

Les récepteurs des gonadotrophines

Micheline Misrahi
Isabelle Beau
Michel Atger
Hugues Loosfelt
Nicolae Ghinea
Mai Vu Hai
Edwin Milgrom

Le récepteur de l'hormone lutéinisante (LH) est le premier d'une nouvelle famille de récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G dont l'ADNc a été cloné. Les récepteurs de l'hormone folliculostimulante (FSH) et de l'hormone thyroïdostimulante (TSH) appartiennent à la même sous-famille. Leur caractéristique est l'existence d'un volumineux domaine extracellulaire, apparenté aux glycoprotéines riches en leucine, responsable de la liaison à l'hormone. Les gènes des récepteurs de la LH et de la FSH sont de très grande taille (> 70 kpb) et sont tous deux localisés au niveau du chromosome 2p21, ce qui évoque un mécanisme de duplication génique. Ils comprennent respectivement 11 et 10 exons. Tous les introns sont localisés au niveau de la partie codant pour le domaine extracellulaire du récepteur. Des formes solubles du récepteur de la LH, engendrées par épissage alternatif, sont physiologiquement exprimées. Les études de mutagenèse dirigée ont permis de donner des informations sur les relations structure-fonction de ces récepteurs. Les récepteurs des gonadotrophines ont également servi de modèle dans l'étude du trafic, et notamment de l'adressage polarisé de ce groupe de récepteurs.

ADRESSES

M. Misrahi: *professeur des Universités, praticien hospitalier*. I. Beau: *assistante hospitalo-universitaire*. M. Atger: *directeur de recherche Inserm*. H. Loosfelt: *directeur de recherche Inserm*. N. Ghinea: *directeur de recherche à l'Inserm*. M. Vu Hai: *directeur de recherche à l'Inserm*. E. Milgrom: *professeur des Universités, praticien hospitalier, directeur de l'unité Inserm 135*. Inserm U.135, hormones, gènes et reproduction et laboratoire d'hormonologie et biologie moléculaire, Hôpital Bicêtre, 78, rue du Général-Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France.

TIRÉS À PART

M. Misrahi.

Les récepteurs des gonadotrophines ont un rôle central dans la reproduction [1, 2]. Le récepteur de la LH contrôle la sécrétion de stéroïdes sexuels par l'ovaire et le testicule. Le récepteur de la FSH joue un rôle important dans le développement des gonades et la production des gamètes, bien que la nature précise de ce rôle ne soit pas encore complètement élucidée. Ces récepteurs contrôlent donc les étapes précoces de la différenciation sexuelle ainsi que l'établissement et le maintien de la fertilité chez l'homme et la femme. Ils sont localisés au niveau de la membrane des cellules cibles ovariennes et testiculaires et agissent prin-

cipalement par stimulation de l'adénylyl cyclase cellulaire.

Clonage des ADNc des récepteurs des gonadotrophines

Les récepteurs des gonadotrophines sont des molécules fragiles et complexes présentes en quantité très faible dans les organes cibles. Leur étude a été difficile et a donné lieu à des controverses importantes. Leurs ADNc n'ont été clonés que dans les années 1989-1990.

L'ADNc du récepteur de la LH (RLH) a tout d'abord été cloné par deux approches différentes. Des anticorps

monoclonaux dirigés contre le récepteur de la LH porcin ont été produits. Cela a permis de cloner l'ARN messager correspondant à partir d'une banque d'expression d'ADNc testiculaires [3]. Simultanément, le clonage de l'ADNc du récepteur de la LH a été réalisé chez le rat [4] grâce aux informations fournies par la purification du récepteur à partir d'ovaires de rats et son microséquençage. L'ADNc du récepteur humain de la LH a été ensuite obtenu par hybridation croisée [5, 6]. Le récepteur de la LH a permis de caractériser une nouvelle famille de récepteurs couplés aux protéines G qui comprend les récepteurs de la FSH [7, 8] et de la TSH [9, 10]. L'ADNc du récepteur de la FSH a été cloné par hybridation croisée d'une banque de cellules de Sertoli avec la sonde correspondant au gène du récepteur de la LH [7].

Les récepteurs humains de la LH et de la FSH comprennent respectivement 699 et 695 acides aminés avec à leur extrémité amino-terminale un peptide signal qui sera secondairement clivé.

Ils contiennent un domaine à sept passages transmembranaires caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G. Cependant ce domaine n'a pas d'homologie avec d'autres récepteurs plus anciennement connus (rhodopsine, récepteurs adrénergiques, muscariniques cholinergiques, etc.). En revanche, c'est le domaine le plus conservé entre les récepteurs des gonadotrophines et de la TSH (figure 1).

La partie amino-terminale du récepteur est volumineuse et comprend plusieurs sites potentiels de glycosylation. Elle s'oppose à la partie extracellulaire tronquée des autres récepteurs à sept segments transmembranaires liant des ligands de petite taille. Ce volumineux domaine extracellulaire est le domaine de liaison de l'hormone. Il a par ailleurs une structure très particulière: il est formé de la répétition très imparfaite d'un motif riche en leucines similaire à ceux décrits pour d'autres glycoprotéines (LRG pour *leucine rich glycoprotein*). Ces protéines sont impliquées dans des phénomènes d'adhérence ou dans des interactions protéine-protéine. L'inhibiteur de la ribonucléase pancréatique, un membre de cette famille, a été cristallisé [11]. L'analyse des cristaux par diffraction des rayons X a permis d'établir sa structure et, par analogie, de modéliser une partie du domaine extracellulaire du récepteur de la LH [12]. La structure tridimensionnelle probable de ce domaine serait organisée en «fer à cheval». Elle serait formée d'une série de répétitions de motifs comprenant une succession d'hélices α et de feuillets β . L'interaction avec l'hormone se produirait dans la concavité de cette structure. Cette modélisation est cependant impossible dans les régions amino- et carboxy-terminales du domaine extracellulaire car les répétitions sont beaucoup moins bien conservées.

La comparaison de la structure des récepteurs de LH, FSH et TSH révèle la même organisation en régions d'homologie variable [1] (figure 1).

Différentes formes de récepteurs des gonadotrophines

Plusieurs espèces moléculaires correspondant au récepteur de la LH sont en fait détectées au niveau des organes cibles [13, 14]. Une forme de 85 kDa présente une glycosylation complète et correspond à la forme mûre du récepteur, présente à la surface cellulaire. D'une façon inhabituelle, il existe également dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi des cellules cibles une forte accumulation physiologique d'un précurseur incomplètement glycosylé de 68 kDa, riche en résidus mannoses, incapable de lier l'hormone. Sa fonction n'est pas connue. Il pourrait correspondre à une réserve intracellulaire de récepteur capable d'être mûrie puis adressée rapidement en surface dans certaines situations physiologiques. Des formes solubles du récepteur de la LH délétées du domaine transmembranaire existent également qui proviennent d'un épissage alternatif [3, 13]. Leur concentration est relativement abondante (~ 40 % des transcrits totaux). L'affinité de ces variants pour l'hormone est voisine de celle du récepteur natif. En outre, ces variants sont

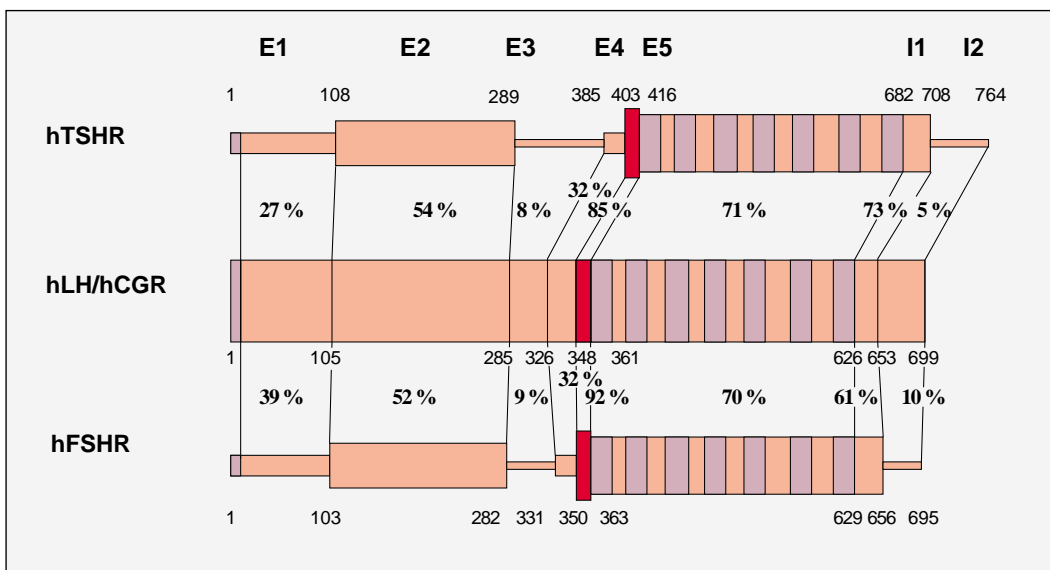


Figure 1. **Comparaison de la structure des récepteurs humains de la LH, de la FSH et de la TSH.** Les récepteurs sont divisés en régions selon leur degré d'identité de séquence (indiqué par la surface des différentes régions des récepteurs de la FSH [8] et de la TSH [10]). Les régions bistres représentent le peptide signal et les sept segments transmembranaires. E1-5 correspondent au domaine extracellulaire et I1-2 au domaine intracellulaire. La

numérotation en acides aminés est indiquée au-dessus et au-dessous des figures. (D'après [1].)

capables *in vitro* de coopérer avec le récepteur complet et d'augmenter la stimulation de l'adénylate cyclase sous l'action de l'hormone [14]. Pour le récepteur humain de la FSH on détecte une forme mûre de 87kDa et une forme précurseur de 81kDa [15].

Gènes des récepteurs des gonadotrophines

Organisation des gènes

Les gènes codant pour les récepteurs humains de la LH [6] et de la FSH [16] existent en un seul exemplaire (figure 2). Ces gènes sont de très grande taille et comprennent respectivement 11 et 10 exons. L'ensemble des domaines transmembranaire et intracellulaire de ces récepteurs est codé par le dernier exon alors que le domaine extracellulaire est codé par une succession de petits exons correspondant à une ou plusieurs répétitions riches en leucines. Les gènes des récepteurs des gonadotrophines pourraient être nés de la recombinaison de deux gènes ancestraux : l'un codant pour un protorécepteur de type adrénérgerique (dépourvu d'introns et codant pour un récepteur à domaine extracellulaire court) et l'autre gène codant pour une glycoprotéine riche en leucine [1].

Localisation chromosomique

Les gènes des récepteurs de la LH et de la FSH sont localisés tous deux au niveau du chromosome 2p21 [17, 18] ce qui évoque une duplication à partir d'un gène ancestral commun. Le gène du récepteur de la TSH qui appartient à la même famille est localisé au niveau du chromosome 14q31 [19] et a donc été dispersé dans le génome au cours de l'évolution.

Relations structure-fonction

Des études de mutagenèse dirigée ont montré que le domaine extracellulaire de ces récepteurs est responsable de la liaison hormonale alors que les domaines transmembranaire et intracellulaire sont responsables de la transmission du signal. Cependant, cette séparation schématique des fonctions du récepteur subit des exceptions. En effet, une courte région extracellulaire proche de la membrane, très conservée dans ce sous-groupe de récepteurs, a également un rôle important dans la transmission du signal. En outre, les boucles extracellulaires du domaine transmembranaire pourraient également intervenir dans la liaison de l'hormone au cours du mécanisme d'activation du récepteur.

Liaison de l'hormone

Le rôle du domaine extracellulaire des récepteurs des gonadotrophines dans la liaison de l'hormone a été clairement démontré par le fait que les variants physiologiques du récepteur de la LH délétés des domaines transmembranaire et intracellulaire (*voir plus haut*), sont capables de lier l'hormone avec la même affinité que le récepteur complet [1, 14]. Une autre démonstration élégante a été effectuée en échangeant les domaines extracellulaires des récepteurs de la LH et de la TSH (pour revue, *voir* [1]).

Le domaine extracellulaire des récepteurs des gonadotrophines est formé de répétitions hydrophobes riches en leucines. Les six premières répétitions sont suffisantes pour permettre la liaison de l'hCG [20]. L'interaction avec l'hormone s'effectue au niveau de sites multiples dispersés au sein du domaine extracellulaire du récepteur de la LH et implique les deux sous-unités de l'hormone [20, 21].

D'une façon inattendue, le récepteur de la LH délété de la majorité de son domaine extracellulaire est capable de lier l'hormone avec une faible affinité et de stimuler l'adénylate cyclase *in vitro* [21]. Cela rappelle le mécanisme d'action des récepteurs couplés aux protéines G plus anciens, de type β -adrénérgerique. En effet, pour ces

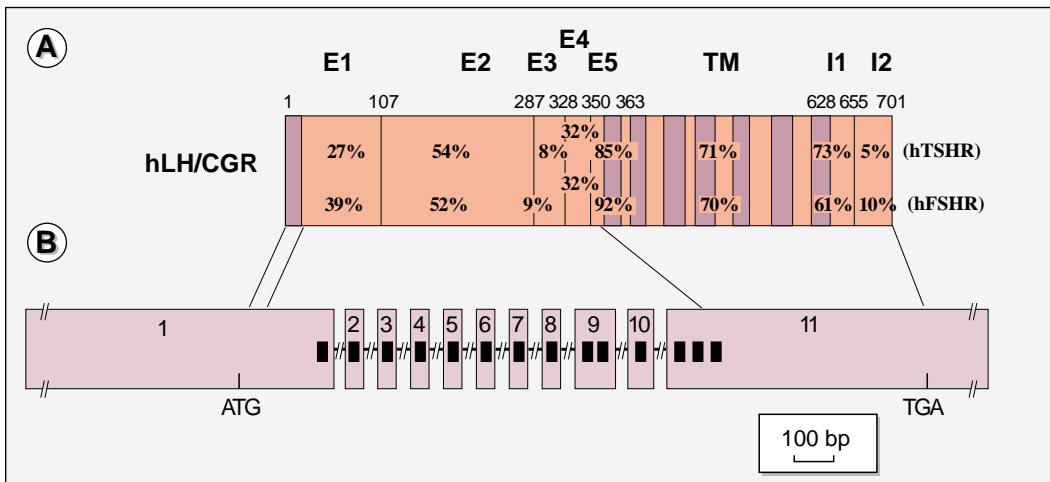


Figure 2. **Organisation du gène du récepteur humain de la LH. A. Structure du gène du récepteur humain de la LH, comparaison avec les récepteurs de la LH, de la TSH et de la FSH.** Le gène du récepteur de la LH (hLH/CGR) est divisé en domaines en fonction de l'identité de séquence avec le gène du récepteur humain de la TSH (hTSHR) et de la FSH (hFSHR). Les séquences codant pour le domaine extracellulaire

laire sont divisées en régions E1 à E5. TM est le domaine transmembranaire. Le domaine extracellulaire est divisé en régions E1 à E5 et le domaine intracellulaire du récepteur en régions I1 et I2. La numérotation des acides aminés déduits est indiquée au-dessus de la figure. **B. Organisation exon/intron du gène du récepteur humain de la LH [6].** Les exons sont numérotés de 1 à 11. La position des sites de début (ATG) et de terminaison (TGA) de la traduction est indiquée. Les rectangles noirs au sein des exons correspondent aux motifs répétés riches en leucines. Les limites des exons sont comparées aux limites des domaines du récepteur de la LH. La correspondance est indiquée en pointillé.

récepteurs qui ont un court domaine extracellulaire, la liaison du ligand se produit au niveau de la partie extracellulaire du domaine transmembranaire. Cette observation suggère un mécanisme d'action en deux étapes pour le récepteur de la LH: la première étape consisterait en une liaison de forte affinité au niveau du domaine extracellulaire et la deuxième en l'interaction du domaine extracellulaire et/ou de l'hormone avec le domaine transmembranaire, produisant l'activation du récepteur. Cette activation pourrait être secondaire à un changement conformationnel du récepteur. Un modèle d'interaction de l'hCG à son récepteur a été proposé [22] à partir des données cristallographiques de l'hCG et de la modélisation du domaine extracellulaire du récepteur. Le domaine extracellulaire du récepteur de la LH possède, en outre, dans sa région amino-terminale, des résidus spécifiques qui ne sont pas nécessaires à la liaison de la LH mais qui empêchent la liaison de la FSH. Une observation similaire a été faite pour la région amino-terminale du récepteur de la FSH. C'est le modèle de spécificité négative. Il est possible en modifiant ces régions de construire un ligand universel pour ces récepteurs. Ce modèle est également en faveur d'une co-évolution entre chaque récepteur et son ligand spécifique [23].

Transmission du signal

La signalisation des récepteurs des gonadotrophines se fait essentiellement par stimulation de l'adénylate cyclase. A forte concentration hormonale, la voie de la phospholipase C peut également être activée [1, 20]. Des études de mutagenèse dirigée, ou de mutants naturels détectés chez des malades ayant un hypo ou un hyperfonctionnement du récepteur de la LH, ont permis de déterminer les régions importantes dans le couplage aux protéines G. Cette dernière approche permet d'étudier, en outre, le retentissement de ces mutations *in vivo*. La mutation de certains résidus inhibe la transmission du signal hormonal et on peut penser qu'ils sont impliqués dans l'établissement d'une configuration active du récepteur en présence d'hormone. Dans d'autres cas, au contraire, la mutation entraîne

une activation constitutive de la transmission du signal. Les acides aminés correspondants semblent impliqués dans la stabilisation d'une configuration inactive du récepteur à l'état basal en l'absence d'hormone.

Le domaine transmembranaire est le domaine principal de transmission du signal. Cependant la partie carboxy-terminale du domaine extracellulaire, très conservée entre les récepteurs des gonadotrophines et de la TSH, joue également un rôle dans la transmission du signal [20, 21].

Pour le récepteur de la LH comme pour de nombreux récepteurs couplés aux protéines G le rôle des boucles intracellulaires, en particulier de la troisième boucle, dans le couplage à la protéine Gs a été montré. On a montré également une coopération directe entre certains acides aminés du récepteur et de l'hormone. En effet, la substitution réciproque d'un acide aminé acide localisé à la partie supérieure du deuxième segment transmembranaire du récepteur de la LH et d'un résidu basique de l'hCG permet de récupérer la fonction de transmission du signal du récepteur muté [20, 21].

Dans la troisième boucle intracellulaire la mutation naturelle d'un résidu commun au récepteur de la LH et au récepteur α_{1b} -adrénergique entraîne l'activation constitutive du récepteur correspondant [24], responsable d'une puberté précoce dans le cas du récepteur de la LH. Cela confirme que les mécanismes d'activation sont très conservés au sein de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Les autres acides aminés impliqués sont pour la plupart spécifiques du sous-groupe des récepteurs de LH, FSH et TSH. La présence de mutations constitutives du récepteur de la LH et de celui de la TSH dans des segments transmembranaires, c'est-à-dire des régions qui ne peuvent pas *a priori* établir de contacts directs avec Gs, a conduit à l'hypothèse d'une modification, par la mutation, de la structure tridimensionnelle de l'ensemble du domaine. Des études antérieures sur des mutants des récepteurs adrénériques obtenus *in vitro* ont permis de proposer un modèle de l'activation du récepteur [25]. On a proposé l'existence d'un équilibre entre des conformations inactive (R) et active (R*) du récepteur. La conformation R inactive, contrainte, serait «verrouillée» par dif-

férents acides aminés localisés dans le domaine transmembranaire du récepteur. La liaison hormonale permettrait de déplacer l'équilibre vers une forme R* «relâchée» du récepteur. Cette dernière est capable d'interagir avec la protéine Gs et de l'activer. Cette modification allostérique du récepteur, induite par la liaison hormonale, pourrait être reproduite par mutation de ce récepteur dans différentes régions charnières. La modélisation du domaine transmembranaire du récepteur de la LH [26] a suggéré que des mutations activatrices spécifiques pourraient perturber les interactions entre certains segments transmembranaires, soit en altérant les interactions hydrophobes, soit en fragilisant les liaisons hydrogènes entre les résidus polaires présents dans ces segments transmembranaires. La cristallisation du récepteur complet, normal ou muté, permettra de connaître les changements conformationnels réels et de les comparer à ceux induits par la liaison au ligand.

Les boucles extracellulaires du récepteur de la LH jouent également un rôle fonctionnel important et il est possible de distinguer par mutagenèse dirigée les résidus ayant un rôle dans la liaison hormonale ou dans la transmission du signal [20, 21].

Régulation négative

A la suite d'une première stimulation des cellules cibles par la LH ou par la FSH, les cellules deviennent résistantes à une autre stimulation. C'est ce qu'on appelle le phénomène de désensibilisation [1, 2]. Ce phénomène a été particulièrement bien étudié pour les récepteurs β -adrénériques [27, 28]. Il comprend plusieurs composantes. La première qui semble être la plus rapide, entraîne la diminution du nombre de sites de liaison à l'agoniste. Ce mécanisme de régulation négative est secondaire à l'internalisation des complexes hormone-récepteur. Cette internalisation est probablement elle-même secondaire à des modifications posttraductionnelles du récepteur, comme par exemple la phosphorylation. A plus long terme, le phénomène de désensibilisation peut faire intervenir une diminution de l'expression du gène du récepteur, elle-même réglée par l'AMPc.

Le domaine intracellulaire des récepteurs des gonadotrophines contient des sérines et thréonines qui sont potentiellement phosphorylables. La liaison des gonadotrophines augmente puis diminue la phosphorylation du récepteur de la LH [20], mais on ne sait pas encore quel type de protéine-kinase intervient physiologiquement. Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant les régions du récepteur qui seraient phosphorylées. La relation même entre la phosphorylation et la désensibilisation du récepteur de la LH n'est pas encore établie. Pour le récepteur de la FSH, on a montré récemment que la phosphorylation est une étape intermédiaire conduisant au découplage du récepteur et qu'elle s'effectue non pas au niveau du domaine intracellulaire comme cela est classique pour cette famille de récepteurs mais sur des résidus sérine et thréonine localisés dans la première et la troisième boucle intracellulaire [29].

Trafic cellulaire des récepteurs des gonadotrophines

Internalisation du récepteur de la LH au niveau des cellules cibles

Le trafic cellulaire des récepteurs de cette superfamille (en particulier la voie d'internalisation) est mal connu, à l'exception des récepteurs muscariniques et β -adrénergiques pour lesquels on a décrit une endocytose effectuée par l'intermédiaire de vésicules lisses [1]. Ce mécanisme a ensuite été proposé comme modèle pour tous les récepteurs couplés aux protéines G. Des études en microscopie électronique de cellules de Leydig ou de cellules L transfectées en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de la LH ont montré qu'en l'absence d'hormone ce récepteur est dispersé sur toute la surface cellulaire, y compris dans les puits recouverts de clathrine. Le récepteur de la LH est internalisé par une voie faisant intervenir les puits recouverts, les vésicules recouvertes et les corps multivésiculaires jusqu'aux lysosomes où il sera finalement dégradé. Une internalisation constitutive du récepteur existe, faible à l'état basal, qui augmente de 11 fois en présence d'hormone. Il n'y a pratiquement pas

de recyclage du récepteur vers la surface cellulaire [30]. Un double marquage avec des particules d'or de tailles différentes d'un anticorps dirigé contre le récepteur de l'hCG a permis de montrer que le récepteur et l'hormone suivent la même route intracellulaire. Le trafic intracellulaire du récepteur de la LH est semblable à celui du récepteur de l'EGF. Ce trafic du récepteur explique l'importante régulation négative qu'il subit sous l'action de l'hormone.

Ces résultats sont intéressants à comparer à ceux obtenus pour le récepteur de la TSH. En effet, ce récepteur présente une internalisation très faible et la quasi-totalité du récepteur internalisé est recyclée à la surface cellulaire. Là encore, cela est en accord avec la persistance d'une activité du récepteur lors d'une stimulation prolongée (maladie de Basedow par exemple).

Comment l'hormone passe la barrière endothéliale

L'endothélium microvasculaire est formé d'une couche de cellules épithéliales reliées entre elles par des jonctions serrées, constituant ainsi une barrière d'échange pour les macromolécules entre le plasma et le fluide interstitiel. Pour traverser cette barrière, les protéines sériques utilisent un mécanisme de transport non spécifique, en phase fluide, par l'intermédiaire des vésicules lisses. Néanmoins, ce mécanisme est très lent comparé à l'action rapide des hormones qui, de plus, sont présentes en quantité très faible dans le sérum. La question se posait donc de savoir comment l'hormone passe la barrière endothéliale pour atteindre le récepteur situé au niveau des cellules testiculaires ou ovariennes [31]. Le passage de l'hCG à travers l'endothélium microvasculaire du testicule a été étudié par microscopie électronique et par l'analyse du transport de l'hCG et d'anticorps anti-LHR marqués [32]. Cette étude montre que l'hCG interagit avec un composant de la membrane de la cellule endothéliale qui a été identifié comme le récepteur de la LH lui-même. La transcytose de l'hCG nécessite plusieurs étapes (*figure 3*). L'hormone se fixe sur le récepteur à la face luminale de l'endothélium. L'hormone et le récepteur sont alors internalisés par les puits recouverts de cla-

thrine puis sont transférés *via* les vésicules recouvertes de clathrine dans un compartiment endosomique. Le complexe récepteur-hormone est alors dirigé vers le pôle abluminal par des vésicules lisses qui se forment à partir d'extensions tubulaires des endosomes. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et finalement l'hormone est relarguée dans cet espace sous-endothélial. Ce mécanisme de transcytose permet de concentrer l'hormone dans cet espace sous-endothélial au contact des cellules de Leydig où elle pourra agir.

Polarisation des récepteurs des gonadotrophines

Des études immunocytochimiques avec des anticorps monoclonaux ont montré que le récepteur de la FSH [15] a une distribution polarisée basolatérale au niveau des cellules de Sertoli du testicule. La même expression polarisée a été observée pour le récepteur de la TSH dans les cellules folliculaires thyroïdiennes [19]. En revanche, le récepteur de la LH est exprimé de façon circconférentielle au niveau des cellules de la thèque et de la granulosa de l'ovaire et des cellules de Leydig du testicule [33]. Cette différence de distribution pourrait être due à des propriétés différentes de ces récepteurs ou à une différence de propriété des cellules cibles.

Pour répondre à cette question, les récepteurs de la LH et de la FSH ont donc été exprimés dans des cellules MDCK, cellules épithéliales rénales polarisées. Nous avons ainsi pu reproduire la polarisation physiologique basolatérale du récepteur de la FSH dans ces cellules [34]. En outre, le récepteur de la LH qui n'est pas exprimé physiologiquement dans des cellules polarisées subit le même ciblage basolatéral dans les cellules MDCK. Les deux récepteurs possèdent donc dans leur structure un signal d'adressage basolatéral qui est fonctionnel dans des cellules hétérologues polarisées.

De nombreuses études ont établi que le ciblage des protéines membranaires basolatérales nécessite un signal localisé dans leur domaine cytoplasmique [35]. Plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (récepteurs α_2 -adrénergiques, récepteurs sérotoninergiques, récepteur de

l'adénosine A1, récepteur de la PTH, rhodopsine...) ou d'autres récepteurs hormonaux (récepteur de l'insuline) ont un adressage polarisé apical ou basolatéral dans les cellules cibles mais la nature des signaux d'adressage est encore inconnue.

La construction de mutants de délétion du récepteur de la FSH a permis

de mettre en évidence l'existence d'un signal d'adressage basolatéral de 14 acides aminés dans la région carboxy-terminale intracellulaire du récepteur de la FSH, d'une façon inhabituelle à distance de la membrane plasmique [36]. La délétion de ce signal entraîne une localisation apicale du récepteur de la FSH (figure 4).

De plus, le signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH est indépendant du signal d'endocytose et fonctionne de façon autonome. Ce signal est transférable à une autre protéine, le récepteur du NGF, qui a une distribution apicale dans les cellules MDCK et permet d'inverser la polarisation de ce récepteur [36].

La détermination des séquences d'adressage de ces récepteurs peut avoir des répercussions importantes sur la compréhension des altérations de la fonction de ces récepteurs en pathologie.

Étude immunocytochimique des gonades et expression ectopique des récepteurs

Des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs de la LH et de la FSH ont été utilisés pour étudier par immunocytochimie la distribution du récepteur de la LH au cours du développement et de la croissance folliculaire dans les conditions physiologiques. Cette distribution a été comparée à celle des enzymes de la stéroïdogénèse [33, 37].

Le récepteur de la LH est détecté dans toutes les cellules thécales des petits follicules; une division de cette couche cellulaire apparaît au niveau des grands follicules antraux ou préovulatoires: seule la couche externe exprime le récepteur. Cette observation contraste avec le fait que l'ensemble des cellules thécales exprime des enzymes de la stéroïdogénèse et permet donc de supposer une régulation hormonale différente de ces cellules. Une forte régulation négative du récepteur de la LH est observée 48 heures après l'ovulation avec une diminution importante de l'immunomarquage du récepteur. Cette régulation négative est réversible dans les cellules thécales mais irréversible dans les cellules lutéales dérivant de la granulosa.

La possibilité de détecter les récepteurs par des méthodes très sensibles, notamment immunocytochimiques, permet l'analyse d'un groupe minoritaire de cellules dans différents organes. Cela permet d'étudier l'expression du récepteur dans des organes non classiquement connus comme des organes cibles. De nombreuses études par PCR ont par

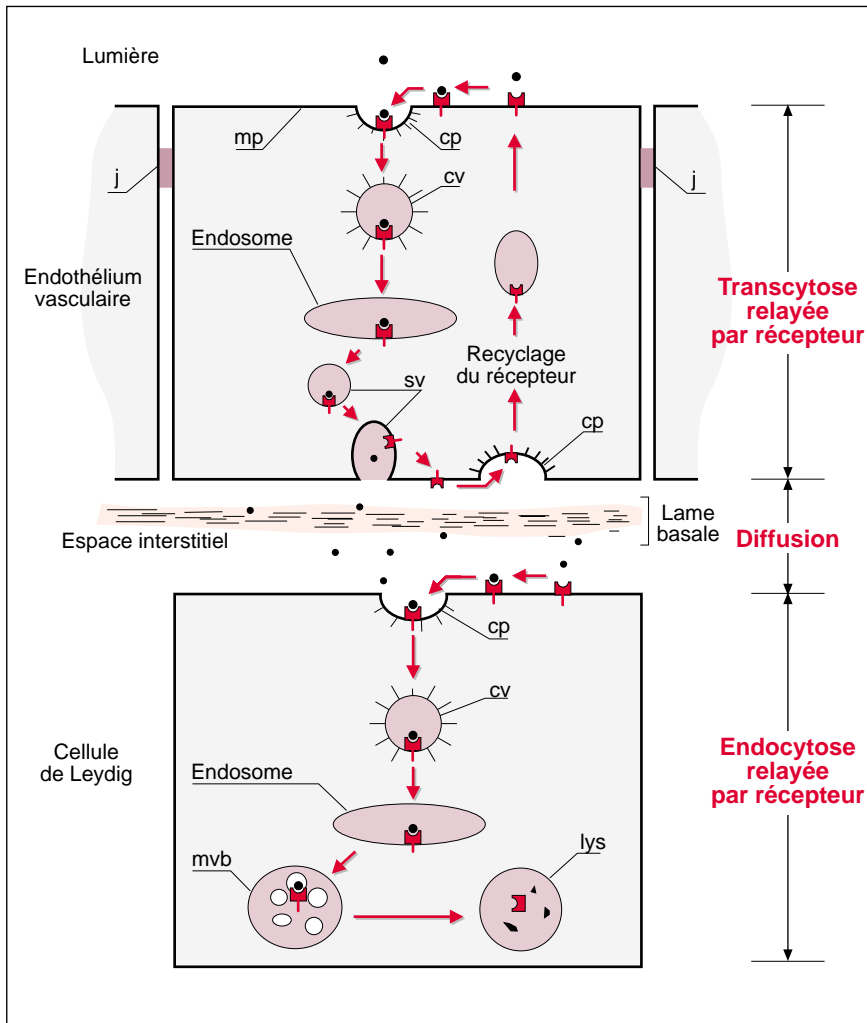


Figure 3. **Trafic cellulaire de l'hCG (hormone gonadotrophine chorionique) et de son récepteur à travers l'endothélium des microvaisseaux testiculaires et au niveau des cellules de Leydig.** L'hormone (rond noir) se fixe sur le récepteur à la face luminale de l'endothélium. L'hormone et le récepteur sont alors internalisés par les puits recouverts de clathrine (cp) puis sont transférés via les vésicules recouvertes de clathrine (cv) dans un compartiment endosomique. Le complexe récepteur-hormone est alors dirigé vers le pôle abluminal par des vésicules lisses (sv) qui se forment à partir d'extensions tubulaires des endosomes. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique (mp) et finalement l'hormone est relarguée et concentrée dans cet espace sous-endothélial; le récepteur est recyclé vers la membrane luminale. Au contact des cellules cibles, les cellules de Leydig, l'hormone est internalisée par une voie faisant intervenir les puits recouverts, les vésicules recouvertes et les corps multivésiculaires (mvb) jusqu'aux lysosomes (lys) où elle sera finalement dégradée. j: jonctions endothéliales.

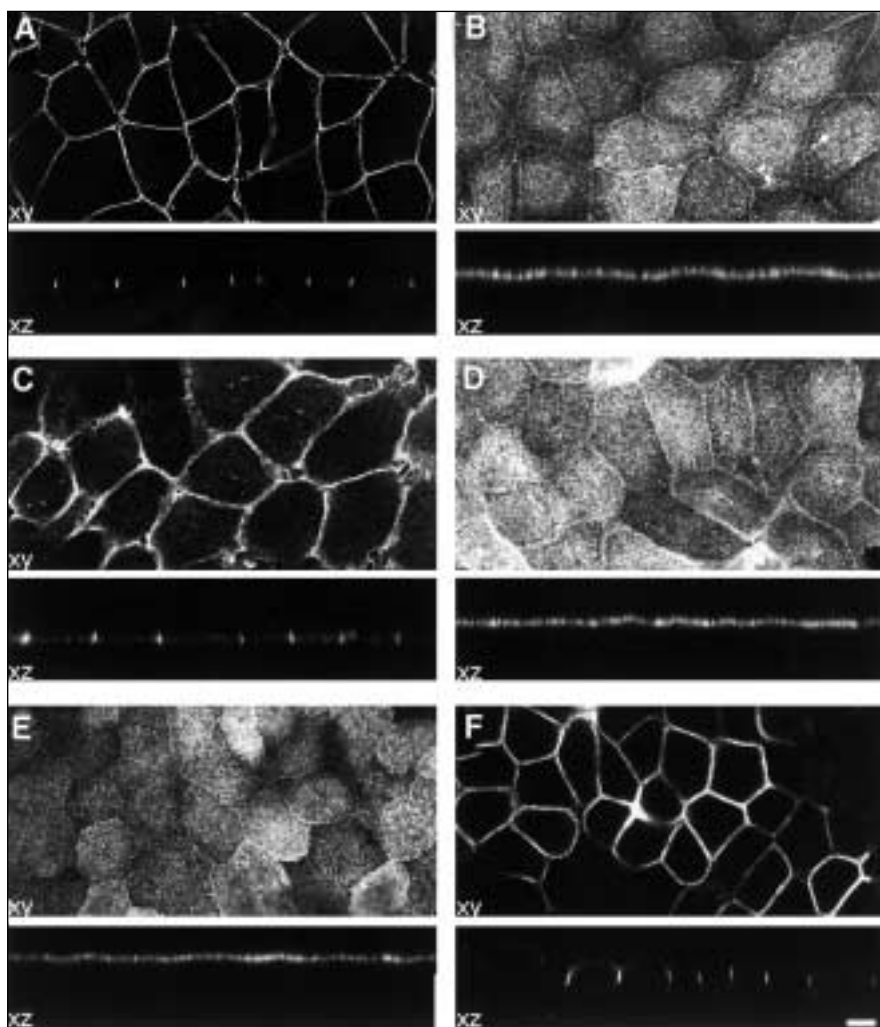


Figure 4. Localisation du signal d'adressage basolatéral du récepteur de la FSH. Observation en microscopie confocale de la distribution du récepteur de la FSH sauvage et muté exprimé dans les cellules MDCK [34]. Des monocouches de cellules confluentes et polarisées sont traitées à l'EGTA pour ouvrir les jonctions serrées. Elles sont incubées avec un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène basolatéral (A), ou apical (B) des cellules MDCK comme contrôle de polarisation cellulaire. Un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur de la FSH est ensuite utilisé pour analyser la distribution du récepteur de la FSH sauvage (C) ou délété d'une partie du domaine intracellulaire: $\Delta 657-695$ (D), $\Delta 677-695$ (E), $\Delta 692-695$. Dans chaque cas, la partie supérieure montre une section horizontale xy qui passe par la membrane apicale (B, D, E) ou basolatérale (A, C, F). La partie inférieure correspond à une section xz perpendiculaire à la section xy. Barre, 10 μm . Noter la distribution basolatérale du récepteur sauvage et la distribution apicale du récepteur tronqué FSHR $\Delta 677-695$ délété du signal de ciblage basolatéral du récepteur [36].

ailleurs été effectuées mais ne permettent pas d'affirmer que la protéine correspondant au transcrit amplifié est exprimée ni de quantifier la proportion de ces transcrits. Nous avons pu détecter la présence du récepteur de la LH dans la glande mammaire dans un modèle animal (espèce porcine) et chez la femme. Ce récepteur

est également présent dans les cancers du sein [38]. Un grand nombre de cancers a été analysé. La corrélation entre la concentration du récepteur de la LH et le pronostic de ces tumeurs ainsi que la réponse à l'hormonothérapie et la chimiothérapie sont en cours d'étude. Ces observations sont en accord avec la descrip-

tion [39] d'un effet inhibiteur de l'hCG sur la croissance des cellules de cancer du sein *in vitro* ou dans un modèle de cancer expérimentalement induit chez les rongeurs. L'effet hormonal pourrait être expliqué par l'induction de la différenciation des cellules mammaires. De plus, la structure de l'hCG obtenue par cristallographie et diffraction aux rayons X [40] montre d'importantes analogies structurales avec la famille de facteurs de croissance «à nœud de cystéines» (NGF, TGF β , PDGF β).

Conclusions

Le clonage des ADNc des récepteurs de la LH et de la FSH et des gènes correspondants a constitué une étape importante dans la compréhension de leur structure et de leur fonction. La détermination de la structure tridimensionnelle des récepteurs normaux ou constitutifs est maintenant nécessaire. Elle permettra de mieux comprendre leur mécanisme d'action et d'aider au développement de nouvelles molécules agonistes ou antagonistes pouvant être utilisées en clinique. Une amélioration des techniques de production de ces récepteurs est un prérequis pour de telles études. L'invalidation des gènes codant pour ces récepteurs ou leurs ligands est en cours et permettra, en conjonction avec les études effectuées chez les malades présentant des anomalies délétères de ces récepteurs, de mieux comprendre le rôle de ces molécules ■

RÉFÉRENCES

- Misrahi M, Beau I, Meduri G, *et al*. Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1998; 12: 35-66.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrinol Rev* 1997; 18: 739-73.
- Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, *et al*. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 1989; 245: 525-8.
- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, *et al*. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989; 245: 494-9.
- Minegish T, Nakamura K, Takakura Y, *et al*. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1049-54.

RÉFÉRENCES

6. Atger M, Misrahi M, Sar S, Le Flem L, Dessen P, Milgrom E. Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding region. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 111: 113-23.
7. Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 525-30.
8. Minegishi T, Nakakura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 1125-30.
9. Libert F, Lefort A, Gerard C, et al. Cloning sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1250-5.
10. Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Sar S, Guiochon-Mantel A, Milgrom E. Cloning sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166: 394-403.
11. Kobe B, Deisenhofer J. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 1993; 366: 751-6.
12. Jiang X, Dreano M, Buckler DR, et al. Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. *Structure* 1995; 3: 1341-53.
13. Vu Hai MT, Jolivet A, Saless R, et al. Monoclonal antibodies against luteinizing hormone receptor. Immunochemical characterization of the receptor. *Endocrinology* 1990; 127: 2090-8.
14. Vu Hai MT, Misrahi M, Houllier M, Jolivet A, Milgrom E. Variant forms of the pig lutropin/choriogonadotropin receptor. *Biochemistry* 1992; 31: 8377-83.
15. Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom E. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry* 1996; 35: 1359-66.
16. Aittomäki K, Lucena JLD, Pakarinen P, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82: 959-68.
17. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human LH (luteinizing hormone) receptor gene to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Gene* 1990; 54: 77-9.
18. Rousseau-Merck MF, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone similar to that of the luteinizing hormone gene. *Genomics* 1993; 15: 222-4.
19. Misrahi M, Milgrom E. The TSH receptor. In: Weetman AP, Grossman A, eds. *Pharmacotherapeutics of the thyroid gland*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1997; 128: 33-73.
20. Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 461-96.
21. Ji TH, Ryu KS, Gilchrist R, Ji I. Interaction, signal generation, signal divergence, and signal transduction of LH/CG and the receptor. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 431-53.
22. Moyle WR, Campbell RK, Rao SN, et al. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1995; 270: 20020-31.
23. Moyle WR, Campbell RK, Myers RV, Bernard MP, Han Y, Wang X. Co-evolution of ligand-receptor pairs. *Nature* 1994; 368: 251-5.
24. Bockaert J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires: physiologie et pathologie de la transduction. *Med Sci* 1995; 11: 382-94.
25. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 4625-36.
26. Lin Z, Shenker A, Pearlstein R. A model of the lutropin/choriogonadotropin receptor: insights into the structural and functional effects of constitutively activating mutations. *Protein Eng* 1997; 10: 501-10.
27. Bouvier M, Nantel F, Valiquette M, Moffett S, Mouillac B. Le récepteur β_2 -adrénergique. Un modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la désensibilisation. *Med Sci* 1995; 11: 819-27.
28. Jaber M, Giros B. Les kinases couplées aux protéines G: désensibilisation des récepteurs β adrénergiques et régulation de l'activité cardiaque. *Med Sci* 1998; 14: 210-4.
29. Nakamura K, Hipkin RW, Ascoli M. The agonist-induced phosphorylation of the rat follitropin receptor maps to the first and third intracellular loops. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 580-91.
30. Ghinea N, Vu Hai MT, Groyer-Picard MT, Houllier A, Schoëvaert D, Milgrom E. Pathways of internalization of the hCG/LH receptor: immunoelectron microscopic studies in Leydig cells and transfected L-cells. *J Cell Biol* 1992; 118: 1347-58.
31. Ghinea N, Milgrom E. Transport of protein hormones through the vascular endothelium. *J Endocrinol* 1995; 145: 1-9.
32. Ghinea N, Vu Hai MT, Groyer-Picard MT, Milgrom E. How protein hormones reach their target cells. Receptor-mediated transcytosis of hCG through endothelial cells. *J Cell Biol* 1994; 125: 87-97.
33. Meduri G, Vu Hai MT, Jolivet A, Milgrom E. New functional zonation in the ovary as shown by immunohistochemistry of luteinizing hormone receptor. *Endocrinology* 1992; 131: 366-73.
34. Beau I, Misrahi M, Gross B, et al. Basolateral localization and transcytosis of gonadotropin and thyrostimulin receptors expressed in MDCK cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 5241-8.
35. Matter K, Mellman I. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 545-54.
36. Beau I, Groyer-Picard MT, Le Bivic A, et al. The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 18610-6.
37. Meduri G, Vu Hai MT, Jolivet A, et al. Comparison of cellular distribution of LH receptors and steroidogenic enzymes in the porcine ovary. *J Mol Endocrinol* 1996; 148: 435-46.
38. Meduri G, Charnaux N, Loosfelt H, et al. LH/hCG receptors in breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 857-64.
39. Russo J, Russo IH. Hormonally induced differentiation: a novel approach to breast cancer prevention. *J Cell Biochem* 1995; 22 (suppl): 58-64.
40. Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369: 455-61.

Summary

Gonadotropin receptors: from cloning to genetic diseases

The LH/CG receptor was the first member of a novel family of G protein coupled receptors to be cloned. This family also includes FSH and TSH receptors. These receptors exhibit a seven transmembrane domain characteristic of all G protein coupled receptors, but a large extracellular domain involved in ligand binding and related to leucine-rich glycoproteins is specific of this family of receptors. Different forms of LH and FSH receptors are physiologically expressed: a mature transmembrane species corresponding to the functional receptor and a high mannose precursor which accumulates inside the cell. Variant forms of the LH receptor generated by alternative splicing and lacking transmembrane domain have been isolated. They can potentiate the full length receptor function. Human LH and FSH receptor genes are both localised on chromosome 2p21. The genes are very large (> 70 kpb). Introns are restricted to the 5' part encoding the extracellular domain of the receptor. The intracellular traffic of the LH receptor has been studied by immunoelectron microscopy in Leydig cells and in transfected L cells. The same approach was used to study the receptor-mediated transendothelial transfer of hCG in testicular microvasculature. The physiological polarisation of the FSH receptor has been reproduced in MDCK cells and a basolateral targeting signal identified. Mutagenesis studies gave informations on structure-function relationships. Mice with deleted FSH β and FSH receptor genes have been obtained. Altogether these models help understanding the role of gonadotropins and their receptors in the ontogenesis and differentiation of gonads.