans. *Blood* *121*, 1553–1562.
- Caraty, A., and Locatelli, A. (1988). Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. *J. Reprod. Fertil.* *82*, 263–269.
- Caraty, A., Martin, G.B., and Montgomery, G. (1984). A new method for studying pituitary responsiveness in vivo using pulses of LH-RH analogue in ewes passively immunized against native LH-RH. *Reprod. Nutr. Dev.* *24*, 439–448.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castaño, J.P., Malagón, M.M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2006). Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* *257–258*, 75–83.
- Castellino, F., Heuser, J., Marchetti, S., Bruno, B., and Luini, A. (1992). Glucocorticoid stabilization of actin filaments: a possible mechanism for inhibition of corticotropin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 3775–3779.
- Castellino, F., Ono, S., Matsumura, F., and Luini, A. (1995). Essential role of caldesmon in the actin filament reorganization induced by glucocorticoids. *J. Cell Biol.* *131*, 1223–1230.
- Castro-Fernández, C., Olivares, A., Söderlund, D., López-Alvarenga, J.C., Zambrano, E., Veldhuis, J.D., Ulloa-Aguirre, A., and Méndez, J.P. (2000). A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 4603–4610.
- Casu, G., and Gremigni, P. (2016). Screening for infertility-related stress at the time of initial infertility consultation: psychometric properties of a brief measure. *J. Adv. Nurs.* *72*, 693–706.
- Catalano, P.N., Bonaventura, M.M., Silveyra, P., Bettler, B., Libertun, C., and Lux-Lantos, V.A. (2005). GABA(B1) knockout mice reveal alterations in prolactin levels, gonadotropic axis, and reproductive function. *Neuroendocrinology* *82*, 294–305.
- Cattanach, B.M., Iddon, C.A., Charlton, H.M., Chiappa, S.A., and Fink, G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* *269*, 338–340.
- Cerdá-Reverter, J.M., and Larhammar, D. (2000). Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *78*, 371–392.
- Chameau, P., Qin, Y., Spijker, S., Smit, A.B., Smit, G., and Joëls, M. (2007). Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* *97*, 5–14.



- Chan, S., and Debono, M. (2010). Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* *1*, 129–138.
- Chan, Y.-M., de Guillebon, A., Lang-Muritano, M., Plummer, L., Cerrato, F., Tsiaras, S., Gaspert, A., Lavoie, H.B., Wu, C.-H., Crowley, W.F., et al. (2009). GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11703–11708.
- Chapman, K., Holmes, M., and Seckl, J. (2013). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol. Rev.* *93*, 1139–1206.
- Chappell, P.E., and Levine, J.E. (2000). Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. *Endocrinology* *141*, 1477–1485.
- Charmandari, E., Ichijo, T., Jubiz, W., Baid, S., Zachman, K., Chrousos, G.P., and Kino, T. (2008). A Novel Point Mutation in the Amino Terminal Domain of the Human Glucocorticoid Receptor (hGR) Gene Enhancing hGR-Mediated Gene Expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 4963–4968.
- Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Cavasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K., and Garabedian, M.J. (2008). Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 1754–1766.
- Chen, Y., Chen, C., and Liu-Chen, L.-Y. (2007). Dynorphin peptides differentially regulate the human  $\kappa$  opioid receptor. *Life Sci.* *80*, 1439–1448.
- Cheung, L.W.T., and Wong, A.S.T. (2008). Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J.* *275*, 5479–5495.
- Christian, C.A., and Moenter, S.M. (2007). Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 1913–1921.
- Christian, C.A., and Moenter, S.M. (2010). The Neurobiology of Preovulatory and Estradiol-Induced Gonadotropin-Releasing Hormone Surges. *Endocr. Rev.* *31*, 544–577.
- Chrousos, G.P. (2004). The glucocorticoid receptor gene, longevity, and the complex disorders of Western societies. *Am. J. Med.* *117*, 204–207.
- Chu, Z., Andrade, J., Shupnik, M.A., and Moenter, S.M. (2009). Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 5616–5627.
- Chung, C.C., Shimmin, L., Natarajan, S., Hanis, C.L., Boerwinkle, E., and Hixson, J.E. (2009). Glucocorticoid receptor gene variant in the 3' untranslated region is associated with multiple measures of blood pressure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 268–276.
- Chung, D., Sairam, M.R., and Li, C.H. (1975). The primary structure of ovine interstitial cell stimulating hormone. IV: Disulfide bridges of the beta subunit. *Int. J. Pept. Protein Res.* *7*, 487–493.

- Ciccione, N.A., Lacza, C.T., Hou, M.Y., Gregory, S.J., Kam, K.-Y., Xu, S., and Kaiser, U.B. (2008). A Composite Element that Binds Basic Helix Loop Helix and Basic Leucine Zipper Transcription Factors Is Important for Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of the Follicle-Stimulating Hormone  $\beta$  Gene. *Mol. Endocrinol.* *22*, 1908–1923.
- Ciccione, N.A., Xu, S., Lacza, C.T., Carroll, R.S., and Kaiser, U.B. (2010). Frequency-Dependent Regulation of Follicle-Stimulating Hormone  $\beta$  by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Is Mediated by Functional Antagonism of bZIP Transcription Factors. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1028–1040.
- Ciechanowska, M., Łapot, M., Antkowiak, B., Mateusiak, K., Paruszczyńska, E., Malewski, T., Paluch, M., and Przekop, F. (2016). Effect of short-term and prolonged stress on the biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor (GnRHR) in the hypothalamus and GnRHR in the pituitary of ewes during various physiological states. *Anim. Reprod. Sci.* *174*, 65–72.
- Cintra, A., Solfrini, V., Agnati, L.F., Gustafsson, J.A., and Fuxe, K. (1991). Strongly glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the neonatal rat brain. *Neuroreport* *2*, 85–88.
- Ciriaco, M., Ventrice, P., Russo, G., Scicchitano, M., Mazzitello, G., Scicchitano, F., and Russo, E. (2013). Corticosteroid-related central nervous system side effects. *J. Pharmacol. Pharmacother.* *4*, S94-98.
- Clarke, I.J., and Cummins, J.T. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* *111*, 1737–1739.
- Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., et al. (2008). Potent Action of RFamide-Related Peptide-3 on Pituitary Gonadotropes Indicative of a Hypophysiotropic Role in the Negative Regulation of Gonadotropin Secretion. *Endocrinology* *149*, 5811–5821.
- Clarke, I.J., Qi, Y., Puspita Sari, I., and Smith, J.T. (2009). Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front. Neuroendocrinol.* *30*, 371–378.
- Clarke, I.J., Bartolini, D., Conductier, G., and Henry, B.A. (2016). Stress Increases Gonadotropin Inhibitory Hormone Cell Activity and Input to GnRH Cells in Ewes. *Endocrinology* *157*, 4339–4350.
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A.S., Colledge, W.H., and Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 8691–8697.
- Clayton, R.N., Raskauskiene, D., Reulen, R.C., and Jones, P.W. (2011). Mortality and morbidity in Cushing's disease over 50 years in Stoke-on-Trent, UK: audit and meta-analysis of literature. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, 632–642.
- Cohen-Tannoudji, J., Avet, C., Garrel, G., Counis, R., and Simon, V. (2012). Decoding high Gonadotropin-releasing hormone pulsatility: a role for GnRH receptor coupling to the cAMP pathway? *Front. Endocrinol.* *3*.

- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., and Schütz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* *9*, 1608–1621.
- Conrad, C.D., Galea, L.A., Kuroda, Y., and McEwen, B.S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav. Neurosci.* *110*, 1321–1334.
- Constantin, S. (2011). Physiology of the GnRH neuron: Studies from embryonic GnRH neurons. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 542–553.
- Constantin, S. (2017). Progress and Challenges in the Search for the Mechanisms of Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Front. Endocrinol.* *8*.
- Constantin, S., Piet, R., Iremonger, K., Hwa Yeo, S., Clarkson, J., Porteous, R., and Herbison, A.E. (2012). GnRH neuron firing and response to GABA in vitro depend on acute brain slice thickness and orientation. *Endocrinology* *153*, 3758–3769.
- Constantin, S., Iremonger, K.J., and Herbison, A.E. (2013). In vivo recordings of GnRH neuron firing reveal heterogeneity and dependence upon GABA<sub>A</sub> receptor signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 9394–9401.
- Cooper, M.S., Seibel, M.J., and Zhou, H. (2016). Glucocorticoids, bone and energy metabolism. *Bone* *82*, 64–68.
- Coss, D., Jacobs, S.B.R., Bender, C.E., and Mellon, P.L. (2004). A Novel AP-1 Site Is Critical for Maximal Induction of the Follicle-stimulating Hormone  $\beta$  Gene by Gonadotropin-releasing Hormone. *J. Biol. Chem.* *279*, 152–162.
- Cottrell, E.C., Campbell, R.E., Han, S.-K., and Herbison, A.E. (2006). Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* *147*, 3652–3661.
- Couse, J.F., Yates, M.M., Walker, V.R., and Korach, K.S. (2003). Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER $\alpha$  but not ER $\beta$ . *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 1039–1053.
- Coutinho, A.E., and Chapman, K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* *335*, 2–13.
- de Croft, S., Piet, R., Mayer, C., Mai, O., Boehm, U., and Herbison, A.E. (2012). Spontaneous kisspeptin neuron firing in the adult mouse reveals marked sex and brain region differences but no support for a direct role in negative feedback. *Endocrinology* *153*, 5384–5393.
- Cronshaw, D.G., Nie, Y., Waite, J., and Zou, Y.-R. (2010). An essential role of the cytoplasmic tail of CXCR4 in G-protein signaling and organogenesis. *PLoS One* *5*, e15397.

Croxtall, J.D., Choudhury, Q., and Flower, R.J. (2000). Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* *130*, 289.

Cuzzoni, E., De Iudibus, S., Bartoli, F., Ventura, A., and Decorti, G. (2012). Association between BclI polymorphism in the NR3C1 gene and in vitro individual variations in lymphocyte responses to methylprednisolone. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *73*, 651–655.

Czieselsky, K., Prescott, M., Porteous, R., Campos, P., Clarkson, J., Steyn, F.J., Campbell, R.E., and Herbison, A.E. (2016). Pulse and Surge Profiles of Luteinizing Hormone Secretion in the Mouse. *Endocrinology* *157*, 4794–4802.

## D

Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., and Marshall, J.C. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* *125*, 917–924.

Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., and Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005). Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience* *135*, 703–714.

Dallman, M.F. (1993). Stress update: Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol. Metab.* *4*, 62–69.

Dardente, H., Birnie, M., Lincoln, G.A., and Hazlerigg, D.G. (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 1252–1259.

Datson, N.A., van den Oever, J.M.E., Korobko, O.B., Magarinos, A.M., de Kloet, E.R., and McEwen, B.S. (2013). Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. *Endocrinology* *154*, 3261–3272.

Daughaday, W.H. (1956). Binding of corticosteroids by plasma proteins. II. Paper electrophoresis and equilibrium paper electrophoresis. *J. Clin. Invest.* *35*, 1434–1438.

Davies, L., Karthikeyan, N., Lynch, J.T., Sial, E.-A., Gkourtsa, A., Demonacos, C., and Krstic-Demonacos, M. (2008). Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 1331–1344.

De Bosscher, K., Beck, I.M., and Haegeman, G. (2010). Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? *Brain. Behav. Immun.* *24*, 1035–1042.

Decourt, C., Anger, K., Robert, V., Lomet, D., Bartzen-Sprauer, J., Caraty, A., Dufourny, L., Anderson, G., and Beltramo, M. (2016). No Evidence That RFamide-Related Peptide 3 Directly Modulates LH Secretion in the Ewe. *Endocrinology* *157*, 1566–1575.

Deng, Q., Waxse, B., Riquelme, D., Zhang, J., and Aguilera, G. (2015a). Helix 8 of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor (GR) is essential for ligand binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* *408*, 23–32.

Deng, Q., Riquelme, D., Trinh, L., Low, M.J., Tomić, M., Stojilkovic, S., and Aguilera, G. (2015b). Rapid Glucocorticoid Feedback Inhibition of ACTH Secretion Involves Ligand-Dependent Membrane Association of Glucocorticoid Receptors. *Endocrinology* *156*, 3215–3227.

Derijk, R.H., Schaaf, M.J., Turner, G., Datson, N.A., Vreugdenhil, E., Cidlowski, J., de Kloet, E.R., Emery, P., Sternberg, E.M., and Detera-Wadleigh, S.D. (2001). A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *28*, 2383–2388.

Derntl, B., Finkelmeyer, A., Eickhoff, S., Kellermann, T., Falkenberg, D.I., Schneider, F., and Habel, U. (2010). Multidimensional assessment of empathic abilities: neural correlates and gender differences. *Psychoneuroendocrinology* *35*, 67–82.

Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Ramachandran, R., Nijher, G.K., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., et al. (2007). Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 3958–3966.

Di Dalmazi, G., Pagotto, U., Pasquali, R., and Vicennati, V. (2012). Glucocorticoids and Type 2 Diabetes: From Physiology to Pathology.

Dieken, E.S., and Miesfeld, R.L. (1992). Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 589–597.

Dobson, H., Fergani, C., Routly, J.E., and Smith, R.F. (2012). Effects of stress on reproduction in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* *130*, 135–140.

Dodé, C., Teixeira, L., Levilliers, J., Fouveaut, C., Bouchard, P., Kottler, M.-L., Lespinasse, J., Lienhardt-Roussie, A., Mathieu, M., Moerman, A., et al. (2006). Kallmann Syndrome: Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 and Prokineticin Receptor-2. *PLOS Genet.* *2*, e175.

Dorling, A.A., Todman, M.G., Korach, K.S., and Herbison, A.E. (2003). Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology* *78*, 204–209.

Douglass, J., McKinzie, A.A., and Pollock, K.M. (1994). Identification of multiple DNA elements regulating basal and protein kinase A-induced transcriptional expression of the rat prodynorphin gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *8*, 333–344.

Druker, J., Liberman, A.C., Antunica-Noguerol, M., Gerez, J., Paez-Pereda, M., Rein, T., Iñiguez-Lluhí, J.A., Holsboer, F., and Arzt, E. (2013). RSUME Enhances Glucocorticoid Receptor SUMOylation and Transcriptional Activity. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2116–2127.

Du, J.-W., Xu, K.-Y., Fang, L.-Y., and Qi, X.-L. (2012). Association between mutations of the luteinizing hormone  $\beta$  subunit and female infertility. *Mol. Med. Rep.* *5*, 473–476.

Dubois, S.L., Acosta-Martínez, M., DeJoseph, M.R., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., Urban, J.H., and Levine, J.E. (2015). Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor  $\alpha$  in kisspeptin neurons. *Endocrinology* *156*, 1111–1120.

Ducret, E., Anderson, G.M., and Herbison, A.E. (2009). RFamide-Related Peptide-3, a Mammalian Gonadotropin-Inhibitory Hormone Ortholog, Regulates Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing in the Mouse. *Endocrinology* *150*, 2799–2804.

Dufourny, L., and Skinner, D.C. (2002). Type II glucocorticoid receptors in the ovine hypothalamus: distribution, influence of estrogen and absence of co-localization with GnRH. *Brain Res.* *946*, 79–86.

Duma, D., Silva-Santos, J.E., and Assreuy, J. (2004). Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. *Crit. Care Med.* *32*, 2304–2310.

Duma, D., Jewell, C.M., and Cidlowski, J.A. (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *102*, 11–21.

Dumesic, D.A., Oberfield, S.E., Stener-Victorin, E., Marshall, J.C., Laven, J.S., and Legro, R.S. (2015). Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr. Rev.* *36*, 487–525.

Duncan, P.J., Tabak, J., Ruth, P., Bertram, R., and Shipston, M.J. (2016). Glucocorticoids Inhibit CRH/AVP-Evoked Bursting Activity of Male Murine Anterior Pituitary Corticotrophs. *Endocrinology* *157*, 3108–3121.

Dwi Putra, S.E., Reichetzedder, C., Meixner, M., Liere, K., Slowinski, T., and Hocher, B. (2017). DNA methylation of the glucocorticoid receptor gene promoter in the placenta is associated with blood pressure regulation in human pregnancy. *J. Hypertens.* *35*, 2276–2286.

## E

Eberwine, J.H., Jonassen, J.A., Evinger, M.J., and Roberts, J.L. (1987). Complex transcriptional regulation by glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone of proopiomelanocortin gene expression in rat pituitary cultures. *DNA* Mary Ann Liebert Inc *6*, 483–492.

Eckhoff, J., and Dohmen, R.J. (2016). In Vitro Characterization of Chain Depolymerization Activities of SUMO-Specific Proteases. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1475*, 123–135.

Edwards, C.R., Stewart, P.M., Burt, D., Brett, L., McIntyre, M.A., Sutanto, W.S., de Kloet, E.R., and Monder, C. (1988). Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 986–989.

Emptoz-Bonneton, A., Crave, J.C., Lejeune, H., Brébant, C., and Pugeat, M. (1997). Corticosteroid-Binding Globulin Synthesis Regulation by Cytokines and Glucocorticoids in Human Hepatoblastoma-Derived (HepG2) Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 3758–3762.

Erickson, G.F., and Shimasaki, S. (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil. Steril.* 76, 943–949.

Eva, C., Serra, M., Mele, P., Panzica, G., and Oberto, A. (2006). Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 308–339.

Everitt, B.J., and Hökfelt, T. (1990). Neuroendocrine Anatomy of the Hypothalamus. In *Neuroendocrinological Aspects of Neurosurgery*, (Springer, Vienna), pp. 1–15.

Eyigor, O., Lin, W., and Jennes, L. (2004). Identification of Neurons in the Female Rat Hypothalamus That Express Oestrogen Receptor-Alpha and Vesicular Glutamate Transporter-2. *J. Neuroendocrinol.* 16, 26–31.

## F

Farnworth, P.G. (1995). Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *J. Endocrinol.* 145, 387–395.

Feltus, F.A., Cote, S., Simard, J., Gingras, S., Kovacs, W.J., Nicholson, W.E., Clark, B.J., and Melner, M.H. (2002). Glucocorticoids enhance activation of the human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82, 55–63.

Ferin, M. (1999). Stress and the Reproductive Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1768–1774.

Fernandes, M.F., Sharma, S., Hryhorczuk, C., Auguste, S., and Fulton, S. (2013). Nutritional controls of food reward. *Can. J. Diabetes* 37, 260–268.

Ferraretti, A.P., Goossens, V., Kupka, M., Bhattacharya, S., de Mouzon, J., Castilla, J.A., Erb, K., Korsak, V., Nyboe Andersen, A., and European IVF-Monitoring (EIM) Consortium for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2013). Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28, 2318–2331.

Ferris, H.A., and Shupnik, M.A. (2006). Mechanisms for Pulsatile Regulation of the Gonadotropin Subunit Genes by GNRH1. *Biol. Reprod.* 74, 993–998.

Fetherston, J., and Boime, I. (1982). Synthesis of bovine lutropin in cell-free lysates containing pituitary microsomes. *J. Biol. Chem.* 257, 8143–8147.

Fiete, D., Srivastava, V., Hindsgaul, O., and Baenziger, J.U. (1991). A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO4-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67, 1103–1110.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.

Foradori, C.D., Coolen, L.M., Fitzgerald, M.E., Skinner, D.C., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2002). Colocalization of progesterone receptors in parvocellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology* 143, 4366–4374.

Foradori, C.D., Goodman, R.L., Adams, V.L., Valent, M., and Lehman, M.N. (2005). Progesterone increases dynorphin a concentrations in cerebrospinal fluid and preprodynorphin messenger ribonucleic Acid levels in a subset of dynorphin neurons in the sheep. *Endocrinology* *146*, 1835–1842.

Foradori, C.D., Amstalden, M., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2006). Colocalisation of dynorphin a and neurokinin B immunoreactivity in the arcuate nucleus and median eminence of the sheep. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 534–541.

Fowkes, R., O, L., Sidhu, K., Patel, M., Geddes, J., and Burrin, J. (2002). EXPRESSION AND ACTION OF CALCIUM/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASES (CaMK). (BioScientifica), p.

Fox, K.M., Dias, J.A., and Van Roey, P. (2001). Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *15*, 378–389.

Fox, S.R., Harlan, R.E., Shivers, B.D., and Pfaff, D.W. (1990). Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* *51*, 276–283.

Frank, M.G., Miguel, Z.D., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2010). Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 19–30.

Freedman, L.P. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr. Rev.* *13*, 129–145.

Friedberg, M., Zoumakis, E., Hiroi, N., Bader, T., Chrousos, G.P., and Hochberg, Z. (2003). Modulation of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Mature Human Subcutaneous Adipocytes by Hypothalamic Messengers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 385–393.

Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2004). Identification of PSD-95 Palmitoylating Enzymes. *Neuron* *44*, 987–996.

Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R., and Smith, A.I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* *242*, 583–585.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., and Gustafson, E.L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1357–1363.

## G

Gal, A., Lin, P.-C., Cacioppo, J.A., Hannon, P.R., Mahoney, M.M., Wolfe, A., Fernandez-Valdivia, R., Lydon, J.P., Elias, C.F., and Ko, C. (2016). Loss of Fertility in the Absence of Progesterone Receptor Expression in Kisspeptin Neurons of Female Mice. *PLOS ONE* *11*, e0159534.

Gallagher-Beckley, A.J., and Cidlowski, J.A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* *61*, 979–986.



- Gallier-Beckley, A.J., Williams, J.G., Collins, J.B., and Cidlowski, J.A. (2008). Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 7309–7322.
- Gametchu, B., Watson, C.S., and Pasko, D. (1991). Size and steroid-binding characterization of membrane-associated glucocorticoid receptor in S-49 lymphoma cells. *Steroids* *56*, 402–410.
- Gametchu, B., Chen, F., Sackey, F., Powell, C., and Watson, C.S. (1999). Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* *64*, 107–119.
- Gao, Y., Chen, F., Kong, Q.-Q., Ning, S.-F., Yuan, H.-J., Lian, H.-Y., Luo, M.-J., and Tan, J.-H. (2016). Stresses on Female Mice Impair Oocyte Developmental Potential: Effects of Stress Severity and Duration on Oocytes at the Growing Follicle Stage. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* *23*, 1148–1157.
- García-Galiano, D., van Ingen Schenau, D., Leon, S., Krajnc-Franken, M.A.M., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Navarro, V.M., Gaytan, F., van Noort, P.I., Pinilla, L., et al. (2012). Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* *153*, 316–328.
- Garrel, G., Simon, V., Denoyelle, C., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Counis, R., Magnan, C., and Cohen-Tannoudji, J. (2011). Unsaturated Fatty Acids Stimulate LH Secretion via Novel PKC $\epsilon$  and  $\theta$  in Gonadotrope Cells and Inhibit GnRH-Induced LH Release. *Endocrinology* *152*, 3905–3916.
- Gauthier-Kemper, A., Igaev, M., Sündermann, F., Janning, D., Brühmann, J., Moschner, K., Reyher, H.-J., Junge, W., Glebov, K., Walter, J., et al. (2014). Interplay between phosphorylation and palmitoylation mediates plasma membrane targeting and sorting of GAP43. *Mol. Biol. Cell* *25*, 3284–3299.
- Gemert, V., G, N., Carvalho, D.M.M., Karst, H., van der Laan, S., Zhang, M., Meijer, O.C., Hell, J.W., and Joëls, M. (2009). Dissociation between Rat Hippocampal CA1 and Dentate Gyrus Cells in Their Response to Corticosterone: Effects on Calcium Channel Protein and Current. *Endocrinology* *150*, 4615–4624.
- Geng, C., Schwartz, J.R., and Vedeckis, W.V. (2008). A conserved molecular mechanism is responsible for the auto-up-regulation of glucocorticoid receptor gene promoters. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 2624–2642.
- Geraghty, A.C., Muroy, S.E., Zhao, S., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., and Kaufer, D. (2015). Knockdown of hypothalamic RFRP3 prevents chronic stress-induced infertility and embryo resorption. *ELife* *4*.
- Gibson, E.M., Humber, S.A., Jain, S., Williams, W.P., Zhao, S., Bentley, G.E., Tsutsui, K., and Kriegsfeld, L.J. (2008). Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* *149*, 4958–4969.
- Gicquel, C., Le Bouc, Y., Luton, J.P., Girard, F., and Bertagna, X. (1992). Monoclonality of corticotroph macroadenomas in Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *75*, 472–475.

- Giguère, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* *46*, 645–652.
- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *15*, 536–541.
- Giovedì, S., Darchen, F., Valtorta, F., Greengard, P., and Benfenati, F. (2004). Synapsin is a novel Rab3 effector protein on small synaptic vesicles. II. Functional effects of the Rab3A-synapsin I interaction. *J. Biol. Chem.* *279*, 43769–43779.
- Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfeld, R., and Yamamoto, K.R. (1987). Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* *325*, 365–368.
- Goel, N., and Bale, T.L. (2010). Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis. *Endocrinology* *151*, 1784–1794.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., and Hood, L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *76*, 6666–6670.
- Gong, H., Liu, L., and Jiang, C.-L. (2017). Chapter 39 - Nongenomic Effects of Glucocorticoids: Translation From Physiology to Clinic. In *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*, G. Fink, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 395–400.
- González-Martínez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpirer, C., and Bakker, J. (2008). Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* *149*, 2333–2340.
- Goodman, R.L., and Karsch, F.J. (1980). Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone: Differential Suppression by Ovarian Steroids. *Endocrinology* *107*, 1286–1290.
- Goodman, R.L., Coolen, L.M., Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Connors, J.M., Fitzgerald, M.E., and Lehman, M.N. (2004). Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* *145*, 2959–2967.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V.R., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., et al. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* *148*, 5752–5760.
- Goodman, R.L., Hileman, S.M., Nestor, C.C., Porter, K.L., Connors, J.M., Hardy, S.L., Millar, R.P., Cernea, M., Coolen, L.M., and Lehman, M.N. (2013). Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Act in the Arcuate Nucleus to Control Activity of the GnRH Pulse Generator in Ewes. *Endocrinology* *154*, 4259–4269.
- Goodwin, J.E., and Geller, D.S. (2012). Glucocorticoid-induced hypertension. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* *27*, 1059–1066.

- Goodwin, J.E., Zhang, J., and Geller, D.S. (2008). A critical role for vascular smooth muscle in acute glucocorticoid-induced hypertension. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 1291–1299.
- Goto, T., Tomikawa, J., Ikegami, K., Minabe, S., Abe, H., Fukanuma, T., Imamura, T., Takase, K., Sanbo, M., Tomita, K., et al. (2015). Identification of hypothalamic arcuate nucleus-specific enhancer region of Kiss1 gene in mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 29, 121–129.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse. *Endocrinology* 145, 4073–4077.
- Gottsch, M.L., Navarro, V.M., Zhao, Z., Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Jameson, J.L., Clifton, D.K., Levine, J.E., and Steiner, R.A. (2009). Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9390–9395.
- Goverman, J.M., Parsons, T.F., and Pierce, J.G. (1982). Enzymatic deglycosylation of the subunits of chorionic gonadotropin. Effects on formation of tertiary structure and biological activity. *J. Biol. Chem.* 257, 15059–15064.
- Grad, I., and Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 2–12.
- Gramsch, C., Höllt, V., Pasi, A., Mehraein, P., and Herz, A. (1982). Immunoreactive dynorphin in human brain and pituitary. *Brain Res.* 233, 65–74.
- Grasso, R.J., Klein, T.W., and Benjamin, W.R. (1981). Inhibition of yeast phagocytosis and cell spreading by glucocorticoids in cultures of resident murine peritoneal macrophages. *J. Immunopharmacol.* 3, 171–192.
- Graversen, D., Vestergaard, P., Stochholm, K., Gravholt, C.H., and Jørgensen, J.O.L. (2012). Mortality in Cushing’s syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Intern. Med.* 23, 278–282.
- Gray, J.D., Rubin, T.G., Hunter, R.G., and McEwen, B.S. (2014). Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery. *Mol. Psychiatry* 19, 1171–1178.
- Gray, J.D., Kogan, J.F., Marrocco, J., and McEwen, B.S. (2017). Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 661–673.
- Greaves, J., and Chamberlain, L.H. (2006). Dual role of the cysteine-string domain in membrane binding and palmitoylation-dependent sorting of the molecular chaperone cysteine-string protein. *Mol. Biol. Cell* 17, 4748–4759.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., and Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780–785.

Gregory, S.J., Lacza, C.T., Detz, A.A., Xu, S., Petrillo, L.A., and Kaiser, U.B. (2005). Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat follicle-stimulating hormone-beta gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 237–254.

Groeneweg, F.L., Karst, H., de Kloet, E.R., and Joëls, M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 299–309.

Gross, K.L., and Cidlowski, J.A. (2008). Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 19, 331–339.

Grumbach, M.M. (2002). The Neuroendocrinology of Human Puberty Revisited. *Horm. Res. Paediatr.* 57, 2–14.

Gummow, B.M., Scheys, J.O., Cancelli, V.R., and Hammer, G.D. (2006). Reciprocal Regulation of a Glucocorticoid Receptor-Steroidogenic Factor-1 Transcription Complex on the Dax-1 Promoter by Glucocorticoids and Adrenocorticotrophic Hormone in the Adrenal Cortex. *Mol. Endocrinol.* 20, 2711–2723.

Guran, T., Tolhurst, G., Bereket, A., Rocha, N., Porter, K., Turan, S., Gribble, F.M., Kotan, L.D., Akcay, T., Atay, Z., et al. (2009). Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3633–3639.

Gutiérrez-Mecinas, M., Trollope, A.F., Collins, A., Morfett, H., Hesketh, S.A., Kersanté, F., and Reul, J.M.H.M. (2011). Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13806–13811.

## H

Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F.P., Plumier, J.-C., Rebsamen, M.C., Hsieh, C.-M., Chui, D.-S., Thomas, K.L., Prorock, A.J., et al. (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8, 473–479.

Hahn, S. (1993). Structure(?) and function of acidic transcription activators. *Cell* 72, 481–483.

Hahn, J.D., and Coen, C.W. (2006). Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats. *J. Comp. Neurol.* 494, 190–214.

Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 271–272.

Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C., Ortolano, G.A., Marshall, J.C., and Shupnik, M.A. (1991). A Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulus is Required to Increase Transcription of the

Gonadotropin Subunit Genes: Evidence for Differential Regulation of Transcription by Pulse Frequency In Vivo. *Endocrinology* 128, 509–517.

Haisenleder, D.J., Burger, L.L., Aylor, K.W., Dalkin, A.C., and Marshall, J.C. (2003a). Gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription: evidence for the involvement of calcium/calmodulin-dependent kinase II (Ca/CAMK II) activation in rat pituitaries. *Endocrinology* 144, 2768–2774.

Haisenleder, D.J., Ferris, H.A., and Shupnik, M.A. (2003b). The calcium component of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone subunit gene transcription is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II. *Endocrinology* 144, 2409–2416.

Haj, M., Wijeweera, A., Rudnizky, S., Taunton, J., Pnueli, L., and Melamed, P. (2017). Mitogen and stress-activated protein kinase 1 is required for gonadotropin-releasing hormone-mediated activation of gonadotropin  $\alpha$  subunit expression. *J. Biol. Chem.* jbc.M117.797845.

Halban, P.A., and Irminger, J.C. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299, 1–18.

Haller, J., Mikics, E., and Makara, G.B. (2008). The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 273–291.

Hammer, G.D., Tyrrell, J.B., Lamborn, K.R., Applebury, C.B., Hannegan, E.T., Bell, S., Rahl, R., Lu, A., and Wilson, C.B. (2004). Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 6348–6357.

Hammond, G.L. (2016). Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J. Endocrinol.* 230, R13–R25.

Han, S.-K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., and Herbison, A.E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 11349–11356.

Haque, M., Wilson, R., Sharma, K., Mills, N.J., and Teruyama, R. (2015). Localisation of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Mineralocorticoid Receptor Expressing Magnocellular Neurosecretory Neurones of the Rat Supraoptic and Paraventricular Nuclei. *J. Neuroendocrinol.* 27, 835–849.

Harris, A., and Seckl, J. (2011). Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm. Behav.* 59, 279–289.

Harris, D., Bonfil, D., Chuderland, D., Kraus, S., Seger, R., and Naor, Z. (2002). Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LHBeta-subunit promoter. *Endocrinology* 143, 1018–1025.

Hayashi, T., Rumbaugh, G., and Huganir, R.L. (2005). Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron* 47, 709–723.

- Heger, S., Seney, M., Bless, E., Schwarting, G.A., Bilger, M., Mungenast, A., Ojeda, S.R., and Tobet, S.A. (2003). Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology* *144*, 2566–2579.
- Helena, C.V., Toporikova, N., Kalil, B., Stathopoulos, A.M., Pogrebna, V.V., Carolino, R.O., Anselmo-Franci, J.A., and Bertram, R. (2015). KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats. *Endocrinology* *156*, 4200–4213.
- Henningsen, J.B., Ancel, C., Mikkelsen, J.D., Gauer, F., and Simonneaux, V. (2017). Roles of RFRP-3 in the Daily and Seasonal Regulation of Reproductive Activity in Female Syrian Hamsters. *Endocrinology* *158*, 652–663.
- Herbison, A.E. (1997). Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. *Brain Res. Bull.* *44*, 321–326.
- Herbison, A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr. Rev.* *19*, 302–330.
- Herbison, A.E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 452–466.
- Herbison, A.E., and Dyer, R.G. (1991). Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* *53*, 317–320.
- Herbison, A.E., and Moenter, S.M. (2011). Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 557–569.
- Herbison, A.E., Skinner, D.C., Robinson, J.E., and King, I.S. (1996). Androgen Receptor-Immunoreactive Cells in Ram Hypothalamus: Distribution and Co-Localization Patterns with Gonadotropin-Releasing Hormone, Somatostatin and Tyrosine Hydroxylase. *Neuroendocrinology* *63*, 120–131.
- Herbison, A.E., de Tassigny, X. d'Anglemont, Doran, J., and Colledge, W.H. (2010). Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* *151*, 312–321.
- Hesam, A.A., Taghipour, L., Rasekhi, S., Fallahi, S., and Hesam, Z. (2017). Investigating the Multiple Aspects of Mental Health in Infertile Women. *Int. J. Ment. Health Addict.* *15*, 928–932.
- Higo, S., Honda, S., Iijima, N., and Ozawa, H. (2016). Mapping of Kisspeptin Receptor mRNA in the Whole Rat Brain and its Co-Localisation with Oxytocin in the Paraventricular Nucleus. *J. Neuroendocrinol.* *28*.

- Hilfiker, S., Pieribone, V.A., Czernik, A.J., Kao, H.T., Augustine, G.J., and Greengard, P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 269–279.
- Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., et al. (2000). New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat. Cell Biol.* 2, 703–708.
- Hirsch, H.J., Lahlou, N., Gillis, D., Strich, D., Rosenberg-Hagen, B., Chertin, B., Farkas, A., Hartman, H., and Spitz, I.M. (2010). Free alpha-subunit is the most sensitive marker of gonadotropin recovery after treatment of central precocious puberty with the histrelin implant. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2841–2844.
- Holmstrom, S.R., Chupreta, S., So, A.Y.-L., and Iñiguez-Lluhí, J.A. (2008). SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 2061–2075.
- Horton, C.D., and Halvorson, L.M. (2004). The cAMP signaling system regulates LHbeta gene expression: roles of early growth response protein-1, SP1 and steroidogenic factor-1. *J. Mol. Endocrinol.* 32, 291–306.
- Hosaka, M., Hammer, R.E., and Südhof, T.C. (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24, 377–387.
- Hrabovszky, E. (2014). Neuroanatomy of the Human Hypothalamic Kisspeptin System. *Neuroendocrinology* 99, 33–48.
- Hsueh, A.J., and Erickson, G.F. (1978). Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 32, 639–648.
- Hu, G., Lin, C., He, M., and Wong, A.O.L. (2014). Neurokinin B and reproductive functions: “KNDy neuron” model in mammals and the emerging story in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 208, 94–108.
- Huang, K., and El-Husseini, A. (2005). Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 527–535.
- Huang, T.-J., and Shirley Li, P. (2001). Dexamethasone Inhibits Luteinizing Hormone-Induced Synthesis of Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Cultured Rat Preovulatory Follicles. *Biol. Reprod.* 64, 163–170.
- Huang, X., and Harlan, R.E. (1993). Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res.* 624, 309–311.
- Huang, H.-J., Sebastian, J., Strahl, B.D., Wu, J.C., and Miller, W.L. (2001). Transcriptional Regulation of the Ovine Follicle-Stimulating Hormone- $\beta$  Gene by Activin and Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): Involvement of Two Proximal Activator Protein-1 Sites for GnRH Stimulation. *Endocrinology* 142, 2267–2274.

Hubler, T.R., and Scammell, J.G. (2004). Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids. *Cell Stress Chaperones* *9*, 243–252.

Hudson, W.H., Youn, C., and Ortlund, E.A. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 53–58.

Hunter, R.G., Gagnidze, K., McEwen, B.S., and Pfaff, D.W. (2015). Stress and the dynamic genome: Steroids, epigenetics, and the transposome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6828–6833.

## I

Ilgaz, N.S., Aydos, O.S.E., Karadag, A., Taspinar, M., Eryilmaz, O.G., and Sunguroglu, A. (2015). Impact of follicle-stimulating hormone receptor variants in female infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* *32*, 1659–1668.

Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* *80*, 264–272.

Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* *2*, 297–307.

Ismaili, N., Blind, R., and Garabedian, M.J. (2005). Stabilization of the unliganded glucocorticoid receptor by TSG101. *J. Biol. Chem.* *280*, 11120–11126.

Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J. Exp. Med.* *203*, 7–13.

Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., and Irahara, M. (2017). Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction. *Front. Endocrinol.* *8*.

Iwasaki-Sekino, A., Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Yamauchi, N., and Shibasaki, T. (2009). Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* *34*, 226–237.

## J

Jääskeläinen, T., Makkonen, H., and Palvimo, J.J. (2011). Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling. *Curr. Opin. Pharmacol.* *11*, 326–331.

Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C., and O’Rahilly, S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* *16*, 303–306.



- Jain, S., Li, Y., Kumar, A., and Sehgal, P.B. (2005). Transcriptional signaling from membrane raft-associated glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *336*, 3–8.
- Jiang, C.-L., Liu, L., Li, Z., and Buttgerit, F. (2015). The novel strategy of glucocorticoid drug development via targeting nongenomic mechanisms. *Steroids* *102*, 27–31.
- Jimena, P., Castilla, J.A., Peran, F., Ramirez, J.P., Vergara, F., Molina, R., Vergara, F., and Herruzo, A. (1992). Adrenal hormones in human follicular fluid. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* *127*, 403–406.
- John, S., Sabo, P.J., Thurman, R.E., Sung, M.-H., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Hager, G.L., and Stamatoyannopoulos, J.A. (2011). Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.* *43*, 264–268.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Hansen, M.K., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2003). Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *284*, R422–R432.
- Johnson, J.D., Campisi, J., Sharkey, C.M., Kennedy, S.L., Nickerson, M., Greenwood, B.N., and Fleshner, M. (2005a). Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neuroscience* *135*, 1295–1307.
- Johnson, L.R., Farb, C., Morrison, J.H., McEwen, B.S., and LeDoux, J.E. (2005b). Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience* *136*, 289–299.
- Johnson, M.A., Tsutsui, K., and Fraley, G.S. (2007). Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav.* *51*, 171–180.
- Joseph, D.N., and Whirledge, S. (2017). Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Jovanovic, J.N., Czernik, A.J., Fienberg, A.A., Greengard, P., and Sihra, T.S. (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* *3*, 323–329.
- Jovanovic, J.N., Sihra, T.S., Nairn, A.C., Hemmings, H.C., Greengard, P., and Czernik, A.J. (2001). Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7944–7953.

## **K**

- Kadmiel, M., and Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *34*, 518–530.
- Kaiser, U.B., Conn, P.M., and Chin, W.W. (2011). Studies of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Action Using GnRH Receptor-Expressing Pituitary Cell Lines<sup>1</sup>. *Endocr. Rev.*

- Kaltsas, G.A., Korbonits, M., Isidori, A.M., Webb, J.A., Trainer, P.J., Monson, J.P., Besser, G.M., and Grossman, A.B. (2000). How common are polycystic ovaries and the polycystic ovarian syndrome in women with Cushing's syndrome? *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 53, 493–500.
- Kanasaki, H., Bedecarrats, G.Y., Kam, K.-Y., Xu, S., and Kaiser, U.B. (2005). Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused LbetaT2 cells. *Endocrinology* 146, 5503–5513.
- Kanter, A.S., Diallo, A.O., Jane, J.A., Sheehan, J.P., Asthagiri, A.R., Oskouian, R.J., Okonkwo, D.O., Sansur, C.A., Vance, M.L., Rogol, A.D., et al. (2005). Single-center experience with pediatric Cushing's disease. *J. Neurosurg.* 103, 413–420.
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., and Tena-Sempere, M. (2007a). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148, 1774–1783.
- Kauffman, A.S., Park, J.H., McPhie-Lalmansingh, A.A., Gottsch, M.L., Bodo, C., Hohmann, J.G., Pavlova, M.N., Rohde, A.D., Clifton, D.K., Steiner, R.A., et al. (2007b). The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 8826–8835.
- Kaur, M., Smyth, L.J., Cadden, P., Grundy, S., Ray, D., Plumb, J., and Singh, D. (2012). T lymphocyte insensitivity to corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* 13, 20.
- Kaynard, A.H., Pau, K.-Y.F., Hess, D.L., and Spies, H.G. (1990). Third-Ventricular Infusion of Neuropeptide Y Suppresses Luteinizing Hormone Secretion in Ovariectomized Rhesus Macaques. *Endocrinology* 127, 2437–2444.
- Keller-Wood, M. (2015). Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control. *Compr. Physiol.* 5, 1161–1182.
- Kelly, W.F. (1996). Psychiatric aspects of Cushing's syndrome. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* 89, 543–551.
- Khan, J.A., Bellance, C., Guiochon-Mantel, A., Lombès, M., and Loosfelt, H. (2012). Differential Regulation of Breast Cancer-Associated Genes by Progesterone Receptor Isoforms PRA and PRB in a New Bi-Inducible Breast Cancer Cell Line. *PLOS ONE* 7, e45993.
- Khorram, O., Pau, K.Y., and Spies, H.G. (1988). Release of hypothalamic neuropeptide Y and effects of exogenous NPY on the release of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins in intact and ovariectomized does in vitro. *Peptides* 9, 411–417.
- Kiesel, L., Bertges, K., Rabe, T., and Runnebaum, B. (1986). Gonadotropin releasing hormone enhances polyphosphoinositide hydrolysis in rat pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 861–867.

- Kim, H.-G., Pedersen-White, J., Bhagavath, B., and Layman, L.C. (2010). The Genotype and Phenotype of Patients with Gonadotropin Releasing Hormone Receptor Mutations. *Front. Horm. Res.* *39*, 94–110.
- Kimura, F., and Jinnai, K. (1994). Bicuculline infusions advance the timing of luteinizing hormone surge in proestrous rats: comparisons with naloxone effects. *Horm. Behav.* *28*, 424–430.
- King, J.A., and Millar, R.P. (1979). Heterogeneity of vertebrate luteinizing hormone-releasing hormone. *Science* *206*, 67–69.
- Kino, T., Su, Y.A., and Chrousos, G.P. (2009). Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 3435–3448.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., et al. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* *146*, 4431–4436.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Luckman, S.M., and O’Byrne, K.T. (2008). Effects of kisspeptin-10 on the electrophysiological manifestation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female rat. *Endocrinology* *149*, 1004–1008.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Knox, A.M.I., Wilkinson, E.S., Zhu, X.L., Chaudhary, A.A., Milligan, S.R., Lightman, S.L., and O’Byrne, K.T. (2009). Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 20–29.
- Kinyamu, H.K., Chen, J., and Archer, T.K. (2005). Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J. Mol. Endocrinol.* *34*, 281–297.
- Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., and Kaufer, D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11324–11329.
- Knobil, E. (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* *36*, 53–88.
- Knoll, A.T., and Carlezon, W.A. (2010). Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res.* *1314C*, 56.
- Kononen, J., Honkaniemi, J., Gustafsson, J.A., and Peltö-Huikko, M. (1993). Glucocorticoid receptor colocalization with pituitary hormones in the rat pituitary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* *93*, 97–103.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., et al. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* *276*, 34631–34636.

Koukouritaki, S.B., Theodoropoulos, P.A., Margioris, A.N., Gravanis, A., and Stournaras, C. (1996). Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. *J. Cell. Biochem.* *62*, 251–261.

Kourides, I.A., Landon, M.B., Hoffman, B.J., and Weintraub, B.D. (1980). Excess free alpha relative to beta subunits of the glycoprotein hormones in normal and abnormal human pituitary glands. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *12*, 407–416.

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15677–15682.

Krett, N.L., Pillay, S., Moalli, P.A., Greipp, P.R., and Rosen, S.T. (1995). A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res.* *55*, 2727–2729.

Krey, L.C., Tyrey, L., and Everett, J.W. (1973). The Estrogen-Induced Advance in the Cyclic LH Surge in the Rat: Dependency on Ovarian Progesterone Secretion. *Endocrinology* *93*, 385–390.

Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., and Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2410–2415.

Kriegsfeld, L.J., Gibson, E.M., Williams, W.P., Zhao, S., Mason, A.O., Bentley, G.E., and Tsutsui, K. (2010). The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. *J. Neuroendocrinol.* *22*, 692–700.

Kriegsfeld, L.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., and Tsutsui, K. (2015). Seasonal control of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Front. Neuroendocrinol.* *37*, 65–75.

Kumar, R., and Calhoun, W.J. (2008). Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biol. Targets Ther.* *2*, 845–854.

Kumar, R., and Thompson, E.B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* *64*, 310–319.

Kumar, R., and Thompson, E.B. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 1–10.

## L

Lado-Abeal, J., Rodriguez-Arnao, J., Newell-Price, J.D.C., Perry, L.A., Grossman, A.B., Besser, G.M., and Trainer, P.J. (1998). Menstrual Abnormalities in Women with Cushing's Disease Are Correlated with Hypercortisolemia Rather Than Raised Circulating Androgen Levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 3083–3088.

Lahera Vargas, M., and da Costa, C.V. (2009). [Prevalence, etiology and clinical findings of Cushing's syndrome]. *Endocrinol. Nutr. Organo Soc. Espanola Endocrinol. Nutr.* *56*, 32–39.

- de Lange, P., Segeren, C.M., Koper, J.W., Wiemer, E., Sonneveld, P., Brinkmann, A.O., White, A., Brogan, I.J., de Jong, F.H., and Lamberts, S.W. (2001). Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res.* *61*, 3937–3941.
- Laryea, G., Muglia, L., Arnett, M., and Muglia, L.J. (2015). Dissection of Glucocorticoid Receptor-mediated Inhibition of the Hypothalamic-pituitary-adrenal Axis by Gene Targeting in Mice. *Front. Neuroendocrinol.* *0*, 150–164.
- Lawson, M.A., Tsutsumi, R., Zhang, H., Talukdar, I., Butler, B.K., Santos, S.J., Mellon, P.L., and Webster, N.J.G. (2007). Pulse Sensitivity of the Luteinizing Hormone  $\beta$  Promoter Is Determined by a Negative Feedback Loop Involving Early Growth Response-1 and Ngfi-A Binding Protein 1 and 2. *Mol. Endocrinol.* *21*, 1175–1191.
- Layman, L.C., Cohen, D.P., Jin, M., Xie, J., Li, Z., Reindollar, R.H., Bolbolan, S., Bick, D.P., Sherins, R.R., Duck, L.W., et al. (1998). Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat. Genet.* *18*, 14–15.
- Layman, L.C., Porto, A.L.A., Xie, J., da Motta, L.A.C.R., da Motta, L.D.C., Weiser, W., and Sluss, P.M. (2002). FSH beta gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 3702–3707.
- Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., and Michel, D. (2002). Potentiation of Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activity by Sumoylation. *Endocrinology* *143*, 3482–3489.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 862–864.
- Lee, A.K., Tse, F.W., and Tse, A. (2015). Arginine Vasopressin Potentiates the Stimulatory Action of CRH on Pituitary Corticotropes via a Protein Kinase C–Dependent Reduction of the Background TREK-1 Current. *Endocrinology* *156*, 3661–3672.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., and Welch, D.R. (1996a). KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* *88*, 1731–1737.
- Lee, K., Porteous, R., Campbell, R.E., Lüscher, B., and Herbison, A.E. (2010). Knockdown of GABA(A) receptor signaling in GnRH neurons has minimal effects upon fertility. *Endocrinology* *151*, 4428–4436.
- Lee, R.S., Tamashiro, K.L.K., Yang, X., Purcell, R.H., Huo, Y., Rongione, M., Potash, J.B., and Wand, G.S. (2011). A measure of glucocorticoid load provided by DNA methylation of Fkbp5 in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *218*, 303–312.
- Lee, S.L., Sadovsky, Y., Swirnoff, A.H., Polish, J.A., Goda, P., Gavriline, G., and Milbrandt, J. (1996b). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (*Egr-1*). *Science* *273*, 1219–1221.

- Lehman, M.N., Ebling, F.J., Moenter, S.M., and Karsch, F.J. (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinology* *133*, 876–886.
- Lehman, M.N., Coolen, L.M., and Goodman, R.L. (2010a). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* *151*, 3479–3489.
- Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., and Goodman, R.L. (2010b). Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* *1364*, 90–102.
- Leipheimer, R.E., Bona-Gallo, A., and Gallo, R.V. (1984). The influence of progesterone and estradiol on the acute changes in pulsatile luteinizing hormone release induced by ovariectomy on diestrus day 1 in the rat. *Endocrinology* *114*, 1605–1612.
- Leite, C.M., Kalil, B., Uchôa, E.T., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.K.L., Levine, J.E., and Anselmo-Franci, J.A. (2016). Progesterone-induced amplification and advancement of GnRH/LH surges are associated with changes in kisspeptin system in preoptic area of estradiol-primed female rats. *Brain Res.* *1650*, 21–30.
- Lemos, J.C., Roth, C.A., Messinger, D.I., Gill, H.K., Phillips, P.E.M., and Chavkin, C. (2012). Repeated Stress Dysregulates  $\kappa$ -Opioid Receptor Signaling in the Dorsal Raphe through a p38 $\alpha$  MAPK-Dependent Mechanism. *J. Neurosci.* *32*, 12325–12336.
- Leon, S., and Tena-Sempere, M. (2016). Dissecting the Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Mammals: Studies Using Pharmacological Tools and Genetically Modified Mouse Models. *Front. Endocrinol.* *6*.
- León, S., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Roa, J., Vázquez, M.J., Gaytan, F., Blomenrohr, M., et al. (2014). Physiological Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Signaling in the Control of Mammalian Reproductive Axis: Studies in the NPFF1 Receptor Null Mouse. *Endocrinology* *155*, 2953–2965.
- Leranth, C., MacLusky, N.J., Sakamoto, H., Shanabrough, M., and Naftolin, F. (1985). Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* *40*, 536–539.
- Levine, J.E., and Ramirez, V.D. (1980). In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology* *107*, 1782–1790.
- Lewis-Tuffin, L.J., and Cidlowski, J.A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1069*, 1–9.
- Li, P.S. (1994). Modulation by cortisol of luteinizing hormone secretion from cultured porcine anterior pituitary cells: effects on secretion induced by phospholipase C, phorbol ester and cAMP. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *349*, 107–112.

- Li, C., Chen, P., and Smith, M.S. (1999). Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* *140*, 5382–5390.
- Li, D., Mitchell, D., Luo, J., Yi, Z., Cho, S.-G., Guo, J., Li, X., Ning, G., Wu, X., and Liu, M. (2007). Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology* *148*, 4821–4828.
- Lightman, S.L. (2008). The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 880–884.
- Lightman, S.L., and Conway-Campbell, B.L. (2010). The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 710–718.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., and Miller, W.L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* *267*, 1828–1831.
- Lin, S., Boey, D., and Herzog, H. (2004). NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* *38*, 189–200.
- Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 74–84.
- Lindholm, J., Juul, S., Jørgensen, J.O., Astrup, J., Bjerre, P., Feldt-Rasmussen, U., Hagen, C., Jørgensen, J., Kosteljanetz, M., Kristensen, L., et al. (2001). Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 117–123.
- Liposits, Z., and Bohn, M.C. (1993). Association of glucocorticoid receptor immunoreactivity with cell membrane and transport vesicles in hippocampal and hypothalamic neurons of the rat. *J. Neurosci. Res.* *35*, 14–19.
- Lipworth, B.J. (2000). Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. *Lancet Lond. Engl.* *356*, 87–89.
- Liu, X., and Herbison, A.E. (2016). Kisspeptin Regulation of Neuronal Activity throughout the Central Nervous System. *Endocrinol. Metab.* *31*, 193–205.
- Lofrano-Porto, A., Barra, G.B., Giacomini, L.A., Nascimento, P.P., Latronico, A.C., Casulari, L.A., and da Rocha Neves, F. de A. (2007). Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. *N. Engl. J. Med.* *357*, 897–904.
- Loh, K., Herzog, H., and Shi, Y.-C. (2015). Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 125–135.
- Long, F., Wang, Y.-X., Liu, L., Zhou, J., Cui, R.-Y., and Jiang, C.-L. (2005). Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids* *70*, 55–61.

- Lonser, R.R., Wind, J.J., Nieman, L.K., Weil, R.J., DeVroom, H.L., and Oldfield, E.H. (2013). Outcome of surgical treatment of 200 children with Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 892–901.
- Lonser, R.R., Nieman, L., and Oldfield, E.H. (2017). Cushing's disease: pathobiology, diagnosis, and management. *J. Neurosurg.* *126*, 404–417.
- Loose, D.S., Do, Y.S., Chen, T.L., and Feldman, D. (1980). Demonstration of glucocorticoid receptors in the adrenal cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. *Endocrinology* *107*, 137–146.
- Lopes, P.C., Wingfield, J.C., and Bentley, G.E. (2012). Lipopolysaccharide injection induces rapid decrease of hypothalamic GnRH mRNA and peptide, but does not affect GnIH in zebra finches. *Horm. Behav.* *62*, 173–179.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.-C., Rossol-Haseroth, K., and Wehling, M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol. Rev.* *83*, 965–1016.
- Louiset, E., Stratakis, C.A., Perraudin, V., Griffin, K.J., Libé, R., Cabrol, S., Fève, B., Young, J., Groussin, L., Bertherat, J., et al. (2009). The Paradoxical Increase in Cortisol Secretion Induced by Dexamethasone in Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease Involves a Glucocorticoid Receptor-Mediated Effect of Dexamethasone on Protein Kinase A Catalytic Subunits. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 2406–2413.
- Louiset, E., Duparc, C., Young, J., Renouf, S., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Libé, R., Bram, Z., Groussin, L., Caron, P., et al. (2013). Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2115–2125.
- Löwenberg, M., Tuynman, J., Bilderbeek, J., Gaber, T., Buttgereit, F., van Deventer, S., Peppelenbosch, M., and Hommes, D. (2005). Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* *106*, 1703–1710.
- Löwenberg, M., Stahn, C., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2008). Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* *73*, 1025–1029.
- Lozach, A., Garrel, G., Lerrant, Y., Bérault, A., and Counis, R. (1998). GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus. *Mol. Cell. Endocrinol.* *143*, 43–51.
- Lu, N.Z., and Cidlowski, J.A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell* *18*, 331–342.
- Lu, N.Z., Collins, J.B., Grissom, S.F., and Cidlowski, J.A. (2007). Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7143–7160.



Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11162–11166.

Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* *352*, 497–505.

Luo, E., Stephens, S.B.Z., Chaing, S., Munaganuru, N., Kauffman, A.S., and Breen, K.M. (2016). Corticosterone Blocks Ovarian Cyclicity and the LH Surge via Decreased Kisspeptin Neuron Activation in Female Mice. *Endocrinology* *157*, 1187–1199.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* *9*, 2266–2278.

Lynch, C.D., Sundaram, R., Maisog, J.M., Sweeney, A.M., and Buck Louis, G.M. (2014). Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study--the LIFE study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *29*, 1067–1075.

## M

M. Ayrout, V. Simon, V. Bernard, N. Binart, J. Cohen-Tannoudji, M. Lombès, and S. Chauvin (2017). A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells.

Ma, X.M., Camacho, C., and Aguilera, G. (2001). Regulation of corticotropin-releasing hormone (CRH) transcription and CRH mRNA stability by glucocorticoids. *Cell. Mol. Neurobiol.* *21*, 465–475.

Maeda, K.-I., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., and Okamura, H. (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.* *1364*, 103–115.

Maier, C., Rünzler, D., Schindelar, J., Grabner, G., Waldhäusl, W., Köhler, G., and Luger, A. (2005). G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *J. Cell Sci.* *118*, 3353–3361.

Maione et al (2017). Contrôle de l'axe gonadotrope : nouveaux aspects physiologiques et thérapeutiques: Control of the gonadotrope axis: new physiologic and therapeutic... - PubMed - NCBI.

Majdoubi, M.E., Sahu, A., Ramaswamy, S., and Plant, T.M. (2000). Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6179–6184.

Malven, P.V., Haglof, S.A., and Degroot, H. (1992). Effects of intracerebral administration of neuropeptide-Y on secretion of luteinizing hormone in ovariectomized sheep. *Brain Res. Bull.* *28*, 871–875.

- Maneix, L., Antonson, P., Humire, P., Rochel-Maia, S., Castañeda, J., Omoto, Y., Kim, H.-J., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor  $\beta$  exon 3-deleted mouse: The importance of non-ERE pathways in ER $\beta$  signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 5135–5140.
- Mansour, A., Burke, S., Pavlic, R.J., Akil, H., and Watson, S.J. (1996). Immunohistochemical localization of the cloned kappa 1 receptor in the rat CNS and pituitary. *Neuroscience* *71*, 671–690.
- Manwani, N., Gagnon, S., Post, M., Joza, S., Muglia, L., Cornejo, S., Kaplan, F., and Sweezey, N.B. (2010). Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *43*, 599–606.
- Marie Saint-Dizier (2014). *La reproduction animale et humaine*. p.
- Marino, M., and Ascenzi, P. (2006). Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation. *IUBMB Life* *58*, 716–719.
- Marshall, J.C., Eagleson, C.A., and McCartney, C.R. (2001). Hypothalamic dysfunction. *Mol. Cell. Endocrinol.* *183*, 29–32.
- Martin, C., Navarro, V.M., Simavli, S., Vong, L., Carroll, R.S., Lowell, B.B., and Kaiser, U.B. (2014). Leptin-responsive GABAergic neurons regulate fertility through pathways that result in reduced kisspeptinergic tone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 6047–6056.
- Mashiko, S., Moriya, R., Ishihara, A., Gomori, A., Matsushita, H., Egashira, S., Iwaasa, H., Takahashi, T., Haga, Y., Fukami, T., et al. (2009). Synergistic interaction between neuropeptide Y1 and Y5 receptor pathways in regulation of energy homeostasis. *Eur. J. Pharmacol.* *615*, 113–117.
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Zoeller, R.T., Young, W.S., Phillips, H.S., Nikolics, K., and Seeburg, P.H. (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* *234*, 1366–1371.
- Mason, A.O., Greives, T.J., Scotti, M.-A.L., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E.D., Demas, G.E., and Kriegsfeld, L.J. (2007). Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters. *Horm. Behav.* *52*, 492–498.
- Matsuda, M., Tsutsumi, K., Kanematsu, T., Fukami, K., Terada, Y., Takenawa, T., Nakayama, K.I., and Hirata, M. (2009). Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol. Reprod.* *81*, 681–689.
- Matthews, C., and Chatterjee, V.K. (1997). Isolated deficiency of follicle-stimulating hormone revisited. *N. Engl. J. Med.* *337*, 642.
- Matthews, L., Berry, A., Ohanian, V., Ohanian, J., Garside, H., and Ray, D. (2008). Caveolin mediates rapid glucocorticoid effects and couples glucocorticoid action to the antiproliferative program. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 1320–1330.
- Mayer, C.M., Fick, L.J., Gingerich, S., and Belsham, D.D. (2009). Hypothalamic cell lines to investigate neuroendocrine control mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* *30*, 405–423.

- McCartney, C.R., and Marshall, J.C. (2016). CLINICAL PRACTICE. Polycystic Ovary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *375*, 54–64.
- McCartney, C.R., Gingrich, M.B., Hu, Y., Evans, W.S., and Marshall, J.C. (2002). Hypothalamic Regulation of Cyclic Ovulation: Evidence That the Increase in Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Frequency during the Follicular Phase Reflects the Gradual Loss of the Restraining Effects of Progesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 2194–2200.
- McEwen, B.S., Bowles, N.P., Gray, J.D., Hill, M.N., Hunter, R.G., Karatsoreos, I.N., and Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nat. Neurosci.* *18*, 1353–1363.
- McGuire, N.L., and Bentley, G.E. (2010). Neuropeptides in the gonads: from evolution to pharmacology. *Front. Pharmacol.* *1*, 114.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2001). Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *949*, 3–5.
- McNay, E.C., Fries, T.M., and Gold, P.E. (2000). Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 2881–2885.
- McNeilly, A.S., Crawford, J.L., Taragnat, C., Nicol, L., and McNeilly, J.R. (2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod. Camb. Engl. Suppl.* *61*, 463–476.
- Meaney, M.J., Szyf, M., and Seckl, J.R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol. Med.* *13*, 269–277.
- Mehler, M.F. (2008). Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog. Neurobiol.* *86*, 305–341.
- Meijsing, S.H., Pufall, M.A., So, A.Y., Bates, D.L., Chen, L., and Yamamoto, K.R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* *324*, 407–410.
- Melamed, P. (2008). Histone deacetylases and repression of the gonadotropin genes. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *19*, 25–31.
- Melamed, P., Savulescu, D., Lim, S., Wijeweera, A., Luo, Z., Luo, M., and Pnueli, L. (2012). Gonadotrophin-releasing hormone signalling downstream of calmodulin. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 1463–1475.
- Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L., and Weiner, R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* *5*, 1–10.
- Mercer, W., Obeyesekere, V., Smith, R., and Krozowski, Z. (1993). Characterization of 11 $\beta$ -HSD1B gene expression and enzymatic activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* *92*, 247–251.

- Merchenthaler, I., Maderdrut, J.L., Cianchetta, P., Shughrue, P., and Bronstein, D. (1997). In situ hybridization histochemical localization of prodynorphin messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* *384*, 211–232.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., et al. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1761–1766.
- Mi, Y., Fiete, D., and Baenziger, J.U. (2008). Ablation of GalNAc-4-sulfotransferase-1 enhances reproduction by altering the carbohydrate structures of luteinizing hormone in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1815–1824.
- Michael, A.E., Pester, L.A., Curtis, P., Shaw, R.W., Edwards, C.R.W., and Cooke, B.A. (1993). Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by Cortisol and the modulatory role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *38*, 641–644.
- Michael, A.E., Collins, T.D., Norgate, D.P., Gregory, L., Wood, P.J., and Cooke, B.A. (1999). Relationship between ovarian cortisol:cortisone ratios and the clinical outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *51*, 535–540.
- Mihrshahi, R., Lewis, J.G., and Ali, S.O. (2006). Hormonal effects on the secretion and glycoform profile of corticosteroid-binding globulin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *101*, 275–285.
- Mijiddorj, T., Kanasaki, H., Purwana, I.N., Oride, A., Sukhbaatar, U., and Miyazaki, K. (2012). Role of Neurokinin B and Dynorphin A in pituitary gonadotroph and somatolactotroph cell lines. *Endocr. J.* *59*, 631–640.
- Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2009). The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* *30*, 26–33.
- Millar, R.P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Anim. Reprod. Sci.* *88*, 5–28.
- Millar, R.P., Sonigo, C., Anderson, R.A., George, J., Maione, L., Brailly-Tabard, S., Chanson, P., Binart, N., and Young, J. (2017). Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Reactivation by Kisspeptin-10 in Hyperprolactinemic Women With Chronic Amenorrhea. *J. Endocr. Soc.* *1*, 1362–1371.
- Miller, S.G., and Kennedy, M.B. (1986). Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell* *44*, 861–870.
- Miranda, T.B., Voss, T.C., Sung, M.-H., Baek, S., John, S., Hawkins, M., Grøntved, L., Schiltz, R.L., and Hager, G.L. (2013). Reprogramming the chromatin landscape: interplay of the estrogen and glucocorticoid receptors at the genomic level. *Cancer Res.* *73*, 5130–5139.
- Mitri, F., Bentov, Y., Behan, L.A., Esfandiari, N., and Casper, R.F. (2014). A novel compound heterozygous mutation of the luteinizing hormone receptor –implications for fertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* *31*, 787–794.

- Mittelman-Smith, M.A., Wong, A.M., Kathiresan, A.S.Q., and Micevych, P.E. (2015). Classical and membrane-initiated estrogen signaling in an in vitro model of anterior hypothalamic kisspeptin neurons. *Endocrinology* *156*, 2162–2173.
- Mittelman-Smith, M.A., Wong, A.M., and Micevych, P.E. (2018). Estrogen and Progesterone Integration in an in vitro Model of RP3V Kisspeptin Neurons. *Neuroendocrinology* *106*, 101–115.
- Moalli, P.A., Pillay, S., Krett, N.L., and Rosen, S.T. (1993). Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* *53*, 3877–3879.
- Moenter, S.M., and Chu, Z. (2012). Rapid nongenomic effects of oestradiol on gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 117–121.
- Moisan, M.-P. (2013). CBG: a cortisol reservoir rather than a transporter. *Nat. Rev. Endocrinol.* *9*, 78.
- Moisan, M.P., Minni, A.M., Dominguez, G., Helbling, J.C., Foury, A., Henkous, N., Dorey, R., and Béracochéa, D. (2014). Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. *Steroids* *81*, 109–115.
- Monder, C., and Lakshmi, V. (1990). Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase of rat tissues: immunological studies. *Endocrinology* *126*, 2435–2443.
- Mori, Y., Nishihara, M., Tanaka, T., Shimizu, T., Yamaguchi, M., Takeuchi, Y., and Hoshino, K. (1991). Chronic recording of electrophysiological manifestation of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the goat. *Neuroendocrinology* *53*, 392–395.
- Mostari, M.P., IEDA, N., DEURA, C., MINABE, S., YAMADA, S., UENOYAMA, Y., MAEDA, K., and TSUKAMURA, H. (2013). Dynorphin-Kappa Opioid Receptor Signaling Partly Mediates Estrogen Negative Feedback Effect on LH Pulses in Female Rats. *J. Reprod. Dev.* *59*, 266–272.
- Msaouel, P., Diamanti, E., Tzanela, M., and Koutsilieris, M. (2007). Luteinising hormone-releasing hormone antagonists in prostate cancer therapy. *Expert Opin. Emerg. Drugs* *12*, 285–299.
- Mulac-Jericevic, B., and Conneely, O.M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* *128*, 139–146.
- French-Mullen, J.M. (1995). Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. *J. Neurosci.* *15*, 903–911.
- Munhoz, C.D., Lepsch, L.B., Kawamoto, E.M., Malta, M.B., Lima, L. de S., Avellar, M.C.W., Sapolsky, R.M., and Scavone, C. (2006). Chronic Unpredictable Stress Exacerbates Lipopolysaccharide-Induced Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B in the Frontal Cortex and Hippocampus via Glucocorticoid Secretion. *J. Neurosci.* *26*, 3813–3820.
- Murata, I., Ooi, K., Shoji, S., Motohashi, Y., Kan, M., Ohtake, K., Kimura, S., Ueda, H., Nakano, G., Sonoda, K., et al. (2013). Acute lethal crush-injured rats can be successfully rescued by a single

injection of high-dose dexamethasone through a pathway involving PI3K-Akt-eNOS signaling. *J. Trauma Acute Care Surg.* 75, 241–249.

Muroi, Y., and Ishii, T. (2015). Neuropeptide Y is crucial for nutritional state-dependent regulation of maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology* 51, 392–402.

Muroi, Y., and Ishii, T. (2016). A novel neuropeptide Y neuronal pathway linking energy state and reproductive behavior. *Neuropeptides* 59, 1–8.

Muroya, S., Funahashi, H., Uramura, K., Shioda, S., and Yada, T. (2005). Gamma aminobutyric acid regulates glucosensitive neuropeptide Y neurons in arcuate nucleus via A/B receptors. *Neuroreport* 16, 897–901.

Murrey, H.E., Gama, C.I., Kalovidouris, S.A., Luo, W.-I., Driggers, E.M., Porton, B., and Hsieh-Wilson, L.C. (2006). Protein fucosylation regulates synapsin Ia/Ib expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 21–26.

Myers, B., McKlveen, J.M., and Herman, J.P. (2012). Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell. Mol. Neurobiol.*

## N

Nabeshima, T., Katoh, A., Wada, M., and Kameyama, T. (1992). Stress-induced changes in brain Met-enkephalin, Leu-enkephalin and dynorphin concentrations. *Life Sci.* 51, 211–217.

Nabi, G., Muhammad, H., Ali, S., and Ullah, S. (2015). Kisspeptin, its Localization and Physiological Functions in Primates: A Review. 8.

Nagirnaja, L., Rull, K., Uusküla, L., Hallast, P., Grigorova, M., and Laan, M. (2010). Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: Unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci. *Mol. Cell. Endocrinol.* 329, 4–16.

Nahar, J., Rainville, J.R., Dohanich, G.P., and Tasker, J.G. (2016). Further evidence for a membrane receptor that binds glucocorticoids in the rodent hypothalamus. *Steroids* 114, 33–40.

Naor, Z. (1990). Further characterization of protein kinase-C subspecies in the hypothalamo-pituitary axis: differential activation by phorbol esters. *Endocrinology* 126, 1521–1526.

Narlikar, G.J., Sundaramoorthy, R., and Owen-Hughes, T. (2013). Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. *Cell* 154, 490–503.

Naulé, L., and Mhaouty-Kodja, S. (2016). [The neural estrogen receptor beta, a new player in female pubertal maturation]. *Med. Sci. MS* 32, 452–455.

Naulé, L., Marie-Luce, C., Parmentier, C., Martini, M., Albac, C., Trouillet, A.-C., Keller, M., Hardin-Pouzet, H., and Mhaouty-Kodja, S. (2016). Revisiting the neural role of estrogen receptor beta in male sexual behavior by conditional mutagenesis. *Horm. Behav.* 80, 1–9.

- Navarro, V.M. (2012). New Insights into the Control of Pulsatile GnRH Release: The Role of Kiss1/Neurokinin B Neurons. *Front. Endocrinol.* 3.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2004). 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* 145, 4565–4574.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., et al. (2005a). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146, 156–163.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., et al. (2005b). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146, 1689–1697.
- Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Vigo, E., Tovar, S., Chartrel, N., Le Marec, O., Leprince, J., Aguilar, E., Pinilla, L., et al. (2006). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J. Physiol.* 573, 237–249.
- Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 11859–11866.
- Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A.B., and Nieman, L.K. (2006). Cushing's syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 367, 1605–1617.
- Nicol, L., McNeilly, J.R., Stridsberg, M., and McNeilly, A.S. (2004). Differential secretion of gonadotrophins: investigation of the role of secretogranin II and chromogranin A in the release of LH and FSH in LbetaT2 cells. *J. Mol. Endocrinol.* 32, 467–480.
- Nicolaidis, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., and Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75, 1–12.
- Nobukuni, Y., Smith, C.L., Hager, G.L., and Detera-Wadleigh, S.D. (1995). Characterization of the human glucocorticoid receptor promoter. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 8207–8214.
- Noel, S.D., and Kaiser, U.B. (2011). G Protein-Coupled Receptors Involved in GnRH Regulation: Molecular Insights from Human Disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 346, 91–101.
- Nowakowski, B.E., Okimura, Y., and Maurer, R.A. (1997). Characterization of DNA regions mediating the ability of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II to stimulate prolactin promoter activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 132, 109–116.

Nunez, B.S., Geng, C.-D., Pedersen, K.B., Millro-Macklin, C.D., and Vedeckis, W.V. (2005). Interaction between the interferon signaling pathway and the human glucocorticoid receptor gene 1A promoter. *Endocrinology* *146*, 1449–1457.

Nusinzon, I., and Horvath, C.M. (2005). Histone Deacetylases as Transcriptional Activators? Role Reversal in Inducible Gene Regulation. *Sci. Signal.* *2005*, re11-re11.

## O

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2011a). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* *286*, 3177–3184.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2011b). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* *286*, 3177–3184.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2013a). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 1033–1044.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2013b). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 1033–1044.

Oakley, A.E., Breen, K.M., Clarke, I.J., Karsch, F.J., Wagenmaker, E.R., and Tilbrook, A.J. (2009). Cortisol reduces gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. *Endocrinology* *150*, 341–349.

Oakley, R.H., Revollo, J., and Cidlowski, J.A. (2012). Glucocorticoids regulate arrestin gene expression and redirect the signaling profile of G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17591–17596.

Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R.A., Tsukamura, H., et al. (2009). Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 813–821.

Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T., and Igarashi, Y. (2006). Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1761*, 474–483.

Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A.-S., Matagne, V., and Mungenast, A.E. (2006). Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* *147*, 1166–1174.

Ojeda, S.R., Dubay, C., Lomniczi, A., Kaidar, G., Matagne, V., Sandau, U.S., and Dissen, G.A. (2010). Gene Networks and the Neuroendocrine Regulation of Puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* *324*, 3–11.



Okamoto, K., Tanaka, H., Ogawa, H., Makino, Y., Eguchi, H., Hayashi, S., Yoshikawa, N., Poellinger, L., Umesono, K., and Makino, I. (1999). Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 10363–10371.

Okubo, K., and Nagahama, Y. (2008). Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol.* *193*, 3–15.

Olazábal, U.E., Pfaff, D.W., and Mobbs, C.V. (1992). Sex differences in the regulation of heat shock protein 70 kDa and 90 kDa in the rat ventromedial hypothalamus by estrogen. *Brain Res.* *596*, 311–314.

Onofri, F., Messa, M., Matafora, V., Bonanno, G., Corradi, A., Bachi, A., Valtorta, F., and Benfenati, F. (2007). Synapsin phosphorylation by SRC tyrosine kinase enhances SRC activity in synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* *282*, 15754–15767.

Orth, D.N. (1995). Cushing's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *332*, 791–803.

Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M.W., and Eichele, G. (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* *4*, 163–173.

Ottem, E.N., Godwin, J.G., Krishnan, S., and Petersen, S.L. (2004). Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8097–8105.

## P

Padmanabhan, V., Keech, C., and Convey, E.M. (1983). Cortisol Inhibits and Adrenocorticotropin Has No Effect on Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-Induced Release of Luteinizing Hormone from Bovine Pituitary Cells in Vitro. *Endocrinology* *112*, 1782–1787.

Padmanabhan, V., Lang, L.L., Sonstein, J., Kelch, R.P., and Beitins, I.Z. (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *67*, 465–473.

Paliogianni, F., Hama, N., Balow, J.E., Valentine, M.A., and Boumpas, D.T. (1995). Glucocorticoid-mediated regulation of protein phosphorylation in primary human T cells. Evidence for induction of phosphatase activity. *J. Immunol.* *155*, 1809–1817.

Pals, K., Roudbaraki, M., and Deneff, C. (2008). Growth hormone-releasing hormone and glucocorticoids determine the balance between luteinising hormone (LH) beta- and LH beta/follicle-stimulating hormone beta-positive gonadotrophs and somatotrophs in the 14-day-old rat pituitary tissue in aggregate cell culture. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 535–548.

Pan, D., Kocherginsky, M., and Conzen, S.D. (2011). Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res.* *71*, 6360–6370.

- Papargiris, M.M., Rivalland, E.T.A., Clarke, I.J., Smith, J.T., Pereira, A., and Tilbrook, A.J. (2011). Evidence that RF-amide related peptide-3 is not a mediator of the inhibitory effects of psychosocial stress on gonadotrophin secretion in ovariectomised ewes. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 208–215.
- Park, Y.-K., and Ge, K. (2017). Glucocorticoid Receptor Accelerates, but Is Dispensable for, Adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *37*.
- Parsons, T.F., and Pierce, J.G. (1980). Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: bovine lutropin resists enzymatic deglycosylation because of terminal O-sulfated N-acetylhexosamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7089–7093.
- Pasquali, R., Patton, L., and Gambineri, A. (2007). Obesity and infertility. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* *14*, 482–487.
- Patel, G.C., Liu, Y., Millar, J.C., and Clark, A.F. (2018). Glucocorticoid receptor GR $\beta$  regulates glucocorticoid-induced ocular hypertension in mice. *Sci. Rep.* *8*, 862.
- Paulsen, S.K., Pedersen, S.B., Fisker, S., and Richelsen, B. (2007). 11 $\beta$ -HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization. *Obes. Silver Spring Md* *15*, 1954–1960.
- Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R.C.A., Kim, J.K., Hughes, C.C., and Levin, E.R. (2007). A Conserved Mechanism for Steroid Receptor Translocation to the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* *282*, 22278–22288.
- Peffer, M.E., Chandran, U.R., Luthra, S., Volonte, D., Galbiati, F., Garabedian, M.J., Monaghan, A.P., and DeFranco, D.B. (2014). Caveolin-1 regulates genomic action of the glucocorticoid receptor in neural stem cells. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 2611–2623.
- Perrett, R.M., and McArdle, C.A. (2013). Molecular Mechanisms of Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling: Integrating Cyclic Nucleotides into the Network. *Front. Endocrinol.* *4*.
- Piekarski, D.J., Zhao, S., Jennings, K.J., Iwasa, T., Legan, S.J., Mikkelsen, J.D., Tsutsui, K., and Kriegsfeld, L.J. (2013). Gonadotropin-inhibitory hormone reduces sexual motivation but not lordosis behavior in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Horm. Behav.* *64*, 501–510.
- Pierce, J.G., and Parsons, T.F. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* *50*, 465–495.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 639–650.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2010a). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* *151*, 722–730.

Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blomenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., et al. (2010b). Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *299*, E39–E46.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2012a). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* *92*, 1235–1316.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., and Tena-Sempere, M. (2012b). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* *92*, 1235–1316.

Plotsky, P.M., Otto, S., and Sapolsky, R.M. (1986). Inhibition of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation by delayed glucocorticoid feedback. *Endocrinology* *119*, 1126–1130.

Poling, M.C., and Kauffman, A.S. (2013). Organizational and activational effects of sex steroids on kisspeptin neuron development. *Front. Neuroendocrinol.* *34*, 3–17.

Poling, M.C., Kim, J., Dhamija, S., and Kauffman, A.S. (2012). Development, Sex Steroid Regulation, and Phenotypic Characterization of RFamide-Related Peptide (Rfrp) Gene Expression and RFamide Receptors in the Mouse Hypothalamus. *Endocrinology* *153*, 1827–1840.

Polman, J.A.E., Welten, J.E., Bosch, D.S., de Jonge, R.T., Balog, J., van der Maarel, S.M., de Kloet, E.R., and Datson, N.A. (2012). A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells. *BMC Neurosci.* *13*, 118.

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 22–37.

Powell, C.E., Watson, C.S., and Gametchu, B. (1999). Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine* *10*, 271–280.

Pralong, F.P. (2010). Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol. Cell. Endocrinol.* *324*, 82–86.

## Q

Qi, A.-Q., Qiu, J., Xiao, L., and Chen, Y.-Z. (2005). Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells. *J. Neurosci. Res.* *80*, 510–517.

Qiu, J., Lou, L., Huang, X., Lou, S., Pei, G., and Chen, Y. (1998). Nongenomic Mechanisms of Glucocorticoid Inhibition of Nicotine-Induced Calcium Influx in PC12 Cells: Involvement of Protein Kinase C\*This work was supported by a research grant from the Natural Science Foundation of China. *Endocrinology* *139*, 5103–5108.

Qiu, J., Wang, C., Huang, X., and Chen, Y. (2003). Nongenomic mechanism of glucocorticoid inhibition of bradykinin-induced calcium influx in PC12 cells: possible involvement of protein kinase C. *Life Sci.* 72, 2533–2542.

Quelle, F.W., Smith, R.V., Hrycyna, C.A., Kaliban, T.D., Crooks, J.A., and O'Brien, J.M. (1988). [3H]Dexamethasone Binding to Plasma Membrane-Enriched Fractions from Liver of Nonadrenalectomized Rats. *Endocrinology* 123, 1642–1651.

## R

Radovick, S., Levine, J.E., and Wolfe, A. (2012). Estrogenic Regulation of the GnRH Neuron. *Front. Endocrinol.* 3.

Radtke, K.M., Schauer, M., Gunter, H.M., Ruf-Leuschner, M., Sill, J., Meyer, A., and Elbert, T. (2015). Epigenetic modifications of the glucocorticoid receptor gene are associated with the vulnerability to psychopathology in childhood maltreatment. *Transl. Psychiatry* 5, e571.

Rainville, J., Pollard, K., and Vasudevan, N. (2015). Membrane-initiated non-genomic signaling by estrogens in the hypothalamus: cross-talk with glucocorticoids with implications for behavior. *Front. Endocrinol.* 6, 18.

Raju, G.A.R., Chavan, R., Deenadayal, M., Gunasheela, D., Gutgutia, R., Haripriya, G., Govindarajan, M., Patel, N.H., and Patki, A.S. (2013). Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *J. Hum. Reprod. Sci.* 6, 227–234.

Ralph, C.R., Lehman, M.N., Goodman, R.L., and Tilbrook, A.J. (2016). Impact of psychosocial stress on gonadotrophins and sexual behaviour in females: role for cortisol? *Reproduction* 152, R1–R14.

Ramamoorthy, S., and Cidlowski, J.A. (2013). Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1711–1722.

Ramamoorthy, S., and Cidlowski, J.A. (2016). Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 42, 15–31.

Rance, N.E. (2009). Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 30, 111–122.

Rance, N.E., Krajewski, S.J., Smith, M.A., Cholanian, M., and Dacks, P.A. (2010). Neurokinin B and the Hypothalamic Regulation of Reproduction. *Brain Res.* 1364, 116–128.

Rani, C.S.S., Elango, N., Wang, S., Kobayashi, K., and Strong, R. (2009). Identification of an Activator Protein-1-Like Sequence as the Glucocorticoid Response Element in the Rat Tyrosine Hydroxylase Gene. *Mol. Pharmacol.* 75, 589–598.

Ray, D.W., Davis, J.R., White, A., and Clark, A.J. (1996). Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 56, 3276–3280.

- Reame, N.E., Sauder, S.E., Case, G.D., Kelch, R.P., and Marshall, J.C. (1985). Pulsatile gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea: evidence that reduced frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion is the mechanism of persistent anovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *61*, 851–858.
- Reddy, T.E., Gertz, J., Crawford, G.E., Garabedian, M.J., and Myers, R.M. (2012). The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3756–3767.
- Reichardt, S.D., Föllner, M., Rexhepaj, R., Pathare, G., Minnich, K., Tuckermann, J.P., Lang, F., and Reichardt, H.M. (2012). Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes. *Endocrinology* *153*, 1783–1794.
- Revel, F.G., Ansel, L., Klosen, P., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2007). Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *8*, 57–65.
- Revest, J.-M., Kaouane, N., Mondin, M., Le Roux, A., Rougé-Pont, F., Vallée, M., Barik, J., Tronche, F., Desmedt, A., and Piazza, P.V. (2010). The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-1a/1b. *Mol. Psychiatry* *15*, 1125, 1140–1151.
- Revest, J.-M., Le Roux, A., Roullot-Lacarrière, V., Kaouane, N., Vallée, M., Kasanetz, F., Rougé-Pont, F., Tronche, F., Desmedt, A., and Piazza, P.V. (2014). BDNF-TrkB signaling through Erk1/2MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. *Mol. Psychiatry* *19*, 1001–1009.
- Riester, A., Issler, O., Spyroglou, A., Rodrig, S.H., Chen, A., and Beuschlein, F. (2012). ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland. *Endocrinology* *153*, 212–222.
- Ringstrom, S.J., and Schwartz, N.B. (1987). Differential effect of glucocorticoids on synthesis and secretion of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH). *J. Steroid Biochem.* *27*, 625–630.
- Rivers, C., Levy, A., Hancock, J., Lightman, S., and Norman, M. (1999). Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 4283–4286.
- Rivier, C., and Vale, W. (1983). Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* *305*, 325–327.
- Rizwan, M.Z., Poling, M.C., Corr, M., Cornes, P.A., Augustine, R.A., Quennell, J.H., Kauffman, A.S., and Anderson, G.M. (2012). RFamide-Related Peptide-3 Receptor Gene Expression in GnRH and Kisspeptin Neurons and GnRH-Dependent Mechanism of Action. *Endocrinology* *153*, 3770–3779.
- Roa, J., and Herbison, A.E. (2012). Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* *153*, 5587–5599.

- Roberson, M.S., Misra-Press, A., Laurance, M.E., Stork, P.J., and Maurer, R.A. (1995). A role for mitogen-activated protein kinase in mediating activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3531–3539.
- Robson, A.C., Leckie, C.M., Seckl, J.R., and Holmes, M.C. (1998). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Mol. Brain Res.* *61*, 1–10.
- Romeo, R.D. (2010). Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 232–240.
- Romero, A.M., and Rance, N.E. (2008). Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 1376–1381.
- Ronacher, K., Hadley, K., Avenant, C., Stubbsrud, E., Simons, S.S., Louw, A., and Hapgood, J.P. (2009). Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* *299*, 219–231.
- Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 627–643.
- de Roux, N., Young, J., Misrahi, M., Genet, R., Chanson, P., Schaison, G., and Milgrom, E. (1997). A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N. Engl. J. Med.* *337*, 1597–1602.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., and Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10972–10976.
- Roy, D., Angelini, N.L., and Belsham, D.D. (1999). Estrogen directly respresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* *140*, 5045–5053.
- Rubinow, D.R., Roca, C.A., Schmidt, P.J., Danaceau, M.A., Putnam, K., Cizza, G., Chrousos, G., and Nieman, L. (2005). Testosterone suppression of CRH-stimulated cortisol in men. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *30*, 1906–1912.
- Ruchhoft, E.A., Elkind-Hirsch, K.E., and Malinak, R. (1996). Pituitary function is altered during the same cycle in women with polycystic ovary syndrome treated with continuous or cyclic oral contraceptives or a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil. Steril.* *66*, 54–60.
- Ruka, K.A., Burger, L.L., and Moenter, S.M. (2013). Regulation of Arcuate Neurons Coexpressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin by Modulators of Neurokinin 3 and  $\kappa$ -Opioid Receptors in Adult Male Mice. *Endocrinology* *154*, 2761–2771.
- Russell, G.M., Durant, C., Ataya, A., Papastathi, C., Bhake, R., Woltersdorf, W., and Lightman, S. (2014). Subcutaneous pulsatile glucocorticoid replacement therapy. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *81*, 289–293.

## S

- Sabatino, F.D., Collins, P., and McDonald, J.K. (1990). Investigation of the effects of progesterone on neuropeptide Y-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence of ovariectomized and estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology* 52, 600–607.
- Sahu, A., Kalra, S.P., Crowley, W.R., and Kalra, P.S. (1988). Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res.* 457, 376–378.
- Sainsbury, A., and Zhang, L. (2010). Role of the arcuate nucleus of the hypothalamus in regulation of body weight during energy deficit. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316, 109–119.
- Sakamoto, K., Murata, K., Wakabayashi, Y., Yayou, K., Ohkura, S., Takeuchi, Y., Mori, Y., and Okamura, H. (2012). Central administration of neurokinin B activates kisspeptin/NKB neurons in the arcuate nucleus and stimulates luteinizing hormone secretion in ewes during the non-breeding season. *J. Reprod. Dev.* 58, 700–706.
- Salvi, R., and Pralong, F.P. (2010). Molecular Characterization and Phenotypic Expression of Mutations in Genes for Gonadotropins and Their Receptors in Humans. In *Frontiers of Hormone Research*, R. Quinton, ed. (Basel: KARGER), pp. 1–12.
- Samarasinghe, R.A., Di Maio, R., Volonte, D., Galbiati, F., Lewis, M., Romero, G., and DeFranco, D.B. (2011). Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16657–16662.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., and Munck, A.U. (2011). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions<sup>1</sup>. *Endocr. Rev.*
- Satake, H., and Kawada, T. (2006). Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors. *Curr. Drug Targets* 7, 963–974.
- Sawchenko, P.E. (1987). Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 403, 213–223.
- Schaaf, M.J.M., and Cidlowski, J.A. (2002). AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 67, 627–636.
- Schally, A.V., Baba, Y., Nair, R.M., and Bennett, C.D. (1971). The amino acid sequence of a peptide with growth hormone-releasing activity isolated from porcine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 246, 6647–6650.
- Scheschowitsch, K., Leite, J.A., and Assreuy, J. (2017). New insights in glucocorticoid receptor signaling – more than just a ligand binding receptor. *Front. Endocrinol.* 8.

- Schreiber, J.R., Nakamura, K., and Erickson, G.F. (1982). Rat ovary glucocorticoid receptor: identification and characterization. *Steroids* 39, 569–584.
- Schrey, M.P. (1985). Gonadotropin releasing hormone stimulates the formation of inositol phosphates in rat anterior pituitary tissue. *Biochem. J.* 226, 563–569.
- Schwarzer, C. (2009). 30 years of dynorphins--new insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacol. Ther.* 123, 353–370.
- Schwienhorst, I., Johnson, E.S., and Dohmen, R.J. (2000). SUMO conjugation and deconjugation. *Mol. Gen. Genet. MGG* 263, 771–786.
- Scully, K.M., Gleiberman, A.S., Lindzey, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Rosenfeld, M.G. (1997). Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 11, 674–681.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., et al. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.* 349, 1614–1627.
- Shahjahan, M., Kitahashi, T., and Ando, H. (2017). Temperature affects sexual maturation through the control of kisspeptin, kisspeptin receptor, GnRH and GTH subunit gene expression in the grass puffer during the spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 243, 138–145.
- Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S., Huang, X.-F., et al. (2013). Arcuate NPY Controls Sympathetic Output and BAT Function via a Relay of Tyrosine Hydroxylase Neurons in the PVN. *Cell Metab.* 17, 236–248.
- Shirayama, Y., Ishida, H., Iwata, M., Hazama, G.-I., Kawahara, R., and Duman, R.S. (2004). Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. *J. Neurochem.* 90, 1258–1268.
- Shishkina, G.T., and Dygalo, N.N. (2017). The glucocorticoid hypothesis of depression: History and prospects. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 7, 128–133.
- Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I., and Pfaff, D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304, 345–347.
- Simerly, R.B. (1991). Prodynorphin and proenkephalin gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the rat: Sexual differentiation and hormonal regulation. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 473–484.
- Singh, S.P., Wolfe, A., Ng, Y., DiVall, S.A., Buggs, C., Levine, J.E., Wondisford, F.E., and Radovick, S. (2009). Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (ESR1). *Biol. Reprod.* 81, 488–496.
- Skorupskaite, K., George, J.T., and Anderson, R.A. (2014a). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum. Reprod. Update* 20, 485–500.



- Skorupskaite, K., George, J.T., and Anderson, R.A. (2014b). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum. Reprod. Update* 20, 485–500.
- Skrapits, K., Borsay, B.Á., Herczeg, L., Ciofi, P., Liposits, Z., and Hrabovszky, E. (2015). Neuropeptide co-expression in hypothalamic kisspeptin neurons of laboratory animals and the human. *Front. Neurosci.* 9.
- Smith, J.T., and Clarke, I.J. (2010). Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 21, 255–260.
- Smith, S.M., and Vale, W.W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 383–395.
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2005a). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146, 2976–2984.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2005b). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146, 3686–3692.
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., and Steiner, R.A. (2006). Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 6687–6694.
- Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., and Clarke, I.J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148, 1150–1157.
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., and Clarke, I.J. (2011). Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152, 1001–1012.
- Smith, R.E., Maguire, J.A., Stein-Oakley, A.N., Sasano, H., Takahashi, K., Fukushima, K., and Krozowski, Z.S. (1996). Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3244–3248.
- Soghomonian, J.J., and Martin, D.L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 500–505.
- Solito, E., Mulla, A., Morris, J.F., Christian, H.C., Flower, R.J., and Buckingham, J.C. (2003). Dexamethasone Induces Rapid Serine-Phosphorylation and Membrane Translocation of Annexin 1 in a Human Folliculostellate Cell Line via a Novel Nongenomic Mechanism Involving the Glucocorticoid Receptor, Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology* 144, 1164–1174.
- Song, I.H., and Buttgereit, F. (2006). Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 142–146.

- Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D., and Sapolsky, R.M. (2009). The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation. *Neuron* 64, 33–39.
- Spampinato, S., and Goldstein, A. (1983). Immunoreactive dynorphin in rat tissues and plasma. *Neuropeptides* 3, 193–212.
- Spampinato, S., Canossa, M., Campana, G., Carboni, L., and Bachetti, T. (1995). Estrogen regulation of prodynorphin gene expression in the rat adenohypophysis: effect of the antiestrogen tamoxifen. *Endocrinology* 136, 1589–1594.
- Spät, A., Bradford, P.G., McKinney, J.S., Rubin, R.P., and Putney, J.W. (1986). A saturable receptor for 32P-inositol-1,4,5-triphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature* 319, 514–516.
- Spies, C.M., Bartholome, B., Berki, T., Burmester, G.-R., Radbruch, A., Scheffold, A., and Buttgereit, F. (2007). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) on monocytes are up-regulated after vaccination. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 46, 364–365.
- Spiga, F., Liu, Y., Aguilera, G., and Lightman, S.L. (2011). Temporal effect of adrenocorticotrophic hormone on adrenal glucocorticoid steroidogenesis: involvement of the transducer of regulated cyclic AMP-response element-binding protein activity. *J. Neuroendocrinol.* 23, 136–142.
- Stackpole, C.A., Clarke, I.J., Breen, K.M., Turner, A.I., Karsch, F.J., and Tilbrook, A.J. (2006). Sex difference in the suppressive effect of cortisol on pulsatile secretion of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 147, 5921–5931.
- Stahn, C., and Buttgereit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 525–533.
- Stamatiades, G.A., and Kaiser, U.B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 463, 131–141.
- Stavreva, D.A., Wiench, M., John, S., Conway-Campbell, B.L., McKenna, M.A., Pooley, J.R., Johnson, T.A., Voss, T.C., Lightman, S.L., and Hager, G.L. (2009). Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat. Cell Biol.* 11, 1093–1102.
- Stellato, C. (2004). Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 255–263.
- Stephens, S.B.Z., Tolson, K.P., Rouse, M.L., Poling, M.C., Hashimoto-Partyka, M.K., Mellon, P.L., and Kauffman, A.S. (2015). Absent Progesterone Signaling in Kisspeptin Neurons Disrupts the LH Surge and Impairs Fertility in Female Mice. *Endocrinology* 156, 3091–3097.
- Stojadinovic, O., Sawaya, A., Pastar, I., and Tomic-Canic, M. (2013). Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes. *PLoS One* 8, e63453.
- Strahl, B.D., Huang, H.-J., Pedersen, N.R., Wu, J.C., Ghosh, B.R., and Miller, W.L. (1997). Two Proximal Activating Protein-1-Binding Sites Are Sufficient to Stimulate Transcription of the Ovine Follicle-Stimulating Hormone- $\beta$  Gene. *Endocrinology* 138, 2621–2631.

Strehl, C., Gaber, T., Löwenberg, M., Hommes, D.W., Verhaar, A.P., Schellmann, S., Hahne, M., Fangradt, M., Wagegg, M., Hoff, P., et al. (2011). Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. *Arthritis Rheum.* *63*, 3779–3788.

Su, B., and Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 402–411.

Suh, B.Y., Liu, J.H., Berga, S.L., Quigley, M.E., Laughlin, G.A., and Yen, S.S. (1988). Hypercortisolism in Patients With Functional Hypothalamic-Amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *66*, 733–739.

Sullivan, S.D., and Moenter, S.M. (2004). Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7129–7134.

Suri, D., Bhattacharya, A., and Vaidya, V.A. (2014). Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *17*, 289–301.

Surjit, M., Ganti, K.P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M., and Chambon, P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* *145*, 224–241.

Szymanski, L., and Bakker, J. (2012). Aromatase knockout mice show normal steroid-induced activation of gonadotrophin-releasing hormone neurones and luteinising hormone surges with a reduced population of kisspeptin neurones in the rostral hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 1222–1233.

## T

Tanco, V.M., Whitlock, B.K., Jones, M.A., Wilborn, R.R., Brandebourg, T.D., and Foradori, C.D. (2016). Distribution and regulation of gonadotropin-releasing hormone, kisspeptin, RF-amide related peptide-3, and dynorphin in the bovine hypothalamus. *PeerJ* *4*, e1833.

Tasaka, K., Stojilkovic, S.S., Izumi, S., and Catt, K.J. (1988). Biphasic activation of cytosolic free calcium and LH responses by gonadotropin-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *154*, 398–403.

Tasker, J.G., and Herman, J.P. (2011). Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress Amst. Neth.* *14*, 398–406.

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., et al. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10714–10719.

Teitsma, C.A., Anglade, I., Lethimonier, C., Le Dréan, G., Saligaut, D., Ducouret, B., and Kah, O. (1999). Glucocorticoid Receptor Immunoreactivity in Neurons and Pituitary Cells Implicated in Reproductive Functions in Rainbow Trout: A Double Immunohistochemical Study. *Biol. Reprod.* *60*, 642–650.

- Temple, J.L., and Wray, S. (2005). Developmental changes in GABA receptor subunit composition within the gonadotrophin-releasing hormone-1 neuronal system. *J. Neuroendocrinol.* *17*, 591–599.
- Tena-Sempere, M., Pinilla, L., Gonzalez, L.C., Navarro, J., Dieguez, C., Casanueva, F.F., and Aguilar, E. (2000). In vitro pituitary and testicular effects of the leptin-related synthetic peptide leptin(116-130) amide involve actions both similar to and distinct from those of the native leptin molecule in the adult rat. *Eur. J. Endocrinol.* *142*, 406–410.
- Teng, Z., Zhang, M., Zhao, M., and Zhang, W. (2013). Glucocorticoid exerts its non-genomic effect on IPSC by activation of a phospholipase C-dependent pathway in prefrontal cortex of rats. *J. Physiol.* *591*, 3341–3353.
- Terasaka, T., Otsuka, F., Tsukamoto, N., Nakamura, E., Inagaki, K., Toma, K., Ogura-Ochi, K., Glidewell-Kenney, C., Lawson, M.A., and Makino, H. (2013). Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *381*, 8–15.
- Terasawa, E., Kurian, J.R., Guerriero, K.A., Kenealy, B.P., Hutz, E.D., and Keen, K.L. (2010). Recent Discoveries on the Control of GnRH Neurons in Nonhuman Primates. *J. Neuroendocrinol.* *22*, 630–638.
- Thackray, V.G., McGillivray, S.M., and Mellon, P.L. (2006). Androgens, Progestins, and Glucocorticoids Induce Follicle-Stimulating Hormone  $\beta$ -Subunit Gene Expression at the Level of the Gonadotrope. *Mol. Endocrinol.* *20*, 2062–2079.
- Thibault, C., and Levasseur, M.-C. (2001). *La reproduction chez les mammifères et l’homme* (Editions Quae).
- Thibault, C., and Levasseur, M.C. (2014). *La reproduction chez les mammifères et l’homme*.
- Thomas, M.G., Gazal, O.S., Williams, G.L., Stanko, R.L., and Keisler, D.H. (1999). Injection of neuropeptide Y into the third cerebroventricle differentially influences pituitary secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* *16*, 159–169.
- Thomassin, H., Flavin, M., Espinás, M.L., and Grange, T. (2001). Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *EMBO J.* *20*, 1974–1983.
- Thompson, I.R., and Kaiser, U.B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* *385*, 28–35.
- Thompson, I.R., Ciccone, N.A., Xu, S., Zaytseva, S., Carroll, R.S., and Kaiser, U.B. (2013). GnRH pulse frequency-dependent stimulation of FSH $\beta$  transcription is mediated via activation of PKA and CREB. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *27*, 606–618.
- Thompson, I.R., Ciccone, N.A., Zhou, Q., Xu, S., Khogeer, A., Carroll, R.S., and Kaiser, U.B. (2016). GnRH Pulse Frequency Control of Fshb Gene Expression Is Mediated via ERK1/2 Regulation of ICER. *Mol. Endocrinol.* *30*, 348–360.

- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.M., and Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *6*, 811–816.
- Thunhorst, R.L., Beltz, T.G., and Johnson, A.K. (2007). Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *293*, R1444–R1451.
- Tilbrook, A.J., Turner, A.I., and Clarke, I.J. (2002). Stress and reproduction: central mechanisms and sex differences in non-rodent species. *Stress Amst. Neth.* *5*, 83–100.
- Tillmann, H.-C., Stuck, B.A., Feuring, M., Rossol-Haseroth, K., Tran, B.M., Lösel, R., Schmidt, B.M., Hörmann, K., Wehling, M., and Schultz, A. (2004). Delayed genomic and acute nongenomic action of glucocorticosteroids in seasonal allergic rhinitis. *Eur. J. Clin. Invest.* *34*, 67–73.
- Tomikawa, J., Uenoyama, Y., Ozawa, M., Fukanuma, T., Takase, K., Goto, T., Abe, H., Ieda, N., Minabe, S., Deura, C., et al. (2012). Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E1294–E1301.
- Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A.S., Kotan, L.D., Porter, K.M., Serin, A., Mungan, N.O., Cook, J.R., Imamoglu, S., et al. (2009). TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat. Genet.* *41*, 354–358.
- Tortoriello, D.V., McMinn, J., and Chua, S.C. (2004). Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* *145*, 1238–1247.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* *23*, 99–103.
- Tronche, F., Opherk, C., Moriggl, R., Kellendonk, C., Reimann, A., Schwake, L., Reichardt, H.M., Stangl, K., Gau, D., Hoeflich, A., et al. (2004). Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev.* *18*, 492–497.
- True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K.L., and Smith, M.S. (2011). Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 52–64.
- Tse, A., and Hille, B. (1992). GnRH-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes. *Science* *255*, 462–464.
- Tsunasawa, S., Liu, W.K., Burleigh, B.D., and Ward, D.N. (1977). Studies of disulfide bond location in ovine lutropin beta subunit. *Biochim. Biophys. Acta* *492*, 340–356.
- Tsutsui, K. (2009). A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog. Neurobiol.* *88*, 76–88.

Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., and Sharp, P.J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *275*, 661–667.

Tsutsui, K., Bentley, G.E., Bedecarrats, G., Osugi, T., Ubuka, T., and Kriegsfeld, L.J. (2010). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 284–295.

Tsutsumi, R., and Webster, N.J.G. (2009). GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr. J.* *56*, 729–737.

Turgeon, J.L., Kimura, Y., Waring, D.W., and Mellon, P.L. (1996). Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *10*, 439–450.

Turner, J.D., and Muller, C.P. (2005). Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J. Mol. Endocrinol.* *35*, 283–292.

Turner, J.D., Vernocchi, S., Schmitz, S., and Muller, C.P. (2014). Role of the 5'-untranslated regions in post-transcriptional regulation of the human glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 1051–1061.

## U

Ubuka, T., Lai, H., Kitani, M., Suzuuchi, A., Pham, V., Cadigan, P.A., Wang, A., Chowdhury, V.S., Tsutsui, K., and Bentley, G.E. (2009a). Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *J. Comp. Neurol.* *517*, 841–855.

Ubuka, T., Morgan, K., Pawson, A.J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Minakata, H., Tsutsui, K., Millar, R.P., and Bentley, G.E. (2009b). Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* *4*, e8400.

Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., and Tsutsui, K. (2012a). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* *153*, 373–385.

Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., and Tsutsui, K. (2012b). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* *153*, 373–385.

Ubuka, T., Haraguchi, S., Tobar, Y., Narihiro, M., Ishikawa, K., Hayashi, T., Harada, N., and Tsutsui, K. (2014). Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat. Commun.* *5*, 3061.

Ubuka, T., Son, Y.L., and Tsutsui, K. (2016). Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* *227*, 27–50.

Uenoyama, Y., Inoue, N., Pheng, V., Homma, T., Takase, K., Yamada, S., Ajiki, K., Ichikawa, M., Okamura, H., Maeda, K.-I., et al. (2011). Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *J. Neuroendocrinol.* *23*, 863–870.

Uhlenhaut, N.H., Barish, G.D., Yu, R.T., Downes, M., Karunasiri, M., Liddle, C., Schwalie, P., Hübner, N., and Evans, R.M. (2013). Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes. *Mol. Cell* *49*, 158–171.

Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., and Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *25*, 861–873.

Urbach, V., Walsh, D.E., Mainprice, B., Bousquet, J., and Harvey, B.J. (2002). Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl<sup>-</sup> secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium. *J. Physiol.* *545*, 869–878.

Urbanski, H.F. (2012). Differential roles of GnRH-I and GnRH-II neurons in the control of the primate reproductive axis. *Front. Endocrinol.* *3*, 20.

## V

Valdes-Socin, H., Potorac, I., Libiouille, C., Daly, A., and Beckers, A. (2017). La déficience en hormone lutéinisante: ses conséquences sur la reproduction. *UROLOGIC* *13*, 18–23.

Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2014). Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.* *35*, 671–693.

Vasilyev, V.V., Pernasetti, F., Rosenberg, S.B., Barsoum, M.J., Austin, D.A., Webster, N.J.G., and Mellon, P.L. (2002). Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by gonadotropin-releasing hormone involves multiple signal transduction pathways. *Endocrinology* *143*, 1651–1659.

Vedeckis, W.V., Ali, M., and Allen, H.R. (1989). Regulation of glucocorticoid receptor protein and mRNA levels. *Cancer Res.* *49*, 2295s–2302s.

Veldhuis, J.D., Iranmanesh, A., Lizarralde, G., and Johnson, M.L. (1989). Amplitude modulation of a burstlike mode of cortisol secretion subserves the circadian glucocorticoid rhythm. *Am. J. Physiol.* *257*, E6-14.

Vernocchi, S., Battello, N., Schmitz, S., Revets, D., Billing, A.M., Turner, J.D., and Muller, C.P. (2013). Membrane glucocorticoid receptor activation induces proteomic changes aligning with classical glucocorticoid effects. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *12*, 1764–1779.

Vitellius, G., Trabado, S., Bouligand, J., Delemer, B., and Lombès, M. (2018a). Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Ann. Endocrinol.*

Vitellius, G., Trabado, S., Bouligand, J., Delemer, B., and Lombès, M. (2018b). Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Ann. Endocrinol.*

Voss, T.C., Schiltz, R.L., Sung, M.-H., Yen, P.M., Stamatoyannopoulos, J.A., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Miranda, T.B., John, S., and Hager, G.L. (2011). Dynamic Exchange at Regulatory Elements during Chromatin Remodeling Underlies Assisted Loading Mechanism. *Cell* *146*, 544–554.

## W

Wagenmaker, E.R., and Moenter, S.M. (2017). Exposure to Acute Psychosocial Stress Disrupts the Luteinizing Hormone Surge Independent of Estrous Cycle Alterations in Female Mice. *Endocrinology* *158*, 2593–2602.

Wagenmaker, E.R., Breen, K.M., Oakley, A.E., Tilbrook, A.J., and Karsch, F.J. (2009a). Psychosocial stress inhibits amplitude of gonadotropin-releasing hormone pulses independent of cortisol action on the type II glucocorticoid receptor. *Endocrinology* *150*, 762–769.

Wagenmaker, E.R., Breen, K.M., Oakley, A.E., Pierce, B.N., Tilbrook, A.J., Turner, A.I., and Karsch, F.J. (2009b). Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. *Biol. Reprod.* *80*, 458–463.

Wagenmaker, E.R., Breen, K.M., Oakley, A.E., Pierce, B.N., Tilbrook, A.J., Turner, A.I., and Karsch, F.J. (2009c). Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. *Biol. Reprod.* *80*, 458–463.

Wahlestedt, C., and Reis, D.J. (1993). Neuropeptide Y-related peptides and their receptors--are the receptors potential therapeutic drug targets? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *33*, 309–352.

Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., et al. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 3124–3132.

Waldhoer, M., Bartlett, S.E., and Whistler, J.L. (2004). Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 953–990.

Walker, J.J., Spiga, F., Gupta, R., Zhao, Z., Lightman, S.L., and Terry, J.R. (2015). Rapid intra-adrenal feedback regulation of glucocorticoid synthesis. *J. R. Soc. Interface* *12*.

Wallace, A.D., and Cidlowski, J.A. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* *276*, 42714–42721.

Walton, W.J., Nguyen, V.T., Butnev, V.Y., Singh, V., Moore, W.T., and Bousfield, G.R. (2001). Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated beta-subunit in addition to the conventional glycosylated beta-subunit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 3675–3685.

Wang, S.-C.M., Myers, S., Dooks, C., Capon, R., and Muscat, G.E.O. (2010). An ERRbeta/gamma agonist modulates GRalpha expression, and glucocorticoid responsive gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *315*, 146–152.



- Wang, S.-S., Mu, R.-H., Li, C.-F., Dong, S.-Q., Geng, D., Liu, Q., and Yi, L.-T. (2017). microRNA-124 targets glucocorticoid receptor and is involved in depression-like behaviors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 79, 417–425.
- Wang, Z., Frederick, J., and Garabedian, M.J. (2002). Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573–26580.
- Watanabe, M., Fukuda, A., and Nabekura, J. (2014). The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front. Neurosci.* 8.
- Watanabe, T., Jeziorowski, T., Wuttke, W., and Grube, D. (1993). Secretory granules and granins in hyperstimulated male rat gonadotropes. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 41, 1801–1812.
- Watanabe, Y., Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., and McEwen, B.S. (1992). Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus* 2, 431–435.
- Watson, L.C., Kuchenbecker, K.M., Schiller, B.J., Gross, J.D., Pufall, M.A., and Yamamoto, K.R. (2013). The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 876–883.
- Watson, M.L., Baehr, L.M., Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Bodine, S.C., and Furlow, J.D. (2012). A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E1210-1220.
- Watts, A.G. (2005). Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: A complexity beyond negative feedback. *Front. Neuroendocrinol.* 26, 109–130.
- Weaver, I.C.G., Diorio, J., Seckl, J.R., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024, 182–212.
- Weaver, I.C.G., D’Alessio, A.C., Brown, S.E., Hellstrom, I.C., Dymov, S., Sharma, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2007). The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 1756–1768.
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M.D. (2000). Inhibition of Protein Palmitoylation, Raft Localization, and T Cell Signaling by 2-Bromopalmitate and Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 275, 261–270.
- Webster, J.C., Jewell, C.M., Bodwell, J.E., Munck, A., Sar, M., and Cidlowski, J.A. (1997). Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J. Biol. Chem.* 272, 9287–9293.
- Webster, J.C., Oakley, R.H., Jewell, C.M., and Cidlowski, J.A. (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the

dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6865–6870.

Weems, P.W., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2015). Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Front. Neuroendocrinol.* *37*, 43–51.

Weems, P.W., Witty, C.F., Amstalden, M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2016).  $\kappa$ -Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology* *157*, 2367–2379.

Wehmeyer, L., Du Toit, A., Lang, D.M., and Hapgood, J.P. (2014). Lipid raft- and protein kinase C-mediated synergism between glucocorticoid- and gonadotropin-releasing hormone signaling results in decreased cell proliferation. *J. Biol. Chem.* *289*, 10235–10251.

Weikum, E.R., Knuesel, M.T., Ortlund, E.A., and Yamamoto, K.R. (2017). Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 159–174.

Weitzman, E.D., Fukushima, D., Nogeire, C., Roffwarg, H., Gallagher, T.F., and Hellman, L. (1971). Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *33*, 14–22.

Wen, J.-P., Liu, C., Bi, W.-K., Hu, Y.-T., Chen, Q., Huang, H., Liang, J.-X., Li, L.-T., Lin, L.-X., and Chen, G. (2012). Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J. Endocrinol.* *214*, 177–189.

Wersinger, S.R., Haisenleder, D.J., Lubahn, D.B., and Rissman, E.F. (1999). Steroid feedback on gonadotropin release and pituitary gonadotropin subunit mRNA in mice lacking a functional estrogen receptor alpha. *Endocrine* *11*, 137–143.

West, A., Vojta, P.J., Welch, D.R., and Weissman, B.E. (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* *54*, 145–148.

Whirledge, S., and Cidlowski, J.A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol.* *35*, 109–125.

Whirledge, S., and Cidlowski, J.A. (2013a). Estradiol antagonism of glucocorticoid-induced GILZ expression in human uterine epithelial cells and murine uterus. *Endocrinology* *154*, 499–510.

Whirledge, S., and Cidlowski, J.A. (2013b). A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* *154*, 4450–4468.

Whirledge, S., and Cidlowski, J.A. (2017a). Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. *Trends Endocrinol. Metab. TEM.*

Whirledge, S., and Cidlowski, J.A. (2017b). Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. *Trends Endocrinol. Metab. TEM.*

Whirledge, S., and DeFranco, D.B. (2018). Glucocorticoid Signaling in Health and Disease: Insights From Tissue-Specific GR Knockout Mice. *Endocrinology* 159, 46–64.

Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P.M., and Hall, J.E. (2009). Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 958–964.

Wie, J., Kim, J., Ha, K., Zhang, Y.H., Jeon, J.-H., and So, I. (2015). Dexamethasone activates transient receptor potential canonical 4 (TRPC4) channels via Rasd1 small GTPase pathway. *Pflugers Arch.* 467, 2081–2091.

Windle, R.J., Wood, S.A., Shanks, N., Lightman, S.L., and Ingram, C.D. (1998). Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139, 443–450.

Wintermantel, T.M., Elzer, J., Herbison, A.E., Fritzsche, K.H., and Schütz, G. (2006a). Genetic dissection of estrogen receptor signaling in vivo. *Ernst Schering Found. Symp. Proc.* 25–44.

Wintermantel, T.M., Campbell, R.E., Porteous, R., Bock, D., Gröne, H.-J., Todman, M.G., Korach, K.S., Greiner, E., Pérez, C.A., Schütz, G., et al. (2006b). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52, 271–280.

Witzmann, S.R., Turner, J.D., Mériaux, S.B., Meijer, O.C., and Muller, C.P. (2012). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor promoter 17 in adult rats. *Epigenetics* 7, 1290–1301.

Wójcik-Gładysz, A., and Polkowska, J. (2006). Neuropeptide Y--a neuromodulatory link between nutrition and reproduction at the central nervous system level. *Reprod. Biol.* 6 Suppl 2, 21–28.

Wolfe, A., and Wu, S. (2012). Estrogen Receptor- $\beta$  in the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron. *Semin. Reprod. Med.* 30, 23–31.

Wood, P.J., Barth, J.H., Freedman, D.B., Perry, L., and Sheridan, B. (1997). Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome--recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann. Clin. Biochem.* 34 ( Pt 3), 222–229.

Woolfrey, K.M., and Dell'Acqua, M.L. (2015). Coordination of Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Synaptic Plasticity. *J. Biol. Chem.* 290, 28604–28612.

Wray, S. (2002). Molecular mechanisms for migration of placodally derived GnRH neurons. *Chem. Senses* 27, 569–572.

## X

Xie, J., Bliss, S.P., Nett, T.M., Ebersole, B.J., Sealfon, S.C., and Roberson, M.S. (2005). Transcript Profiling of Immediate Early Genes Reveals a Unique Role for Activating Transcription Factor 3 in Mediating Activation of the Glycoprotein Hormone  $\alpha$ -Subunit Promoter by Gonadotropin-Releasing Hormone. *Mol. Endocrinol.* 19, 2624–2638.

Xu, M., Hill, J.W., and Levine, J.E. (2000). Attenuation of luteinizing hormone surges in neuropeptide Y knockout mice. *Neuroendocrinology* 72, 263–271.

## Y

Yamagata, Y. (2003). New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation in vivo. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 22–29.

Yaneva, M., Kalinov, K., and Zacharieva, S. (2013). Mortality in Cushing's syndrome: data from 386 patients from a single tertiary referral center. *Eur. J. Endocrinol.* 169, 621–627.

Yang, J.A., Stires, H., Belden, W.J., and Roepke, T.A. (2017). The Arcuate Estrogen-Regulated Transcriptome: Estrogen Response Element-Dependent and -Independent Signaling of ER $\alpha$  in Female Mice. *Endocrinology* 158, 612–626.

Yang, K., Guan, H., Arany, E., Hill, D.J., and Cao, X. (2008). Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J.* 22, 2452–2464.

Yeo, S.-H., Kyle, V., Morris, P.G., Jackman, S., Sinnott-Smith, L.C., Schacker, M., Chen, C., and Colledge, W.H. (2016). Visualisation of Kiss1 Neurone Distribution Using a Kiss1-CRE Transgenic Mouse. *J. Neuroendocrinol.* 28.

Yip, S.H., Boehm, U., Herbison, A.E., and Campbell, R.E. (2015). Conditional Viral Tract Tracing Delineates the Projections of the Distinct Kisspeptin Neuron Populations to Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in the Mouse. *Endocrinology* 156, 2582–2594.

Yokoi, T., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kimura, A., Kanda, Y., Hayakawa, J., Tahara, M., Hisamoto, K., Kurachi, H., and Murata, Y. (2000). Activation of the luteinizing hormone beta promoter by gonadotropin-releasing hormone requires c-Jun NH2-terminal protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 21639–21647.

Young, E.A., Abelson, J., and Lightman, S.L. (2004). Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front. Neuroendocrinol.* 25, 69–76.

Young, J., Bouligand, J., Francou, B., Raffin-Sanson, M.-L., Gaillez, S., Jeanpierre, M., Grynberg, M., Kamenicky, P., Chanson, P., Brailly-Tabard, S., et al. (2010). TAC3 and TACR3 Defects Cause Hypothalamic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2287–2295.

Yuan, H.-J., Han, X., He, N., Wang, G.-L., Gong, S., Lin, J., Gao, M., and Tan, J.-H. (2016). Glucocorticoids impair oocyte developmental potential by triggering apoptosis of ovarian cells via activating the Fas system. *Sci. Rep.* 6, 24036.

Yudt, M.R., and Cidlowski, J.A. (2001). Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 1093–1103.

## Z

- Zalányi, S. (2001). Progesterone and ovulation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *98*, 152–159.
- Zhang, C., Bosch, M.A., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2009a).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid B Receptor Mediated Inhibition of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Is Suppressed by Kisspeptin-G Protein-Coupled Receptor 54 Signaling. *Endocrinology* *150*, 2388–2394.
- Zhang, Y., Leung, D.Y.M., Nordeen, S.K., and Goleva, E. (2009b). Estrogen inhibits glucocorticoid action via protein phosphatase 5 (PP5)-mediated glucocorticoid receptor dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* *284*, 24542–24552.
- Zhang, Z., Zhang, W., Jung, D.Y., Ko, H.J., Lee, Y., Friedline, R.H., Lee, E., Jun, J., Ma, Z., Kim, F., et al. (2012). TRPM2 Ca<sup>2+</sup> channel regulates energy balance and glucose metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *302*, E807.
- Zheng, J., Ali, A., and Ramirez, V.D. (1996). Steroids conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steroid neuronal membrane binding sites. *J. Psychiatry Neurosci.* *21*, 187–197.
- Zhou, J., and Cidlowski, J.A. (2005). The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* *70*, 407–417.
- Zhou, J., Kang, Z.M., Xie, Q.M., Liu, C., Lou, S.J., Chen, Y.Z., and Jiang, C.L. (2003). Rapid nongenomic effects of glucocorticoids on allergic asthma reaction in the guinea pig. *J. Endocrinol.* *177*, R1–R4.
- Zorn, J.V., Schür, R.R., Boks, M.P., Kahn, R.S., Joëls, M., and Vinkers, C.H. (2017). Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* *77*, 25–36.
- Zuure, W.A., Roberts, A.L., Quennell, J.H., and Anderson, G.M. (2013). Leptin signaling in GABA neurons, but not glutamate neurons, is required for reproductive function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 17874–17883.

**Titre :** IMPACT DE L'HYPERCORTICISME SUR L'AXE GONADOTROPE FEMELLE

**Mots clés :** GLUCOCORTICOÏDES, STRESS ET INFERTILITE

**Résumé :**

Le stress chronique apparaît comme une cause importante de troubles de la fertilité chez la femelle. L'hypercorticisme (sécrétion excessive de glucocorticoïdes (GC) surrénaliens) induit par le stress agit sur l'axe de reproduction pour perturber le cycle œstrien et l'ovulation. Chez la femelle, l'axe de reproduction comprend 3 grandes structures : l'hypothalamus, l'hypophyse et l'ovaire. Pour bloquer l'activité de cet axe, les GC agissent *via* un récepteur spécifique (GR) pour induire une signalisation rapide non génomique et/ou une signalisation génomique tardive. Malgré de nombreuses recherches, les connaissances sur le mode d'action des GC sur cet axe restent fragmentaires. Au cours de ce travail de thèse, l'utilisation de différents modèles cellulaires et animaux nous a permis de mettre en évidence des mécanismes d'action des GC originaux sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Au niveau hypothalamique, nous avons décrit un nouveau dialogue entre les œstrogènes et les GC, qui favorise l'expression d'un neuropeptide hypothalamique inhibiteur, la dynorphine A. Ce neuropeptide pourrait ainsi participer au blocage des sécrétions pulsatiles de la GnRH (Gonadotropin-releasing Hormone) hypothalamique et des

gonadotropines hypophysaires indispensables à l'ovulation. Au niveau hypophysaire, nous avons mis en évidence une action paradoxale des GC sur les cellules gonadotropes. En absence de GnRH, les GC stimulent une nouvelle voie de signalisation non génomique, initiée à la membrane plasmique par un GR palmitoylé. Cette signalisation rapide implique la calcium/calmoduline kinase II (CaMKII) ainsi qu'une de ses cibles, la synapsine-Ia. Néanmoins, en présence de GnRH, les GC bloquent la signalisation induite par la GnRH, en empêchant l'activation de la CaMKII, pouvant être à l'origine de l'inhibition de la sécrétion de la gonadotropine LH (Luteinizing Hormone).

De nouvelles recherches sont à poursuivre pour approfondir nos connaissances sur les différents modes d'action des GC pouvant être spécifiquement mis en jeu au sein de chacune des cellules, et à l'origine des effets variés des GC au sein de l'organisme. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'altération de la fertilité, en particulier durant un stress chronique, est essentielle pour envisager l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes.

**Title:** IMPACT OF HYPERCORTICISM ON GONADOTROPE AXIS IN FEMALE

**KEY WORDS:** GLUCOCORTICOIDS, STRESS ET INFERTILITY

**Abstract:**

The chronic stress is an important cause of fertility disorders in female. Stress-induced hypercorticism (excessive secretion of glucocorticoids (GC)) acts on the reproductive axis to disrupt the estrous cycle and ovulation. In female, the reproductive axis comprises 3 structures: the hypothalamus, the pituitary and the ovary. To block the activity of this axis, GC act through a specific receptor (GR) to promote rapid non genomic and/or late genomic signaling. Despite extensive researches, knowledge on the mechanism of action of GC on this axis remains elusive. During my PhD, the use of different cellular and animal models allowed to highlight new mechanisms of GC actions on the hypothalamic-pituitary axis. At the hypothalamic level, we described a new genomic cross-talk between estrogen and GC to promote the expression of an inhibitory hypothalamic neuropeptide, dynorphin A. This neuropeptide could then participate in disrupting the pulsatile secretion of GnRH (Gonadotropin-releasing

hormone) and pituitary gonadotropins which are essential for ovulation. At the pituitary level, we demonstrated a paradoxical action of GC on gonadotrope cells. In the absence of GnRH, GC stimulate a new non genomic pathway initiated at the plasma membrane through a palmitoylated GR. This rapid signaling involves calcium/calmodulin kinase II (CaMKII) as well as one of its targets, synapsin-Ia. Nevertheless, in the presence of GnRH, GC interfere with GnRH-induced signaling by preventing CaMKII activation, which may be responsible for the inhibition of LH (Luteinizing Hormone) release.

Further researches are required to improve our knowledge on cell-specific mechanisms of action of GC that could explain the diversity of their activities. A better understanding of the molecular mechanisms responsible for fertility dysfunction, especially during chronic stress, is essential for the development of new and innovative therapeutic targets.



