

LE SYSTÈME KISSPEPTINE: AU COEUR DU CONTRÔLE DE LA REPRODUCTION

KISSPEPTIN SYSTEM: INTO THE HEART OF REPRODUCTION CONTROL

Par Massimiliano BELTRAMO⁽¹⁾ et Laurence DUFOURNY⁽¹⁾
(Mémoire présenté le 12 février 2015)

RÉSUMÉ

Depuis la découverte de son importance en physiologie de la reproduction, le système composé par le neuropeptide kisspeptine et son récepteur (KISS1R) a fait l'objet d'une intense activité de recherche. Chez les mammifères, il joue un rôle dans de nombreux aspects de la reproduction. En raison de la richesse des données disponibles, nous avons focalisé notre attention sur un nombre limité de points suffisants, néanmoins, pour en avoir une vision générale. Les données neuroanatomiques et physiologiques nous permettent d'illustrer la fonction principale de ce système, qui est de réguler l'activité des neurones à GnRH et notamment de leur mode de sécrétion (pulsatile ou pic préovulatoire aussi appelé *surge*). Puis, son implication dans le déclenchement de la puberté et le contrôle de l'ovulation est développée. Pour terminer, sont décrites les applications possibles de la modulation du système Kp en zootechnie, pour une meilleure maîtrise de la reproduction des animaux d'élevage ou à forte valeur patrimoniale, et en médecine vétérinaire ou humaine, pour le traitement des troubles de la fonction de reproduction.

Mot-clés: kisspeptine, GnRH, LH, FSH, reproduction, ovulation.

SUMMARY

Since the discovery of its importance in reproduction, the system formed by the neuropeptide kisspeptin and its receptor (KISS1R) has been the object of intense research activities. The results obtained in mammals show that this system plays an important role in several aspects of reproduction. Considering the extent of available data, we have focused our attention on a limited number of points that allow anyhow drawing a general picture of the field. First, we will illustrate the neuroanatomical and physiological data that permitted to establish that the main action of the system is the regulation of GnRH neurons and of their secretion patterns (pulsatile or surge). Then we will describe evidence for the implication of this system in initiating puberty and triggering ovulation. Finally, we will sketch a picture of the possible applications of Kp system modulation to better manage reproduction or to treat pathologies of the reproductive system either in veterinary or human medicine.

Key words: kisspeptin, GnRH, LH, FSH, reproduction, ovulation.

(1) 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.
Corresponding author : Massimiliano Beltramo, PhD, E-mail Massimiliano.Beltramo@tours.inra.fr,
Tel +33 (0)2 47 42 73 60, Fax +33 (0)2 47 42 77 43

La reproduction est une fonction essentielle pour la survie et l'évolution des espèces. Au cours de l'évolution, différents mécanismes se sont mis en place afin de permettre l'intégration des informations en provenance de l'environnement et du milieu interne garantissant ainsi les conditions de reproduction les plus favorables. Pour ce faire, les différentes informations doivent être intégrées et élaborées pour fournir une réponse univoque. Le système nerveux central, et plus précisément l'hypothalamus médio-basal, représente le centre dirigeant cette fonction. Au cours des dernières décennies, un système complexe d'interactions entre différents réseaux neuronaux impliqués dans ce contrôle et mettant en jeu plusieurs neurotransmetteurs et neuromodulateurs, a été peu à peu découvert. L'identification au cours des années 2000 de l'importance d'un nouveau neuropeptide, la kisspeptine (Kp) a profondément modifié le schéma initialement proposé puisque la Kp constitue la clé de voute de ce système. La Kp est un facteur essentiel dans plusieurs aspects de la reproduction qui vont du déclenchement de la puberté à l'ovulation. Une analyse détaillée de l'ensemble des informations disponibles sur ce sujet serait trop vaste pour cette revue. Nous avons donc choisi, après une introduction générale, de nous focaliser seulement sur certains aspects du système à Kp : la neuroanatomie du système Kp, son rôle dans la libération pulsatile des gonadotrophines, le déclenchement de la puberté, et l'induction de l'ovulation ainsi que les applications possibles de la modulation pharmacologique de ce système.

INTRODUCTION

Le nom de kisspeptine (Kp) se réfère dans l'usage courant à une famille de neuropeptides hypothalamiques dérivés d'un même précurseur. Chez l'homme, ce précurseur composé de 145 acides aminés est clivé par des convertases des prohormones en une forme active longue de 54 acides aminés, appelée Kp54. Par clivages successifs, la Kp54 donne naissance à des formes plus courtes contenant 14, 13 ou 10 acides aminés nommées respectivement Kp14, Kp13 et Kp10. Ces formes sont toutes biologiquement actives et ont en commun les dix derniers acides aminés de la partie C-terminale, partie hautement conservée chez les vertébrés et en particulier chez les mammifères (tableau 1).

Il est intéressant de noter que la tyrosine présente en position terminale chez la plupart des mammifères est remplacée chez les primates par une phénylalanine, dans les deux cas cet acide aminé est amidé. En outre, la séquence de la Kp10 du cheval et du chien diffère d'un acide aminé par rapport à la séquence de base des mammifères non-primates. Pour le chien, il s'agit de la sérine en position 5 qui est remplacée par une valine et, dans le cas du cheval, de l'asparagine en position 2 qui est remplacée par une arginine. L'effet de ces changements sur l'affinité, la puissance et l'efficacité⁽²⁾ de ces formes de la Kp n'a

pas été étudié, mais constitue sûrement un sujet qui mériterait d'être approfondi.

À l'origine, la Kp a été décrite au cours de recherches sur les tumeurs (Lee *et al.* 1996). En particulier la forme longue a été identifiée comme un possible facteur anti-métastatique et le nom de métastatine a ainsi été également utilisé pour la désigner. La cible moléculaire des kisspeptines à l'époque est inconnue et c'est seulement quelques années plus tard qu'elle a été identifiée comme étant le récepteur orphelin GPR54 (Kotani *et al.* 2001 ; Ohtaki *et al.* 2001), maintenant appelé KISS1R. Le KISS1R est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G et en particulier, à la protéine Gq11. La présence de son ARN messenger a été détectée par PCR dans plusieurs organes : cerveau, placenta, pancréas, ovaire, etc. (Kotani *et al.* 2001 ; Ohtaki *et al.* 2001). La stimulation du récepteur provoque une augmentation du calcium intracellulaire dans les neurones, provoquant leur dépolarisation et de là leur activation et la libération de leurs neurotransmetteurs. Le système Kp/KISS1R a donc un rôle essentiellement stimulateur de l'activité neuronale.

Des études phylogénétiques documentent l'existence d'orthologues de la Kp et de son récepteur chez la plupart des vertébrés. Un travail récent montre la présence de duplications des gènes codant la Kp et son récepteur dans certains groupes de vertébrés. Des analyses bioinformatiques suggèrent une classification des récepteurs en quatre clades, basée sur l'homologie des séquences peptidiques (Pasquier *et al.* 2012). Le Kissr-1 et ses orthologues sont présents chez les mammifères, le xénope et certains poissons ; le Kissr-2 est présent principalement chez les poissons téléostéens et les amphibiens ; le Kissr-3, chez le xénope et certains poissons ; le Kissr-4, chez deux espèces de poissons osseux d'origine phylogénétiquement ancienne, le lézard anole vert (*Anolis carolinensis*) et l'ornithorynque. Le ou les gènes codant la Kp et son récepteur font défaut chez les oiseaux qui semblent une exception notable, malgré l'existence

Espèce	Séquence
Homo sapiens	YNWNSFGLRF
Pan troglodytes	YNWNSFGLRF
Macaca mulatta	YNWNSFGLRF
Capra hircus	YNWNSFGLRY
Ovis aries	YNWNSFGLRY
Bos taurus	YNWNSFGLRY
Sus scrofa	YNWNSFGLRY
Felis catus	YNWNSFGLRY
Canis familiaris	YNWNVFLGRY
Mus musculus	YNWNSFGLRY
Equus caballus	YRNWNSFGLRY

Tableau 1 : Comparaison des séquences de la Kp10 dans différentes espèces de mammifères. En rouge sont indiqués les acides aminés qui diffèrent de la séquence de base.

(2) L'efficacité d'une molécule est la réponse maximale qu'une molécule est capable de produire, par exemple, le taux maximal d'augmentation du calcium intracellulaire. Par contre, la concentration à laquelle une molécule produit 50% de son effet maximal est une mesure de sa puissance. Il existe des molécules très puissantes mais peu efficaces et des molécules très efficaces mais peu puissantes.

d'un gène semblable à celui de *Kissr2* suggérant la régression et la perte de ce système dans cette classe (Pasquier *et al.* 2014).

La découverte de l'importance du système Kp dans la reproduction date de 2003 quand deux groupes différents ont démontré l'implication de mutations dans le récepteur de la Kp dans l'hypogonadisme hypogonadotrope et la régulation de la puberté (de Roux *et al.* 2003 ; Seminara *et al.* 2003). Ces résultats ont stimulé les travaux sur le rôle de la Kp dans la reproduction et très rapidement l'ampleur de ses effets est devenue claire. Nos connaissances sont issues de recherches effectuées principalement chez les mammifères et, dans une moindre mesure, chez les poissons, encore qu'il ait été montré récemment chez le poisson zèbre que la délétion des deux gènes codant les peptides et des deux codant leurs récepteurs n'a pas un impact important sur la reproduction de cette espèce. Très peu d'études sont disponibles dans les autres classes de vertébrés (Tang *et al.* 2014). En raison de ces résultats et de nos connaissances très focalisées sur les mammifères, il est prématuré de dresser un cadre général de la fonction du système Kp dans la reproduction chez les vertébrés. Ainsi, dans la suite de cet article, allons-nous centrer notre attention sur l'influence de la Kp dans la reproduction des mammifères chez lesquels ce système joue un rôle essentiel et mieux défini.

NEUROANATOMIE DU SYSTÈME KISSEPTINE CHEZ L'ADULTE

La localisation anatomique des cellules exprimant la Kp a été étudiée par immunohistochimie et par hybridation *in situ*. Les premiers résultats obtenus par l'immunohistochimie ont fait l'objet de doutes par manque de spécificité des anticorps utilisés. Par la suite, la production d'anticorps spécifiques et sélectifs (Franceschini *et al.* 2006) a permis d'étudier en détail la distribution des cellules exprimant la Kp. Chez les mammifères, deux populations principales de neurones à Kp sont identifiées, l'une dans le noyau arqué (NA) et l'autre, dans l'aire préoptique (AP) (**figure 1**). La localisation précise de cette seconde population varie selon l'espèce. Chez les rongeurs, les neurones à Kp sont distribués dans le noyau antéroventral paraventriculaire et s'étendent caudalement dans le noyau paraventriculaire préoptique en formant un ensemble appelé aire rostrale préoptique du troisième ventricule (RP3V). Chez les primates et la brebis, les neurones à Kp de l'AP sont parsemés et ne longent pas le ventricule (Lehman *et al.* 2010b). La population de neurones à Kp de l'AP montre un dimorphisme sexuel prononcé chez toutes les espèces de mammifères étudiées avec une population beaucoup plus importante chez la femelle que chez le mâle. La situation du NA est moins claire. Dans le NA des rongeurs, certains auteurs n'observent pas de différence dans le nombre de cellules entre mâles et femelles (Clarkson & Herbison, 2006 ; Smith *et al.* 2006 ; Ansel *et al.*, 2010) contrairement à d'autres (Iijima *et al.* 2011 ; Desrozières *et al.* 2012b). Chez les ovins, les neurones à Kp sont plus abondants chez la brebis que chez le bélier (Cheng *et al.* 2010). Les

neurones des deux populations expriment les récepteurs pour les hormones stéroïdes sexuelles. Ces stéroïdes influencent l'expression de la Kp, provoquant en général un effet stimulateur sur les neurones de l'AP mais inhibiteur sur ceux du NA ; des exceptions existent toutefois à ce modèle communément admis. La fluctuation de l'état hormonal complique donc l'interprétation des résultats et la comparaison entre sexes.

Si les populations du NA et de l'AP sont différentes par leur localisation anatomique, elles le sont aussi par leur contenu en neurotransmetteurs. La majorité des neurones à Kp du NA co-expriment deux autres neuropeptides : la neurokinine B (NKB) et la dynorphine (Dyn). La NKB a un rôle excitateur et la Dyn, un rôle inhibiteur sur la libération de la LH. L'existence des récepteurs de ces deux neuropeptides sur les neurones à Kp du NA suggère que NKB et Dyn agiraient localement de façon paracrine sur les neurones du NA pour moduler la libération de la Kp (Lehman *et al.* 2010a). Par contre, dans les neurones de l'AP, la Kp co-existe avec la met-enkephaline et la galanine (Porteous *et al.* 2011), deux autres neuropeptides connus pour leur effet sur la fonction gonadotrope. Entre 20 et 50% des neurones à Kp de l'AP et une partie des terminaisons Kp sur les neurones à GnRH co-expriment aussi la tyrosine hydroxylase. L'absence dans cette région de neurones adrénergiques ou noradrénergiques et la présence de neurones dopaminergiques suggère la nature dopaminergique de ces neurones (Kauffman *et al.* 2007 ; Clarkson & Herbison, 2011). L'action inhibitrice de la dopamine pose la question du fonctionnement de ces neurones exprimant deux neurotransmetteurs (Kp et dopamine) ayant un effet opposé sur la sécrétion de la GnRH.

Les données sur la localisation du KISS1R sont extrêmement limitées. Aucun anticorps spécifique du KISS1R n'a jusqu'à présent été validé aussi l'hybridation *in situ* a été principalement utilisée pour analyser son expression dans les neurones

Photo en basse def

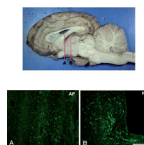


Figure 1 : Illustration de la distribution des deux populations de neurones à Kp dans le diencéphale de la brebis. Les deux barres A et B sur cette vue sagittale d'un cerveau de brebis correspondent aux deux plans de coupes frontales où sont distribués les neurones à Kp dans l'aire préoptique (plan A, cliché de gauche) et dans le noyau arqué (plan B, cliché de droite). Les neurones à Kp sont détectés par immunofluorescence. Barre d'échelle : 105µm

à GnRH. Chez le rat, la présence du récepteur est confirmée sur une large majorité de neurones à GnRH (Irwig *et al.* 2004). La révélation du messager du KISS1R par hybridation *in situ* montre un signal très intense dans différentes zones de l'hypothalamus, de l'hippocampe et de la matière grise périaqueducule (Lee *et al.* 1999). Plus récemment, la cartographie plus précise de la distribution du récepteur, obtenue chez des souris transgéniques Kiss1R-LacZ knock-in, confirme chez la souris des résultats identiques à ceux obtenus par hybridation *in situ* chez le rat (Herbison *et al.* 2010). La fonction des récepteurs exprimés en dehors de l'hypothalamus reste très mal connue car peu étudiée. Pour une revue détaillée sur la distribution de la Kp et de son récepteur chez les mammifères, on se référera à la publication de (Lehman *et al.* 2013).

LA KISSPEPTINE CONTRÔLE-T-ELLE LA PULSATILITÉ DES NEURONES À GNRH ?

Une libération pulsatile appropriée des gonadotrophines est essentielle pour la reproduction. Les mécanismes qui la contrôlent ont fait l'objet de nombreuses recherches mais, pour le moment, il manque toujours une hypothèse unificatrice prenant en compte tous les résultats obtenus. Plusieurs données expérimentales suggèrent que la Kp joue un rôle dans la sécrétion pulsatile de la GnRH. Par exemple chez la chèvre, l'activité électrique pulsatile enregistrée dans le NA, siège d'une population de neurones à Kp, est corrélée à la libération pulsatile de GnRH et de Kp dans le sang du système porte et à celle de LH dans le sang périphérique (Wakabayashi *et al.* 2010). Suite au développement de souris transgéniques chez lesquelles le promoteur du gène Kp dirige l'expression d'une protéine de fusion comprenant la GFP (*Green Fluorescent Protein* ou protéine fluorescente verte), il a été possible d'identifier les neurones à Kp grâce à ce marquage et d'étudier leurs propriétés biophysiques sur des coupes d'hypothalamus contenant le NA. Ces neurones montrent en général une activité spontanée et présentent les propriétés électrophysiologiques des autres neurones du système nerveux central du type *pacemaker* (Gottsch *et al.* 2011). Des rats mâles et femelles invalidés pour la Kp montrent une absence complète de pulsativité de la LH. Chez les femelles, on n'observe pas de pic préovulatoire de LH spontané ou induit par les œstrogènes, (Uenoyama *et al.* 2015). Chez la ratte ovariectomisée, l'injection intracérébro-ventriculaire d'un antagoniste de la Kp (peptide 234) réduit la fréquence des pulses de LH (Li *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent que la Kp est essentielle aussi bien pour la sécrétion pulsatile de la GnRH que pour l'induction du pic préovulatoire.

Reste ouverte la question concernant le rôle de la Kp : est-il simplement de permettre l'expression d'une sécrétion pulsatile propre aux neurones à GnRH ? Ou est-il à l'origine même de cette pulsativité et en détermine-t-il le profil (pulsatile ou *surge*) ? La réponse à cette question est difficile et les résultats disponibles à présent ne permettent pas de trancher clairement entre ces deux possibilités. Chez des volontaires sains,

l'administration en continu de Kp provoque une augmentation de la fréquence des pulses de la LH (George *et al.* 2011). Chez des patients n'atteignant pas la maturité sexuelle suite à une déficience dans la signalisation du système NKB et à une sécrétion de LH très réduite, la perfusion de Kp restaure partiellement la pulsativité de la LH (Young *et al.* 2013). Enfin chez des femmes atteintes d'aménorrhée hypothalamique, une perfusion de Kp54 augmente la pulsativité de la LH (Jayasena *et al.* 2014b). Ces résultats suggèrent que la Kp permet l'expression d'un rythme endogène de sécrétion intrinsèque des neurones à GnRH.

Par contre chez la brebis, l'administration continue de Kp provoque une augmentation importante de la sécrétion de la GnRH et de la LH mais ne s'accompagne pas d'une pulsativité évidente. Une injection aiguë est suivie d'un pulse unique de la GnRH et de la LH (Caraty *et al.* 2013). En opposition avec ce qui précède, ces résultats suggèrent que le profil de sécrétion de la GnRH dépendrait totalement de la modalité de libération de la Kp. D'autres neurotransmetteurs tels que la NKB et la Dyn ont aussi été mis en cause dans la genèse de la sécrétion pulsatile des gonadotrophines mais les résultats disponibles suggèrent que leur effet est transmis par les neurones à Kp du NA et donc par la Kp (Goodman *et al.* 2013). Au-delà de la difficulté à répondre à la question posée plus haut, il apparaît évident, à l'analyse de l'ensemble de ces résultats, que le système de neurones à Kp joue un rôle très important dans la détermination du type de modalité sécrétoire exprimée par les neurones à la GnRH (**figure 2**).

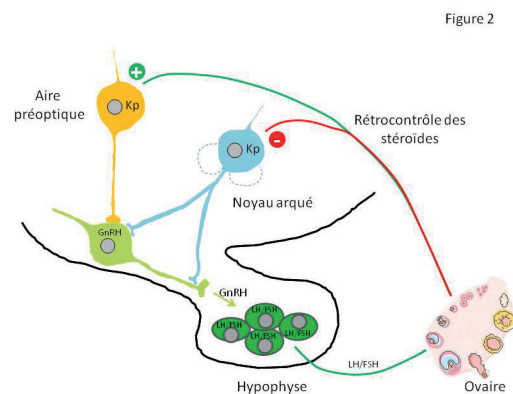


Figure 2 : Schéma de la régulation de la sécrétion de la GnRH chez la femelle. Les deux populations des neurones à Kp de l'aire préoptique et du noyau arqué projettent sur les neurones et terminaisons à GnRH. La libération de la Kp par ces projections axonales induit la sécrétion de la GnRH. La GnRH libérée dans le sang porte atteint l'hypophyse et déclenche la sécrétion des gonadotrophines (LH et FSH). La LH et la FSH activent l'ovaire qui à son tour produit et sécrète les hormones stéroïdiennes dont l'œstradiol. Chez les rongeurs, ce dernier exerce un rétrocontrôle sur l'activité des cellules à Kp qui est négatif sur les neurones du noyau arqué et positif sur ceux de l'aire préoptique. Les neurones à Kp du noyau arqué sont aussi soumis à un rétrocontrôle local négatif, mis en œuvre par la dynorphine, et positif, induit par la neurokinine B, indiqués dans le schéma par les traits en pointillés. L'ensemble de ces différents mécanismes permet de réguler finement la libération de la GnRH pour induire soit une sécrétion pulsatile, soit un pic préovulatoire.

LA KISSEPTINE ET LE DÉCLENCHEMENT DE LA PUBERTÉ

Les mécanismes qui contrôlent le déclenchement de la puberté et les changements physiologiques associés sont différents selon les espèces et restent à ce jour mal caractérisés. Chez les mammifères, le seul élément commun à toutes les espèces est l'augmentation importante de l'activité pulsatile de sécrétion de la GnRH par des neurones qui sont quiescents jusqu'à la puberté. La sécrétion pulsatile de la GnRH entraîne une sécrétion de la LH et FSH qui servent d'activateurs de la maturation des gonades. Il n'est pas surprenant que la Kp, par son action stimulatrice très forte sur la sécrétion de la GnRH, soit impliquée dans le déclenchement de la puberté.

Aspects cliniques en médecine humaine

Rappelons que la découverte même du rôle de la Kp dans la reproduction est liée à son effet sur la puberté. Les patients atteints par l'hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique ne montrent pas de développement pubertaire. Dans environ 2% des cas, (Bianco & Kaiser, 2009), cette anomalie est associée à des mutations ou à une délétion partielle du récepteur KISS1R (de Roux *et al.* 2003 ; Seminara *et al.* 2003). Les tests réalisés sur des cellules transfectées avec les récepteurs mutés montrent un déficit de l'activation des voies de signalisation intracellulaire (Seminara *et al.* 2003). Cette signalisation défectueuse est suggérée comme étant à l'origine de l'absence de développement pubertaire chez ces 2% de patients. À l'inverse, un cas de puberté précoce est rapporté chez un patient porteur d'une mutation activant le KISS1R (Teles *et al.* 2008),

Aspects expérimentaux chez l'animal

Chez les rongeurs, l'inactivation du gène KISS1R provoque dans les deux sexes une réduction très importante de la taille des gonades et des organes sexuels associés, aboutissant à la stérilité (Seminara *et al.* 2003). Les femelles n'ont pas de cycle ovarien et chez les mâles la spermatogénèse est absente, les organes sexuels sont de taille très réduite et les animaux restent impubères. Ces animaux ne montrent pas de déficience de la migration des neurones à GnRH (Messenger *et al.* 2005) ni de déficit dans la production et/ou la sécrétion des gonadotrophines (Seminara *et al.* 2003), ce qui montre bien que le déficit porte sur l'étape en amont du système GnRH.

Le système kisspeptine au cours du développement

L'analyse de l'expression de la Kp et du KISS1R au cours du développement fournit des éléments précieux, même s'ils sont indirects, pour comprendre l'implication de ce système dans le déclenchement de la puberté. Dans le NA du rat, la présence de Kp est détectable, chez le fœtus, par immunohistochimie à partir de E14.5. Le nombre de cellules immunoréactives augmente pour atteindre un maximum à E18.5 et par la suite, diminue jusqu'à la naissance. Ce profil d'expression n'est pas

différent entre mâles et femelles (Desroziers *et al.* 2012a), mais une différence sexuelle de l'expression de la Kp se met graduellement en place après la naissance. À partir du 7^{ème} jour post-natal, l'intensité du marquage dans le NA devient beaucoup plus importante chez les femelles et cette différence augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte (Iijima *et al.* 2011 ; Desroziers *et al.* 2012b). Par ailleurs, l'expression des ARN messagers de la Kp et de son récepteur présentent un pic lors de la période péri-pubertaire chez le rat, respectivement à 30 et 45 jours chez la femelle et le mâle (Navarro *et al.* 2004a).

Au plan fonctionnel, chez la souris, le nombre des neurones à GnRH activés par la Kp augmente progressivement de 27% à 90% lors du développement post-natal (Han *et al.* 2005). Les premières connexions identifiables par immunohistochimie entre fibres qui contiennent la Kp et les neurones à GnRH apparaissent autour du 25^{ème} jour post-natal et elles augmentent rapidement dans les jours suivants, période qui coïncide chez les souris femelles avec l'ouverture vaginale et le premier cycle œstrien (Clarkson & Herbison, 2006). Ces résultats suggèrent un lien entre l'augmentation du nombre d'appositions et la faculté des neurones à GnRH à répondre à la stimulation par la Kp. Néanmoins chez cette espèce, l'expression du gène du récepteur ne semble pas s'accroître au cours de cette période (Han *et al.* 2005). Les changements concomitants de l'intensité de l'activité des neurones produisant la Kp et de l'activité du récepteur pourraient être, chez la souris, à l'origine de l'activation des neurones à GnRH induite par la Kp. Par contre, chez la femelle macaque (*Macaca mulatta*), l'expression de l'ARN messager de la Kp et celle de son récepteur augmentent pendant la puberté (Shahab *et al.* 2005). Malgré de possibles différences entre espèces, le cadre général montre bien que le système à Kp subit un remaniement important concomitant avec le début de la puberté.

Effets des injections de Kp

Une preuve directe du rôle stimulateur de la Kp dans la période critique pré-pubère est obtenue par l'infusion ou l'injection de Kp10 chez différentes espèces (rat, macaque et brebis). Chez la ratte, une perfusion de Kp provoque l'activation de l'axe gonadotrope avec une ouverture vaginale précoce et une augmentation des concentrations de la LH et des œstrogènes dans le sang (Navarro *et al.* 2004b). Chez le jeune macaque mâle castré, l'injection de Kp induit aussi l'augmentation des taux plasmatiques de la LH (Shahab *et al.* 2005). Chez des agnelles, l'injection répétée de Kp entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de la LH et de sa pulsativité, puis déclenche un pic de sécrétion de LH suivi par une augmentation, quoique transitoire, de la progestérone plasmatique issue d'un corps jaune dégénérant après 2-3 jours (Redmond *et al.* 2011).

Influence des stéroïdes sexuels

Les œstrogènes agissent sur les deux populations principales de neurones exprimant la Kp. Des expériences d'ovariecto-

mie montrent que l'absence d'œstrogènes est associée à une diminution du nombre de neurones exprimant la Kp dans l'AP et que l'administration d'œstradiol 17 β bloque cet effet (Clarkson *et al.* 2009). La situation est moins claire dans le NA des femelles ovariectomisées qui présentent soit une augmentation de la synthèse de Kp (Kauffman *et al.* 2009 ; Takase *et al.* 2009), soit une diminution (Clarkson *et al.* 2009). Chez les souris dont le gène codant l'aromatase est invalidé et qui sont incapables de synthétiser les œstrogènes, la Kp n'est pas détectée par immunohistochimie dans les neurones de l'AP mais elle est toujours clairement observable dans le NA même si elle est réduite (Clarkson *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent une influence stimulatrice très marquée des œstrogènes sur l'expression de la Kp dans l'AP au cours du développement et de la puberté et un rôle non-essentiel des œstrogènes sur son expression dans le NA.

En conclusion, la Kp exerce son effet sur le déclenchement de la puberté chez les espèces modèles étudiées jusqu'à maintenant: l'augmentation de sa synthèse est concomitante de la mise en place de contacts synaptiques spécifiques sur les neurones à GnRH. En parallèle, le récepteur KISS1R deviendrait plus sensible à la Kp soit par suite de modifications post-traductionnelles soit par un changement dans les voies de signalisation. Ces adaptations participeraient à l'activation de la sécrétion pulsatile de la GnRH amorçant la transition pubertaire.

LA KISSPEPTINE ET L'OVULATION

Deux modalités de libération de la GnRH et deux populations de neurones à kisspeptine

Les modalités de libération de la GnRH diffèrent selon le sexe. Chez la femelle, il existe une sécrétion pulsatile basale (avec une libération régulière de LH en petite quantité) et une libération massive, appelée *surge*, responsable de l'ovulation. Chez le mâle, cette seconde modalité n'existe pas. La fonction des deux populations neuronales qui expriment la Kp dans le contrôle de ces modes différents de libération de la GnRH est au cœur d'un débat scientifique animé. Dans l'AP, les neurones qui expriment la Kp sont beaucoup plus nombreux chez la souris femelle que chez le mâle. Un plus grand nombre de neurones GnRH de l'AP reçoivent des contacts synaptiques de terminaisons axonales contenant la Kp. Le nombre de ces neurones est significativement corrélé à la densité de ces contacts synaptiques sur les corps cellulaires et à celle des arborisations dendritique des neurones à GnRH. Le traçage rétrograde et antérograde et le marquage par immunocytochimie montrent l'existence, dans l'éminence médiane, d'axones à Kp provenant du NA. La libération de la Kp par ces fibres provoque celle de la GnRH contenue dans les terminaisons axonales des neurones à GnRH qui se projettent dans la zone externe de l'éminence médiane. Elle est démontrée par la libération de la GnRH provoquée par la stimulation, par la Kp, de tranches d'hypothalamus médio-basal qui ne contiennent pas de neurones à

GnRH (d'Anglemont de Tassigny *et al.* 2008).

Ces données morpho-fonctionnelles suggèrent que l'AP pourrait être le siège de l'activité qui déclenche l'ovulation. Les neurones à Kp de l'AP, en stimulant les neurones à GnRH assurent la libération massive de GnRH, provoquant son pic préovulatoire. Les neurones du NA seraient, par contre, responsables de la pulsativité de base en agissant uniquement sur les terminaisons axonales des neurones à GnRH dans l'éminence médiane.

Effets des perfusions de la kisspeptine selon les espèces

L'influence directe de la Kp dans l'induction de l'ovulation est montrée chez la brebis. En période d'anoestrus saisonnier, la perfusion de la Kp peut induire une ovulation mais des durées de perfusion trop courtes, de six à 12 heures, sont très peu ou pas efficaces tandis que des perfusions de 24 à 48 heures induisent l'ovulation chez environ 75% des brebis (Sebert *et al.* 2010). En saison de reproduction, la perfusion de Kp permet la synchronisation des ovulations chez un groupe de brebis traitées par la progestérone par une synchronisation des de la GnRH et donc celle des pics préovulatoires de la LH (Caraty *et al.* 2007). Chez la jument, même si la Kp stimule la sécrétion de la LH à différents moments du cycle ovulatoire lors de la saison de reproduction ou pendant l'anoestrus saisonnier, elle ne provoque ni l'avancée de l'ovulation dans le premier cas, ni son induction dans le second (Magee *et al.* 2009; Decourt *et al.* 2014). Plusieurs causes peuvent être évoquées : la spécificité physiologique de la régulation de l'ovulation chez la jument, la désensibilisation du récepteur GnRH ou du KISS1R, la neuroanatomie du système porte-hypophysaire du cheval, etc. Aucune des hypothèses avancées n'est soutenue par des preuves expérimentales. Néanmoins les résultats invitent à la prudence et nous enjoignent à éviter de les généraliser à des femelles de différentes espèces, à partir des effets démontrés de la Kp chez des femelles d'une seule et même espèce.

Kisspeptine et ovaire

Lors de l'ovulation, la Kp jouerait non seulement un rôle au niveau hypothalamique, mais aussi dans l'ovaire. Les ARNm de la Kp et de son récepteur ont été détectés dans l'ovaire chez plusieurs espèces (Castellano *et al.* 2006 ; Gaytan *et al.* 2009 ; Shahed & Young, 2009). Ceci suggère l'existence d'un système local à Kp capable d'un contrôle direct de l'activité de l'ovaire. Le niveau d'expression de l'ARN messager de la Kp change pendant le cycle œstrien chez la ratte et est nettement accru pendant la phase préovulatoire. Cette augmentation fait défaut si le pic préovulatoire des gonadotrophines est bloqué mais elle est induite par un traitement avec la chorio-gonadotrophine humaine (hCG), un agoniste du récepteur de la LH (Castellano *et al.* 2006).

L'utilisation d'animaux invalidés ou hétérozygotes pour le KISS1R a aussi révélé l'importance de la signalisation du système Kp dans l'ovaire. Les souris hétérozygotes montrent,

sans diminution des gonadotrophines circulantes, un déclin prématuré du taux d'ovulation et une perte progressive des follicules conduisant à des ovaires atrophiques qui ne montrent plus de follicules en croissance ni de corps jaunes. Ce résultat est associé à une réduction de l'expression de l'ARNm du KISS1R dans l'ovaire. L'absence complète du KISS1R bloque la maturation folliculaire et l'ovulation. Les souris homozygotes *-/-* ne répondent pas à un traitement standard d'amorçage par les gonadotrophines PMSG (*pregnant mare's serum gonadotrophin*) et hCG (*human chorionic gonadotrophin*). De plus, une semaine de stimulation par la GnRH associée à un traitement par PMSG et hCG induit un taux d'ovulation inférieur de moitié à celui observé chez des souris immatures soumises au même traitement (Gaytan *et al.* 2014). L'hypothèse a été émise que sous l'influence des gonadotrophines, la Kp et le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) produits par les cellules de la granulosa agiraient ensemble pour promouvoir la survie des oocytes (Dorfman *et al.* 2014).

UTILISATIONS POTENTIELLES DE LA MODULATION PHARMACOLOGIQUE DU SYSTEME KISSPEPTINE

Les résultats accumulés au fil des années mettent clairement en évidence l'intérêt du système à Kp comme cible thérapeutique pour mettre au point de nouveaux traitements de maladies de la reproduction (tableau 2) mais aussi pour mieux maîtriser la reproduction chez l'homme et les animaux d'élevage (tableaux 2 et 3).

Pathologie ou traitement	Type de substance
PMA (procréation médicale assistée)	Agoniste
Contraception	Antagoniste
Puberté retardée	Agoniste
Puberté précoce	Antagoniste
Maladies liées à l'hypogonadisme hypogonadotrope (par exemple aménorrhée hypothalamique, mutation génétique, etc)	Agoniste
Cancers hormono-dépendants (exemple cancer de la prostate)	Antagoniste/Agoniste (désensibilisation)

Tableau 2 : Possibles applications thérapeutiques des ligands du récepteur KISS1R.

	Application	Espèce cible	Type de substance
Animaux domestiques	Reproduction en contre-saison	Brebis et chèvre Cerf (<i>Cervus elaphus</i>)	Agoniste
	Synchronisation de l'ovulation	Brebis et chèvre	Agoniste
	Stimulation des mâles	Ruminants	Agoniste
	Maîtrise de l'ovulation	Bovins	Agoniste
	Castration	Porc, chien et chat	Antagoniste/ Agoniste (désensibilisation)
Animaux sauvages en captivité	Stimulation de la reproduction	Espèces et sous-espèces en voie de disparition (par exemple les cervidés)	Agoniste
	Inhibition du rut	Espèces dangereuses pendant la saison du rut (par exemple éléphant)	Antagoniste

Tableau 3 : Possibles applications vétérinaires des ligands du KISS1R chez les mammifères.

Applications thérapeutiques en médecine humaine

Le potentiel de la Kp est en cours d'évaluation clinique dans le traitement de différentes formes d'hypogonadisme hypogonadotrope et dans un protocole d'induction de l'ovulation pour la procréation médicale assistée (PMA). L'aménorrhée hypothalamique est une forme d'hypogonadisme hypogonadotrope caractérisée par une absence de menstruation souvent associée à une importante perte de poids, à l'anorexie, à un entraînement sportif excessif ou au stress. L'absence de menstruation est le résultat d'une forte réduction de la sécrétion de la GnRH et de sa pulsatilité et par conséquent, de la sécrétion de la LH et de la FSH. L'administration répétée de la forme Kp54 chez des patientes atteintes d'aménorrhée hypothalamique induit une augmentation de la sécrétion de LH et FSH. Un traitement deux fois par jour induit cependant une diminution rapide de la réponse à la Kp (Jayasena *et al.* 2009), moins marquée si la fréquence des injections est ramenée à deux par semaine (Jayasena *et al.* 2010). Une perfusion de Kp54 pendant huit heures à des concentrations données (0,3-1 nmoles/kg/heure) augmente la pulsatilité et la sécrétion totale de LH sans désensibilisation du système (Jayasena *et al.* 2014b). Les résultats obtenus sont encourageants mais des études ultérieures sont nécessaires pour montrer qu'il est possible non seulement d'augmenter la sécrétion des gonadotrophines mais aussi d'induire une reprise du cycle menstruel.

D'autres formes d'hypogonadisme hypogonadotrope sont liées à des mutations génétiques. Ces mutations peuvent invalider l'activité du récepteur de la Kp, celle du récepteur de la NKB (TAC3R) ou de la NKB. En fonction de la mutation et du patient, les porteurs de telles mutations montrent une forte réduction, voire une absence de la sécrétion pulsatile des gonadotrophines. L'administration en continu pendant 12 heures de la Kp à ces patients restaure une sécrétion pulsatile de la LH (Young et al. 2013). Dans ces deux types de troubles d'origine génétique, il apparaît nécessaire, pour obtenir une reprise de la pulsatilité, d'induire une stimulation prolongée du système Kp. Dans cette perspective, le développement d'agonistes de la Kp, capables après une seule injection d'activer de façon prolongée le KISS1R, serait une avancée importante en thérapeutique.

Le domaine où l'utilisation de la Kp a progressé le plus rapidement est celui de la PMA. On fait appel à la Kp54 pour induire la maturation des ovocytes après un protocole de stimulation ovarienne. Après fécondation et implantation du blastocyste, des grossesses et des naissances sont obtenues. (Jayasena et al. 2014a). Des études ultérieures seront nécessaires pour démontrer l'efficacité supérieure de la Kp par rapport au traitement actuellement utilisé.

Chez les animaux

Plusieurs applications dérivées de l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes de la Kp sont aussi envisageables chez les animaux (**tableau 3**). La maîtrise de la reproduction chez les animaux de rente est un point central dans la gestion des élevages. Pour différentes raisons économiques et sociétales, les méthodes actuellement disponibles ne répondent pas de façon satisfaisante aux attentes des producteurs (efficacité et rentabilité) et des consommateurs (contaminants dans les produits consommés et pollution de l'environnement). Le développement d'agonistes de la Kp pourrait aider à résoudre au moins en partie ces problèmes en améliorant par exemple l'efficacité de l'insémination artificielle grâce à une meilleure synchronisation de l'ovulation et en réduisant l'utilisation d'hormones exogènes. Les résultats obtenus dans le contrôle de l'ovulation décrits plus haut sont très prometteurs et le développement en cours d'agonistes du KISS1R avec un meilleur profil pharmacologique (longue durée d'action et absence de

désensibilisation) (Beltramo et al. 2014) permettra de confirmer la faisabilité de cette approche.

Comme indiqué dans le **tableau 3**, d'autres applications sont aussi possibles mais nous n'avons pas actuellement de résultats publiés concernant la mise au point de substances ciblant le système à Kp pour ces applications vétérinaires. Le **tableau 3** est basé sur des déductions s'appuyant sur les connaissances actuelles du système à Kp. En fonction de l'application, les agonistes à développer devront avoir un profil pharmacologique spécifique. Par exemple pour la castration, un agoniste capable d'induire une désensibilisation importante du récepteur KISS1R est nécessaire de façon à réduire rapidement l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Par contre pour l'induction de l'ovulation, un agoniste qui ne désensibilise pas le récepteur, permettant ainsi la stimulation prolongée du système gonadotrope et sa réactivation en période de repos sexuel, sera un atout majeur. Dans le cas de la castration, l'utilisation d'un antagoniste capable de bloquer l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique pourrait être aussi envisagée afin de réduire les taux sanguin des gonadotrophines et des hormones sexuelles. Actuellement deux antagonistes ont été décrits dans la littérature (Roseweir et al. 2009 ; Kobayashi et al. 2010) mais aucune donnée n'a été publiée sur leur possible utilisation pour induire une castration chez des animaux d'élevage. Énormément de travail existe encore à accomplir dans ce domaine pour d'une part, démontrer l'efficacité des traitements basés sur la modulation du système Kp et d'autre part, développer les molécules adaptées à chaque application.

CONCLUSIONS

La découverte de l'importance du système à Kp dans la physiologie de la reproduction a ouvert la porte à une nouvelle ère d'études sur la régulation centrale de cette fonction. Les progrès rapides dans le domaine et ont permis d'accroître énormément nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'activité de coordination de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique par le système nerveux central. Néanmoins, de nombreuses questions restent ouvertes et les prochaines années s'annoncent riches d'intenses et enthousiasmantes recherches sur le sujet.

BIBLIOGRAPHIE

- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A.H., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 2010; 25: 81-91.
- Beltramo, M., Aucagne, V., Robert, V., Galibert, M., Madinier, J.-B., Marceau, P. *et al.* Design and profiling of new selective KISS1R agonists that stimulate the reproductive system. In *Proceeding of the 8th International Congress of Neuroendocrinology*, Sydney 17-20 August 2014.
- Bianco D & Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol.* 2009; 5: 569-76.
- Caraty A, Lomet D, Me S, Guillaume D, Beltramo M, Evans NP. GnRH 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. *J Neuroendocrinol.* 2013; 25(6):537-46.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cagnie J *et al.* Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 2007; 148:5258-67.
- Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C *et al.* Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 2006; 147:4852-62.
- Cheng, G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 2010;151: 301-11.
- Clarkson J & Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147:5817-25.
- Clarkson J & Herbison AE. Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol.* 2011; 23:293-301.
- Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 2009;150: 3214-20.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 2008; 149:3926-32.
- 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.
- Decourt C, Caraty A, Briant C, Guillaume D, Lomet D, Chesneau D *et al.* Acute injection and chronic perfusion of kisspeptin elicit gonadotropins release but fail to trigger ovulation in the mare. *Biol. Reprod.* 2014; 90: 36.
- Desroziers E, Droguerre M, Bentsen AH, Robert V, Mikkelsen JD, Caraty A *et al.* Embryonic development of kisspeptin neurones in rat. *J Neuroendocrinol.* 2012a ; 24: 1284-95.
- Desroziers E, Mikkelsen JD, Duittoz A, Franceschini I. Kisspeptin-immunoreactivity changes in a sex- and hypothalamic-region-specific manner across rat postnatal development. *J Neuroendocrinol.* 2012b; 24: 1154-65.
- Dorfman MD, Garcia-Rudaz C, Alderman Z, Kerr B, Lomniczi A, Dissen GA *et al.* Loss of Ntrk2/Kiss1r signaling in oocytes causes premature ovarian failure. *Endocrinology* 2014; 155: 3098-111.
- 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: 225-0.
- Gaytan, F, Garcia-Galiano D, Dorfman MD, Manfredi-Lozano M, Castellano JM, Dissen GA *et al.* Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2014;155: 3088-97.
- Gaytan F, Gaytan M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B *et al.* KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296, E520-31.
- George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, Newton CL, Faccenda E, Millar RP, Anderson RA. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 2011; 96: E1228-36.
- Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL *et al.* Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology* 2013; 154: 4259-69.
- Gottsch ML, Popa SM, Lawhorn JK, Qiu J, Tonsfeldt KJ, Bosch MA *et al.* Molecular properties of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *Endocrinology* 2011; 152: 4298-309.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT *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.
- Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 312-21.
- Iijima N, Takumi K, Sawai N, Ozawa H. An immunohistochemical study on the expression dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody. *J Mol Neurosci.* 2011; 43:146-54.
- 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, Abbara A, Comninou AN, Nijher GM, Christopoulos G, Narayanaswamy S *et al.* Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *The Journal of clinical investigation* 2014a ; 124: 3667-77.
- Jayasena CN, Abbara A, Veldhuis JD, Comninou AN, Ratnasabapathy R, De Silva A *et al.* Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of Kisspeptin-54. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 2014b; 99: E953-61.
- 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 amenorrhoea. *Clin Pharmacol Ther.* 2010; 88: 840-47.
- Jayasena CN, Nijher GM, Chaudhri OB, Murphy K, Ranger A, Lim A *et al.* Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhoea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 2009; 94: 4315-23.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK *et al.* Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007; 148: 1774-83.
- Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton DK, Steiner RA. Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty. *Am. J Phys. Endocrinology and metabolism* 2009; 297: E1212-21.
- Kobayashi, T., Sasaki, S., Tomita, N., Fukui, S., Nakayama, M., Kiba, A. *et al.* 2-acylami-

no-4,6-diphenylpyridine derivatives as novel GPR54 antagonists with good brain exposure and in vivo efficacy for plasma LH level in male rats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010;18: 5157-5171.

- Kotani M, Detheux M, Vandenberghe 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.

- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 1999; 446: 103-07.

- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88:1731-7.

- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010a;151: 3479-89.

- Lehman MN, Hileman SM, Goodman RL. Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Advances in experimental medicine and biology* 2013; 784: 27-62.

- Lehman MN, Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 2010b; 1364: 90-102.

- Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA *et al.* Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* 2009; 4, e8334.

- Magee C, Foradori CD, Bruemmer JE, Arreguin-Arevalo JA, McCue PM, Handa RJ *et al.* Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology* 2009; 150: 2813-21.

- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1761-6.

- Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-

Criado JE *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004a; 145: 4565-74.

- Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro M *et al.* Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol.* 2004b; 561: 379-86.

- 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.

- Pasquier J, Lafont AG, Rousseau K, Querat B, Chemineau P, Dufour S. Looking for the bird Kiss: evolutionary scenario in sauropsids. *BMC Evol Biol.* 2014; 14:30.

- Pasquier J, Lafont AG, Tostivint H, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S. Comparative evolutionary histories of kisspeptins and kisspeptin receptors in vertebrates reveal both parallel and divergent features. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 173.

- 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. *J Comp Neurol* 2011; 519: 3456-69.

- Redmond JS, Macedo GG, Velez IC, Caraty A, Williams GL, Amstalden M. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 2011; 141, 541-48.

- Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J *et al.* Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J. Neurosci.* 2009; 29: 3920-9.

- 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, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr., Shagoury JK *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N*

Engl J Med. 2003; 349: 1614-27.

- Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2129-134.

- Shahaed A & Young KA. Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Mol. Reprod. Dev.* 2009; 76: 444-52.

- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neurosci.* 2006; 26: 6687-694.

- Takase K, Uenoyama Y, Inoue N, Matsui H, Yamada S, Shimizu M *et al.* Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J. Neuroendocrinol.* 2009; 21, 527-537.

- Tang H, Liu Y, Luo D, Ogawa S, Yin Y, Li S *et al.* The kiss/kissr systems are dispensable for zebrafish reproduction: evidence from gene knockout studies. *Endocrinology* 2014; en20141204.

- Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S *et al.* S A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008; 358: 709-15.

- Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C *et al.* Lack of Pulse and Surge Modes and Glutamatergic Stimulation of LH Release in Kiss1 Knockout Rats. *J. Neuroendocrinol.* 2015 Jan 13. doi: 10.1111/jne.12257

- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K., Navarro VM *et al.* 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.* 2010; 30: 3124-32.

- Young, J, George JT, Tello JA, Francou B, Bouligand J, Guiochon-Mantel A *et al.* Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology* 2013; 97:193-202.