

LA KISSPEPTINE, UN NOUVEL ACTEUR CLÉ DANS LE CONTRÔLE DE LA REPRODUCTION

KISSPEPTIN, A NEW KEY PLAYER IN REPRODUCTION CONTROL

Par Massimiliano BELTRAMO⁽¹⁾ et Alain CARATY
(Communication présentée le 23 Janvier 2014)

RÉSUMÉ

La découverte de la kisspeptine et de son récepteur, KISS1R, a permis une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes qui contrôlent la reproduction et plus particulièrement, la sécrétion de la GnRH. L'administration de la kisspeptine chez différentes espèces de mammifères permet de stimuler la sécrétion de la GnRH et chez la brebis, d'induire l'ovulation en contre-saison. Son action sur la libération de la GnRH est sous le rétrocontrôle à la fois positif et négatif des hormones sexuelles qui agissent directement et de façon opposée sur les deux populations de neurones à kisspeptine présentes dans l'hypothalamus. L'intérêt de cette molécule pour une utilisation en élevage ou en clinique humaine est évident, mais sa demi-vie très courte a été pour le moment un frein à son exploitation. La création d'analogues à durée d'action accrue représente une solution possible à ce problème et les premiers résultats sont encourageants.

Mots-clés : kisspeptine, GnRH, ovulation, reproduction.

SUMMARY

The discovery of the role of kisspeptin and of its cognate receptor, KISS1R, has been a breakthrough in the understanding of the mechanisms underpinning reproduction and in particular GnRH secretion. The injection of kisspeptin in various mammalian species showed its capacity to stimulate GnRH secretion and to trigger ovulation in anoestrus ewe. This capacity is under the control of sexual hormones that act directly and with opposite effects on the two kisspeptin neuronal populations present in the hypothalamus. There is a clear interest for the use of this molecule in farming and in human medicine although its short half-life has until now hampered its exploitation. The design of analogs with longer half-life represents a possible solution and preliminary results look promising.

Key words: kisspeptine, GnRH, ovulation, reproduction.

INTRODUCTION

La GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*), libérée dans le sang porte hypothalamique, est le facteur qui déclenche la libération de la LH (*Luteinizing Hormone*) et de la FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) par les cellules gonadotropes hypophysaires. Ces deux hormones stimulent les gonades induisant un état favorable à la reproduction. Chez la femelle des mammifères, deux modalités principales de sécrétion de la GnRH ont été décrites: une sécrétion pulsatile de faible intensité et une décharge massive (que nous

appellerons pic de la GnRH dans cet article). Lors de la libération pulsatile, une quantité limitée de GnRH est libérée dans le sang porte en un temps réduit et à des intervalles réguliers. La fréquence des pulses varie en fonction de l'espèce, de la phase du cycle ovarien et de la période de l'année pour les espèces ayant une reproduction saisonnière. Par contre, une sécrétion massive de GnRH, en un pic, se produit sur une période plus longue. Elle est la réponse à une augmentation de la concentration d'œstradiol circulant dans le sang, qui est produit par le follicule lors de sa maturation. Elle provoque l'augmentation de la concentration

(1) Massimiliano Beltramo, PhD, Institut National de la Recherche Agronomique, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Équipe « Neurobiologie Intégrative de la Reproduction », INRA UMR85 - CNRS UMR7247 - 37380 Nouzilly, France,
Tel 00 33 2 47 42 73 60, Fax 00 33 2 47 42 77 43
E-mail : Massimiliano.Beltramo@tours.inra.fr

plasmatique de la LH, ou pic de la LH, qui induit la rupture du follicule et l'ovulation. Les mécanismes qui sous-tendent ces deux types de sécrétion sont différents.

Jusqu'à récemment, le mode d'action de l'œstradiol sur les neurones à GnRH qui possèdent peu ou pas de récepteurs pour cette hormone restait à élucider. L'hypothèse admise était celle de l'existence d'autres neurones (interneurones) présents dans l'hypothalamus medio-basal, capables de détecter l'augmentation d'œstradiol et de transmettre cette information aux neurones à GnRH. Néanmoins, leur identification neurochimique demeurait l'une des grandes questions dans le domaine du contrôle de la reproduction.

En 2003, la découverte simultanée par deux équipes (de Roux *et al.* 2003; Seminara *et al.* 2003), d'un rôle majeur dans la reproduction de la kisspeptine, un neuropeptide, et de son récepteur (KISS1R aussi appelé GPR54) a profondément modifié nos connaissances du contrôle central de la reproduction. Les résultats obtenus par ces équipes montrent que des mutations chez l'homme de KISS1R induisent l'hypogonadisme et empêchent la puberté. Par ailleurs, l'invalidation de ces gènes chez la souris provoque l'infertilité et une très forte réduction de la taille des organes sexuels (Seminara *et al.* 2003).

Le gène codant la kisspeptine est traduit en une protéine de 145 acides aminés. Cette protéine est clivée, chez l'homme, en un peptide de 54 acides aminés appelé métastatine ou KP54, qui est capable d'activer le KISS1R. Le KP54 peut être clivé à son tour en fragments plus courts de longueur variable, qui contiennent tous la partie C-terminale de la métastatine. Ces fragments sont appelés, en fonction de leur longueur en acides aminés, KP16, KP14, KP13 et KP10. Dans des tests *in vitro*, ils sont tous également actifs sur le KISS1R. Le gène de la kisspeptine code donc une famille de neuropeptides d'activité semblable.

Le KISS1R appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Sur des lignées cellulaires transfectées, exprimant le KISS1R, la kisspeptine provoque une mobilisation intracellulaire du calcium ; cette réponse indique que le récepteur est couplé aux protéines Gq (Kotani *et al.* 2001; Ohtaki *et al.* 2001). D'autres voies de signalisation intracellulaire sont également activées, telles que celles de la MAP kinase et des β -arrestines (Beltramo *et al.* 2014).

La production d'un anticorps sélectif, dirigé contre la partie C-terminale commune aux différentes formes de kisspeptine, a permis de montrer que les cellules produisant la kisspeptine sont localisées principalement dans deux parties de la région hypothalamique du cerveau : l'aire préoptique/région periventriculaire et le noyau arqué (Franceschini *et al.* 2006). Des doubles marquages par immunohistochimie montrent qu'une proportion importante des neurones de ces populations expriment le récepteur ER α des œstrogènes (Franceschini *et al.* 2006). Ces neurones sont donc capables de réagir directement à l'augmentation du taux plasmatique des œstrogènes et représentent le maillon manquant du rétrocontrôle exercé par les œstrogènes sur les neurones à GnRH. Les deux populations neuronales qui

expriment la kisspeptine sont sexuellement dimorphiques. La population localisée dans l'aire préoptique/région periventriculaire est plus importante chez les femelles. Les résultats obtenus indiquent que les deux populations répondent de façon différente à la présence des stéroïdes sexuels. Des taux plasmatiques d'œstrogènes élevés stimulent les neurones à kisspeptine localisés dans l'aire préoptique/région periventriculaire, mais inhiberaient ceux localisés dans le noyau arqué. Dans une hypothèse fonctionnelle, il est suggéré que les premiers sont impliqués dans l'induction du pic de la GnRH et les seconds interviendraient plutôt dans le contrôle de sa pulsativité.

Les deux populations de neurones à kisspeptine diffèrent aussi par la nature des neuromodulateurs qu'ils expriment. Ceux du noyau arqué co-expriment de façon importante deux autres neuropeptides, la neurokinine B et la dynorphine (Goodman *et al.* 2007), qui contrôlent aussi la reproduction : la neurokinine B a un effet stimulateur et la dynorphine, un effet inhibiteur. La co-expression de ces deux neuropeptides avec la kisspeptine et l'expression de leurs récepteurs dans les mêmes neurones du noyau arqué suggèrent l'existence d'un circuit local d'autorégulation. Ceux-ci constituent en fait une sorte de « *pacemaker* » qui interviendrait dans la régulation pulsatile de la GnRH. Chez la souris, une partie des neurones de la région periventriculaire contenant la kisspeptine expriment la tyrosine hydroxylase (Clarkson & Herbison, 2011), enzyme de la voie de synthèse de catécholamines, la met-enképhaline et en moindre mesure, la galanine (Porteous *et al.* 2011).

INDUCTION DE LA SÉCRÉTION DE LA GNRH PAR LA KISSPEPTINE

Des résultats d'immunohistochimie analysés en microscopie confocale montrent que les fibres à kisspeptine établissent des connexions synaptiques avec les neurones à GnRH, aussi bien au niveau de leur corps cellulaires que de leurs terminaisons axonales. Par ailleurs, il a été montré que des neurones à GnRH expriment le récepteur KISS1R (Irwig *et al.* 2004). Ils représentent entre 75 et 90% de la population totale des neurones à GnRH, selon l'espèce, les noyaux hypothalamiques, l'âge et les études considérées (Beltramo *et al.* 2014). Ces résultats suggèrent que la kisspeptine exerce une action directe sur la sécrétion de la GnRH, mais que certains neurones à GnRH y seraient insensibles. La confirmation d'une action directe a été fournie en couplant l'utilisation de souris transgéniques exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) dans les neurones à GnRH et l'électrophysiologie sur des tranches de leur cerveau (Han *et al.* 2005) : la kisspeptine induit une dépolarisation des neurones à GnRH identifiés par la fluorescence verte. *In vivo*, l'injection d'un antagoniste de la GnRH bloque l'augmentation de la LH obtenue par la kisspeptine (Irwig *et al.* 2004). L'ensemble de ces résultats confirme que les effets de la kisspeptine sur la libération de la LH sont principalement la conséquence de la stimulation des neurones à GnRH, même si une action directe sur les cellules hypophysaires gonadotropes a aussi été proposée.

ESSAIS DE TRAITEMENTS PAR LA KISSPEPTINE

Influence des modalités de traitement

Le rôle de la kisspeptine dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique a suggéré des applications possibles en élevage et en clinique humaine. Une seule injection induit rapidement une augmentation de la sécrétion de la LH, de courte durée. Cette brève durée d'action est due à la très courte demi-vie de la kisspeptine. Une fois dans le sang, elle est rapidement dégradée par plusieurs protéases et de par la petite taille de ses métabolites, rapidement excrétée par les reins (**figure 1**).

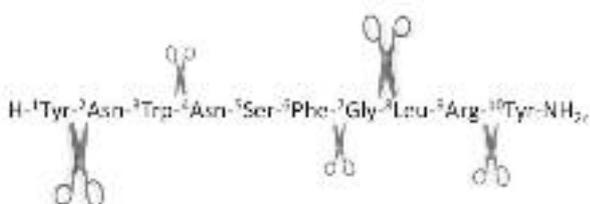


Figure 1 : Sites de clivage de la kisspeptine 10. La kisspeptine 10 est la forme active la plus courte des neuropeptides issues du gène de la kisspeptine. Une fois sécrétée, la molécule est rapidement dégradée. Les ciseaux indiquent les principaux sites de clivage de la molécule et la taille des ciseaux et proportionnelle à l'importance du site de clivage.

Dans le but d'explorer les effets d'une stimulation plus prolongée, des injections répétées ou des administrations de KP10 à concentration constante réalisée au travers d'une perfusion intraveineuses ont été réalisées. L'injection deux fois par jour de KP54 pendant deux semaines chez des femmes présentant une aménorrhée hypothalamique produit une augmentation initiale de la LH et de la FSH ; celle-ci est suivie par une désensibilisation des neurones à GnRH à l'action de la kisspeptine qui perd rapidement son efficacité. Par contre, un protocole de deux injections par semaine de KP54 reste efficace après deux semaines de traitement (Jayasena *et al.* 2010).

Chez la brebis, l'injection de KP10 induit une augmentation de la libération de la LH et l'injection répétée à douze heures d'intervalle n'entraîne pas de réduction de la réponse (Caraty *et al.* 2007).

Chez le jeune macaque (*Macaca mulatta*) mâle castré, des injections répétées de KP10 toutes les heures produisent une pulsativité de la libération de la LH pendant plusieurs jours (Plant *et al.* 2006). Une perfusion intraveineuse continue de KP10 conduit, après une période de stimulation de la libération de la LH, à une réduction importante de sa libération, alors que le traitement se poursuit (Seminara *et al.* 2006). Pendant la perfusion de kisspeptine, l'injection de la GnRH, ou de l'NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) qui stimule la sécrétion de la GnRH, produit une augmentation de la sécrétion de la LH. Ces résultats suggèrent que la réduction de l'effet de la kisspeptine pendant la perfusion est liée à la désensibilisation du KISS1R et non pas à une déplétion de stock de la GnRH ou de la LH (Seminara *et al.* 2006).

Deux explications sont possibles pour réconcilier ces résultats contradictoires, d'une part l'utilisation de molécules différentes (KP54 et KP10) mais, plus vraisemblablement, l'utilisation de doses différentes. La réduction de la réponse à la kisspeptine a été observée avec des doses élevées : 6,4 nmol/kg pour les injections répétées chez la femme et 75 nmoles/heures pour la perfusion intraveineuse continue chez le macaque. Par contre, des doses de 25 à 50 fois plus faibles (1,5 nmole/animal chez le singe et 12,6 nmoles/animal chez la brebis) dans les protocoles d'injections répétées ont permis de maintenir une réponse à la kisspeptine. Des doses plus faibles mais efficaces garantissent la réactivité du système, qu'elles soient administrées de façon répétée ou continue. En effet, les concentrations plasmatiques de la GnRH et de la LH sont constamment plus élevées que les niveaux de base lors d'une perfusion de la kisspeptine à faible concentration (20 µg/heure) pendant cinq heures (**figure 2**). De plus, une injection de kisspeptine à la fin de la perfusion est encore capable d'induire un pic de sécrétion de la LH (Caraty *et al.* 2013).

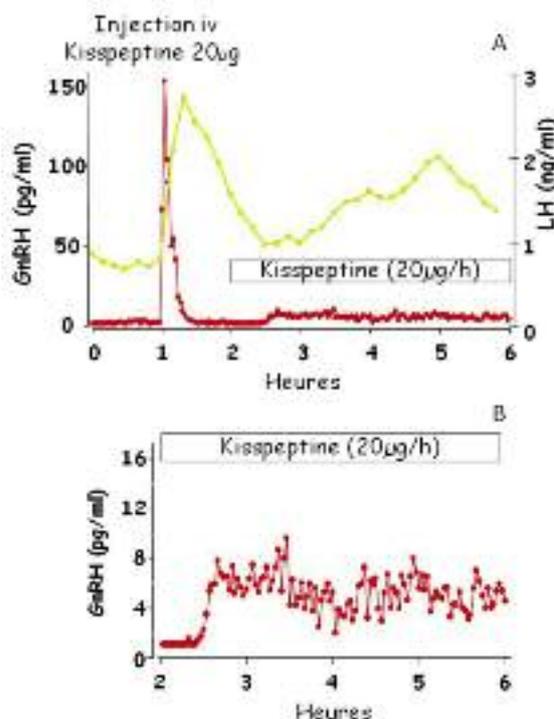


Figure 2 : Effet de la kisspeptine sur la libération de la GnRH et de la LH. A. Au temps 0, l'injection de 20 µg de kisspeptine par voie veineuse provoque une augmentation extrêmement rapide de la concentration plasmatique de la GnRH, qui retourne rapidement à son niveau de base. Ce pic stimule la libération de la LH dont la concentration plasmatique revient à son niveau de base avec une cinétique plus lente. Au temps 2 heures, une perfusion de kisspeptine (20 µg/h) déclenche une augmentation plus lente de la GnRH et de la LH, qui persiste tout au cours de la perfusion. B. Agrandissement de la figure A sur la période 2-6h de perfusion : il permet de mieux apprécier l'augmentation du taux plasmatique de la GnRH pendant la période de perfusion.

Induction de l'ovulation par la kisspeptine

L'ovulation est déclenchée par une libération massive de la LH dans le sang. Est-il possible de reproduire cet évènement physiologique par l'administration de kisspeptine exogène ? Une injection unique de kisspeptine, même à une dose importante, ou des injections répétées de kisspeptine toutes les 12 heures pendant 48 heures, n'induit pas de pic pré-ovulatoire de la LH chez la brebis (Caraty *et al.* 2007). Par contre, la perfusion de KP10, à la dose de 12,6 nmoles/heure pendant 48 heures, chez des brebis en anoestrus déclenche l'ovulation chez plus de 80% d'entre elles (Caraty *et al.* 2007). Lorsqu'on suit les concentrations plasmatiques de la LH et de la FSH lors de la perfusion, on observe d'abord leur augmentation transitoire pendant environ cinq heures, suivie, à la fin de cette période, de leur réduction ; celle de la LH reste toutefois plus élevée que son taux de base. Cette situation hormonale entraîne une augmentation progressive et prolongée de la concentration plasmatique d'œstradiol qui, par rétroaction positive, déclenche le pic pré-ovulatoire de LH (Sebert *et al.* 2010). Dans cette étude, le profil plasmatique des hormones gonadotropes est très semblable à celui observé au cours d'un cycle ovulatoire normal. Ces résultats sont très intéressants parce qu'ils prouvent l'induction d'une ovulation en saison de repos sexuel par une perfusion de KP10. Néanmoins, un tel traitement, trop contraignant, ne peut être utilisé en élevage ou en clinique humaine

Effets d'analogues de la kisspeptine

Peu d'études sont menées pour identifier des molécules dont le profil pharmacologique permettrait une meilleure efficacité dans les tests *in vivo*. Un analogue de synthèse de la KP appelé [dY]1KP-10 provoque, chez la souris mâle, une augmentation de la LH et de la testostérone plus élevée que celle induite par la KP10 (Curtis *et al.* 2010).

Dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments pour le traitement de cancers sensibles aux hormones, des analogues de la kisspeptine sont synthétisés et testés chez l'homme et la souris. Chez les deux espèces, une fois injectées, ces molécules sont plus résistantes à la dégradation. Administrées en perfu-

sion, elles produisent une réponse biphasique caractérisée par une augmentation initiale de la concentration de LH suivie par sa réduction à des niveaux très faibles (Matsui *et al.* 2012 ; Scott *et al.* 2013). La réduction de la LH à des niveaux très bas et, par conséquent, des hormones stéroïdiennes, est dans ce cas l'effet thérapeutique recherché.

Par contre, pour stimuler l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique afin de déclencher l'ovulation, il est souhaitable d'avoir une molécule permettant, par une injection unique, d'obtenir l'augmentation de LH prolongée et contrôlée dans le temps. Pour cet objectif, nous avons adopté une stratégie de modification chimique de la KP10 conduisant à la synthèse de molécules qui portent un bio-isostère non hydrolysable en remplacement de liaisons peptidiques sensibles à la dégradation protéolytique. L'introduction d'un bio-isostère non hydrolysable associée à d'autres modifications chimiques, en particulier l'introduction d'un groupement acétyle en position N-terminale, nous permet d'obtenir des molécules plus puissantes dont la durée de vie est significativement accrue par rapport à celle de la KP10. Elles entraînent une augmentation prolongée de la concentration plasmatique de LH en saison d'anoestrus chez la brebis. Encore faut-il qu'elles puissent, par une injection unique, induire une ovulation, ce qui est l'objectif des futurs essais.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Depuis la découverte du rôle de la kisspeptine dans la reproduction il y a 10 ans, la compréhension des mécanismes de régulation de l'activation des neurones à GnRH a considérablement progressé et permis, notamment, d'élaborer de nouvelles hypothèses sur le fonctionnement des réseaux neuronaux qui contrôlent la reproduction. Ces avancées majeures de la physiologie permettent d'envisager de nouveaux traitements pour remédier aux infertilités observées à la fois chez les animaux d'élevage et chez l'Homme. Chez les animaux d'élevage, l'induction de l'ovulation en contre-saison et la synchronisation de l'ovulation sont deux objectifs majeurs ; ils pourraient être atteints grâce à la mise au point et à l'utilisation d'agonistes du KISS1R avec une durée de vie prolongée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Laurence Dufourny pour la relecture critique du manuscrit.

Ce travail à été financé par la Région Centre, projet Reprokiss.

BIBLIOGRAPHIE

- Beltramo M, Dardente H, Cayla X, Caraty A. Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Molecular and cellular endocrinology* 2014; 382: 387–99.
- Caraty A, Lomet D, Sebert ME, Guillaume D, Beltramo M, Evans NP). Gonadotrophin-releasing hormone release into the hypophyseal portal blood of the ewe mirrors both pulsatile and continuous intravenous infusion of kisspeptin: an insight into kisspeptin's mechanism of action. *Journal of neuroendocrinology* 2013; 25: 537–46.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 2007; 148: 5258–67.
- Clarkson J & Herbison AE. Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *Journal of neuroendocrinology* 2011; 23: 293–301.
- Curtis AE, Cooke JH, Baxter JE, Parkinson JR, Bataveljic A, Ghatei MA *et al.* A kisspeptin-10 analog with greater *in vivo* bioactivity than kisspeptin-10. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2010; 298: E296–303.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10972–76.
- Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett.* 2006; 401:225–30.
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR *et al.* Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 2007; 148: 5752–60.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 2005;25: 11349–56.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 264–72.
- Jayasena CN, Nijher GM, Abbara A, Murphy KG, Lim A, Patel D *et al.* Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 88: 840–47.
- Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.*2001; 276: 34631–36.
- Matsui H, Tanaka A, Yokoyama K, Takatsu Y, Ishikawa K, Asami T *et al.* Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KiSS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats. *Endocrinology* 2012; 153: 5297–308.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613–7.
- Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 2006; 147: 1007–13.
- Porteous R, Petersen SL, Yeo SH, Bhattarai JP, Ciofi P, de Tassigny XD *et al.* Kisspeptin neurons co-express met-enkephalin and galanin in the rostral periventricular region of the female mouse hypothalamus. *The Journal of comparative neurology* 2011; 519: 3456–69.
- Scott G, Ahmad I, Howard K, MacLean D, Oliva C, Warrington S *et al.* Double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of TAK-683, an investigational metastin analogue in healthy men. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75: 381–91.
- Sebert ME, Lomet D, Said SB, Monget P, Briant C, Scaramuzzi RJ, Caraty A. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: potential role of estradiol. *Domest Anim Endocrinol.* 2010; 38: 289–98.
- Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF Jr, Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 2006; 147: 2122–26.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* 2003; 349: 1614–7.